



**Detección molecular del Virus de la Leucosis Bovina, genotipos circulantes
y factores asociados en trabajadores de hatos lecheros del departamento de
Antioquia, Colombia, 2021**

Molecular detection of Bovine Leukemia Virus, circulating genotypes and
associated factors in dairy herd workers from the department of Antioquia, Colombia,
2021

Willinton Leandro Mendoza Uribe

Trabajo de investigación para optar al título de Magister en Microbiología

Tutora:

Lina Andrea Gutiérrez Builes. Bact, PhD

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Maestría en Microbiología
Medellín- Colombia

2024

Cita	Mendoza Uribe W (1)
Referencia	(1) Mendoza Uribe W. Detección molecular del Virus de la Leucosis Bovina, genotipos circulantes y factores asociados en trabajadores de hatos lecheros del departamento de Antioquia, Colombia, 2021 [Tesis de maestría]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2024.
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Maestría en Microbiología, Cohorte XI.
 Grupo de investigación Biología de Sistemas
 Universidad Pontificia Bolivariana



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedico esta tesis a todas las personas que me han apoyado incondicionalmente a lo largo de este viaje académico. Que han contribuido a mi crecimiento personal, enseñándome valiosas lecciones de vida. Su influencia ha sido crucial no solo para mi desarrollo académico, sino también para mi desarrollo como individuo.

Finalmente, a mí mismo por mantener la perseverancia y la determinación.

Tabla de contenido

1. Introducción	12
1.1 Características Virales	15
1.1.1 <i>Clasificación, Genoma Viral Y Estructura</i>	15
1.1.2 <i>Tropismo Viral, Ciclo Replicativo Y Respuesta Inmune</i>	18
1.1.3 <i>Presentación Clínica, Transmisión Y Epidemiología</i>	22
1.1.4 <i>Clasificación Filogenética</i>	26
1.2 BLV En Humanos	27
2. Objetivos	30
2.1 Objetivo General	30
2.2 Objetivos Específicos	31
3. Metodología	31
3.1 Diseño Del Estudio	31
3.2 Detección Molecular Del Virus De La Leucosis Bovina	34
3.3 Plan De Análisis De Datos	38
3.3.1 <i>Análisis Molecular Basado En Secuencias De ADN</i>	38
3.3.2 <i>Análisis De Filogenia Molecular Para La Identificación Del Genotipo De Blv Circulante</i>	38
3.3.3 <i>Sustituciones aminoacídicas en la proteína gp51 del BLV aisladas en humanos</i>	40
3.3.4 <i>Análisis Estadístico Descriptivo E Inferencial De Factores Asociados A La Detección Molecular Del BLV</i>	40
4. Resultados	41
4.1 Características Sociodemográficas De La Población De Estudio	41
4.2 Detección Molecular Del BLV Mediante La Amplificación Por PCR De Los Genes <i>env</i> Y <i>tax</i>	48
4.3 Análisis De Las Secuencias De ADN Obtenidas E Identificación De Los Genotipos Del BLV	49
4.4 Análisis De Las Secuencias Aminoacídicas De La Proteína Gp51 Del BLV Traducidas A Partir De Las Secuencias De ADN De Este Estudio	55

4. Análisis De Factores Asociados Con La Detección Molecular Del BLV	57
5. Discusión	62
6. Conclusiones Y Perspectivas De Investigación	70
7. Datos Disponibles	72
8. Limitaciones	72
9. Agradecimientos	73
10. Financiamiento	73
11. Referencias	74
12. Anexos	88

Lista de tablas

Tabla 1. Lista de primers para la identificación molecular del Virus de la Leucosis Bovina	37
Tabla 2. Descripción de las características epidemiológicas, ambientales y clínicas	43
Tabla 3. Información de las secuencias obtenidas en este estudio y del análisis Megablast	49
Tabla 4. Análisis bivariado	57
Tabla 5. Análisis multivariado	61

Lista de figuras

Figura 1. Estructura del genoma del BLV	16
Figura 2. Morfología de la partícula viral del BLV	18
Figura 3. Ciclo replicativo del BLV	22
Figura 4. Vías de transmisión del BLV	24
Figura 5. Ubicación geográfica de los hatos lecheros, lugar de captación y origen de la población incluida en este estudio	32
Figura 6. Árbol filogenético inferido a partir de un dataset de nucleótidos del gen <i>env</i>	52
Figura 7. Red de haplotipos del BLV obtenida a partir del alineamiento múltiple del conjunto de datos	53
Figura 8. Sustituciones aminoacídicas en la proteína gp51 del BLV	56

Resumen

El Virus de la Leucosis Bovina (BLV) afecta principalmente bovinos, se transmite por exposición a fluidos biológicos contaminados y genera linfomas en el 5% de los animales infectados. El potencial zoonótico del BLV ha sido estudiado y actualmente se desconoce si circula en humanos trabajadores de hatos lecheros de Antioquia. Objetivo: determinar la frecuencia del BLV, los genotipos circulantes del virus y los factores asociados a su circulación en trabajadores de hatos lecheros de Antioquia, Colombia. Mediante un estudio transversal, en 51 hatos lecheros, se captaron 164 personas mayores de edad. De cada participante, se recolectó una muestra de sangre periférica para la detección molecular de los genes *env* y *tax* del BLV y mediante análisis bivariados y multivariados Mixtos de Poisson se exploraron los factores asociados. El 83,4% (134/164) de los participantes fueron hombres, edad media de 40 años. Mediante qPCR se amplificó el gen constitutivo GAPDH para evaluar la presencia de inhibidores de la amplificación en las muestras de ADN. Usando PCR anidada se obtuvo amplificación del gen viral *env*, en el 13% (22/164) del total de muestras analizadas. Los amplicones del gen *env* se secuenciaron y por análisis BLAST (NCBI) se verificó la identidad compatible con BLV. Usando análisis de filogenia molecular, basado en máxima verosimilitud, y análisis de red de haplotipos, se identificó que el genotipo 1 del BLV está presente en la población evaluada. El 16% (26/164) de los participantes reportó haber tenido accidente con material quirúrgico durante el trabajo con los bovinos, esta variable se asoció con la positividad a BLV (RPa= 2.696, IC 95%= 1.01- 7.21). Considerando que otros estudios han reportado la circulación del genotipo 1 del BLV en bovinos de esta misma región y el presente reporte en humanos de hatos lecheros, los resultados sugieren una posible transmisión zoonótica del BLV genotipo 1 en Antioquia, reforzando la necesidad de seguir investigando para determinar el papel potencial de este virus como agente etiológico de enfermedad en los ganaderos del departamento.

Palabras clave: Zoonosis, Virus de la Leucosis Bovina, ganadería, humanos, genotipos.

Abstract

The Bovine Leukemia Virus (BLV) affects cattle, is transmitted by exposure to contaminated biological fluids, and generates lymphomas in 5% of infected animals. The zoonotic potential of BLV has been studied and it is currently unknown if it circulates in human workers on dairy herds in Antioquia. Objective: determine the frequency of BLV, the circulating genotypes of the virus, and the factors associated with its circulation in dairy herd workers in Antioquia, Colombia. Through a cross-sectional study, in 51 dairy herds, 164 adults were recruited. From each participant, a peripheral blood sample was collected for molecular detection of the BLV *env*, and *tax* genes, and through bivariate and multivariate Mixed Poisson analyses the associated factors were explored. 83.4% (134/164) of the participants were men, average age 40 years. Using qPCR, the constitutive gene GAPDH was amplified to evaluate the presence of amplification inhibitors in the DNA samples. Using nested PCR, amplification of the *env* viral gene was obtained in 13% (22/164) of the total samples analyzed. The amplicons of the *env* gene were sequenced and the identity compatible with BLV was verified by BLAST analysis (NCBI). Using molecular phylogeny analysis, based on maximum likelihood, and haplotype network analysis, it was identified that BLV genotype 1 is present in the evaluated population. 16% (26/164) of the participants reported having ever had an accident with surgical material during work with cattle; this variable was associated with BLV positivity even after adjusting for other variables (2.696, 95% CI= 1.01- 7.21). Considering that other studies have reported the circulation of BLV genotype 1 in cattle from this same region and the present report in humans from dairy herds, together the results suggest a possible zoonotic transmission of BLV genotype 1 in Antioquia, reinforcing the need to continue investigating to determine the potential role of this virus as an etiological agent of disease in livestock farmers in the department.

Keywords: Zoonoses, Bovine Leukemia Virus, livestock, humans, genotypes.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGID: Inmunodifusión en gel de Agar

ARN: Ácido ribonucleico

ARNg: ARN genómico

ATL: Leucemia/Linfoma T del adulto

BLV: Virus de la Leucosis Bovina

dNTPs: Trifosfato de nucleósido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

HTLV: Virus Linfotrópico Humano De Células T

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

LBE: Leucosis bovina enzoótica

LP: Linfocitosis persistente

LTR: Repetición terminal larga (Abr. LTR, del inglés Long Terminal Repeat)

nPCR: PCR anidada

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR en tiempo real

RFLP: Técnica de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

STLV: Virus Linfotrópico T de los Simios

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TTP: Tristetraprolina

USA: Estados Unidos de América

1. Introducción

El Virus de la Leucosis Bovina (BLV) es un retrovirus del género *Deltaretrovirus* que afecta principalmente a los bovinos, causando la enfermedad conocida como leucosis bovina enzoótica (LBE), esta enfermedad se presenta como una infección crónica en el ganado bovino relacionada con linfocitosis persistente y con el posterior desarrollo de leucemias y/o linfomas en los estadios más avanzados de la enfermedad. Se ha estimado que de los animales infectados con el BLV aproximadamente el 5 al 10% desarrollan síntomas clínicos, cuando tienen entre 3 a 5 años de infección, lo que hace que la mayoría de los animales positivos que permanecen asintomáticos en los hatos constituyan una fuente de diseminación del virus a los animales no infectados (1).

Estudios recientes reportan que la prevalencia de la LBE en países fuera de Europa va en aumento y que esta enfermedad es más frecuente en el ganado destinado a la producción lechera. Países como USA (2, 3), Japón (4), Canadá (5), China (6) y Argentina (7) advierten que la mayoría de sus rebaños están infectados con el BLV y se acercan a una situación en la que casi la mitad de su ganado lechero muestra evidencia serológica de infección (8). En Colombia se tiene poca información sobre los aspectos epidemiológicos y moleculares del BLV, en un estudio realizado por Corredor-Figueroa et al., 2020 evaluaron muestras de sangre de 289 bovinos en diferentes departamentos del país, reportando una prevalencia molecular del BLV de 62% (179/289) en los animales y de 92% (69/75) en los hatos evaluados. Respecto a los resultados obtenidos para el departamento de Antioquia en dicho estudio la prevalencia fue de 73% en los animales y de 100% en los hatos evaluados (9). Por otra parte, Úsuga-Monroy et al., 2018 reportaron la prevalencia molecular del BLV en tres subregiones del departamento de Antioquia, la cual fue de 69.79% (88/126) en la subregión Oriente, 49.19% (314/640) en la subregión Norte y de 32.44% (76/234) para la subregión Valle de Aburrá (10).

La transmisión del BLV se da de forma horizontal de un individuo a otro, a través de la transferencia de células que contienen el virus integrado en su genoma en forma de provirus, por medio de fluidos biológicos contaminados como la sangre, la saliva y la leche o calostro (11). Se ha encontrado que el virus tiene la capacidad de infectar células de diferentes especies entre ellas los humanos, forjando inquietud respecto al potencial zoonótico de este virus. Diferentes estudios han evidenciado la presencia de anticuerpos

anti-BLV, de genes y proteínas específicas del virus en muestras de sangre periférica de hombres y mujeres sanas, pacientes con cáncer de pulmón y tejidos mamarios de pacientes con y sin cáncer de seno, siendo más frecuente en el grupo de mujeres con cáncer de seno (12-20). Estos datos han generado hipótesis en torno a la vía de transmisión que podría estar utilizando el virus para pasar de los animales a los humanos. Olaya-Galán et al., 2017 en Colombia, reportaron la presencia de células infectadas con el BLV en muestras de leche y carne cruda que estaban destinadas para el consumo humano (21). En un estudio similar realizado en Brasil, se detectó el BLV en el 39% (14/36) de las muestras de leche y en el 32% (17/54) de las muestras de carne analizadas (22), por lo cual estos autores propusieron al consumo de este tipo de alimentos, (leche sin proceso de pasteurización y carne mal cocida), como una posible vía y fuente de transmisión del BLV a humanos. Son varios los patógenos virales con potencial zoonóticos que podrían transmitirse a los humanos a través de la carne fresca y/o de alimentos derivados de ésta (23, 24). Por ejemplo, el Poliomavirus Bovino (BPvV), que podría estar relacionado con el cáncer colorrectal en humanos, se detectó en la carne molida en diferentes mercados de Maryland, USA. (23, 25), apoyando la hipótesis de que la leche y la carne cruda pueden representar una fuente de infección para los humanos con este tipo de agentes virales.

En el ganado bovino, la leche contaminada con BLV es infecciosa para los terneros lactantes y cuando se ha inyectado por vía intraperitoneal en ovejas, induce la producción de anticuerpos anti-BLV, lo que indica que la leche puede contener partículas virales infecciosas y/o células infectadas con el BLV y que el virus podría ser infeccioso por vía gastrointestinal y por vía intraperitoneal (26). Alternativamente, se ha propuesto como una potencial vía de transmisión del virus a los humanos, el contacto directo con fluidos provenientes de animales infectados, dado que la transmisión del BLV en los bovinos se da por medio de la transferencia de células infectadas con el provirus a animales no infectados, la transmisión a los humanos no debería ser muy diferente (22). Bajo este escenario, la prevalencia de anticuerpos contra las proteínas del BLV o la presencia de ADN del BLV debería ser mayor en los trabajadores de las plantas de faenado, de las granjas lecheras, en los veterinarios y en las personas que gustan de consumir carne

cruda, o poco cocida, y leche sin pasteurizar; sin embargo, los estudios sobre estos grupos poblacionales son limitados. En un reporte realizado por Donham et al., 1977 en USA, evaluaron la presencia del BLV en muestras de suero de 73 veterinarios y 62 granjeros mediante la técnica de inmunodifusión en gel de agar (AGID), sin encontrar la presencia de anticuerpos anti-BLV (27). Considerando que los estudios en las personas con contacto directo y exposición a la ganadería son limitados y los reportes de la presencia del virus en el ganado bovino en diferentes regiones del país, existe la necesidad vigente de evaluar en nuestro territorio, mediante herramientas diagnósticas más sensibles y específicas, la presencia del BLV en ganaderos, considerando que son un grupo de riesgo para la infección por distintos agentes infecciosos.

A la fecha se han reportado 12 genotipos (G) del BLV circulando en bovinos de diferentes regiones del mundo, lo anterior mediante técnicas de RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica), secuenciación parcial del gen *env* y secuenciación del genoma completo del virus (28). El genotipo 1 es considerado el más prevalente en todo el mundo, ya que ha sido reportado en 17 países principalmente de América, Europa y Australia (29). En Colombia, los estudios sobre la variabilidad genética del BLV se limitan a los estudios reportados por Úsuga-Monroy et al., 2023 en el departamento de Antioquia, donde describieron la presencia del G1 y G3, amplificando una región de 444 pb del gen *env* con los primers descritos por Beier et al., 2001 (30, 31). Mientras que Corredor-Figueroa et al., 2021 reportaron la co-circulación de los G1 y G6 del BLV en el ganado bovino colombiano, amplificando un fragmento de mayor tamaño del gen viral *env* (32). Benavides et al., 2017, reportaron la circulación del G1 y G2 del BLV en animales provenientes de fincas lecheras del municipio de Pasto, Nariño (33). Con estos resultados los autores refuerzan la importancia de estudiar la circulación de los genotipos virales específicos en una población en particular, para avanzar en propuestas preventivas, relacionar las cepas con las regiones geográficas, evaluar la estabilidad del genoma y los distintos niveles de virulencia y patogenicidad (32).

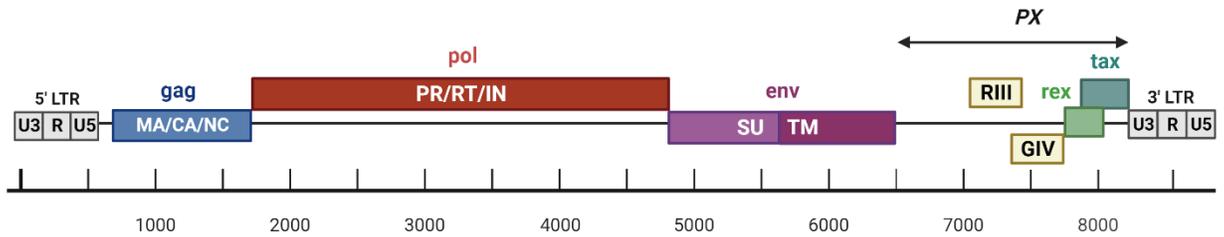
1.1 Características virales

1.1.1 Clasificación, genoma viral y estructura

El BLV es un retrovirus, exógeno y oncogénico similar al virus de la leucemia de células T humanas (HTLV). Este virus pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, la cual está dividida en 6 géneros: *Alfaretrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* y *Deltaretrovirus* donde se encuentra el BLV, junto a otros virus linfotrópicos de células T tanto de simio como de humanos (PTLV-1, 2 y 3) (ICTV, 2022). El BLV pertenece al grupo VI de la clasificación de Baltimore, pues su genoma está compuesto por ARN diploide de cadena sencilla y de polaridad positiva (ARNg) y se replica a través de una forma intermedia de ADN bicatenario (34). Es un virus envuelto con un tamaño aproximado de 80 a 125 nm, el genoma está constituido por 8714 nucleótidos que dan lugar a 8 marcos abiertos de lectura (ORFs), dentro de los cuales se encuentran los genes *gag*, *pro*, *pol* y *env* que codifican proteínas importantes en los procesos de replicación o multiplicación del virus (11).

El BLV al igual que el HTLV se caracteriza por contener en su genoma una región denominada PX, la cual codifica para proteínas accesorias, así como microARNs que modulan la expresión de genes virales y/o celulares (**Figura 1**). El genoma del BLV está flanqueado por dos regiones no codificantes, Long Terminal Repeats o LTR, ubicadas en los extremos 5' y 3' del genoma viral, las cuales contienen secuencias comprometidas en los procesos de regulación de la expresión génica viral (35). Las LTR son idénticas entre sí y están organizadas en las subregiones U3-R-U5, estas secuencias son importantes en la regulación de la interacción virus-hospedador y durante los procesos de iniciación de la transcripción y maduración postranscripcional (11, 36, 37).

Figura 1. Estructura del genoma del BLV



Nota: El provirus está flanqueado por dos secuencias repetidas terminales largas (LTR) idénticas y contiene los marcos de lectura abiertos (orfs) correspondientes a *gag*, *pol* (proteasa, retrotranscriptasa e integrasa) y *env*. Varios orfs que codifican Tax, Rex, R3 y G4 están presentes en la región *PX* entre *env* y 3'LTR. La transcripción de ARN genómico se inicia y termina en las LTR 5' y 3', respectivamente (11). Creado con BioRender.com

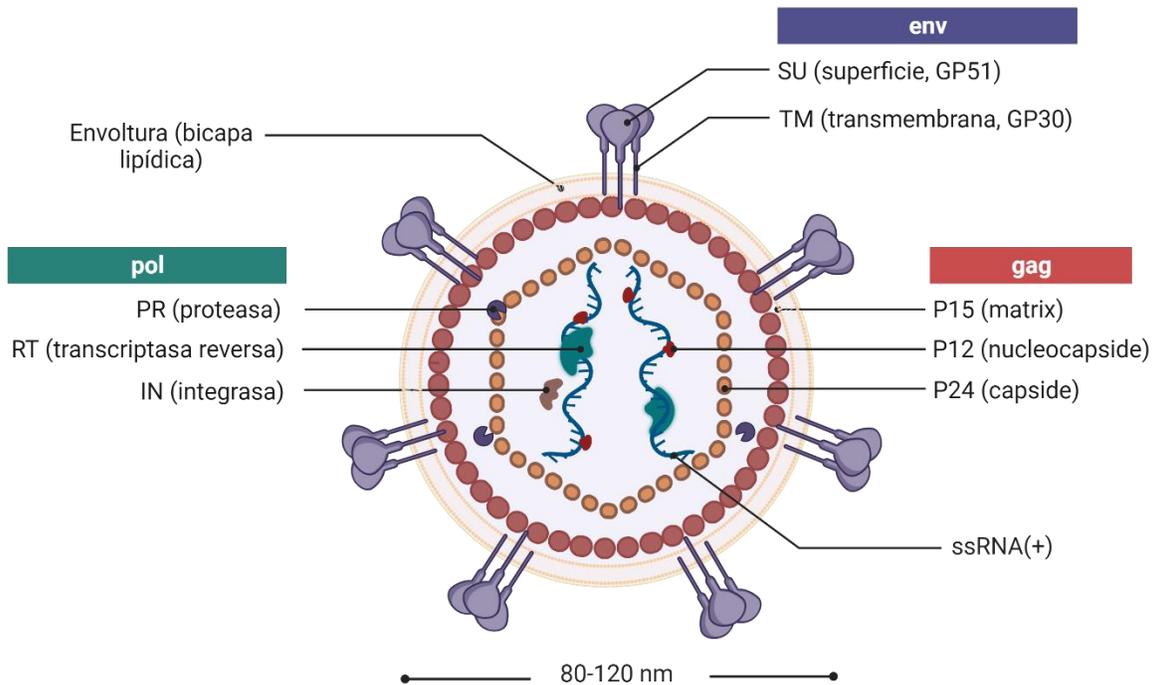
El gen *env* tiene una longitud de 1547 nucleótidos, codifica para un precursor de 72 kDa (Pr 72) del cual provienen las dos glicoproteínas de envoltura encargadas de la unión al receptor, gp51 y gp30, siendo esta última la proteína transmembranal que ancla a gp51 (38). La gp51 es la proteína más externa de la partícula viral y se ha propuesto que es la encargada de interactuar directamente con el receptor celular (39). Estas proteínas son fundamentales en el reconocimiento y entrada del virus a la célula hospedera, adicionalmente el gen *env* ha sido el más utilizado para la genotipificación viral (28). Por otro lado, el gen *pol* con un tamaño aproximado de 2533 nucleótidos, produce una poliproteína de 95 kDa que incluye la enzima transcriptasa reversa y la enzima integrasa, esta última con función endonucleasa, estas dos enzimas son claves en el ciclo de replicación viral ya que permiten que se dé el proceso de retrotranscripción del ARNg a ADN y la posterior integración del virus al genoma de la célula hospedera en forma de provirus (11, 40).

La región pX codifica para las proteínas Tax, Rex, R3 y GIV, las cuales, en asociación con las LTR, están involucradas en funciones regulatorias, ya que activan la transcripción para favorecer la expresión viral e interactúan con factores de transcripción celular. Algunos mecanismos descritos por los cuales Tax induce transformación en las células es por la inhibición de la reparación del ADN, el bloqueo de la apoptosis, la alteración de los procesos de regulación de la transcripción y de la traducción celular (11).

Las proteínas Tax y GIV tienen características oncogénicas, siendo capaces de promover la transformación de fibroblastos primarios de embrión de rata (41-43). Aunque los mecanismos de transformación celular aún deben investigarse a mayor profundidad, es interesante notar que la proteína Tax de los virus BLV y HTLV comparten los mismos blancos celulares. De hecho, en ambos virus esta proteína funciona como transactivador, ya que se unen a la tristetraprolina (TTP), un modulador postranscripcional de la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (44).

El BLV tiene forma esférica con un diámetro que va de 80 a 125 nm, las proteínas de la cápside p24, p15 y p12 son las responsables de darle la estructura del virión. La proteína p24, forma la cápside icosaédrica que contiene en su interior un complejo proteína-ácido nucleico compuesto por la proteína p12 y dos copias idénticas del ARN genómico del virus, luego se encuentra la proteína p15 conformando una matriz que interactúa con la proteína transmembranal de la envoltura gp30. La envoltura viral contiene 2 glicoproteínas, la gp30 o porción transmembrana (TM) unida a la gp51 o proteína mayor de superficie (SU) y finalmente una envoltura o capa lipídica, obtenida de la membrana celular de la célula hospedera durante el proceso de gemación (**Figura 2**) (1).

Figura 2. Morfología de la partícula viral del BLV



Nota: Dos copias de ARN genómico se empaquetan en el virión. Las proteínas de cápside CA (P24) forman la cápside icosaédrica que contiene el ARN viral y la proteína de nucleocápside (P12), junto con proteínas enzimáticas como la retrotranscriptasa RT, la integrasa IN y la proteasa viral PR (también puede encontrarse fuera de la cápside). La proteína de matriz MA (P15) conecta la cápside con la cara interna de la bicapa lipídica formando la envoltura viral. En esta se inserta el complejo env formado por las subunidades (gp51 SU y gp30 TM) (45). Creado con BioRender.com

1.1.2 Tropismo viral, ciclo replicativo y respuesta inmune

Aunque las células mononucleares, como los monocitos, los granulocitos y las células T CD4+ y CD8+, pueden infectarse con el BLV, el linfocito B CD5+ es considerado como la célula blanco-primaria de este virus (46-48). En la literatura también se ha reportado que este virus tiene la capacidad de infectar a células distintas al linfocito B, y a células de otras especies diferentes al ganado bovino. Se cuenta con reportes de

infecciones exitosas por el BLV en modelos *in vivo* en cabras, ovejas, pollos y conejos, generando procesos patológicos en algunos de ellos, tal como ocurre en los bovinos (45, 46). Se ha observado que el BLV interrumpe la homeostasis de las células B y T y altera las respuestas proliferativa y apoptótica, ya que interfiere con la expresión génica y las acciones de las cascadas de señalización en diferentes momentos posteriores a la infección (49).

Como otros retrovirus, el BLV presenta una estrategia replicativa que involucra dos etapas, una temprana, dependiente de proteínas virales, y una tardía, dependiente de enzimas del hospedero y de los productos de los genes virales (**Figura 3**). Los genes estructurales del virus, *pol* y *env* son esenciales en la etapa temprana para la infectividad *in vivo* y su delección elimina la infectividad. Además, se ha reportado que los polimorfismos en el gen *env* generan cambios en la patogenicidad de los retrovirus (50). Durante la infección por BLV, la glicoproteína transmembrana gp51, desestabiliza la membrana de la célula hospedera con un péptido de fusión, después de lo cual las proteínas estructurales promueven la fusión de membranas de forma independiente de pH, con la posterior liberación de la cápside en el citoplasma (51). Los mecanismos específicos de entrada del virus a la célula aún no están bien descritos. El receptor celular utilizado en la entrada del BLV aún no ha sido descubierto, se cree que en este proceso interviene la subunidad δ del complejo de proteína adaptadora bovina 3 (AP-3) (52), la cual se encuentra altamente conservada entre especies, ya que en los humanos y ratones existen cuatro tipos de complejos AP diferentes, que al igual que en los bovinos desempeñan un papel importante en el transporte de proteínas intracelulares (53). Sin embargo, AP-3 no es una molécula exclusiva de los linfocitos B, lo que apoya la hipótesis de que otros tipos de células son susceptibles a la infección con el BLV, pero aún es necesario profundizar en los mecanismos y la capacidad de este virus de infectar diferentes tipos de células.

Posterior a la entrada del virus, no hay viremia detectable, pero hay una respuesta inmune humoral fuerte y persistente frente a las proteínas estructurales, especialmente contra la glicoproteína gp51 y la proteína p24 de la cápside (54). La síntesis de las moléculas de ADN del BLV a partir del ARNg, se logra mediante la enzima transcriptasa

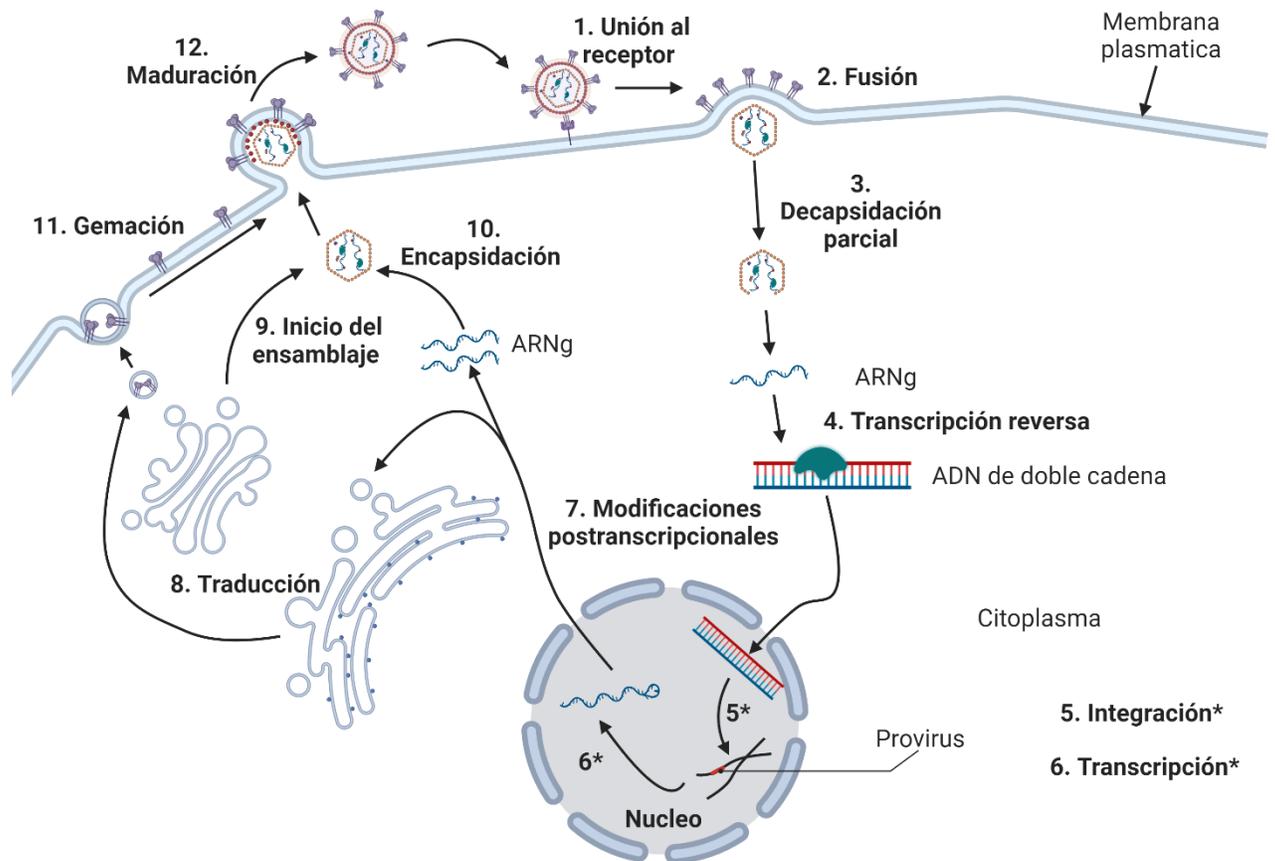
reversa viral, luego, con la ayuda de la integrasa viral, el ADN del virus se inserta en sitios aleatorios en el genoma del hospedero en el núcleo de las células infectadas, la forma viral integrada se conoce como provirus (55). La inserción del ácido nucleico de BLV ocurre a menudo en regiones intrónicas, la inserción en estas regiones de baja transcripción ayuda a mantener la latencia del virus (56). Los datos actuales indican que, en el ganado bovino, al menos de 2 a 6 copias del ADN del BLV se integran en una sola célula (11), y la integración podría depender aún más de la etapa del ciclo celular en el momento de la infección. Es más probable que las células replicantes permitan que el genoma retrotranscrito entre en el núcleo (57), y provoque una infección productiva; en este caso los animales infectados producen anticuerpos anti-BLV. Por el contrario, el genoma del BLV retrotranscrito que permanece en el citoplasma se degrada y provoca una infección no productiva. Se desconoce el alcance de la replicación del BLV en este caso, pero podría ser suficiente para inducir anticuerpos y hacer que el animal dé positivo en ensayos serológicos sensibles como un ELISA (25). La integración viral marca el fin de la etapa temprana y el comienzo de la etapa tardía del ciclo viral, donde se lleva a cabo la síntesis de ARN viral, síntesis de proteínas virales y ensamblaje de la progenie.

Las células que contienen provirus integrados en sitios donde la transcripción está inactiva no son reconocidos por el sistema inmunológico del hospedero, como resultado, las células infectadas se acumulan provocando linfocitosis persistente (11). Lo anterior representa una estrategia de replicación alternativa del virus a través de la mitosis celular e implica el papel de las proteínas reguladoras, como Tax, en la proliferación celular (58). De acuerdo a esto la transmisión del BLV se da cuando una célula infectada con un provirus BLV integrado en su genoma pasa a un nuevo hospedero, momento en el cual el provirus BLV se expresa en partículas virales nuevas que infectan a otros linfocitos B (59). Alternativamente el virus se propaga mediante la expansión clonal de las células infectadas durante la mitosis celular, sin indicación de transcripción reversa (11, 57).

El provirus del BLV permanece integrado en el genoma celular de por vida, incluso en ausencia de anticuerpos anti-BLV detectables, adicionalmente la transcripción viral se bloquea durante el período latente de la enfermedad, el cual es conocido como estado silencioso, favoreciendo la evasión de la respuesta inmune (59). La hibridación *in situ* ha

revelado que la expresión del ARN viral se mantiene en niveles bajos en células mononucleares de sangre periférica recién aisladas de animales asintomáticos infectados con el BLV (40). Por lo tanto, la infección por BLV probablemente no sea suficiente para inducir leucemogénesis y algunos eventos adicionales, como mutaciones genéticas, podrían estar involucrados en el desarrollo de enfermedad. La mayoría de los estudios de leucemogénesis inducida por el BLV se han centrado en la proteína Tax, porque se cree que es un potente activador transcripcional de la expresión génica viral (60). Se ha considerado, que la capacidad de la proteína Tax para inducir la inmortalización celular, podría ser el primer paso en el proceso de transformación mediado por el BLV (59, 61).

Figura 3. Ciclo replicativo del BLV



Nota: Se esquematizan los procesos de unión, entrada, integración, síntesis de proteína, ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales, las cuales maduran fuera de la célula hospedadora. Adaptado de Nisole et al., 2005 (62). Creado con BioRender.com

1.1.3 Presentación clínica, transmisión y epidemiología

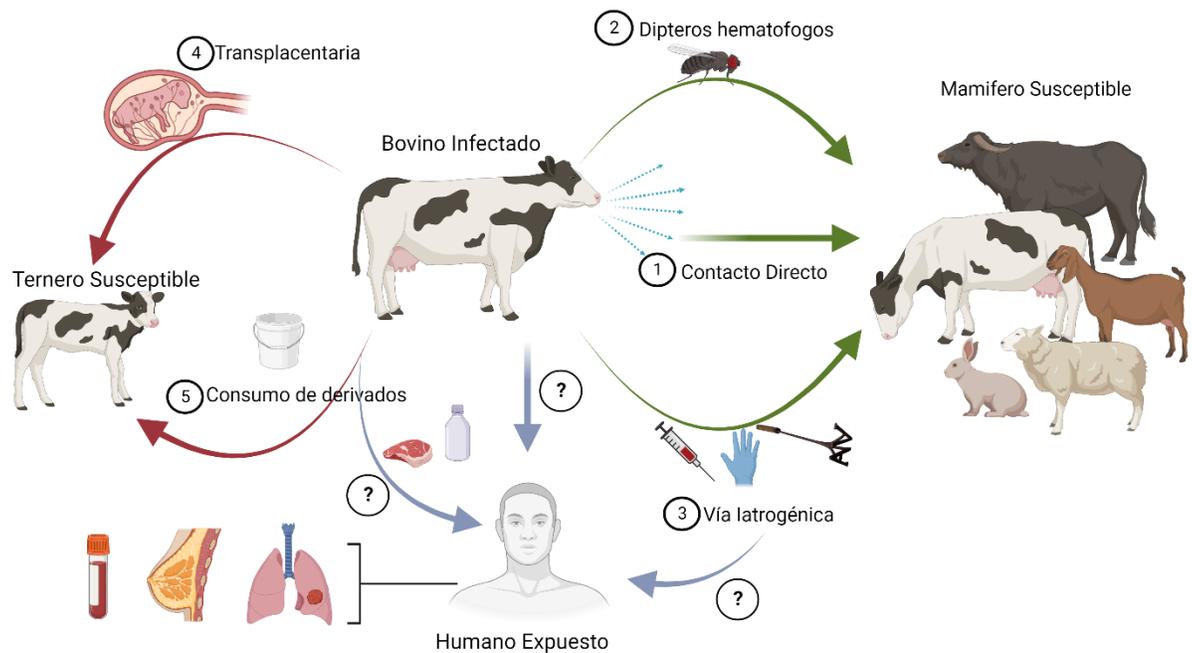
El BLV produce en el ganado bovino la enfermedad conocida como leucosis bovina enzoótica (LBE) la cual es una enfermedad infecciosa crónica del ganado bovino, donde la mayoría de los animales cursan con una infección clínicamente asintomática. Aproximadamente el 60% de los animales infectados son aleucémicos, el 30% presenta linfocitosis persistente y menos del 10% desarrolla las etapas más avanzadas de la enfermedad en forma de leucemias o linfomas de células B (11). La Linfocitosis persistente (LP) se considera una condición preneoplásica que se caracteriza por un

aumento permanente, y relativamente estable, en el número de linfocitos B no transformados en la sangre periférica. Durante su progreso a leucemia/linfoma las manifestaciones clínicas se asocian con adenomegalia generalizada, esplenomegalia, formación de nódulos en el bazo con acumulación de células B transformadas y más adelante, el decaimiento y la muerte del animal; además se pueden presentar daños digestivos, inapetencia, pérdida de peso, debilidad general y algunas veces manifestaciones neurológicas (11, 63). Por otra parte, debido a la desregulación de la función inmunológica, se ha reportado la reducción en la producción de leche, pérdida de peso y aumento en la probabilidad de adquirir infecciones concomitantes (49, 64, 65).

Debido al aumento de linfocitos circulantes y glóbulos blancos totales durante la LP, el BLV puede transmitirse de un animal infectado a uno sano por medio de cualquier fluido corporal que contenga este tipo de células con el virus integrado en su genoma (66-68). Esto convierte al BLV en un agente sumamente versátil, pues puede transmitirse tanto por medios horizontales como verticales (69-71). Se considera que las malas prácticas de bioseguridad en la producción pecuaria contribuyen a la diseminación del virus en los hatos mediante transmisión horizontal iatrogénica, durante los procesos de extracción de sangre, castración, palpaciones rectales, entre otros. Por ejemplo, el uso de una única aguja para vacunar a todos los animales de un hato se ha reportado como un factor de riesgo para la infección por el BLV (66, 72). De igual forma, procesos como la monta natural o inseminación artificial utilizando semen proveniente de toros infectados con BLV, representan una fuente de infección y diseminación (73). Es importante mencionar que los dípteros hematófagos, como la moscas (*Stomoxys calcitrans*, *S. Indica*, *Heamatobia irritans*, *Tabanus bovinus* y *Haematobosca sanguinolenta*), juegan un papel fundamental en la prevalencia y epidemiología del BLV, lo cual ha sido reportado en diversos estudios realizados en USA y Japón (72, 74); en los cuales se logró demostrar que el control de vectores utilizando una combinación de repelentes de insectos, sumado a la implementación de buenas prácticas de producción pecuarias, fueron muy eficientes para controlar la diseminación del virus, ya que no se observaron nuevos casos de infección por BLV en los hatos, posterior al tratamiento con repelentes.

Adicionalmente, se ha reportado que una vaca infectada puede pasar el virus a los terneros por medio del calostro, por la leche o por vía transplacentaria; sin embargo, esta última es menos frecuente (**Figura 4**) (67).

Figura 4. Vías de transmisión del BLV



Nota: Se esquematizan las vías de transmisión horizontal: 1. Contacto directo con secreciones y fluidos provenientes de un animal infectado, 2. A través de dípteros hematófagos, 3. Vía iatrogénica, en la que intervienen todos los instrumentos usados en la producción pecuaria, que cuando no se desinfectan correctamente favorecen la diseminación del virus. Las vías de transmisión vertical: 4. Transplacentaria y 5. Cuando se alimentan terneros susceptibles con leche o calostro provenientes de una vaca infectada. Adicionalmente, se hipotetizan las posibles vías de transmisión del virus a los humanos. Creado con BioRender.com

Se ha demostrado que los hatos que presentan bovinos infectados con el BLV poseen una menor producción láctea, así como una mayor susceptibilidad de los animales para adquirir otras enfermedades de etiología infecciosa, lo que deja como

resultado altas pérdidas económicas y serias implicaciones para el sector ganadero de la mayoría de los países, pues la prevalencia del BLV a nivel mundial oscila entre el 15 al 80% (28). El BLV ha sido reportado en regiones de todo el mundo, y algunos países han sido declarados libres de la infección por el virus, mediante la implementación de estrategias de erradicación como testear y descartar y la segregación de animales positivos (generalmente diagnosticados mediante inmunoensayos como el ELISA) (1). En Europa iniciaron un programa de erradicación del BLV a mediados de los años 60, por lo que hoy en día países como Alemania, Francia, España, entre otros, son declarados libres del virus (8, 75). Recientemente, se aprobó en Argentina una vacuna BLV genéticamente modificada la cual es capaz de inducir una respuesta inmune anti-BLV comparable a una respuesta inmune contra el virus silvestre, el virus no se propagó a centinelas no infectados mantenidos durante períodos de tiempo prolongados en el mismo hato. A su vez, provocó la transferencia pasiva de anticuerpos a los terneros recién nacidos a través del calostro materno, mostrando la persistencia de la inmunidad pasiva antiviral (76), pero su eficacia en rebaños infectados a gran escala en condiciones de granjas lecheras reales aún debe evaluarse más a fondo.

El comportamiento del virus en Sudamérica es endémico con cifras que oscilan entre el 27 al 77% (28). En Colombia, en el 2016 se reportó una seroprevalencia del BLV de 42% (3423/8150) empleando la técnica ELISA para detectar anticuerpos anti-gp51 en muestras de sangre periférica de bovinos provenientes de 7 departamentos del país (77). Posteriormente Corredor Figueroa et al., 2020 reportaron una prevalencia molecular del 62% (173/289), amplificando un fragmento del gen *gag* por medio de PCR anidada en muestras de sangre periférica tomadas aleatoriamente de bovinos de las zonas más representativas del país en términos de ganadería (9). El aumento en las cifras de prevalencia del BLV en el país, se pueden explicar por el uso reciente de técnicas diagnósticas más sensibles y específicas como la PCR, debido a la ausencia de vacuna o por el subregistro y la falta de estrategias de control oficial, ya que el diagnóstico rutinario del BLV no es obligatorio, haciendo que el control de este virus sea difícil y no sea de prioridad para el gremio ganadero; lo cual explicaría también que no exista información actualizada y representativa sobre el BLV en el país.

1.1.4 Clasificación filogenética

A pesar de que el genoma del BLV está compuesto por ARN, este retrovirus presenta una variabilidad genética relativamente baja, debido principalmente a su latencia en el genoma del hospedero como ADNds, y el uso de la mitosis celular como principal vía de replicación de su genoma (78). La mayoría de los reportes disponibles sobre la genotipificación del BLV, se basan en la amplificación y secuenciación completa del gen *env* o de un fragmento de 444 pb de este, con los primers recomendados en el manual de diagnóstico viral de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018) (79). Existen algunos reportes de genotipificación mediante la secuenciación del genoma completo del virus (28), y adicionalmente en 2018 se reportó la utilidad de los fragmentos LTR del BLV para genotipificarlo, dado que el análisis de estas regiones respalda la agrupación de variantes del BLV en función de su origen geográfico (80). Un reporte similar se realizó recientemente en Colombia, en el cual se demuestra la utilidad del gen *tax* para evaluar la variabilidad genética y estimar la diversidad de genotipos del virus (9).

Actualmente, la clasificación filogenética de BLV incluye 12 genotipos (G1-G12), reportados en diferentes regiones del mundo (81-88). La evaluación de genotipos en el BLV data del año 1985, con el reporte del genotipo 1, el cual además de ser el más antiguo, es el más prevalente en todo el mundo, ya que ha sido reportado en 17 países (79). Los primeros análisis filogenéticos del BLV basados en secuencias derivadas del gen *env*, agruparon al virus en tres (89), cuatro (90) y siete genotipos distintos (91). Posteriormente se demostró la existencia del genotipo 8 en ganado bovino de Croacia (92), el genotipo 9 en ganado de Bolivia (93), el genotipo 10 en Tailandia (85), el genotipo 11 identificado en China (82) y el genotipo 12 reportado recientemente, en ganado bovino de Kazajistán (88). Estos estudios han demostrado que la agrupación de genotipos en un país particular generalmente se asocia con el origen geográfico del aislamiento, y se plantea que la dispersión de los genotipos del BLV ha sido impulsada por la dispersión histórica de su hospedero, ya que la población mundial de ganado vacuno está

estrechamente vinculada con la historia de la colonización humana y la domesticación animal durante los últimos 200 a 1000 años (91).

En general, el análisis filogenético del BLV basado en el análisis de las secuencias del gen *env*, permite categorizar este virus en aislados geográficamente diferentes, ya que, aunque comparten una alta identidad de secuencia entre los aislados; muchos de ellos muestran la presencia de mutaciones puntuales a pequeña escala (28). Se plantea que algunas de estas mutaciones están asociadas con la infectividad, la replicación y la patogénesis del BLV (94, 95) y pueden cambiar el estado serológico del ganado infectado (79). Por lo tanto, el análisis de la diversidad genética del BLV a escala global es un esfuerzo de investigación en curso, ya que representa una estrategia útil que puede explicar las características de los genotipos y su asociación con la progresión de la enfermedad. También puede resultar útil para entidades gubernamentales y productoras de vacunas. Adicionalmente, esta información puede ser útil para comprobar el potencial zoonótico de este virus, ya que las secuencias nucleotídicas de las cepas circulantes en ganado bovino serán necesarias para compararlas con las secuencias obtenidas de cepas aisladas de muestras de origen humano, así como de otros posibles hospederos (96).

1.2 BLV en humanos

Con la identificación en 1972 del BLV como el agente causal de la LBE en el ganado bovino, también nació un notable interés en determinar si los humanos podrían infectarse con este virus (46). En las primeras décadas de la investigación con el BLV se impuso el paradigma de que este virus no infecta a los humanos, debido a la poca evidencia y capacidad tecnológica para demostrar la transmisión, apoyado en diferentes reportes en los cuales se descartaba la presencia de anticuerpos anti-BLV por medio de la técnica AGID (97). Posteriormente, en 1976 se demostró la capacidad del BLV para infectar *in vitro* a diversas líneas celulares (98). En dicho estudio, se enfrentaron cultivos celulares de humanos, simios (Chimpancés y Rhesus), caninos, ovejas, cabras y

murciélagos con muestras de sangre de vacas que presentaban LP. En todos los cultivos celulares se observó la producción de la partícula viral completa, con lo que los autores resaltaron el potencial riesgo biológico para los humanos. Adicionalmente, Altaner y Yokoro en 1989 reportaron que el BLV podía replicarse en células humanas de origen neuronal, y que algunas de estas células, eran muy susceptibles a la infección por el BLV, sugiriendo que este virus puede ingresar a células no hematológicas, incluyendo las células epiteliales que recubren los vasos sanguíneos (36).

Los primeros en lograr demostrar la presencia del BLV en humanos, fueron Buehring et al., 2003 en USA, reportando la presencia de anticuerpos anti-p24 en muestras de suero de personas sanas voluntarias (99). Estos autores en su momento concluyeron que la presencia de anticuerpos en humanos podría interpretarse como una respuesta inmune a antígenos desnaturalizados del virus, consumidos con la carne de res y los productos lácteos pasteurizados. Posteriormente, la llegada de la PCR y la secuenciación del ADN hicieron posible detectar el ADN del BLV, con lo cual en la última década se ha ido acumulando la evidencia de la presencia del virus en diferentes muestras de origen humano. Varios estudios han explorado el posible vínculo entre el BLV y el desarrollo de enfermedad en el humano, especialmente el cáncer de mama, pero los datos siguen siendo limitados y controvertido (97, 99, 100). Hay algunos artículos que vinculan a un retrovirus de ratón relacionado al BLV (virus del tumor mamario de ratón [MMTV]), así como a otros virus, con el cáncer de mama humano (101). Se ha demostrado de manera convincente que el MMTV infecta y se replica en células humanas (102), e incluso se han analizado los sitios de integración del provirus MMTV en células humanas infectadas (103). Existe la hipótesis de que el BLV causa cáncer de mama de manera similar a cómo el HTLV-1 causa leucemia/linfoma T del adulto (ATL) a través de la proteína Tax y otras características compartidas entre estos dos virus. Se ha observado que el BLV y el HTLV-1 comparten gran cantidad de similitudes tales como: transmitirse únicamente a través del contacto entre células, producir pocos viriones, capacidad de propagarse a través de la lactancia materna, e inhibición de la reparación de las bases del ADN, lo que provoca la acumulación de mutaciones que a su vez pueden provocar cáncer (104).

Giovanna et al., 2013 en Colombia reportaron la presencia del BLV en el 41% (44/106) de las muestras de tejido mamario humano analizadas. El análisis filogenético realizado por los autores confirmó una alta identidad entre las secuencias genéticas del BLV tomadas de los tejidos mamaros humanos y “las secuencias provenientes de ganado bovino con leucosis”. Con estos resultados los investigadores concluyeron que “se puede confirmar la presencia de genes del BLV en humanos y su localización en el tejido mamario; sin embargo, aún se debe aclarar su papel como un posible promotor de procesos malignos en este tejido” (105).

Aunque la vía de transmisión del virus a los humanos aún no se ha establecido, es muy probable que sea de origen zoonótico, e incluso como una infección transmitida por alimentos (leche no pasteurizada o carne mal cocida). En un estudio realizado en Bogotá en el 2017, se detectó mediante técnicas de biología molecular la presencia de fragmentos génicos del BLV en muestras de carne y leche cruda, además se observó que dichos fragmentos se degradaban una vez los alimentos eran sometidos a cocción, por lo cual estos autores proponen la vía oral, mediante el consumo de estos productos agrícolas sin pasteurizar como una potencial vía de transmisión (21). Teniendo en cuenta que una de las estrategia de transmisión que presenta este virus en su hospedero natural, es el contacto directo con animales infectados, esta vía también podría ser un probable mecanismo de transmisión a los humanos, siendo esto favorecido por prácticas pecuarias deficientes en temas de bioseguridad en labores como la palpación sin guantes, la reutilización de agujas para vacunar múltiples animales, la incorrecta desinfección de implementos usados en los procesos de castración, descorne, entre otras (66). Recientemente Buehring et al., 2019, en USA, realizaron un estudio de la presencia BLV en sangre de personas sanas voluntarias, encontrando linfocitos infectados con el BLV en el 38% de los sujetos evaluados, lo que sugiere una infección con transmisión por vía sanguínea (19). Otros posibles mecanismos de transmisión para el BLV que es necesario investigar en humanos son la lactancia materna, la exposición a la sangre de la madre durante el parto y las transfusiones de sangre, ya que los bancos de sangre no testean las unidades sanguíneas en busca de BLV de forma rutinaria.

La historia de contacto ocupacional entre los humanos y el ganado bovino, sumado al consumo de productos lácteos y cárnicos de origen bovino sin pasterización o sin buena cocción y que podrían estar contaminados con el BLV, pueden haber dado al virus la oportunidad de adaptarse a un nuevo hospedero. Aunque se necesitan muchos pasos para establecer la causalidad de cualquier enfermedad, el primer paso es una asociación estadísticamente significativa entre la enfermedad y el agente sospechoso. La validación de esta asociación por parte de múltiples investigadores en diferentes poblaciones es un paso también esencial (106). En conjunto, la evidencia científica respecto a la detección del BLV en muestras de origen humano en otras zonas del mundo, sugieren la necesidad de investigar cual es la frecuencia de detección molecular de este virus en personas con exposición ocupacional en la ganadería en nuestro medio, los genotipos circulantes y los factores asociados, para verificar si a futuro es importante investigar sus posibles rutas de transmisión, así como su papel potencial en el desarrollo y la progresión de enfermedades en humanos, considerando que ya es evidente como agente etiológico de enfermedad en los bovinos, reconocidos como su hospedero primario natural (107).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia del Virus de la Leucosis Bovina, los genotipos circulantes y los factores asociados en trabajadores de hatos lecheros del departamento de Antioquia, 2021.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar la frecuencia del Virus de la leucosis bovina, mediante la detección molecular de los genes *env* y *tax*, en trabajadores de hatos lecheros de Antioquia.

- 2) Identificar los genotipos circulantes del Virus de la Leucosis Bovina en trabajadores de hatos lecheros de Antioquia.
- 3) Identificar los factores asociados con la detección molecular del Virus de la Leucosis Bovina en trabajadores de hatos lecheros de Antioquia.

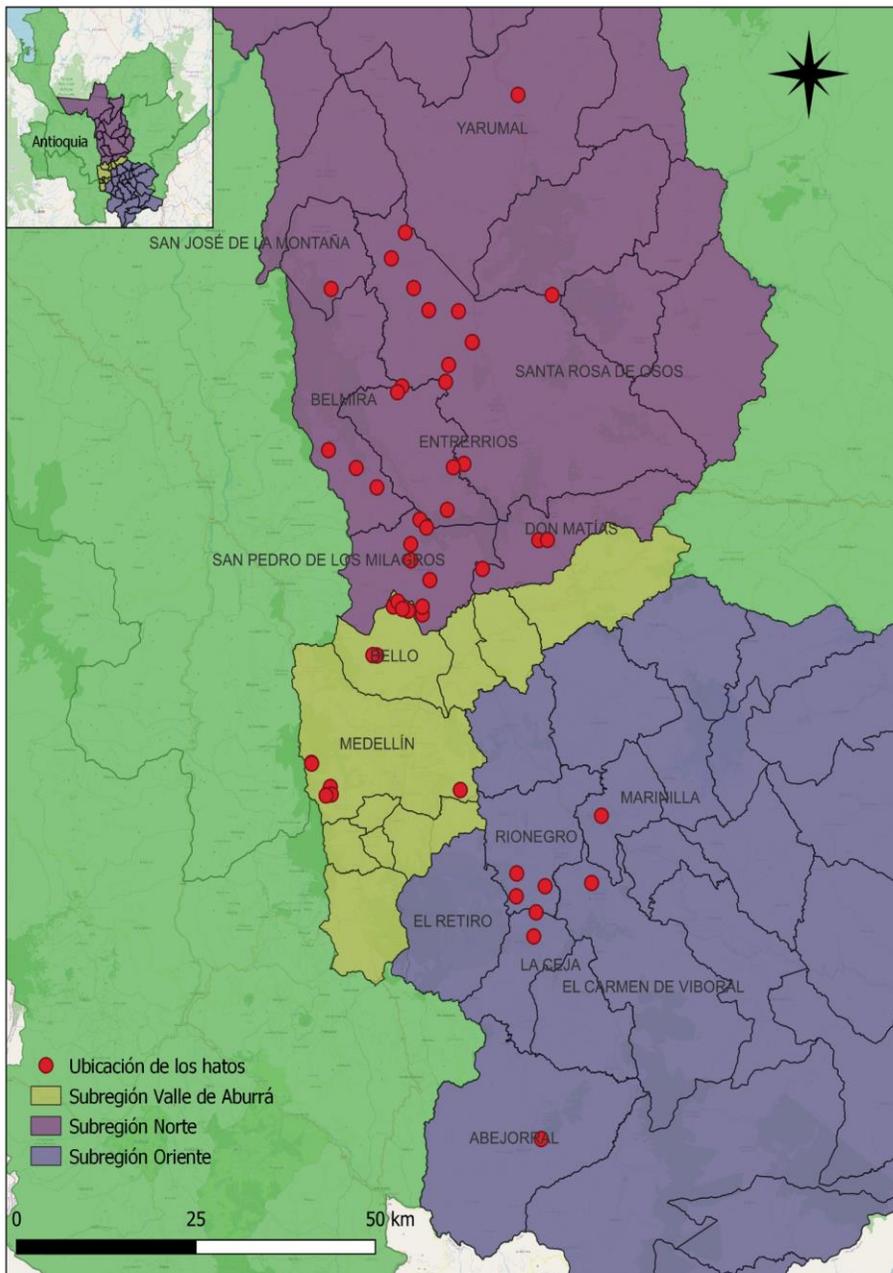
3 Metodología

El desarrollo de la presente investigación contó con el aval del Comité de Ética de Investigación en Salud de la Universidad Pontificia Bolivariana (Registro No. 20, expedida el 28 de septiembre de 2020) (**Anexo 1**).

3.1 Diseño del estudio

Este estudio tuvo un diseño descriptivo de corte transversal analítico en trabajadores de hatos lecheros del departamento de Antioquia. Para la captación de los trabajadores se realizó un muestreo entre junio y diciembre de 2021 en 51 hatos de lechería especializada ubicados en las subregiones Norte, Oriente y Valle de Aburrá del departamento de Antioquia (**Figura 5**). En este estudio se incluyeron hatos lecheros asociados a la cooperativa Colanta, ubicados en una de las tres subregiones mencionadas anteriormente y que voluntariamente aceptaron participar en la investigación. Se seleccionó a Colanta como socio para este proyecto por ser la empresa de la cadena láctea de Antioquia que tiene el mayor número de productores lecheros asociados y que son propietarios de más del 50% de los animales de la lechería especializada y tradicional del departamento.

Figura 5. Ubicación geográfica de los hatos lecheros, lugar de captación y origen de la población incluida en este estudio



Nota: Se recolectaron muestras de sangre de todos los trabajadores presentes en cada uno de los 51 hatos lecheros que se muestran como puntos rojos en las subregiones Norte, Oriente y Valle de Aburrá. Las coordenadas geográficas se determinaron durante el trabajo de campo utilizando el equipo GPS Trimble Juno 3B (Westminster, EE. UU.) El mapa se creó utilizando el software QGIS Geographic Information System 3.22.3 (<http://www.qgis.org>). Los mapas utilizados están a disposición del público y se obtuvieron de Grupo Ingeolan (C.A., Esri, Garmin, FAO, NOAA; Esri, HERE, Garmin, FAO, NOAA, USGS) y el Departamento Administrativo Nacional de Estadística ((DANE)

<https://geoportal.dane.gov.co/servicios/descarga-ydatos/descarga-mgn-marco-geoestadístico-nacional/>).

En este estudio se incluyeron todas las personas mayores de 18 años, hombres y mujeres, que al momento del muestreo se encontraban laborando en el hato, que voluntariamente aceptaron participar en el estudio, firmaron el consentimiento informado de participación (**Anexo 2**), aceptaron responder a la encuesta y permitir la recolección de una muestra de sangre periférica.

A cada uno de los participantes al momento del muestreo se le realizó una encuesta estructurada para recopilar la información necesaria para identificar los factores asociados con la detección molecular del BLV. El cuestionario se diligenció de forma digital en el software © Jotform Inc. (San Francisco, California, EE. UU.), e incluía preguntas de respuesta abierta y cerrada relacionadas con las características epidemiológicas y ambientales del participante, como género, edad, residencia, municipio de procedencia, presencia de bovinos y animales domésticos en la vivienda y/o el lugar de trabajo, antecedentes laborales, actividades realizadas en el hato, consumo de carne y productos lácteos derivados, condiciones higiénicas y sanitarias, entre otras y características clínicas (autoreporte)(**Anexo 3**).

De cada participante se realizó recolección de muestras de sangre periférica (10 ml), usando el sistema de extracción al vacío en tubos BD Vacutainer® estériles con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético-EDTA, mediante venopunción de la vena cefálica a la altura del brazo. Los procedimientos de recolección de las muestras biológicas fueron ejecutados por personal capacitado (Microbiólogo y bioanalista). Las muestras de sangre total obtenidas se transportaron al laboratorio de Biovigilancia de la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), en condiciones de refrigeración (4°C) para la realización posterior de los procedimientos de separación de linfocitos, extracción y amplificación de ADN viral.

3.2 Detección molecular del Virus de la Leucosis Bovina

3.2.1 Separación de linfocitos

A partir de la muestra de sangre total obtenida de cada participante, se realizó la separación de los linfocitos de los demás componentes sanguíneos (108). Brevemente, en un tubo cónico de 15 mL se mezclaron 2 mL de sangre total con 2 mL de buffer fosfato salina-PBS (1X, pH 7.4) en una dilución 1:1, esta mezcla se transfirió a un tubo cónico de 15 mL previamente cargado con 3 mL del reactivo Histopaque-1077® densidad 1.077 g/mL. Posteriormente se centrifugó a 400x g por 20 minutos, a temperatura ambiente, dando como resultado la formación de cuatro capas diferentes de acuerdo con su densidad. Se recuperó la capa de mononucleares transfiriéndola a un tubo cónico de 15 mL y se retiró el exceso de Histopaque-1077® y de plaquetas mediante lavados con PBS. Se resuspendió el precipitado de células mononucleares en 500 µL de PBS y se confirmó la morfología mediante microscopía. La capa de mononucleares se almacenó en congelación a -20°C hasta su procesamiento para la extracción de ADN.

3.2.2 Extracción de ADN y evaluación de la calidad

La extracción de ADN se realizó a partir de la capa de mononucleares aislada previamente, usando el estuche comercial MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit (APPLIED BIOSYSTEMS), en el equipo semiautomatizado KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración obtenida de ADN de todas las muestras extraídas se evaluó en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), adicionalmente se verificó la calidad de la extracción teniendo en cuenta las relaciones 260/280 (Índice 1.8 -2.0) y 260/230 (Índice >2.2) reportadas por el equipo. Las muestras con calidad insuficiente fueron extraídas nuevamente. El ADN con buenos índices de calidad se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Adicionalmente, a todas las muestras de ADN genómico extraídas se les realizó una evaluación de la presencia de inhibidores de la amplificación, esto mediante la amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) del gen constitutivo o “housekeeping” que codifica para la enzima GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), con 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia), que contiene ADN polimerasa HOT FIREPol®, dNTPs ultrapuros, MgCl₂, colorante EvaGreen® y colorante ROX, usando los primers (**Tabla 1**) y condiciones de amplificación descritas previamente (109). Aquellas muestras de ADN que no presentaron amplificación del gen GAPDH o mostraron una curva de amplificación exponencial (Ct) mayor al ciclo 30, fueron excluidas y a partir de nuevas alícuotas de muestras de linfocitos se realizaron nuevos procesos de extracción de ADN, hasta contar con una muestra que cumpliera las condiciones de calidad y sin inhibidores de la amplificación.

3.2.3 Amplificación de los genes *env* y *tax* del BLV

Como controles para los protocolos de amplificación tanto del gen *env* como de *tax* se utilizó la máster mix con y sin agua Milli-Q® Type I (Merck, Darmstadt, Germany) en lugar de ADN (controles de reactivos), y como control positivo se utilizó ADN procedente de un bovino testado como BLV positivo en un estudio anterior (10), esta muestra de ADN fue donada por investigadores del grupo Biodiversidad y genética molecular “BIOGEM” de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Para la detección molecular del BLV se amplificó un fragmento de 444 pb del gen viral *env* (gp51), mediante un protocolo de PCR anidada (nPCR) usando los primers reportados por Beier et al., 2001 (**Tabla 1**) (30). La primera ronda de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con 50 ng de ADN, 0,625 µl de 10 µmol/L de cada primer 5023-Fw y 5608-Rv, y la enzima MyTaq™ DNA Polymerase, ref: BIO-21105 y el tampón de reacción MyTaq 5X que contiene dNTPs, MgCl₂ y potenciadores en concentraciones óptimas. En la segunda reacción de PCR se utilizaron como ADN molde 3 µl de una dilución 1:10 del amplicon obtenido en la primera ronda de PCR, con las mismas

concentraciones de los reactivos y los primers 5099-Fw y 5521-Rv en un volumen final de 25 μ L. Cada una de las rondas de nPCR se realizaron en un termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, Laboratories, Inc, USA) con los siguientes protocolos: ronda#1 desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; la extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 5 minutos; ronda#2 desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 73.9°C por 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; la extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 5 minutos.

Para la amplificación del gen *tax* del BLV se utilizó un par de primers (**Tabla 1**) previamente reportados en la literatura (16), que amplifican un fragmento de 898 pb de este gen viral. Mediante la técnica de PCR convencional en un volumen final de 25 μ l con 50 ng de ADN, 1.875 μ l de 10 μ mol/L de cada primer taxFw y taxRv, la enzima MyTaq™ DNA Polymerase, ref: BIO-21105 y el tampón de reacción MyTaq 5X que contiene dNTP, MgCl₂ y potenciadores en concentraciones óptimas. En un termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, Laboratories, Inc, USA) con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56.8°C por 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; la extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 5 minutos.

Para reducir la probabilidad de contaminación durante los protocolos de PCR, además del uso de elementos de protección personal (bata, guantes y tapabocas), se realizó el procedimiento de PCR en 3 áreas de laboratorio diferentes: 1) área para la preparación exclusiva de master mix, cerrada y libre de ADN, con entrada y sistema de ventilación, separados del laboratorio principal, con campana de flujo laminar y luz UV; 2) área de adición de ADN molde en un área de laboratorio diferente, dedicada a la manipulación de muestras de ácidos nucleicos, fácilmente descontaminada por luz UV y con limpieza usando etanol grado técnico y agua Milli-Q® Type I (Merck, Darmstadt, Germany), antes y después de cada uso; 3) finalmente el proceso de amplificación y de electroforesis se realizó en una tercera área diferente del laboratorio destinada exclusivamente para estos métodos.

3.2.3 Electroforesis de ADN para la detección de los genes *env* y *tax* del BLV

Los productos de PCR se separaron a 120V durante 35 minutos en un gel de agarosa al 2% con TBE (Tris, borato y EDTA) 1X como buffer tampón, como referente de tamaño y control de corrida se usó un marcador de peso molecular HyperLadder™ 100bp (Meridian Life Science Inc, EE. UU.). Para visualizar las bandas, el ADN y el marcador de peso molecular fueron teñidos en relación 5:1 con EZvision™ Dye (AMRESCO Inc. Cochran Road Solon, EE. UU.), y se visualizaron en el fotodocumentador BioSpectrum@Imaging System (UVP, Nuffield Road, Cambridge, UK).

Tabla 1. Lista de primers para la identificación molecular del BLV

Marcador Molecular	Primers (5'-3')	Tipo de PCR	Tamaño de amplicon (Pb)	Referencia
GAPDH	Fw TGGGTGTGAACCATGAGAAG Rv GCTAAGCAGTTGGTGGTGC	PCR en tiempo real	76	(109)
<i>env</i>	5023-Fw TCTGTGCCAAGTCTCCCAGAT A 5608-Rv AACAACAACCTCTGGGGAGGG T	PCR anidada 1era Ronda	598	
	5099-Fw CCCACAAGGGCGGCGCCGGT TT 5521-Rv GCGAGGCCGGGTCCAGAGCT GG	PCR anidada 2da Ronda	444	(30)
<i>tax</i>	taxFW GGCCCCACTCTCTACATGC taxRV CGGGAGAGCCATTCATTT	PCR convencional	898	(16)

3.3 Plan de análisis de datos

3.3.1 Análisis molecular basado en las secuencias del BLV

Las muestras en las que se observó el tamaño de banda esperado para los genes *env* y *tax* del BLV por medio de electroforesis en gel de agarosa, se enviaron a secuenciar bidireccionalmente utilizando tecnología Sanger en el servicio comercial Psomagen (Rockville, Maryland, Estados Unidos) utilizando los mismos pares de primers utilizados para su amplificación mediante PCR.

Las secuencias parciales de ADN obtenidas de los genes virales fueron editadas y alineadas en el programa Geneious® 9.1.2 (Wellesley St, Auckland, New Zealand); desde el mismo programa se realizó un análisis de secuencias muy similares-Megablast (NCBI, GenBank) a cada secuencia consenso para evaluar su porcentaje de identidad con relación a las secuencias reportadas en el GenBank (NCBI, NIH Bethesda (EE. UU.), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

3.3.2 Análisis de filogenia molecular para la identificación del genotipo del BLV

Se construyó un alineamiento múltiple de las 12 secuencias obtenidas en este estudio (incluyendo la secuencia de la muestra usada como control positivo) y se determinó el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias. Los análisis se realizaron utilizando el modelo de distancias p en MEGA 11 (110). Las posiciones de los codones incluidas fueron 1st+2nd+3rd++No codificantes. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares).

Para el análisis filogenético, se construyó un dataset con las secuencias de ADN obtenidas de los genes virales en este estudio y con secuencias de referencia de bovinos

pertenecientes a los 12 genotipos reportados previamente a nivel mundial, disponibles en el GenBank (**Anexo 4**). Estas secuencias fueron alineadas usando el alineamiento múltiple ClustalW en el programa MEGA versión 11 bajo la configuración automática del programa (111).

Después de obtener el alineamiento múltiple del conjunto de datos completo, las relaciones filogenéticas fueron inferidas a partir del método de Máximo Likelihood (ML) usando el software IQ-TREE versión 2.2.0. Se realizó una selección previa del modelo de sustitución de nucleótidos más relevante y acorde al conjunto de datos a analizar, usando el plugin de jModelTest integrado en el mismo software de reconstrucción filogenética, teniendo en cuenta el estadístico Bayesian Information Criterion (BIC) y un ajuste ultrafast bootstrap de 1000 réplicas. En este estudio no se incluyó un outgroup para enraizar el árbol, debido a que no se encontraron secuencias de especies cercanas al BLV, que permitieran una correcta visualización del árbol filogenético. La visualización y edición final del árbol filogenético obtenido se llevó a cabo en los programas FigTree versión 1.4.4 (Andrew Rambaut, 2007, <http://tree.bio.ed.ac.uk/>) e Inkscape versión 1.2.1 (Inkscape Project, 2020, <https://inkscape.org>).

De manera complementaria para el análisis, se reconstruyó una red de haplotipos con el conjunto de datos alineado, estas se identificaron usando el formato Nexus con el bloque TRAITs, y fue construido en el software PopArt versión 1.7. (Leigh, JW, Bryant D, 2015, <https://popart.maths.otago.ac.nz/>) paralelamente, se utilizó el modelo Median-joining, basado en 1000 iteraciones con los parámetros predeterminados por el software.

3.3.3 Sustituciones aminoacídicas en la proteína gp51 del BLV aisladas en humanos

Para observar los cambios de aminoácidos presentes en las secuencias del BLV aisladas de los participantes incluidos en este estudio, se alinearon las 11 secuencias recuperadas de humanos con la secuencia de referencia del BLV MT452070, usando clustal W, y posteriormente se tradujeron las secuencias nucleotídicas a aminoácidos utilizando el programa MEGA 11 (111).

3.3.4 Análisis estadístico descriptivo e inferencial de factores asociados a la detección molecular del BLV

Para describir la población de estudio se estimaron frecuencias absolutas y relativas, en el caso de las variables cualitativas tales como sexo, escolaridad, actividad que desempeña, etc., en el caso de las variables cuantitativas como edad y tiempo realizando la actividad se calculó mediana con rangos intercuartílicos (P25, P75). Para determinar la frecuencia de la detección molecular del BLV en las muestras analizadas se estimaron frecuencias absolutas.

Para explorar los posibles factores asociados con la detección molecular del BLV, en el caso de variables independientes cualitativas se usaron pruebas Chi cuadrado o test exacto de Fisher, dependiendo de la frecuencia de cada evento (>5 o <5. respectivamente) y en el caso de las variables independientes cuantitativas, se usó la prueba U de Mann Whitney. La normalidad de las variables cuantitativas se determinó usando la prueba Shapiro-Wilk.

Se realizó un modelo de regresión mixto de Poisson con enlace Log, en el que el clúster fue el hato, con el fin de estimar las razones de prevalencia crudas y ajustadas con intervalos de confianza (IC) del 95%. Se consideró la ocurrencia de asociación y de diferencias significativas a aquellas comparaciones que presentaron valores $p < 0.05$. En el modelo multivariado se incluyeron aquellas variables que cumplieron con el criterio estadístico de un valor de $p < 0.05$ después de realizar el análisis bivariado, por considerarse importantes en la historia natural del BLV o por tratarse de factores de riesgo previamente descritos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Jamovi versión 2.3.18 (The jamovi project, 2023, <https://www.jamovi.org>).

4 Resultados

4.1 Características sociodemográficas de la población estudiada

En este estudio se incluyeron muestras de 164 (N) trabajadores de 51 hatos lecheros, ubicados en las subregiones Norte (N=106), Valle de Aburrá (N=35) y Oriente (N=23) del departamento de Antioquia.

Como muestra la tabla 2, el 82% de los participantes fueron hombres, y presentaron una mediana de la edad de 41 años (IQR: 22, 73). El 48.2% de los participantes contaban con formación académica a nivel de primaria y sólo 18.3% con estudios de técnico/tecnólogo o profesional. El 97.6% de los participantes pertenecían al régimen contributivo del sistema de seguridad social en salud.

El 50% de los participantes llevaban 7 años o menos trabajando en el hato donde fueron captados. El 94.5% de los participantes reportó contacto frecuente con vacas y solo el 4.3% de ellos reportó no tener contacto con ningún tipo de animales en el lugar de trabajo. El 50% de los participantes tenían contacto con los bovinos durante 8 horas al día o menos (IQR: 4, 12). Entre los trabajadores incluidos en este estudio, las actividades o funciones desempeñadas en el hato con mayor frecuencia fueron el ordeño de los bovinos 62.8% (103/164), el cuidado de crías 53.7% (88/164) y la asistencia de partos de animales 51.8% (85/164). La ocupación previa más frecuente dentro de los participantes correspondió al oficio de ordeñador 45.7% (75/164).

El 92.7% (152/164) de los participantes reporto exposición a abortos de bovinos, y el 80.5% (132/164) reporto haber estado expuesto, presenciado o ayudado en partos de bovinos. Los participantes reportaron contacto frecuente con fluidos biológicos provenientes de los animales, tales como leche cruda (95.7%), saliva (87.7%), sangre (83.5%), fluidos vaginales (74.4%) y semen (57.3%), así mismo reportaron contacto frecuente con placenta (80.5%), material fecal (92.1%) y lana o pieles de los animales (95.1%). El 45.7% (75/164) de los participantes reportó el consumo frecuente de leche

cruda, a diferencia del consumo de carne cruda o poco cocida que fue reportada por el 3% de las personas (5/164).

Respecto a las medidas higiénico-sanitarias, el 97% (152/164) de las personas reportó el lavado de manos después de trabajar con los animales. Mientras que el 79.9% (131/164) de ellos reportó el uso de elementos de protección personal al momento de trabajar con los animales, principalmente botas (97.6%), guantes (69.5%) y overol (44.5%). El 63% (103/164) de los participantes reportó antecedentes de accidentes laborales durante el trabajo con los animales, incluidos pinchazos con agujas (47%; 77/164) y heridas con material quirúrgico, como cuchillas o bisturís (15.9%; 26/164).

Los participantes reportaron la presencia en el lugar de trabajo de insectos hematófagos, como mosquitos (91.5%) y tábanos (32.3%). Se indagó a los participantes, por antecedentes de ocurrencia de signos y síntomas relacionados con la infección por BLV en los animales con que trabajan, los más frecuentes reportados fueron ganglios preescapulares y femorales agrandados (29.9%), disminución en la producción de leche (39%) y caquexia (28%).

Respecto a los antecedentes clínicos de los participantes, las enfermedades de base o crónicas no fueron reportadas con frecuencia en la población de estudio; el 10.4% (17/164) de los participantes reportó diagnóstico previo de hipertensión, el 36% (59/164) reportaron antecedentes de cáncer en la familia, sin especificar el tipo de cáncer y el 11% (18/164) reportó cáncer de mama como antecedente familiar. El 26.8% (44/164) de los participantes consideraba que había presentado episodios recurrentes de fiebre en los 6 meses previos al momento de muestreo ejecutado en este estudio.

Tabla 2. Descripción de las características epidemiológicas, ambientales y clínicas de las personas

Valle de Aburrá	Norte	Oriente	Total	p-value
N = 35 (21%)	N = 106 (65%)	N = 23 (14%)	N = 164	
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	

CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS

Edad¹	43 (35, 49)	39 (33, 48)	45 (32, 56)	41 (22, 73)	0.29
Sexo					0.36
Masculino	31 (89%)	83 (78%)	20 (87%)	134 (81.7%)	
Femenino	4 (11%)	23 (22%)	3 (13%)	30 (18.3%)	
Pertenencia étnica					0.58
Afrocolombiano	0 (0%)	1 (0.9%)	0 (0%)	1 (0,1%)	
Indígena	1 (2.9%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,1%)	
Otro	34 (97%)	105 (99%)	23 (100%)	162 (98,8%)	
Régimen seguridad social					>0.99
Contributivo	34 (97%)	103 (97%)	23 (100%)	160 (97,6%)	
Subsidiado	1 (2.9%)	3 (2.8%)	0 (0%)	4 (2,4%)	
Escolaridad					0.04
Primaria	12 (34%)	52 (49%)	15 (65%)	79 (48.2%)	
Secundaria	12 (34%)	39 (37%)	4 (17%)	55 (33.5%)	
Técnico/Tecnólogo	5 (14%)	3 (2.8%)	0 (0%)	8 (4.9%)	
Profesional/Posgrado	6 (17%)	12 (11%)	4 (17%)	22 (13.4%)	
FACTORES DE RIESGO PARA LA INFECCIÓN POR BLV					
Tiempo trabajando en el hato (años)¹	4 (1, 8)	2 (1, 7)	4 (2, 12)	3(1, 8)	0.064
Ocupación en el hato					
Mayordomo	7 (20%)	24 (23%)	3 (13%)	34 (20.7%)	0.66
Cuidado de crías	20 (57%)	54 (51%)	14 (61%)	88 (53.7%)	0.62
Ordeñador	20 (57%)	69 (65%)	14 (61%)	103 (62.8%)	0.69
Asistencia de partos	20 (57%)	52 (49%)	13 (57%)	85 (51.8%)	0.63
Transporte de animales/productos agrícolas	19 (54%)	46 (43%)	12 (52%)	77 (47%)	0.46
Manejo de animales en labores diferentes al ordeño	1 (2.9%)	1 (0.9%)	0 (0%)	2 (1.2%)	0.58
Manejo de potreros	18 (51%)	52 (49%)	13 (57%)	83 (50.6%)	0.81
Encierro	15 (43%)	51 (48%)	9 (39%)	75 (45.7%)	0.68
Vacunación	17 (49%)	50 (47%)	12 (52%)	79 (48.2%)	0.91

Baño de los animales	19 (54%)	45 (42%)	9 (39%)	73 (44.5%)	0.41
Sector agrícola	4 (11%)	24 (23%)	2 (8.7%)	30 (18.3%)	0.18
Sacrificio de los animales	1 (2.9%)	9 (8.5%)	0 (0%)	10 (6.1%)	0.34
Veterinario	1 (2.9%)	8 (7.5%)	1 (4.3%)	10 (6.1%)	0.71
Zootecnista	3 (8.6%)	8 (7.5%)	2 (8.7%)	13 (7.9%)	>0.99
Ama de casa	1 (2.9%)	12 (11%)	1 (4.3%)	14 (8.5%)	0.3
Administrativo	3 (8.6%)	7 (6.6%)	0 (0%)	10 (6.1%)	0.44
Otras*	10 (29%)	31 (29%)	7 (30%)	48 (29.3%)	0.99
Ocupación Previa					
Mayordomo	8 (23%)	18 (17%)	4 (17%)	30 (18.3%)	0.69
Ordeñador	18 (51%)	46 (43%)	11 (48%)	75 (45.7%)	0.69
Manejo de potreros	8 (23%)	20 (19%)	0 (0%)	28 (17.1%)	0.03
Encierro	8 (23%)	20 (19%)	0 (0%)	28 (17.1%)	0.03
Vacunación	8 (23%)	21 (20%)	0 (0%)	29 (17.7%)	0.03
Baño	7 (20%)	20 (19%)	0 (0%)	27 (16.5%)	0.045
Cuidado de crías	8 (23%)	23 (22%)	0 (0%)	31 (18.9%)	0.022
Asistencia de partos	8 (23%)	19 (18%)	0 (0%)	27 (16.5%)	0.031
Transporte de animales/productos agrícolas	5 (14%)	16 (15%)	0 (0%)	21 (12.8%)	0.12
Veterinario	0 (0%)	7 (6.6%)	1 (4.3%)	8 (4.9%)	0.3
Zootecnista	2 (5.7%)	5 (4.7%)	1 (4.3%)	8 (4.9%)	>0.99
Otras	8 (23%)	49 (46%)	8 (35%)	65 (39.6%)	0.044
Contacto frecuente con animales					
Perros	22 (63%)	79 (75%)	15 (65%)	116 (70.7%)	0.35
Vacas	35 (100%)	97 (92%)	23 (100%)	155 (94.5%)	0.11
Cabras	1 (2.9%)	2 (1.9%)	1 (4.3%)	4 (2.4%)	0.6
Caballos	20 (57%)	61 (58%)	17 (74%)	98 (59.8%)	0.33
Ovejas	3 (8.6%)	3 (2.8%)	2 (8.7%)	8 (4.9%)	0.2
Sin contacto	0 (0%)	7 (6.6%)	0 (0%)	7 (4.3%)	0.16
Tenencia de animales en la residencia					

Perros	18 (51%)	71 (67%)	14 (61%)	103 (62.8%)	0.25
Vacas	6 (17%)	9 (8.5%)	1 (4.3%)	16 (9.8%)	0.24
Caballos	2 (5.7%)	5 (4.7%)	0 (0%)	7 (4.3%)	0.73
Horas de contacto con bovinos al día					
<8horas	27 (77%)	53 (50%)	11 (48%)	91 (55.5%)	0.014
>8horas	8 (23%)	53 (50%)	12 (52%)	73 (44.5%)	
Exposición a partos/abortos					
Abortos de bovinos	33 (94%)	97 (92%)	22 (96%)	152 (92.7%)	0.83
Abortos de mascotas	2 (5.7%)	6 (5.7%)	0 (0%)	156 (95.1%)	0.75
Partos de vacas	28 (80%)	84 (79%)	20 (87%)	132 (80.5%)	0.8
Partos de perras	1 (2.9%)	5 (4.7%)	0 (0%)	6 (3.7%)	0.84
Partos humanos	1 (2.9%)	1 (0.9%)	1 (4.3%)	3 (1.8%)	0.29
Contacto frecuente con fluidos biológicos de los animales					
Sangre	29 (83%)	88 (83%)	20 (87%)	137 (83.5%)	0.95
Fluidos vaginales	27 (77%)	77 (73%)	18 (78%)	122 (74.4%)	0.78
Semen	23 (66%)	62 (58%)	9 (39%)	94 (57.3%)	0.12
Saliva	31 (89%)	92 (87%)	21 (91%)	144 (87.7%)	0.94
Orina	4 (11%)	14 (13%)	2 (8.7%)	20 (12.2%)	0.94
Materia fecal	33 (94%)	97 (92%)	21 (91%)	151 (92.1%)	0.92
Leche cruda	34 (97%)	100 (94%)	23 (100%)	157 (95.7%)	0.62
Placenta	28 (80%)	85 (80%)	19 (83%)	132 (80.5%)	>0.99
Lana o pieles	33 (94%)	100 (94%)	23 (100%)	156 (95.1%)	0.75
Heno o paja	22 (63%)	85 (80%)	21 (91%)	128 (78%)	0.025

Exposición a artrópodos en el trabajo y residencia

Moscas (trabajo)	34 (97%)	99 (93%)	23 (100%)	156 (95.1%)	0.57
Mosquitos (trabajo)	32 (91%)	96 (91%)	22 (96%)	150 (91.5%)	0.92
Pulgas (trabajo)	6 (17%)	25 (24%)	8 (35%)	39 (23.8%)	0.3
Tábanos (trabajo)	5 (14%)	31 (29%)	17 (74%)	53 (32.3%)	<0.001
Moscas (residencia)	15 (43%)	88 (83%)	18 (78%)	121 (73.8%)	<0.001
Mosquitos (residencia)	18 (51%)	82 (77%)	16 (70%)	116 (70.7%)	0.014
Pulgas (residencia)	4 (11%)	10 (9.4%)	5 (22%)	19 (11.6%)	0.27

Medidas higiénico-sanitarias

Lavado manos antes de comer	35 (100%)	104 (98%)	23 (100%)	162 (98.8%)	>0.99
Lavado manos antes de preparar los alimentos	31 (89%)	99 (93%)	23 (100%)	153 (93.3%)	0.26
Lavado manos después de usar el baño	35 (100%)	105 (99%)	23 (100%)	163 (99.4%)	>0.99
Lavado de manos posterior al trabajo con animales	33 (94%)	103 (97%)	23 (100%)	159 (97%)	0.65
Consumo de leche cruda	17 (49%)	45 (42%)	13 (57%)	75 (45.7%)	0.44
Consumo de derivados lácteos sin pasteurizar	26 (74%)	83 (78%)	13 (57%)	122 (74.4%)	0.1
Consumo de carne cruda o poco cocida	1 (2.9%)	4 (3.8%)	0 (0%)	5 (3%)	>0.99

Uso de elementos de protección personal (EPP) al trabajar con los animales

EPP	29 (83%)	81 (76%)	21 (91%)	131 (79.9%)	0.24
Guantes	27 (77%)	70 (66%)	17 (74%)	114 (69.5%)	0.41
Tapabocas	12 (34%)	26 (25%)	7 (30%)	45 (27.4%)	0.5
Gafas	5 (14%)	12 (11%)	1 (4.3%)	18 (11%)	0.58
Botas	34 (97%)	103 (97%)	23 (100%)	160 (97.6%)	>0.99

Overol	18 (51%)	46 (43%)	9 (39%)	73 (44.5%)	0.61
Delantal	3 (8.6%)	2 (1.9%)	0 (0%)	5 (3%)	0.1
Reporte de accidentes laborales					
Accidente con agujas	12 (34%)	53 (50%)	12 (52%)	77 (47%)	0.23
Accidente con material quirúrgico	2 (5.7%)	21 (20%)	3 (13%)	26 (15.9%)	0.12
Reporte de antecedentes de signos y síntomas en los animales del hato					
Caquexia	3 (8.6%)	31 (29%)	12 (52%)	46 (28%)	0.001
Disminución en la producción de leche	17 (49%)	42 (40%)	5 (22%)	64 (39%)	0.12
Ganglios preescapulares y femorales agrandados	26 (74%)	18 (17%)	5 (22%)	49 (29.9%)	<0.001
Tumores	15 (43%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (9.1%)	<0.001
Exoftalmia	15 (43%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (9.1%)	<0.001
Mastitis	10 (29%)	66 (62%)	13 (57%)	89 (54.3%)	0.002
Fiebre de leche	0 (0%)	5 (4.7%)	0 (0%)	5 (3%)	0.4
ANTECEDENTES CLÍNICOS Y CONDICIONES DE RIESGO DE LAS PERSONAS					
Diabetes	0 (0%)	1 (0.9%)	1 (4.3%)	2 (1.2%)	0.31
Hipertensión	2 (5.7%)	11 (10%)	4 (17%)	17 (10.4%)	0.38
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.3%)	1 (0.6%)	0.14
Presentación de Episodios febriles en los últimos 6 meses	5 (14%)	32 (30%)	7 (30%)	44 (26.8%)	0.17
Antecedentes de algún tipo de cáncer en la familia	14 (40%)	40 (38%)	5 (22%)	59 (36%)	0.3
Antecedentes de cáncer de mama	3 (8.6%)	12 (11%)	3 (13%)	18 (11%)	0.81
Hábito de fumar	1 (2.9%)	16 (15%)	2 (8.7%)	19 (11.6%)	0.12
Consumo de licor	22 (63%)	62 (58%)	13 (57%)	97 (59.1%)	0.87

¹ Mediana (P25, P75)

*Otras incluye: Estudiantes de posgrados en ciencias pecuarias, ingeniería agropecuaria, jardinería y oficios varios

4.2 Detección molecular del BLV mediante la amplificación por PCR de los genes *env* y *tax*

Previo a la detección viral en las muestras de los participantes, se realizó la estandarización de la concentración y la temperatura de *annealing* óptima de los primers (**Anexo 5**), y se evaluó la calidad del ADN de las muestras mediante qPCR's diseñadas para amplificar el gen de la enzima GAPDH. Todas las muestras dieron positivo para el gen, lo que indicó que el ADN estaba libre de inhibidores de la amplificación por PCR y cumplía con condiciones de calidad para el análisis molecular (**Anexo 6**).

Mediante el análisis molecular implementado en este estudio, se detectó el gen *env* del BLV en el 13.4% (22/164) de las muestras de sangre periférica analizadas (**Anexo 7**). No se obtuvo amplificación del gen *tax* del BLV en ninguna de las 164 muestras obtenidas de los participantes (**Anexo 8**).

El 77% (17/22) de los participantes positivos al gen *env* de BLV fueron captados en la subregión Norte, específicamente en hatos ubicados en los municipios de Entreríos 18% (3/17), Belmira 29% (5/17), San José de la Montaña 6% (1/17), San Pedro de los Milagros 18% (3/17) y Santa Rosa de Osos 29% (5/17). El 14% (3/22) de los participantes positivos para la detección molecular del BLV se encontraban ubicados en la subregión del Valle de Aburrá, en los municipios de Girardota, Medellín (corregimientos Santa Elena y San Antonio de Prado), y el porcentaje restante 9.1% (2/22) procedían de los municipios de Marinilla y Rionegro, localizados en la subregión Oriente de Antioquia.

4.3 Análisis de las secuencias de ADN obtenidas e identificación de los genotipos del BLV

De las 22 muestras consideradas como positivas por la amplificación del gen *env* del BLV, se secuenciaron 11 amplicones bidireccionalmente. Asimismo, se obtuvo la

secuencia de ADN correspondiente a la muestra de ADN que fue usada en este estudio como control positivo en los ensayos de PCR. En el análisis Megablast de las secuencias se obtuvieron porcentajes de identidad que variaron entre el 99.5% y el 100%, respecto a las secuencias del BLV disponibles en el GenBank (**Tabla 3**).

Con el alineamiento múltiple de las 12 secuencias obtenidas en este estudio (11 de humanos y el control positivo de bovino), se determinaron las distancias genéticas pareadas netas (p), las cuales fluctuaron entre 0.000 y 0.019 con un promedio de 0.002. Existen tres secuencias en las que se observó la mayor diferencia en las secuencias de nucleótidos, estas fueron: OR636724, OR636726 y OR636730, estas distancias son un estimador de la tasa de mutación del conjunto de datos y una medida estándar de variación por lo cual se debe analizar el tipo de mutación que resulta de estas distancias genéticas (**Anexo 6**).

Tabla 3. Información de las secuencias obtenidas en este estudio y los resultados del análisis Megablast

Nro Acceso GenBank	INFORMACIÓN SECUENCIACIÓN ¹		DE	LA	SECUENCIA CONSENSO ²			MEGABLAST		
	Nombre de la secuencia	%HQ	Longitud	%GC	% Sitios idénticos	%GC	Longitud secuencia	% Identidad	E Value	Secuencia referencia ³
OR636720	12_env5099	94.9	312	45.5	100	48.8	434	99.9	0	AB987702
	12_env5521	94.4	372	51.6						
OR636721	35_env5099	36.1	320	61.1	100	50.8	320	100	2.27E-164	AB987702
	35_env5521	99.8	36	49.7						
OR636722	51_env5099	98.9	357	48.7	100	49.7	407	100	0	AB987702
	51_env5521	94.7	358	50.6						
OR636723	55_env5099	35	40	60	100	52.3	342	100	1.44E-176	AB987702
	55_env5521	96.5	342	50.3						
OR636724	85_env5099	89.6	335	47.2	100	49.4	426	99.6	0	AB987702
	85_env5521	93.7	366	51.4						
OR636725	96_env5099	70.5	356	48.3	99.7	49.1	417	99.9	0	AB987702
	96_env5521	90.7	353	49.9						
OR636726	119_env5099	88.9	325	47.1	100	49	495	99.5	0	AP018008

	119_env552 1	91	391	50.6						
OR636727	125_env509 9	35.5	31	61.3	100	51.8	338	100	2.37E -174	AB987702
	125_env552 1	92.6	338	50.9						
OR636728	138_env509 9	6.7	239	49.8	100	51	435	99.8	0	AP018008
	138_env552 1	96.6	435	51.7						
OR636729	140_env509 9	95.8	310	46.5	100	48.3	395	99.6	0	AB987702
	140_env552 1	94.3	350	50						
OR636730	150_env509 9	97.5	284	45.8	100	48.6	396	99.7	0	AB987702
	150_env552 1	97.1	342	50.9						
BOVINO CONTROL POSITIVO	CP_env5099	77.7	421	50.7	90.7	51.2	469	99.7	0	AB987702
	CP_env5521	87.4	420	51.7						

1. No se observaron ambigüedades en las secuencias

2.El alineamiento se obtuvo usando el método MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform)

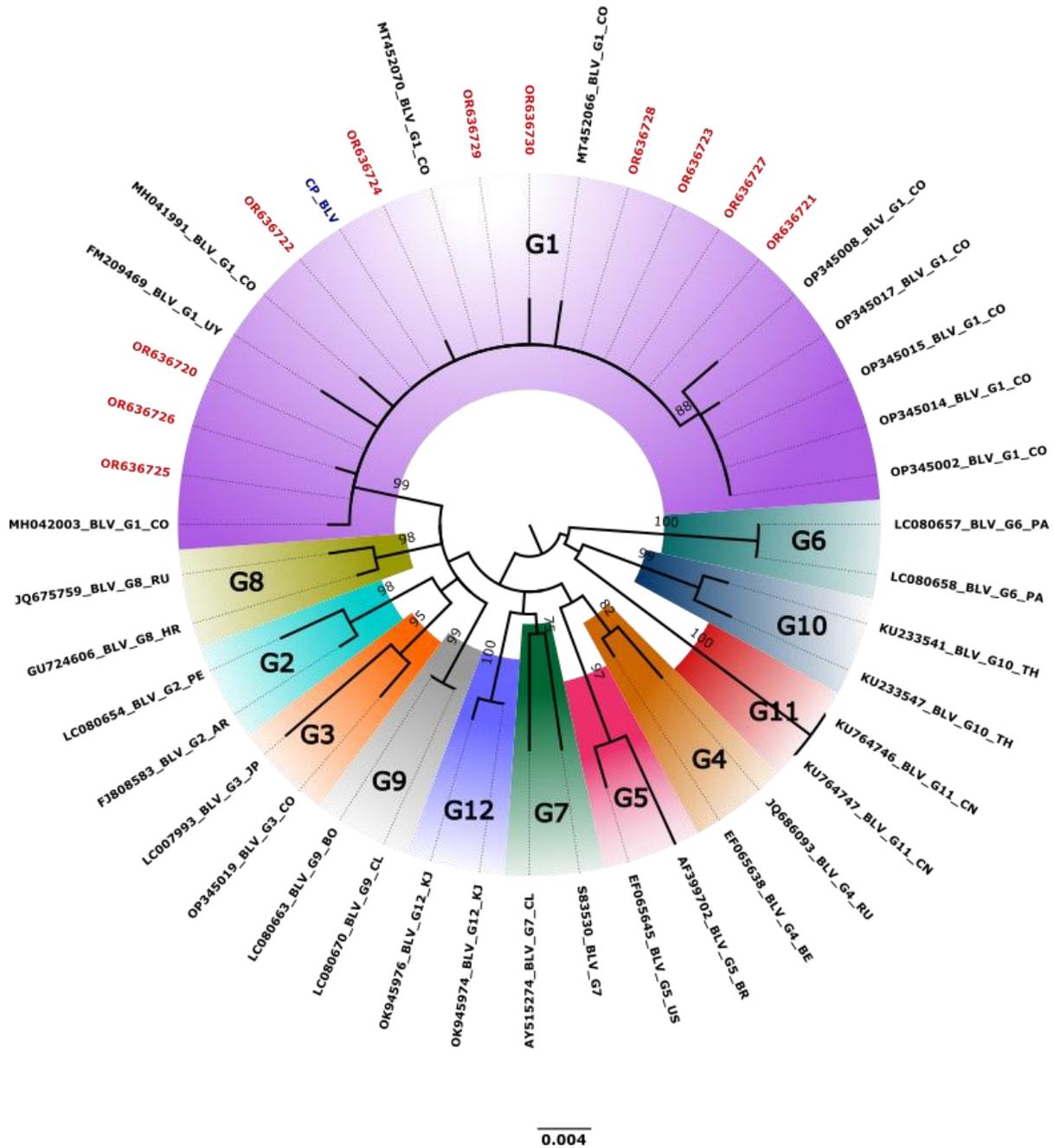
3. Secuencia con mayor % de identidad

La identificación de los genotipos del BLV se realizó mediante el análisis de filogenia molecular. En dicho análisis se incluyeron las 11 secuencias de nucleótidos del gen *env* del BLV recuperadas de humanos en este estudio en las muestras de linfocitos obtenidos de sangre periférica de trabajadores de hatos lecheros del departamento de Antioquia y la secuencia obtenida de la muestra de ADN bovino que se usó como control positivo en los ensayos de PCR; estas secuencias se alinearon con 32 secuencias de referencia del gen *env* del BLV, obtenidas de bovinos en diferentes regiones alrededor del mundo y reportadas en GenBank. Se obtuvo una matriz con una extensión de 137 caracteres. Posteriormente las relaciones filogenéticas fueron inferidas a partir de las secuencias parciales del gen *env* del BLV, usando el método de ML, con el modelo de sustitución de nucleótidos: K2+G (gamma: 0.592) (**Figura 6**).

Se observó que las secuencias de referencia de los 12 genotipos del virus reportadas previamente en bovinos se separan adecuadamente en linajes diferentes, formando 12 clados monofiléticos con un soporte de rama mayor a 70%. Las secuencias

del BLV obtenidas de sangre periférica de los trabajadores de hatos lecheros, se agruparon en un clado monofilético con las secuencias provenientes de bovinos reportadas previamente como genotipo 1 del BLV, dentro de estas últimas se incluyeron secuencias obtenidas por Úsuga-Monroy et al., 2018 (10), obtenidas de bovinos en las mismas subregiones del departamento de Antioquia en las cuales se realizó este estudio.

Figura 6. Árbol filogenético inferido a partir de un dataset de nucleótidos del gen *env* del BLV usando análisis ML



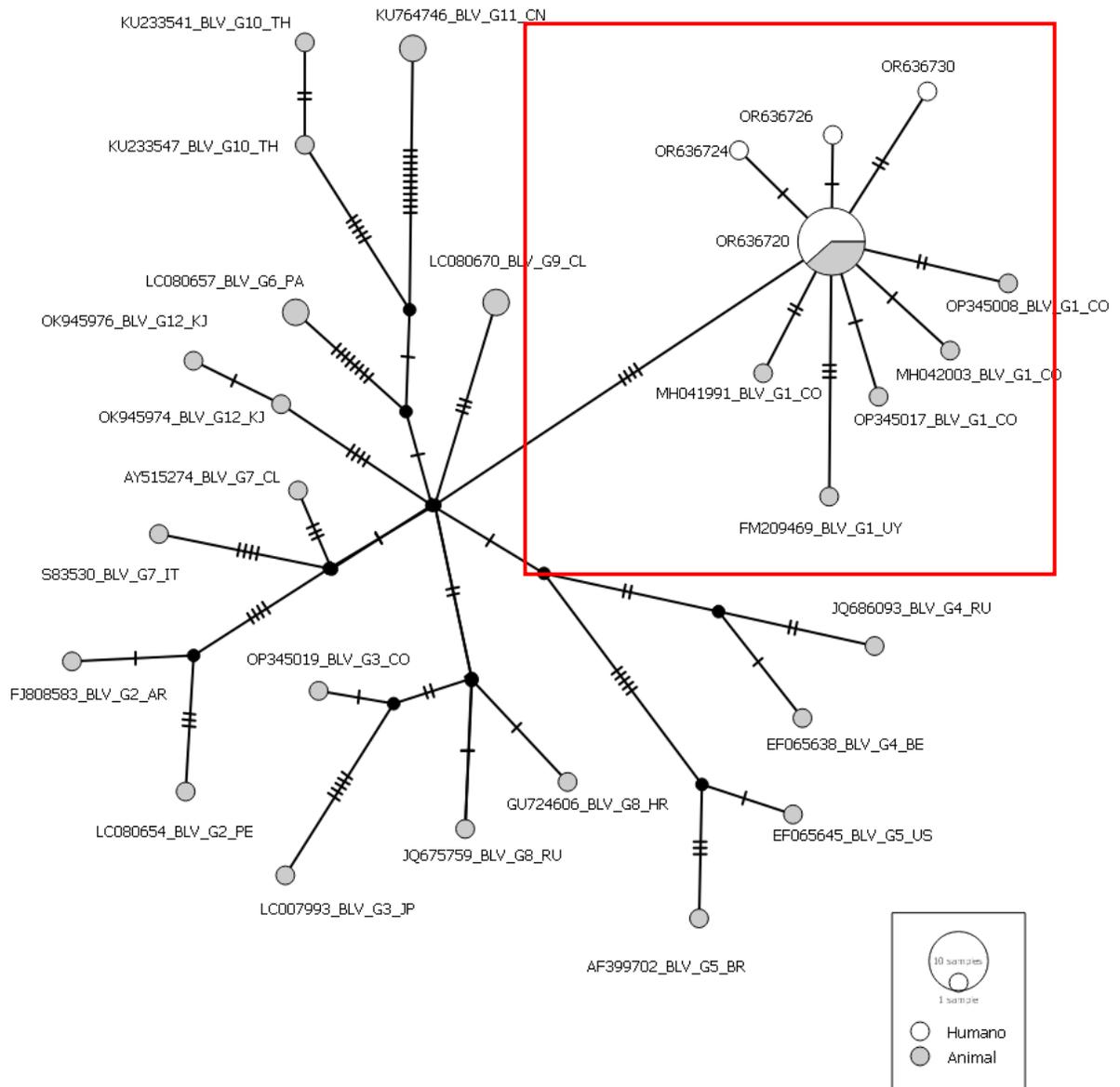
Nota: Se muestra la relación entre los genotipos descritos para el BLV. La longitud de la barra indica el número de sustituciones por sitio. Los porcentajes de ultrafast bootstrap se muestran en las ramas. Las secuencias de referencia obtenidas del GenBank, provenientes de bovinos de diferentes países, se encuentran en color negro, mientras que las secuencias obtenidas en esta investigación, provenientes de

los trabajadores de hatos lecheros de Antioquia se encuentran en color rojo. El control positivo usado en los ensayos de amplificación por PCR se encuentra indicado en color azul.

De manera complementaria y exploratoria, se realizó un análisis de red de haplotipos para evaluar los patrones de distribución del BLV entre los bovinos y los humanos que se analizaron en este estudio, los posibles perfiles de diseminación y las eventuales redes de transmisión entre estas dos poblaciones. En la **figura 7** se observa una gran heterogeneidad de haplotipos independiente del origen de las secuencias (humano o animal). Estos haplotipos se agruparon en nodos cercanos formando clústeres que se estaban asociados al genotipo reportado previamente para cada una de las secuencias, lo cual se relacionó con los patrones de agrupación observados también en el análisis de filogenia molecular, dándole soporte a la relación filogenética inferida en este trabajo.

Las secuencias obtenidas de humanos en este trabajo se agruparon en clústeres con secuencias provenientes de bovinos de las mismas zonas donde se realizó este trabajo (cuadro rojo), lo cual indica que se trata de secuencias estrechamente relacionadas, sugiriendo la detección de haplotipos del BLV compartidos entre bovinos y humanos de Antioquia.

Figura 7. Red de haplotipos del BLV obtenida a partir del alineamiento múltiple del conjunto de datos



Nota: Realizado con la herramienta Median-Joining en PopArt. El tamaño de los círculos representa la frecuencia de haplotipos idénticos obtenidos en este estudio. Las líneas transversales entre las líneas que conectan a los haplotipos representan las diferencias entre las secuencias con respecto a las sustituciones nucleotídicas detectadas en el conjunto de datos analizado. Se generaron automáticamente pequeños

círculos negros para estimar los conectores de las secuencias analizadas. Los haplotipos que se muestran dentro del cuadrado rojo indican aquellos en los que se encuentran secuencias colombianas de origen humano (de este estudio) y animal (Reportadas en el GenBank). Diversidad de nucleótidos π 0.0166599, número de sitios segregantes=74, número de sitios informativos sobre la parsimonia= 48

4.4 Análisis de las secuencias aminoacídicas de la proteína gp51 del BLV traducidas a partir de las secuencias de ADN de este estudio

El análisis incluyó 106 aminoácidos, ubicados en la región comprendida entre el aminoácido 101 y 206 de la proteína gp51 del BLV. Se puede apreciar que las sustituciones de aminoácidos en la proteína de las secuencias en este estudio en comparación con la secuencia del BLV MT452070 no son muy frecuentes. Para validar que los cambios de aminoácidos encontrados no fueran un artefacto del secuenciamiento, las secuencias se compararon con los electroferogramas correspondientes y las variaciones respecto a la secuencia de referencia se consideraron válidas solo si coincidían tanto en la dirección directa como en la inversa. Se observaron dos sustituciones, situadas en el segundo dominio de neutralización de la proteína gp51, una sustitución de Leucina (L) por Fenilalanina (F) en la posición 149 de la proteína en la secuencia OR636726, se cambia un aminoácido alifático por uno aromático, ambos con propiedades físicas y químicas similares, y una sustitución de Prolina (P) por Serina (S) en la posición 179 de la proteína en la secuencia OR636724, se cambia un aminoácido apolar por uno polar con menor tamaño.

4.5 Análisis de los factores asociados con la detección molecular del BLV en la población estudiada

En el análisis bivariado, considerando los resultados obtenidos de la detección molecular del BLV respecto a las características sociodemográficas, epidemiológicas y los antecedentes ocupacionales de los participantes, se observaron variables relacionadas ($p < 0.05$), tales como, la ocupación de veterinario, tanto en los participantes que lo reportaron como su oficio al momento del muestreo (RP = 3.42 IC95%= 1.43- 8.21 $p = 0.01$), como en aquellos que lo reportaron como un oficio u ocupación previa (RP = 3.08 IC95%= 1.15- 8.28 $p = 0.04$) y el antecedente de accidente con material quirúrgico durante el trabajo con los animales (RP= 3.03 IC95%= 1.42-6.50 $p = 0.005$)(**Tabla 4**).

Tabla 4. Análisis bivariado entre las características sociodemográficas, los factores epidemiológicos, ambientales y las características clínicas de los trabajadores de hatos lecheros de Antioquia y la detección molecular del BLV

Variable	Positividad n/N (%)	RP (IC 95%)	P
Características sociodemográficas			
Edad (años)			0.99
<30	4/27(14.8)	1.63 (0.20-13)	
30-40	8/55 (14.5)	1.60 (0.22-11)	
41-50	6/48 (12.5)	1.38 (0.18-10)	
51-60	3/23 (13.0)	1.43 (0.17-12)	
>60	1/11 (9.1)	1	
Sexo			0.61
Masculino	18/134 (13.4)	1	
Femenino	4/30 (13.3)	1 (0.36-2.72)	
Subregión			0.44

Norte	17/106 (16.0)	1.9 (0.18-6)	
Valle de Aburrá	3/35 (8.6)	1	
Oriente	2/23 (8.7)	1 (0.58-6)	
Escolaridad			0.57
Primaria	12/79 (15.2)	1.11 (0.35-3.6)	
Secundaria	5/55 (9.1)	0.67 (0.17-2.5)	
Técnico/Tecnólogo	2/8 (25.0)	1.83 (0.4-9)	
Profesional/posgrado	3/22 (13.6)	1	
Ocupación actual			
Sector agrícola			0.24
Si	6/30 (20.0)	1.68 (0.76- 3.92)	
No	16/134 (11.9)		
Zootecnista			0.28
Si	3/13 (23.1)	1.83 (0.62- 5.39)	
No	19/151 (12.6)		
Veterinario			0.01
Si	4/10 (40.0)	3.42 (1.43- 8.21)	
No	18/154 (11.7)		
Tiempo trabajando en el hato (años)			0.37
<1	3/35 (8.6)	1	
1-5	12/75 (16.0)	1.9 (0.60-6.20)	
6-10	5/24 (20.8)	2.49 (0.64-9.22)	
>10	2/30 (6.7)	0.78 (0.13-4.35)	
Ocupación previa			
Mayordomo			0.24
Si	6/30 (20.0)	1.68 (0.72-3.92)	
No	16/134 (11.9)		
Veterinario			0.04
Si	3/8 (37.5)	3.08 (1.15- 8.28)	

No	19/156 (12.2)		
Zootecnista			0.28
Si	3/13 (23.1)	1.83 (0.62- 5.39)	
No	19/151 (12.6)		
Antecedente de picadura por mosquitos (mes previo)			0.05
Si	6/77 (7.8)	0.424(0.16- 1.04)	
No	16/87(18.4)		
Signos y síntomas observados en los animales del hato			
Ganglios agrandados			0.05
Si	3/9(33.3)	2.72 (1-7.51)	
No	19/155(12.3)		
Fiebre de leche			0.05
Si	2/5(40.0)	3.20 (1.00-10.03)	
No	20/159(12.6)		
Medidas higiénico-sanitarias en el trabajo con los animales			
EPP			0.81
Si	18/131(13.7)	1.13 (0.4-3.12)	
No	4/33(12.1)		
Lavado de manos posterior al trabajo con los animales			0.65
Si	21/159(13.2)	0.66 (0.11-4.0)	
No	1/5(20.0)		
Lavado frecuente con agua jabón y desinfectante			0.83
Si	16/116(13.8)	1.10 (0.50-2.65)	
No	6/48(12.5)		
Contacto frecuente con fluidos de animales			
Sangre			0.34
Si	20/137(14.6)	2 (0.49-7.94)	
No	2/27(7.4)		

Saliva			0.64
Si	20/144(13.9)	1.39 (0.35-5.50)	
No	2/20(10.0)		
Fluidos vaginales			0.17
Si	19/122 (15.6)	2.18 (0.679- 7.0)	
No	3/142(7.1)		
Orina			0.28
Si	21/144(14.6)	2.92 (0.41-20.52)	
No	1/20(5.0)		
Semen			0.23
No	12/70(17.1)	1.61 (0.74-3.51)	
Si	10/94(10.6)		

Antecedentes clínicos			
Accidente con material quirúrgico durante el trabajo con los animales			0.005
Sí	8/26(30.8)	3.03 (1.42-6.50)	
No	14/138(10.1)		
Antecedente familiar de cáncer de mama			0.24
Sí	4/18 (22.2)	1.80 (0.70-7.74)	
No	18/146(12.3)		
Fiebre recurrente en los 6 meses			0.13
Si	3/44 (6.8)	0.431 (0.13- 1.38)	
No	19/120 (15.8)		
Transfusión sanguínea			0.07
Si	2/5 (40.0)	3.18 (1.01- 10.0)	
No	20/159(12.6)		

En el análisis multivariado, después de incluir el hato como efecto aleatorio y ajustar por las variables que aparecen en la **tabla 5**, la variable accidente con material quirúrgico durante el trabajo con los animales siguió mostrando aumento en la positividad al BLV (RP_a= 2.696 IC95%= 1.01-7.2 $p= 0.043$).

Tabla 5. Análisis multivariado de las variables que cumplieron con el criterio estadístico de valor de $p < 0.05$ en el análisis bivariado y/o factores de riesgo para la infección por el BLV previamente descritos

Variable	N=164		
	RP (IC 95%)	RP _a (IC 95%) ^a	P
Accidente con material quirúrgico durante el trabajo con los animales	3.03 (1.42-6.50)	2.696 (1.01- 7.21)	0.043
Veterinario (Actual)	3.42 (1.43- 8.21)	1.34 (0.35-5.11)	0.67
Antecedente de fiebre de leche en los animales del hato	3.20 (1.00-10.03)	2.69 (0.47- 15.5)	0.27
Ganglios agrandados en los animales	2.72 (1-7.51)	1.67 (0.39- 7.05)	0.49
Contacto frecuente con fluidos vaginales de los animales	2.18 (0.679- 7.0)	1.73 (0.50- 6.05)	0.39
Detección molecular del BLV en los animales		1.01 (0.98- 1.05)	0.41

^a Ajustado por hato en clúster

N= Población total estudiada

RP= Razón de prevalencias

IC= Intervalo de confianza del 95%

5. Discusión

El desarrollo de la presente investigación permitió determinar la frecuencia de detección del BLV en trabajadores de hatos lecheros del departamento de Antioquia, definir el genotipo 1 del BLV como el genotipo presente en esta población y los factores asociados a su detección molecular. Este estudio representa el primer reporte de la presencia del BLV en humanos de Antioquia, aportando a la epidemiología actual del virus y reforzando la necesidad de estrategias de vigilancia y control de este importante patógeno veterinario en el departamento. El impacto de las enfermedades zoonóticas es de suma importancia a nivel mundial, ya que tienen el potencial no solo para afectar a la salud y bienestar de los animales, sino también la salud de las personas y los entornos en los cuales estos conviven (113). Anteriormente, la presencia e impacto de los agentes patógenos en los humanos, los animales y el medioambiente, se estudiaba de manera independiente; sin embargo, desde que surgió la iniciativa global de “Una sola Salud” (One Health), propuesta como una estrategia destinada a comprender, anticipar y abordar los riesgos para la salud mundial; se ha integrado el estudio de las enfermedades infecciosas teniendo en cuenta las dinámicas de transmisión y diseminación de los microorganismos patógenos junto con las interacciones entre especies animales y el entorno (114). Bajo este principio en el estudio de agentes patógenos deberían considerarse otras especies animales diferentes a los hospederos naturales que puedan ser susceptibles de infección, sobre todo aquellos que se encuentren en nichos ecológicos compartidos o en situaciones de exposición ocupacional (19, 22) que pudieran favorecer los ciclos de transmisión (29).

Hasta la fecha, se ha conocido que el BLV infecta de forma natural a los bovinos y de manera inducida a los ovinos, en quienes produce una enfermedad similar a la producida en el ganado vacuno (98). También se ha reportado la asociación de la presencia de BLV con disfunciones inmunes en conejos (115), y la asociación de BLV con la presencia de linfoma multicéntrico en alpacas (116). Hasta el momento no se le ha atribuido ningún otro hospedero en el que pudiera causar enfermedad. Sin embargo, los reportes de la presencia del genoma, la detección de proteínas del virus y de anticuerpos anti-BLV en muestras de origen humano, son cada vez más frecuentes (106). En este

estudio, mediante técnicas de biología molecular se analizó la presencia del BLV en muestras de sangre periférica de 164 trabajadores de hatos lecheros del departamento de Antioquia y se encontró una frecuencia de detección del gen *env* del virus en el 13.4% (22/164) de las muestras analizadas. Esta frecuencia de detección molecular del BLV en humanos de Antioquia está en concordancia con la frecuencia reportada en estudios realizados en bovinos de la misma región. Rey DC (2023) realizó una investigación en los bovinos de los mismos hatos lecheros del departamento en los cuales se desarrolló la presente investigación en los trabajadores ganaderos, encontrándose una frecuencia de detección molecular del gen *tax* del BLV de 17.04% (98/575) (117), lo cual permite inferir que este virus se encuentra presente tanto en el ganado bovino como en los ganaderos del departamento de Antioquia.

En Colombia se han realizado diferentes estudios para evaluar la presencia del BLV en muestras histopatológicas de tejido mamario humano; en 2006, se reportó la presencia de proteínas del virus en el 7% (4/56) de las muestras analizadas de mujeres provenientes de la ciudad de Bogotá (118); en 2013, se encontraron segmentos del gen *gag* del BLV en el 40.5% (43/106) de un grupo de mujeres con y sin cáncer de seno (105), procedentes de diferentes zonas del departamento de Cundinamarca. Por otra parte, Olaya Galan et al., 2016 reportaron la presencia del BLV en el 71% (103/145) de las muestras de tejido mamario evaluadas post mortem y procedentes de un grupo de mujeres sanas de la ciudad de Bogotá (29). Posteriormente estos mismos autores, en 2021, realizaron un estudio de casos y controles en el cual evaluaron a 158 mujeres (casos = 75, controles = 83) procedentes también de la ciudad de Bogotá, y mediante el análisis de muestras de sangre periférica y tejido mamario usando técnicas de biología molecular dirigidas a amplificar diferentes fragmentos del genoma del BLV, obtuvieron una positividad de 61.3% en el grupo de casos y de 48.2% en el grupo control (119). Uno de los puntos fuertes de dicho estudio fue el uso de diferentes biomarcadores y la evaluación de la presencia del virus en sangre periférica y tejido mamario de la misma persona, reportando una concordancia del 94% entre las dos matrices utilizadas para la detección viral.

En estudios similares a éste realizados en Irán, para evaluar la presencia de genes del BLV en sangre periférica de humanos, reportaron una frecuencia del virus de 16.5% (33/200) de un grupo de mujeres sanas (107), mientras que en USA en 2019, reportaron la presencia de diferentes genes del BLV en sangre periférica de 33 de 95 (38%) mujeres voluntarias sanas evaluadas (19). En ambos estudios los autores destacan la importancia de la elección de más de una región del genoma del BLV como marcadores moleculares para la detección, ya que está bien documentado que en este virus algunos fragmentos del genoma podrían perderse durante la fase de integración, lo que se considera un mecanismo importante para evadir la respuesta inmune del hospedero (112, 120), por tanto, analizar la presencia del virus con diferentes marcadores disminuye la posibilidad de obtener resultados falsos negativos en la evaluación de las muestras.

En la metodología del presente estudio se planteó la detección molecular del BLV mediante la amplificación por PCR de fragmentos parciales de los genes *env* y *tax* del virus; sin embargo, no se obtuvieron señales de amplificación para el gen que codifica para la proteína Tax en las muestras analizadas, a pesar de tener señales consistentes en los controles positivos. La proteína Tax se describe como una proteína multifacética que tiene la capacidad de co-regular diferentes vías celulares y virales; actúa como transactivador, inhibe los mecanismos de reparación del ADN y también regula las vías de proliferación y apoptosis celular, incluso cuando está presente en pequeñas cantidades (121). Como se mencionó previamente, la evidencia reportada en la literatura para el BLV al igual que para el HTLV-1 indica que estos virus no siempre se integran completamente en el genoma de la célula hospedera, además que la integración es aleatoria, con evidencia de la ocurrencia de deleciones genómicas durante la infección natural. Sin embargo, no están claras las implicaciones de estas deleciones en el ciclo viral, ya que se han reportado, tanto en bovinos asintomáticos como en aquellos animales con LBE en estadios avanzados (120, 122).

En los humanos aún no está claro el mecanismo de integración del virus y el papel específico que pueda tener la proteína Tax. Se necesitan más estudios para aclarar la funcionalidad de este virus en células humanas, el tipo de célula hospedera utilizada, así como sus perfiles de integración para dilucidar un papel plausible en el desarrollo de

enfermedad. Canova et al., 2021 analizaron la presencia del BLV en muestras de tejido mamario fijadas con formalina e incluidas en parafina recolectadas de mujeres en el estado de Rio Grande do Sul, sur de Brasil, y encontraron una frecuencia del gen *env* en el 66% (39/59) de las muestras analizadas, seguido de los genes *tax* y *gag* que se detectaron en un 37% (22/59) y un 12% (7/59), respectivamente. Ninguna de las muestras fue positiva para el gen *pol*. Por ello, proponen que los genes estructurales sean los primeros en eliminarse dependiendo del momento de integración al genoma del hospedero ya que sus productos son dianas del sistema inmunológico. Con dichos resultados plantean que la alta frecuencia de detección del gen *env* en muestras humanas sugiere la transmisión reciente del virus y que las diferentes tasas de detección indican que el provirus podría tener defectos en genes específicos (123).

Adicionalmente, la presencia de polimorfismos en los sitios de unión de los primers o la baja eficiencia de los protocolos de PCR en una muestra de ADN fragmentada podrían contribuir a tasas de detección desiguales de los diferentes genes virales (123). Los primers utilizados para la amplificación del gen *env* del BLV en este estudio corresponden a los reportados inicialmente por Fechner et al., 1996 (124), estos han sido ampliamente utilizados para la detección del virus y la genotipificación basada en un fragmento de 444 pb de este gen viral (88, 90, 125, 126). Para la amplificación del gen *tax* se usaron un par de primers reportados previamente en la literatura como específicos para el BLV, ya que no presentaron amplificaciones cruzadas cuando se probaron en líneas celulares infectadas con HTLV-1 y representantes de todas las demás familias retrovirales y lentivirales, virus del papiloma humano, virus Epstein-Barr y retrovirus K endógeno humano (HERV-K) (16). De igual forma los primers usados para amplificar ambos genes en este estudio se examinaron utilizando las herramientas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para buscar secuencias similares en la base de datos de la colección de nucleótidos del NCBI, la cual incluye virus exógenos y retrovirus endógenos humanos como HERV- K. Las búsquedas en GenBank se optimizaron para “highly similar sequences”, e indicaron una identidad completa (valor E ≤ 1.1) de los primers de PCR solo con secuencias del BLV y baja homología con otros

retrovirus y con el genoma humano, incluidos los retrovirus endógenos ($E = 2.3-750$). Además, las secuencias obtenidas en este estudio también garantizan que los productos amplificados pertenecen al BLV y no a amplificaciones inespecíficas, con porcentajes de identidad que variaron entre 99.5% y 100% con secuencias de referencia.

En el análisis de filogenia molecular basado en el método de máxima verosimilitud realizado en esta investigación se observó que las secuencias de referencia del virus reportadas previamente en bovinos, disponibles en GenBank, se agruparon adecuadamente en los linajes previamente reportados para este virus, formando 12 clados monofiléticos con un soporte ultrafast bootstrap mayor a 70%. Estos resultados están en concordancia con los hallazgos de diferentes reportes que clasifican al BLV en 12 genotipos, basado en secuencias parciales del gen *env* (88, 126). Las secuencias del BLV detectadas en linfocitos de trabajadores de hatos lecheros de Antioquia, se agruparon con las secuencias provenientes de bovinos reportadas previamente como genotipo 1 en un clado monofilético con un soporte de rama de 99%. Con lo cual se puede concluir que el BLV que está circulando en los trabajadores de hatos lecheros del departamento de Antioquia corresponde al genotipo 1. En el clado monofilético del genotipo 1 se agruparon también secuencias de bovinos obtenidas por Úsuga-Monroy et al., 2018, los cuales se captaron en las mismas subregiones del departamento de Antioquia donde se realizó el presente estudio y se analizaron con los mismos primers utilizados (10). En este clado no se identificaron ramificaciones específicas para las secuencias provenientes de humanos o animales, sugiriendo que se trata del mismo virus presente en ambas especies. Canova et al., 2021 en Brasil demostraron que la secuencia de nucleótidos del gen *env* del BLV obtenidas de tejido mamario humano es genéticamente similar a la que se encuentra en muestras de sangre de bovinos recolectadas en el mismo momento y región geográfica. Mediante secuenciación de nucleótidos reportaron la presencia del G1 en el tejido mamario humano, el cual es el genotipo más frecuente en el ganado bovino en Brasil (123). En Antioquia desde 2018 se ha reportado la detección de los genotipos 1 y 3 en el ganado bovino (31). Adicionalmente, en la investigación de Rey DC (2023), también se clasificaron como G1

secuencias del gen *tax* de BLV obtenidas de bovinos en los hatos lecheros donde se tomaron las muestras humanas de la presente investigación (117).

Respecto a los estudios de epidemiología molecular del BLV, los hallazgos son limitados y es poca la evidencia existente del seguimiento del virus en especies animales diferentes a los bovinos, e incluso en poblaciones humanas. No existen análisis comparativos que involucren múltiples comunidades o poblaciones para entender las dinámicas de transmisión del virus. La mayoría de los estudios realizados a nivel mundial, se han enfocado en la identificación de los genotipos circulantes del virus en el ganado bovino, pero no existe correlación clara con patrones de patogenicidad, de evolución de la enfermedad ni de perfiles de transmisión (28, 29, 88). En este estudio se realizó un análisis de red de haplotipos como aproximación a los patrones de distribución del BLV entre los bovinos y los humanos que han sido evaluados en Antioquia, los posibles perfiles de diseminación y las eventuales redes de transmisión entre estas dos poblaciones. Se observó una gran heterogeneidad de haplotipos independiente del origen de las secuencias, se identificaron 28 haplotipos en el conjunto de datos completo con una diversidad de haplotipos de 0.17. Los haplotipos se agruparon en nodos cercanos conformando clústers, lo cual se asoció al genotipo reportado previamente para cada una de las secuencias de referencia.

Las secuencias obtenidas de humanos en este trabajo se agrupan en un clúster con secuencias provenientes de bovinos de las mismas subregiones del departamento donde se captaron los humanos, lo cual indica que se trata de secuencias estrechamente relacionadas, sugiriendo la detección de haplotipos del BLV compartidos entre bovinos y humanos en Antioquia. Corredor Figueroa et al., 2021, con el objetivo de avanzar en el conocimiento de los patrones de transmisión del BLV cuando está presente en diferentes fuentes, realizaron un análisis filogenético integral a partir del gen viral *gag* y encontraron características comunes entre secuencias colombianas del BLV obtenidas de humanos, bovinos, y de carne cruda y leche sin pasteurizar de origen bovino. En el análisis filogenético observaron que el virus obtenido de dichas fuentes tenía una distribución heterogénea, sin ramas específicas dentro de las secuencias de origen humano, bovino o alimentario. En la red de haplotipos los resultados mostraron haplotipos usuales entre

las tres fuentes analizadas, en los análisis de recombinación detectaron señales de recombinación, lo que sugirió que dichas secuencias comparten un origen común (32).

Los análisis filogenéticos suelen ser útiles para definir las diferencias moleculares hereditarias

entre secuencias de ácidos nucleicos o proteínas; sin embargo, para los deltaretrovirus (tales como el BLV y el HTLV-1), lograr un resultado resolutivo en este tipo de análisis, suele ser reconocida como una tarea difícil, debido a la baja tasa de mutación que presentan estos virus, lo cual disminuye el número de variaciones en la secuencia nucleotídica a comparar (19). Aunque el BLV está clasificado como un virus ARN, al entrar a la célula rápidamente hace una copia de ADN de su genoma usando su enzima transcriptasa reversa. El bajo grado de variabilidad genética puede explicarse por el hecho de que el BLV replica su ADN proviral principalmente por medio de la replicación mitótica de la célula infectada, con una menor participación de la retrotranscriptasa viral (127). En las secuencias de humanos obtenidas en este estudio las distancias genéticas pareadas netas (p), dan cuenta de la homología entre las secuencias obtenidas. En tres secuencias de las 12 analizadas se observó variación en las secuencias de nucleótidos, sin embargo, no se observaron cambios de marco de lectura, delección, inserción ni mutaciones sin sentido. Al hacer la traducción a aminoácidos se pudo apreciar que las sustituciones de aminoácidos en la proteína gp51 de las secuencias en este estudio en comparación con la secuencia de referencia MT452070 no son muy frecuentes. Para comprender en mayor medida la implicancia de la ubicación de estas mutaciones, serán necesarios más estudios como el modelado tridimensional de la proteína, ya que se ha informado que el segundo dominio de neutralización podría estar involucrado en la interacción de gp51 con el receptor expresado en la membrana de la célula del hospedero, ya que esta región está directamente implicada en la unión del virus, y por ende, en la infectividad de este (51, 128).

Con el objetivo de determinar si algunas variables sociodemográficas, estaban asociadas con la detección molecular del BLV en la población de estudio, se realizó un análisis bivariado y multivariado teniendo en cuenta los factores de riesgo reportados previamente para la infección con BLV en los bovinos y la historia natural del virus (72,

129, 130). En el análisis bivariado, la ocupación de veterinario al momento del muestreo del muestreo (RP = 3.42 IC95%= 1.43- 8.21 $p= 0.01$), así como el reporte de veterinario como ocupación previa (RP = 3.08 IC95%= 1.15- 8.28 $p= 0.04$) y el reporte de accidente con material quirúrgico durante el trabajo con los animales (RP= 3.03 IC95%= 1.42-6.50 $p= 0.005$) fueron variables relacionadas de manera significativa con la detección molecular del virus. En el modelo de regresión mixto de Poisson se observó que los participantes que tuvieron al menos un accidente con material quirúrgico durante el trabajo con los animales también tuvieron mayor riesgo de adquirir el BLV (RPa = 2.696, IC 95%: 1.01–7.21, $p=0.043$). Las vías clásicas de transmisión del BLV en el ganado bovino incluyen el contacto directo con secreciones biológicas procedentes de los animales infectados, durante el contacto sexual en los procesos de reproducción, a través de procesos iatrogénicos como el marcaje, descorne, vacunación, prácticas pecuarias sin el manejo adecuado de utensilios veterinarios; y en los terneros, se ha reportado la transmisión a través de la lactancia materna (1, 131, 132). Si bien en el caso de los humanos no está definido el mecanismo de infección, en especial la vía por la cual el virus pueda estar ingresando a este hospedero, los hallazgos de la presente investigación sugieren que la transmisión se pueda estar dando a través del contacto directo con los animales durante la exposición ocupacional en las labores de ganadería, por ejemplo, dada la alta exposición que tienen los veterinarios. Adicionalmente, si en los animales se da la transmisión horizontal a través de sangre o secreciones que son llevadas de un animal a otro, mediante instrumentos no descontaminados, se puede inferir que en los humanos esta vía de transmisión podría ser también plausible y que los accidentes con material quirúrgico sin descontaminar podrían estar favoreciendo el contacto entre células infectadas provenientes de los animales y las células susceptibles de los humanos. Precisamente en el estudio realizado por Rey DC (2023), se reportó que en los hatos lecheros de Antioquia a pesar de los conocimientos que tienen los ganaderos sobre las medidas preventivas y las buenas prácticas pecuarias, se observó que un 25% (13/53) de los hatos evaluados no aplicaban protocolos de bioseguridad en sus labores, reutilizando elementos como los guantes de palpación entre diferentes animales y un 1,2% (1/53) de los hatos no realizaban la desinfección o descontaminación del material quirúrgico a usarse en las intervenciones entre animales (117).

En los humanos se ha propuesto como potencial vía de contagio la ingestión de productos cárnicos crudos o con baja cocción o lácteos sin pasteurización procedentes de animales infectados con el virus (21). Corredor Figueroa et al., 2021, demostraron que las mujeres que tenían un mayor consumo de productos lácteos también tenían mayor riesgo de adquirir el BLV (OR =2.424, IC 95%: 1.063–5.527, p=0.035) (32). En el presente estudio no se encontró relación entre el consumo de leche cruda y la detección molecular del BLV, a pesar de ser una práctica reiterada en la población de estudio, ya que el 45.7% (75/164) de los participantes reportó el consumo frecuente de leche cruda.

Se requieren más estudios para evaluar el impacto de este virus en los humanos, así como identificar la vía de transmisión, diseminación y patogénesis en este hospedero, hasta el momento las observaciones epidemiológicas respaldan que la presencia del BLV en el humano podría deberse a transmisión zoonótica potencial (29). El alcance de la presente investigación no permite descartar el papel que pueda estar cumpliendo el BLV como agente etiológico de enfermedad en la población de estudio. Serán necesarios estudios prospectivos que evalúen si la presencia de este virus está favoreciendo el desarrollo de enfermedad en el humano, además es crucial realizar estudios enfocados a demostrar si el virus puede transformar las células normales en células malignas y comprender el potencial mecanismo oncogénico del virus en el humano.

6. Conclusiones y perspectivas de investigación

- Se detectó la presencia del BLV en el 13.4% (22/164) de la población estudiada, de personas que trabajan en hatos de lechería especializada, mediante la amplificación del gen viral *env*. Estos datos aportan al conocimiento de la epidemiología actual del virus y refuerzan la necesidad de plantear estrategias de vigilancia y control de este patógeno de importancia veterinaria en el departamento.

- Se obtuvieron 11 secuencias del gen *env* del BLV las cuales están disponibles para consulta pública en la base de datos del GenBank. Estas secuencias serán útiles en futuros estudios de epidemiología molecular relacionados con el BLV.
- Se describió por primera vez la detección del genotipo 1 del BLV en trabajadores de hatos lecheros del departamento de Antioquia; adicionalmente, mediante el análisis de red de haplotipos se determinó una estrecha relación entre las secuencias provenientes de animales y humanos de la misma zona geográfica, sugiriendo la detección de los mismos haplotipos o estrechamente relacionados entre las dos especies.
- De acuerdo con la encuesta epidemiológica realizada y los resultados obtenidos en la detección molecular del BLV, el contacto cercano que tienen los veterinarios con los bovinos y sus secreciones y fluidos y los accidentes de tipo laboral con material quirúrgico durante el trabajo con los animales, están asociados con la detección molecular del BLV en humanos.

Con este agente viral aún existen muchos vacíos respecto al papel que puede estar desempeñando en los humanos y su relación con el desarrollo de enfermedad, la expresión de los genes virales en el hospedero y el mecanismo de ingreso efectivo del virus al humano. Es necesario realizar más estudios enfocados en verificar la liberación ya sea de partículas virales infectivas, o el contacto con células infectadas que garantice el paso del virus al humano, la medición de los niveles de expresión de los diferentes genes virales y la capacidad de transformar células sanas en células tumorales. Para poder profundizar en el conocimiento respecto a los mecanismos de acción, transmisión y patogénesis al atravesar las barreras de especie, es fundamental plantear modelos *in vitro* e *in vivo* bajo condiciones experimentales controladas y así tratar de dar respuesta a incógnitas que no se pueden resolver desde los nichos naturales de la infección.

7. Datos disponibles

Los datos de las secuencias del gen *env* del BLV obtenidas en esta investigación están disponibles a través del GenBank del NCBI con los números de acceso: OR636720-OR636730.

8. Limitaciones

Los estudios transversales como este, no permiten evaluar causalidad de las variables analizadas al no cumplirse con el criterio de temporalidad; no obstante, este tipo de investigaciones ayudan a generar hipótesis para subsecuentes estudios. En este estudio se incluyeron participantes voluntarios por lo cual la muestra no es representativa de toda la población. Al no calcularse un tamaño de muestra se limitó el hallazgo de relaciones y generalizaciones significativas a partir de los datos, ya que las pruebas estadísticas normalmente requieren un tamaño de muestra grande para asegurar una distribución representativa de la población y ser considerados representativos de los grupos de personas estudiados. Entre las limitaciones que pueden declararse en los aspectos técnicos, la detección del virus solo con dos biomarcadores pudo dar espacio a subdiagnóstico, lo que repercute directamente en la precisión de la frecuencia de infección encontrada. La ausencia de secuencias del gen *env* recuperadas de humanos y de otras fuentes diferentes a los bovinos en las bases de datos del NCBI, limitó los análisis de filogenia y de red de haplotipos.

9. Agradecimientos

A la cooperativa COLANTA por el apoyo logístico y la colaboración brindada al proyecto facilitando el contacto con los hatos lecheros en las tres subregiones de muestreo. A los propietarios de los hatos y a sus colaboradores que de forma voluntaria y desinteresada participaron en este estudio. Al grupo BIOGEM de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por su cooperación en el desarrollo de este proyecto

y al grupo Biología de Sistemas de la Universidad Pontificia Bolivariana por todo su apoyo durante mi formación académica.

10. Financiamiento

Este estudio se deriva del macroproyecto: “LEUCOSIS BOVINA EN LECHERÍAS DE ANTIOQUIA: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ZONÓTICO Y DEL EFECTO SOBRE DESEMPEÑO REPRODUCTIVO.”, el cual fue financiado en la convocatoria: “CONVOCATORIA CONJUNTA DE PROYECTOS DE I+D+i EN EL MARCO DE LA AGENDA REGIONAL DE I+D → i, 2020” del grupo G8+1 y la gobernación de Antioquia, buscando incentivar la generación y aplicación del conocimiento y la colaboración científica. Durante el desarrollo del posgrado recibí una beca en la décimo octava (18ª) convocatoria del Fondo de Becas de Maestría Universidad de Antioquia, para cubrir los gastos de matrícula del programa. Adicionalmente recibí apoyo económico del comité de posgrados de la Escuela de Microbiología y de la dirección de posgrados de la Universidad de Antioquia para participar en el evento: “XLVIII Reunión Científica para la Producción Animal y Seguridad alimentaria A.C., y la XVII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal”. Los patrocinadores no tuvieron ninguna participación en el diseño del estudio, la recopilación de datos, el análisis y la preparación del manuscrito.

11. Referencias

1. Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutiérrez G, et al. Recent Advances in BLV Research. *Viruses*. 2015;7(11):6080-8. Epub 20151124. doi: 10.3390/v7112929. PubMed PMID: 26610551; PubMed Central PMCID: PMC4664998.
2. LaDronka RM, Ainsworth S, Wilkins MJ, Norby B, Byrem TM, Bartlett PC. Prevalence of Bovine Leukemia Virus Antibodies in US Dairy Cattle. *Vet Med Int*. 2018;2018:5831278. Epub 20181111. doi: 10.1155/2018/5831278. PubMed PMID: 30534354; PubMed Central PMCID: PMC6252197.

3. USDA. Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations 2007 2007.
4. Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K-i, Tsutsui T. Nationwide Survey of Bovine Leukemia Virus Infection among Dairy and Beef Breeding Cattle in Japan from 2009–2011. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2013;75(8):1123-6. doi: 10.1292/jvms.12-0374.
5. Nekouei O, VanLeeuwen J, Sanchez J, Kelton D, Tiwari A, Keefe G. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev Vet Med*. 2015;119(3-4):105-13. Epub 20150314. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.02.025. PubMed PMID: 25818520.
6. Yang Y, Fan W, Mao Y, Yang Z, Lu G, Zhang R, et al. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *J Dairy Sci*. 2016;99(5):3688-97. Epub 20160228. doi: 10.3168/jds.2015-10580. PubMed PMID: 26923050.
7. Monti G, Schrijver R, Beier D. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Arch Virol*. 2005;150(3):443-58. Epub 20041210. doi: 10.1007/s00705-004-0437-1. PubMed PMID: 15592892.
8. Bartlett PC, Ruggiero VJ, Hutchinson HC, Droscha CJ, Norby B, Sporer KRB, et al. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus. *Pathogens*. 2020;9(12). Epub 20201218. doi: 10.3390/pathogens9121058. PubMed PMID: 33352855; PubMed Central PMCID: PMC7766781.
9. Corredor-Figueroa AP, Salas S, Olaya-Galán NN, Quintero JS, Fajardo Á, Soñora M, et al. Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian cattle. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;80:104171.
10. *Monroy CÚ, Zuluaga JJE, López-Herrera A. Detección molecular y serológica del virus de la leucosis bovina en una población de vacas Holstein, de Colombia. MEXICO: REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS PECUARIAS; 2018.*
11. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007;4. doi: 10.1186/1742-4690-4-18.
12. Khalilian M, Hosseini SM, Madadgar O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. *Microb Pathog*. 2019;135:103566. Epub 20190625. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103566. PubMed PMID: 31252065.

13. Delarmelina E, Buzelin MA, Souza BSd, Souto FM, Bicalho JM, Câmara RJF, et al. High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. *PLOS ONE*. 2020;15(10):e0239745. doi: 10.1371/journal.pone.0239745.
14. Olaya-Galán NN, Salas-Cárdenas SP, Corredor-Figueroa AP, Buehring GC, Shen H, Patarroyo MA, et al. Evidence of bovine leukemia virus genes detected in Colombian women with and without breast cancer: A zoonotic infection. *AACR*; 2019.
15. Baltzell KA, Shen HM, Krishnamurthy S, Sison JD, Nuovo GJ, Buehring GC. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. *Cancer*. 2018;124(7):1342-9.
16. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Choi KY, Sun D, Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(5):772-82. doi: 10.3201/eid2005.131298. PubMed PMID: 24750974; PubMed Central PMCID: PMC4012802.
17. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G. Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. *PLoS One*. 2015;10(9):e0134304-e. doi: 10.1371/journal.pone.0134304.
18. Buehring G, Shen HM, Clay R, Delprado W, Schwartz D, Lawson J, editors. *Bovine Leukemia Virus Is Strongly Associated With Breast Cancer in Australian Women*. Open Forum Infectious Diseases; 2016: Oxford University Press.
19. Buehring GC, DeLaney A, Shen H, Chu DL, Razavian N, Schwartz DA, et al. Bovine leukemia virus discovered in human blood. *BMC infectious diseases*. 2019;19(1):297-. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9. PubMed PMID: 30940091.
20. Robinson LA, Jaing CJ, Pierce Campbell C, Magliocco A, Xiong Y, Magliocco G, et al. Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. *British Journal of Cancer*. 2016;115(4):497-504. doi: 10.1038/bjc.2016.213.
21. Olaya-Galán N, Corredor-Figueroa A, Guzmán-Garzón T, Ríos-Hernandez K, Salas-Cárdenas S, Patarroyo M, et al. Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. *Epidemiology & Infection*. 2017;145(15):3125-30.
22. de Quadros DL, Ribeiro VA, Rezende MA, Maté YA, Gomes MA, Secchi K, et al. Oncogenic viral DNA related to human breast cancer found on cattle milk and meat. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2023;101:102053. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102053>.
23. Zhang W, Li L, Deng X, Kapusinszky B, Delwart E. What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken. *Virology*. 2014;468-470:303-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.025>.

24. Bachofen C. Selected Viruses Detected on and in our Food.
25. Peretti A, FitzGerald PC, Bliskovsky V, Buck CB, Pastrana DV. Hamburger polyomaviruses. *Journal of General Virology*. 2015;96(4):833-9. doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.000033>.
26. Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Oue Y, Edamatsu H, Konno Y, et al. Effect of Freezing Treatment on Colostrum to Prevent the Transmission of Bovine Leukemia Virus. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014;76(2):255-7. doi: 10.1292/jvms.13-0253.
27. Donham KJ, VanDerMaaten MJ, Miller JM, Kruse BC, Rubino MJ. Seroepidemiologic studies on the possible relationships of human and bovine leukemia: Brief communication. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977;59(3):851-3. doi: 10.1093/jnci/59.3.851.
28. Polat M, Takeshima SN, Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J*. 2017;14(1):209. Epub 20171102. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4. PubMed PMID: 29096657; PubMed Central PMCID: PMC5669023.
29. Olaya-Galán NN. Virus de la leucosis bovina (VLB) y evidencias de su potencial zoonótico2021. Available from: https://doi.org/10.48713/10336_33690.
30. Beier D, Blankenstein P, Marquardt O, Kuzmak J. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2001;114(7-8):252-6. PubMed PMID: 11505797.
31. Úsuga-Monroy C, Díaz FJ, González-Herrera LG, Echeverry-Zuluaga JJ, López-Herrera A. Phylogenetic analysis of the partial sequences of the env and tax BLV genes reveals the presence of genotypes 1 and 3 in dairy herds of Antioquia, Colombia. *VirusDisease*. 2023. doi: 10.1007/s13337-023-00836-9.
32. Corredor-Figueroa AP, Olaya-Galán NN, Velandia-Álvarez S, Muñoz M, Salas-Cárdenas SP, Ibáñez-Pinilla M, et al. Co-Circulation of Bovine Leukemia Virus Haplotypes among Humans, Animals, and Food Products: New Insights of Its Zoonotic Potential. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(9). Epub 20210504. doi: 10.3390/ijerph18094883. PubMed PMID: 34064361; PubMed Central PMCID: PMC8124648.
33. Benavides B, Muñoz S, Ceriani C. Molecular analysis of a fragment of bovine leukemia virus env gene by Nested-PCR in dairy cows from Pasto, Nariño. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2017:67-75.
34. Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A, Talbot G, Paces J, Burt A, et al. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

2004;101(14):4894-9. Epub 20040325. doi: 10.1073/pnas.0307800101. PubMed PMID: 15044706; PubMed Central PMCID: PMC387345.

35. Luciw P.A. LNJ. Mechanisms of retrovirus replication In: Levy JA, editor. *The retroviridae*. The Viruses. 3. 1 ed: Springer New York, NY; 1992. p. 159–298.

36. Altaner C, Altanerová V, Bán J, Niwa O, Yokoro K. Human cells of neural origin are permissive for bovine leukemia virus. *Neoplasma*. 1989;36(6):691-5. PubMed PMID: 2559338.

37. Pluta A, Rola-Łuszczak M, Kubiś P, Balov S, Moskalik R, Choudhury B, et al. Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle. *Arch Virol*. 2017;162(6):1563-76. Epub 20170217. doi: 10.1007/s00705-017-3241-4. PubMed PMID: 28213870; PubMed Central PMCID: PMC5425504.

38. Larsen A, Gonzalez ET, Serena MS, Echeverría MG, Mortola E. Expression of p24 gag protein of bovine leukemia virus in insect cells and its use in immunodetection of the disease. *Mol Biotechnol*. 2013;54(2):475-83. doi: 10.1007/s12033-012-9587-7. PubMed PMID: 22829115.

39. Sagata N, Yasunaga T, Ohishi K, Tsuzuku-Kawamura J, Onuma M, Ikawa Y. Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *Embo j*. 1984;3(13):3231-7. doi: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb02283.x. PubMed PMID: 6098469; PubMed Central PMCID: PMC557842.

40. Lagarias DM, Radke K. Transcriptional activation of bovine leukemia virus in blood cells from experimentally infected, asymptomatic sheep with latent infections. *J Virol*. 1989;63(5):2099-107. doi: 10.1128/jvi.63.5.2099-2107.1989. PubMed PMID: 2539506; PubMed Central PMCID: PMC250626.

41. Kettmann R, Meunier-Rotival M, Cortadas J, Cuny G, Ghysdael J, Mammerickx M, et al. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(10):4822-6. doi: 10.1073/pnas.76.10.4822. PubMed PMID: 228266; PubMed Central PMCID: PMC413029.

42. Kerkhofs P, Heremans H, Burny A, Kettmann R, Willems L. In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J Virol*. 1998;72(3):2554-9. doi: 10.1128/jvi.72.3.2554-2559.1998. PubMed PMID: 9499124; PubMed Central PMCID: PMC109563.

43. Willems L, Grimonpont C, Heremans H, Rebeyrotte N, Chen G, Portetelle D, et al. Mutations in the bovine leukemia virus Tax protein can abrogate the long terminal repeat-directed transactivating activity without concomitant loss of transforming potential. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 1992;89(9):3957-61. doi: 10.1073/pnas.89.9.3957. PubMed PMID: 1315045; PubMed Central PMCID: PMC525610.

44. Twizere JC, Kruys V, Lefèbvre L, Vanderplasschen A, Collete D, Debaq C, et al. Interaction of retroviral Tax oncoproteins with tristetraprolin and regulation of tumor necrosis factor-alpha expression. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(24):1846-59. doi: 10.1093/jnci/djg118. PubMed PMID: 14679154.

45. Florins A, Gillet N, Asquith B, Boxus M, Burteau C, Twizere JC, et al. Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci.* 2007;12:1520-31. Epub 20070101. doi: 10.2741/2165. PubMed PMID: 17127399.

46. Burny A, Bruck C, Cleuter Y, Couez D, Deschamps J, Gregoire D, et al. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Onderstepoort J Vet Res.* 1985;52(3):133-44. PubMed PMID: 3003647.

47. Wannemuehler Y, Isaacson J, Wannemuehler M, Wood C, Roth JA, Carpenter S. In vitro detection of bovine immunodeficiency-like virus using monoclonal antibodies generated to a recombinant gag fusion protein. *Journal of Virological Methods.* 1993;44(1):117-27. doi: [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(93\)90014-I](https://doi.org/10.1016/0166-0934(93)90014-I).

48. D'Angelino JL, Garcia M, Birgel EH. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. *Journal of Dairy Research.* 1998;65:693 - 5.

49. Frie MC, Coussens PM. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163(3-4):103-14. Epub 20141215. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.11.014. PubMed PMID: 25554478.

50. Park BH, Matuschke B, Lavi E, Gaulton GN. A point mutation in the env gene of a murine leukemia virus induces syncytium formation and neurologic disease. *J Virol.* 1994;68(11):7516-24. doi: 10.1128/jvi.68.11.7516-7524.1994. PubMed PMID: 7933135; PubMed Central PMCID: PMC237194.

51. Gatot JS, Callebaut I, Van Lint C, Demonté D, Kerkhofs P, Portetelle D, et al. Bovine leukemia virus SU protein interacts with zinc, and mutations within two interacting regions differently affect viral fusion and infectivity in vivo. *J Virol.* 2002;76(16):7956-67. doi: 10.1128/jvi.76.16.7956-7967.2002. PubMed PMID: 12134000; PubMed Central PMCID: PMC155115.

52. Corredor AA-O, González J, Baquero LA, Curtidor H, Olaya-Galán NA-O, Patarroyo MA-O, et al. In silico and in vitro analysis of boAP3d1 protein interaction with bovine leukaemia virus gp51. *PLoS one.* 2018;13(6). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397>.

53. Robinson MS, Bonifacino JS. Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(4):444-53. doi: 10.1016/s0955-0674(00)00235-0. PubMed PMID: 11454451.

54. Camargos MF, Pereda A, Stancek D, Rocha MA, dos Reis JK, Greiser-Wilke I, et al. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine leukemia virus. *Virus Genes.* 2007;34(3):343-50. Epub 20060818. doi: 10.1007/s11262-006-0011-x. PubMed PMID: 16917740.

55. Tanaka AS, Komuro K. Targeted rearrangement of a chromosomal repeat sequence by transfection of a homologous DNA sequence using purified integrase. *Gene Ther.* 2005;12(9):783-94. doi: 10.1038/sj.gt.3302458. PubMed PMID: 15716978.

56. Murakami H, Yamada T, Suzuki M, Nakahara Y, Suzuki K, Sentsui H. Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. *Virus Research.* 2011;156(1):107-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.004>.

57. Gillet NA, Gutiérrez G, Rodríguez SM, de Brogniez A, Renotte N, Alvarez I, et al. Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003687. Epub 20131003. doi: 10.1371/journal.ppat.1003687. PubMed PMID: 24098130; PubMed Central PMCID: PMC3789779.

58. Panel EA. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal.* 2015;13(7):4188.

59. Polat M, Ohno A, Takeshima S-n, Kim J, Kikuya M, Matsumoto Y, et al. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Archives of virology.* 2015;160(1):285-96.

60. Willems L, Heremans H, Chen G, Portetelle D, Billiau A, Burny A, et al. Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. *Embo j.* 1990;9(5):1577-81. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08277.x. PubMed PMID: 2158445; PubMed Central PMCID: PMC551852.

61. Kettmann R, Deschamps J, Cleuter Y, Couez D, Burny A, Marbaix G. Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(8):2465-9. doi: 10.1073/pnas.79.8.2465. PubMed PMID: 6283527; PubMed Central PMCID: PMC346219.

62. Nisole S, Stoye JP, Saïb A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nature Reviews Microbiology.* 2005;3(10):799-808. doi: 10.1038/nrmicro1248.

63. Schwartz I, Lévy D. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet Res.* 1994;25(6):521-36. PubMed PMID: 7889034.
64. Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.* 2012;95(2):727-34. doi: 10.3168/jds.2011-4760. PubMed PMID: 22281337.
65. Nekouei O, VanLeeuwen J, Stryhn H, Kelton D, Keefe G. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine.* 2016;133:1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.09.011>.
66. Kobayashi S, Hidano A, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Nishida T, et al. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: a nationwide survey. *Research in veterinary science.* 2014;96(1):47-53.
67. Hopkins SG, DiGiacomo RF. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997;13(1):107-28. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30367-4. PubMed PMID: 9071749.
68. Mirsky ML, Olmstead CA, Da Y, Lewin HA. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *Journal of Virology.* 1996;70(4):2178-83. doi: doi:10.1128/jvi.70.4.2178-2183.1996.
69. Hutchinson HC, Ruggiero VJ, Norby B, Sporer KRB, Bartlett PC. Diagnostic Measures of Disease Progression in Cattle Following Natural Infection with Bovine Leukemia Virus. *Pathogens.* 2021;10(8). Epub 20210805. doi: 10.3390/pathogens10080987. PubMed PMID: 34451451; PubMed Central PMCID: PMC8398158.
70. Watanuki S, Takeshima SN, Borjigin L, Sato H, Bai L, Murakami H, et al. Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. *Vet Res.* 2019;50(1):102. Epub 20191129. doi: 10.1186/s13567-019-0724-1. PubMed PMID: 31783914; PubMed Central PMCID: PMC6884895.
71. Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Muroga N, Konishi M, et al. The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk. *J Vet Med Sci.* 2015;77(7):861-3. Epub 20150305. doi: 10.1292/jvms.15-0007. PubMed PMID: 25754652; PubMed Central PMCID: PMC4527511.
72. Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, Norby B, Grooms DL, Swenson CL, et al. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2014;244(8):914-22. doi: 10.2460/javma.244.8.914. PubMed PMID: 24697767.
73. Benitez OJ, Roberts JN, Norby B, Bartlett PC, Takeshima SN, Watanuki S, et al. Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds. *J Am*

Vet Med Assoc. 2019;254(11):1335-40. doi: 10.2460/javma.254.11.1335. PubMed PMID: 31067187.

74. Ooshiro M, Konnai S, Katagiri Y, Afuso M, Arakaki N, Tsuha O, et al. Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Vet Rec.* 2013;173(21):527. Epub 20131024. doi: 10.1136/vr.101833. PubMed PMID: 24158325.

75. Marawan MA, Alouffi A, El Tokhy S, Badawy S, Shirani I, Dawood A, et al. Bovine Leukaemia Virus: Current Epidemiological Circumstance and Future Prospective. *Viruses.* 2021;13(11). Epub 20211027. doi: 10.3390/v13112167. PubMed PMID: 34834973; PubMed Central PMCID: PMC8618541.

76. Suárez Archilla G, Gutiérrez G, Camussone C, Calvino L, Abdala A, Alvarez I, et al. A safe and effective vaccine against bovine leukemia virus. *Frontiers in Immunology.* 2022;13. doi: 10.3389/fimmu.2022.980514.

77. Ortega DO, Alfredo S, Tobáñ J, Chaparro Y, Cortá S. Seroprevalence and risk factors associated with bovine leukemia virus in Colombia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health.* 2016;8(5):35-43.

78. G M. Aspectos genómicos y evolutivos del virus de la leucosis bovina. Montevideo-Uruguay: Universidad de la Republica; 2012.

79. Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology.* 1997;237(2):261-9. doi: 10.1006/viro.1997.8784. PubMed PMID: 9356338.

80. Pluta A, Rola-Łuszczak M, Douville RN, Kuźmak J. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. *Virol J.* 2018;15(1):165. Epub 20181025. doi: 10.1186/s12985-018-1062-z. PubMed PMID: 30359262; PubMed Central PMCID: PMC6202831.

81. Bazzucchi M, Iscaro C, Casciari C, Giammarioli M, Feliziani F. Molecular characterization of Italian bovine leukemia virus isolates reveals the presence of distinct phylogenetic clusters.

82. Yu C, Wang X, Zhou Y, Wang Y, Zhang X, Zheng Y. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China.

83. Gautam S, Mishra N, Kalaiyarasu S, Jhade SK, Sood R. Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus (BLV) Strains Reveals Existence of Genotype 6 in

Cattle in India with evidence of a new subgenotype. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018;65(6):1968-78. doi: <https://doi.org/10.1111/tbed.12979>.

84. Polat M, Moe HH, Shimogiri T, Moe KK, Takeshima S-n, Aida Y. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle. *Archives of virology*. 2017;162(2):425-37.

85. Lee E, Kim E-J, Ratthanophart J, Vitoonpong R, Kim B-H, Cho I-S, et al. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016;41:245-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.010>.

86. Ochirkhuu N, Konnai S, Odbileg R, Nishimori A, Okagawa T, Murata S, et al. Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. *Archives of Virology*. 2016;161(4):985-91. doi: 10.1007/s00705-015-2676-8.

87. Ababneh MM, Al-Rukibat RK, Hananeh WM, Nasar AT, Al-Zghoul MB. Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan. *Arch Virol*. 2012;157(12):2343-8. Epub 20120823. doi: 10.1007/s00705-012-1447-z. PubMed PMID: 22914962.

88. Sultanov A, Rola-Łuszczak M, Mamanova S, Ryłto A, Osiński Z, Saduakassova MA, et al. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan. *Pathogens*. 2022;11(2). Epub 20220128. doi: 10.3390/pathogens11020180. PubMed PMID: 35215125; PubMed Central PMCID: PMC8875264.

89. Hemmatzadeh F. Sequencing and Phylogenetic Analysis of gp51 Gene of Bovine Leukaemia Virus in Iranian Isolates. *Veterinary Research Communications*. 2007;31(6):783-9. doi: 10.1007/s11259-007-0012-9.

90. Felmer R, Muñoz G, Zúñiga J, Recabal M. Molecular analysis of a 444bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Veterinary Microbiology*. 2005;108(1):39-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.005>.

91. Rodriguez SM, Golemba MD, Campos RH, Trono K, Jones LR. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *Journal of General Virology*. 2009;90(11):2788-97. doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.011791-0>.

92. Balić D, Lojkić I, Periškić M, Bedeković T, Jungić A, Lemo N, et al. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. *Archives of Virology*. 2012;157(7):1281-90. doi: 10.1007/s00705-012-1300-4.

93. Polat M, Takeshima SN, Hosomichi K, Kim J, Miyasaka T, Yamada K, et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*. 2016;13:4. Epub 20160112. doi: 10.1186/s12977-016-0239-z. PubMed PMID: 26754835; PubMed Central PMCID: PMC4709907.
94. Brogniez Ad, Bouzar AB, Jacques J-R, Cosse J-P, Gillet N, Callebaut I, et al. Mutation of a Single Envelope N-Linked Glycosylation Site Enhances the Pathogenicity of Bovine Leukemia Virus. *Journal of Virology*. 2015;89(17):8945-56. doi: doi:10.1128/jvi.00261-15.
95. De Brogniez A, Mast J, Willems L. Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis. *Viruses*. 2016;8(4):88. PubMed PMID: doi:10.3390/v8040088.
96. Corredor Figueroa AP. Virus de la Leucosis bovina en Colombia: características epidemiológicas y moleculares lo proponen como agente zoonótico. 2018.
97. Burrige MJ. The zoonotic potential of bovine leukemia virus. *Veterinary Research Communications*. 1981;5(1):117-26. doi: 10.1007/BF02214976.
98. Graves DC, Ferrer JF. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res*. 1976;36(11 Pt 1):4152-9. PubMed PMID: 61801.
99. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS research and human retroviruses*. 2003;19(12):1105-13. doi: 10.1089/088922203771881202. PubMed Central PMCID: 14709247.
100. Burny A, Bruck CEM, Cleuter Y, Couez D, Deschamps J, Ghysdael J, et al. Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogenic effects in various animal species. *Cancer research*. 1985;45 9 Suppl:4578s-82s. PubMed Central PMCID: 2410107.
101. Lawson JS, Glenn WK. Multiple oncogenic viruses are present in human breast tissues before development of virus associated breast cancer. *Infect Agent Cancer*. 2017;12(55). doi: 10.1186/s13027-017-0165-2.; PubMed Central PMCID: PMC5644159.
102. Indik S, Günzburg WH, Kulich P, Salmons B, Rouault F. Rapid spread of mouse mammary tumor virus in cultured human breast cells. *Retrovirology*. 2007;11(4:73). doi: 10.1186/1742-4690-4-73. PubMed Central PMCID: PMC2169256.
103. Faschinger A, Rouault F, Sollner J, Lukas A, Salmons B, Günzburg WH, et al. Mouse Mammary Tumor Virus Integration Site Selection in Human and Mouse Genomes. *Journal of Virology*. 2008;82(3):1360-7. doi: doi:10.1128/jvi.02098-07.

104. Aida Y, Murakami H, Takagashi M, Takeshima S-n. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00328.

105. Giovanna M, Carlos UJ, María UA, Gutiérrez MF. Bovine Leukemia Virus Gene Segment Detected in Human Breast Tissue. *Open Journal of Medical Microbiology*. 2013;3(1):84-90. doi: 10.4236/ojmm.2013.31013 .

106. Mendoza W, Isaza JP, López L, López-Herrera A, Gutiérrez LA. Bovine leukemia virus detection in humans: A systematic review and meta-analysis. *Virus Research*. 2023;335:199186. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199186>.

107. Khalilian M, Hosseini SM, Madadgar O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. *Microb Pathog*. 2019;135:103566-. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103566.

108. BØYUM A. Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1976;5(s5):9-15. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1976.tb03851.x>.

109. Sobotta K, Hillarius K, Jiménez PH, Kerner K, Heydel C, Menge C. Interaction of *Coxiella burnetii* Strains of Different Sources and Genotypes with Bovine and Human Monocyte-Derived Macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018;7. doi: 10.3389/fcimb.2017.00543.

110. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(30):11030-5. Epub 20040716. doi: 10.1073/pnas.0404206101. PubMed PMID: 15258291; PubMed Central PMCID: PMC491989.

111. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38(7):3022-7. doi: 10.1093/molbev/msab120. PubMed PMID: 33892491; PubMed Central PMCID: PMC8233496.

112. Zhao X, Buehring GC. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: Possible effects of selection and escape. *Virology*. 2007;366(1):150-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.058>.

113. McArthur DB. Emerging Infectious Diseases. *Nursing Clinics of North America*. 2019;54(2):297-311. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2019.02.006>.

114. Agriculture Fa, Organization of the United Nations (FAO) UNEP, (UNEP) WHOWWOFA, (WOAH) H. One Health Joint Plan of Action

(2022–2026). Working together for the health of humans, animals, plants and the environment. . 2022.

115. Wyatt CR, Wingett D, White JS, Buck CD, Knowles D, Reeves R, et al. Persistent infection of rabbits with bovine leukemia virus associated with development of immune dysfunction. *Journal of Virology*. 1989;63(11):4498-506. doi: 10.1128/jvi.63.11.4498-4506.1989.

116. Lee LC, Scarratt WK, Buehring GC, Saunders GK. Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*. 2012;53(3):283-6. PubMed PMID: 22942445.

117. Rey DC. *Virus De Leucosis Bovina En Las Lecherías De Antioquia: Prevalencia Molecular, Genotipos Circulantes Y Factores Asociados A Su Circulación*. Medellin: Universidad Nacional de Colombia; 2023.

118. Uribe A, Gutiérrez M, Ochoa-Cruz A. Estudio del potencial zoonótico del virus de la leucosis bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. *Universitas Scientiarum* [Internet]. 2006 01/01; 11(2):[31-40 pp.]. Available from: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4968>.

119. Olaya-Galán NN, Salas-Cárdenas SP, Rodríguez-Sarmiento JL, Ibáñez-Pinilla M, Monroy R, Corredor-Figueroa AP, et al. Risk factor for breast cancer development under exposure to bovine leukemia virus in Colombian women: A case-control study. *PLoS One*. 2021;16(9):e0257492. Epub 20210921. doi: 10.1371/journal.pone.0257492. PubMed PMID: 34547016; PubMed Central PMCID: PMC8454960.

120. Murakami H, Uchiyama J, Nikaido S, Sato R, Sakaguchi M, Tsukamoto K. Inefficient viral replication of bovine leukemia virus induced by spontaneous deletion mutation in the G4 gene. *Journal of General Virology*. 2016;97(10):2753-62. doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000583>.

121. Philpott SM, Buehring GC. Defective DNA repair in cells with human T-cell leukemia/bovine leukemia viruses: role of tax gene. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(11):933-42.

122. Kamihira S S, K TK, Minami S, Uemura A, Akamatsu N, et al. Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. *Clinical & Laboratory Haematology*. 2005;27(4):235-41. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2005.00698.x>.

123. Canova R, Weber MN, Budaszewski RF, da Silva MS, Schwingel D, Canal CW, et al. Bovine leukemia viral DNA found on human breast tissue is genetically related to the cattle virus. *One Health*. 2021;13:100252. doi: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100252>.

124. Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, et al. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1996;43(10):621-30. doi: 10.1111/j.1439-0450.1996.tb00361.x. PubMed PMID: 9011158.

125. Lee E, Kim E-J, Joung H-K, Kim B-H, Song J-Y, Cho I-S, et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates. *Virology journal*. 2015;12:64-. doi: 10.1186/s12985-015-0286-4. PubMed PMID: 25879943.

126. Pereira JG, Silva CdA, Silva LD, Lima CAA, do Rosário CJRM, Silva EMC, et al. Diagnosis and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in dairy cattle in northeastern Brazil. *Frontiers in veterinary science*. 2023;9:1080994-. doi: 10.3389/fvets.2022.1080994. PubMed PMID: 36713884.

127. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia; 2007.

128. Callebaut I, Vonèche V, Mager A, Fumière O, Krchnak V, Merza M, et al. Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol*. 1993;67(9):5321-7. doi: 10.1128/jvi.67.9.5321-5327.1993. PubMed PMID: 7688821; PubMed Central PMCID: PMC237931.

129. Ohno A, Takeshima S-n, Matsumoto Y, Aida Y. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus research*. 2015;210:283-90.

130. Selim A, Megahed AA, Kandeel S, Abdelhady A. Risk factor analysis of bovine leukemia virus infection in dairy cattle in Egypt. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2020;72:101517. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101517>.

131. Hopkins SG, DiGiacomo RF. Natural Transmission of Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1997;13(1):107-28. doi: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30367-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30367-4).

132. Meas S, Usui T, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Vet Microbiol*. 2002;84(3):275-82. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00458-8. PubMed PMID: 11731179.

12. Anexos

Anexo 1. Aval comité de ética	89
Anexo 2. Consentimiento informado	90
Anexo 3. Encuesta epidemiológica del proyecto	98
Anexo 4. Secuencias incluidas en el análisis filogenético	117
Anexo 5. Gradiente concentración y temperatura de los primers	120
Anexo 6. Gráfico de amplificación de una PCR en tiempo real (qPCR) dirigida al gen constitutivo de la enzima GAPDH	124
Anexo 7. Electroforesis de la PCR anidada dirigida al gen <i>env</i> del BLV	125
Anexo 8. Electroforesis de la PCR convencional dirigida al gen <i>tax</i> del BLV	131
Anexo 9. Matriz de distancias de las secuencias obtenidas en este estudio	132
Anexo 10. Productos de apropiación social del conocimiento. Ponencia oral en evento científico internacional	133
Anexo 11. Productos de apropiación social del conocimiento. Ponencia modalidad poster en evento científico nacional	134
Anexo 12. Productos de apropiación social del conocimiento. Ponencia modalidad oral en evento científico nacional	135
Anexo 13. Productos de generación de nuevo conocimiento. Artículo científico publicado. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199186	136
Anexo 14. Productos de generación de nuevo conocimiento. Artículo científico publicado. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107253	137
Anexo 15. Productos de apropiación social del conocimiento. Jornada de socialización de los resultados con los participantes	138

Anexo 1. Aval comité de ética



Medellín, septiembre 28 de 2020

Señores(as) Investigadores(as)

ALBEIRO LÓPEZ HERRERA
Investigador principal

LINA ANDREA GUTIÉRREZ BUILES
Coinvestigador

PROYECTO: LEUCOSIS BOVINA EN LECHERÍAS DE ANTIOQUIA: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ZONÓTICO Y DEL EFECTO SOBRE DESEMPEÑO RE- PRODUCTIVO.

La presente comunicación tiene por objetivo informarle que el Comité de Ética de Investigación en Salud de la Universidad Pontificia Bolivariana, reunido el día 28 de septiembre de 2020 y según consta en el acta N° 20 de 2020, evaluó el proyecto de referencia y ha decidido otorgarle el Aval Ético correspondiente.

Los miembros del Comité se ponen a su disposición para resolver cualquier inquietud de tipo ético que surja durante la ejecución de la investigación. De igual manera, le recuerda que toda modificación que se le haga al proyecto debe ser sometida a nueva consideración del Comité.

Para finalizar, es importante que tenga en cuenta que el Comité, en el cumplimiento de sus funciones, podrá solicitar informes de seguimiento o realizar visitas de auditoría que permitan verificar que todo se esté llevando a cabo adecuadamente desde el punto de vista ético.

Atentamente,

Pbro. Dr. Guillermo Zuleta Salas
Presidente

Mg. Luz Estella Torres Trujillo
Secretaria

Nombre del patrocinador	Convocatoria: CONVOCATORIA CONJUNTA DE PROYECTOS DE I+D+i EN EL MARCO DE LA AGENDA REGIONAL DE I+D -> i
Título del proyecto	LEUCOSIS BOVINA EN LECHERÍAS DE ANTIOQUIA: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ZONÓTICO Y DEL EFECTO SOBRE DESEMPEÑO RE-PRODUCTIVO
Sede del proyecto En UPB	Facultad de Medicina Calle 78B #72A-109, Bloque B (cuarto piso) Laboratorio de investigaciones Medellín, COLOMBIA. Tel: +57(4)4488388 Ext. 19333

Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación que busca analizar mediante el uso y evaluación de pruebas de laboratorio si el virus denominado Virus de la Leucosis Bovina que se caracteriza por enfermar al ganado, y puede hacer que les salgan tumores, tiene importancia en el ganado y en las personas que trabajan en los sistemas de producción lecheros de Antioquia.

Antes de que Usted decida participar en el estudio por favor lea este consentimiento cuidadosamente. Haga todas las preguntas que usted tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y los beneficios.

El análisis que se realizará en el componente de salud humana estará a cargo del equipo de investigadores de la de la Facultad de Medicina de la Universidad Pontificia Bolivariana, cuyos datos están descritos en la página anterior de este documento, con amplia experiencia en este tipo de investigaciones.

LOS INVESTIGADORES QUEREMOS QUE USTED CONOZCA QUE:

La investigación a la cual lo estamos invitando a participar tiene por objetivo saber con qué frecuencia se presenta la infección por el Virus de la Leucosis Bovina tanto en bovinos como en los trabajadores de los hatos lecheros de Antioquia. Además,

intentaremos evaluar qué relación existe entre el virus que detectemos en los bovinos y el que detectemos en las personas y los factores (condiciones de vida) que puedan estar asociados con estas infecciones.

El desarrollo de esta investigación se ha considerado importante ya que la utilización y evaluación de las metodologías de laboratorio que se implementaran en esta investigación podrían posibilitar que dichas metodologías queden disponibles más adelante como una manera de hacer diagnóstico en el laboratorio de este virus a usarse de manera rutinaria en los laboratorios clínicos humanos y veterinarios, para hacer diagnósticos y tratamientos más acertados de este tipo de infecciones, tanto en las personas como en los animales.

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria y le tomará aproximadamente 20 minutos de su tiempo. Si usted lo desea puede negarse a participar o puede retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Su decisión de participar en el estudio o retirarse del mismo, al igual que los resultados que este arroje, no tendrán consecuencias o repercusiones negativas para su salud o bienestar.

Su participación en este estudio está planteada de la siguiente manera:

1. Usted recibirá la invitación de parte de los investigadores, ellos además le darán la información sobre el proyecto y los objetivos del estudio.
2. Es necesario que usted revise los documentos de consentimiento informado que son los que aquí le presentamos y consentimiento adicional en el que usted podrá darnos permiso para el almacenamiento y uso futuro de muestras que le serán tomadas en caso de que usted acepte participar.
3. Después de que usted lea los documentos y aclare todas las dudas que pueda tener del estudio, si Usted está de acuerdo con participar en el estudio, le solicitaremos firmar los documentos

4. Cuando haya aceptado participar en el estudio y haya firmado el consentimiento, le pediremos responder a un cuestionario de preguntas que incluyen información socio demográfica (como edad, sexo, estudios), de aspectos clínicos (como si ha tenido o no algunos síntomas), ambientales, higiénicos sanitarios, ocupacionales, entre otros relacionados exclusivamente con los objetivos de esta investigación.

5. Adicional a responder el cuestionario le pediremos que nos permita tomarle una muestra de sangre. Esta muestra será llevada al laboratorio donde haremos diferentes pruebas con las que buscaremos saber si en su sangre hay señales del virus que estamos estudiando.

Con respecto al procedimiento de recolección de las muestras de sangre necesaria para la realización de los procedimientos de laboratorio, los investigadores se comprometen a tomar la cantidad mínima necesaria de sangre, a los participantes que manifiesten de manera libre, informada y voluntaria que no padecen algún tipo de enfermedad o condición física que les impida ser sangrados para realizar las diferentes pruebas con las que buscaremos saber si en su sangre hay señales del virus que estamos estudiando.

Las muestras de sangre serán obtenidas, de uno de los brazos, usando una aguja de manera adecuada y según el protocolo establecido para este procedimiento por personal entrenado y calificado para tal fin, salvaguardando la integridad física de los participantes en el estudio y evitando el riesgo de infecciones.

Cuando le tomemos la muestra de sangre usted podría presentar algunas reacciones que en todos los casos serán poco graves y serán temporales, las reacciones que puede presentar son: sangrado, el cual puede detenerse haciendo una leve presión sobre el sitio de donde le tomaron la muestra de sangre durante un minuto; desmayo o sensación de mareo, por lo cual al momento de la toma de la muestra se acondicionará un lugar adecuado en la finca para que cada persona pueda sentarse o acostarse a esperar su recuperación en caso de presentarse mareo después a la toma de la muestra;

hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), lo cual se desaparece de la piel en cuestión de dos a tres días. Es de resaltar que las reacciones descritas no generan ningún tipo de consecuencia para la salud del participante en esta investigación.

Es posible que los participantes no reciban ningún beneficio directo del estudio actual. Los estudios de investigación como éste sólo producen conocimientos que pueden ser aplicados para formular programas posteriores de prevención de las enfermedades.

La identidad de los participantes será protegida mediante la asignación de un código que será utilizado en lugar del nombre del participante, con el fin de identificar los protocolos de evaluación y toda aquella documentación relacionada con el participante. Toda información o datos que puedan identificar al participante serán manejados confidencialmente. Solamente los investigadores tendrán acceso a los datos que puedan identificar directa o indirectamente a un participante, incluyendo esta hoja de consentimiento. Estos datos serán guardados bajo llave en un archivo en la Facultad de Medicina de la Universidad Pontificia Bolivariana por un periodo de cinco años, y una vez concluya este estudio, al que no tendrán acceso personas diferentes a los investigadores de este estudio, pasados 5 años este material será destruido. Los datos hallados sólo serán utilizados con fines investigativos.

Por participar en este estudio usted no recibirá ninguna compensación económica, así como tampoco tendrá que pagar por ninguno de los exámenes que en el estudio se realicen. Cuando tengamos los resultados de los exámenes de laboratorio que en el estudio haremos, usted recibirá un reporte y de acuerdo con los resultados es posible que los investigadores le recomienden pedir una cita médica en la institución en la que lo entienden regularmente para que le lleve los resultados al médico y sea el médico quien decida si es o no necesario que reciba algún tratamiento, cualquier tratamiento debe ser suministrado por su sistema de salud.

Ni las personas que conforman el equipo de investigación, ni las entidades ejecutoras de este estudio asumirán los gastos de tratamientos o seguimientos médicos posteriores al estudio.

Si ha leído este documento y ha decidido participar en este estudio, por favor tenga presente que su participación es completamente voluntaria y que tiene derecho a abstenerse de participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin ninguna consecuencia. También tiene derecho a no contestar alguna pregunta en particular. Además, Usted recibirá una copia de este documento.

En cualquier momento en que así lo decida, puede cambiar de parecer y negarse a que sus muestras sean analizadas como parte del estudio al que lo estamos invitando. Solo debe notificar sus deseos a quien está a cargo de la investigación o a uno de los investigadores del estudio.

Si tiene alguna pregunta o desea más información sobre esta investigación, por favor comuníquese con los investigadores Albeiro López celular 3128630136 o Lina Gutiérrez celular 3106397181.

A continuación, se pasará a firmar el consentimiento; su firma significa que ha decidido participar en este estudio después de haber leído y discutido la información presentada en esta hoja de consentimiento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Manifiesto que he sido informado de los propósitos de esta investigación, que he podido preguntar y aclarar las dudas y por ello he decidido participar de manera voluntaria. Tengo conocimiento que puedo retirar mi consentimiento cuando lo considere oportuno. Para constancia de ello firmo a continuación:

Nombre del participante:
Firma:
Cédula de ciudadanía:
Dirección de residencia:
Teléfono:

Fecha: DD: _____ / MM: _____ / AA: _____

Testigos: Con mi firma certifico que estuve presente durante la discusión de la información presentada en este formato de consentimiento informado, las dudas fueron resueltas y la decisión de participación del paciente es voluntaria.

Nombre del testigo No. 1:
Firma del testigo:
Cédula de ciudadanía:
Dirección de residencia:
Teléfono:

Fecha: DD: _____ / MM: _____ / AA: _____

Nombre del testigo No. 2:
Firma del testigo:

Cédula de ciudadanía:
Dirección de residencia:
Teléfono:

Fecha: DD: _____ / MM: _____ / AA: _____

Investigador: certifico que he dado la información y explicación al participante acerca del estudio y de la información contenida en el consentimiento informado de la presente investigación, respondiendo las dudas o preguntas realizadas por este y sin ejercer ninguna presión para su participación.

Nombre del investigador:
Firma del investigador:
Cédula de ciudadanía:
Dirección laboral:
Teléfono:

Fecha: DD: _____ / MM: _____ / AA: _____

Se entrega copia al participante: Si ____ No: ____

Anexo 3. Encuesta epidemiológica del proyecto

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA DEL PROYECTO:

“LEUCOSIS BOVINA EN LECHERÍAS DE ANTIOQUIA: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ZONÓTICO Y DEL EFECTO SOBRE DESEMPEÑO REPRODUCTIVO”

CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN RECOLECTADA EN EL INSTRUMENTO

Toda la información aquí recolectada es confidencial y su uso es estrictamente científico, con propósitos de análisis estadístico, y en ningún caso tiene fines fiscales, ni pueden utilizarse como prueba judicial, de conformidad a lo establecido en el artículo 2 de Ley 1266 de 2008 y demás normas que le adicionen y/o modifiquen.

ACLARACIÓN: Esta encuesta será diligenciada de manera asistida y dirigida por un investigador del proyecto

Hoja de identificación del participante

Nombre _____ **completo:**

Fecha de nacimiento: DD/MM/AAAA

Número _____ **de** _____ **documento** _____ **de** _____ **identidad:**

Nombre _____ **del** _____ **hato:** _____ **Código** _____ **del** _____ **Hato:**

Coordenadas:

_____ **Dirección** _____ **de** _____ **residencia:**

_____ **Municipio:**

_____ Vereda y barrio de residencia:

Teléfono o celular de contacto:

Teléfono o celular de familiares o convivientes:

Correo electrónico:

Código del participante: _____

DD/MM/AAAA

Región Municipio Hato Consecutivo Fecha de ingreso

Norte: 1	Oriente: 2	Valle de aburra: 3
Municipios		
Belmira: 1	Abejorral: 1	Bello: 1
Don Matías: 2	Carmen de Viboral: 2	Girardota: 2
Entreríos: 3	La Ceja: 3	Medellín: 3
San José de la Montaña: 4	La Unión: 4	
San Pedro de los Milagros: 5	Marinilla: 5	
Santa Rosa de Osos: 6	Rionegro: 6	
Yarumal: 7	Santuario: 7	

FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS, AMBIENTALES (COMPONENTE HUMANO)

(Marque con una X o complete la información solicitada según aplique en cada ítem)

Fecha de diligenciamiento:	DD/MM/AAAA
CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN DEL PARTICIPANTE (Código asignado en el proyecto)	_____ DD/MM/AAAA Región Municipio Hato Consecutivo Fecha de ingreso
Sexo	Masculino _____ Femenino _____
Lugar de residencia	Municipio: _____ Vereda: _____ Barrio: _____
Lugar de trabajo	Municipio: _____ Vereda: _____ Barrio: _____
Pertenencia étnica	Indígena _____ Afrocolombiano _____ ROM (gitano) _____ Raizal _____ Palenquero _____ Otro ¿cuál? _____
Tipo de seguridad social	Contributivo _____ Subsidiado _____ No asegurado _____ Especial o Excepción _____
Nivel de escolaridad máximo	Grado máximo alcanzado _____

	i	o	Des de cuándo (m/a)
1. Cuál es su ocupación, función o cargo actual en el hato:			
a) Veterinario			
b) Zootecnista			
c) Mayordomo			

d)	Ordeñador			
e)	Manejo de animales diferentes a ordeño			
f)	Manejo de potreros			
g)	Encierro			
h)	Vacunación			
i)	Baño			
j)	Cuidado de crías			
k)	Asistencia de partos			
l)	Transporte de animales/productos agrícolas			
m)	Sacrificio de los animales			
n)	Beneficio de los animales			
o)	Sector agrícola (cultivos)			
p)	Otra(s), ¿Cuál(es)? _____			
2.	Su ocupación previa a la actual era:			
a)	Veterinario			
b)	Zootecnista			
c)	Mayordomo			
d)	Ordeñador			
e)	Manejo de animales diferentes a ordeño			
f)	Manejo de potreros			
g)	Encierro			

h)	Vacunación			
i)	Baño			
j)	Cuidado de crías			
k)	Asistencia de partos			
l)	Transporte de animales/productos agrícolas			
m)	Sacrificio de los animales			
n)	Beneficio de los animales			
o)	Sector agrícola (cultivos)			
p)	Otra(s), ¿Cuál(es)? _____			
Desde cuándo está laborando en este hato <u>DD/MM/AAAA</u>				

		i	o
3. ¿En su trabajo en este hato tiene contacto directo con animales?			
A continuación, señale con qué animales			
a)	Gatos		
b)	Perros		
c)	Vacas		
d)	Cerdos		
e)	Cabras		
f)	Ovejas		
g)	Gallinas		

h) Caballos		
i) Otro(s), _____	¿Cuál(es)?	
4. Trabaja simultáneamente en otros hatos En cuántos hatos: _____		
5. Con qué animales tiene contacto en los otros hatos		
Gatos		
Perros		
Vacas		
Cerdos		
Cabras		
Ovejas		
Gallinas		
Caballos		
Otro(s), _____	¿Cuál(es)?	

6. ¿Qué animales tiene en su residencia?		
a) Gatos		
b) Perros		
c) Vacas		
d) Cerdos		
e) Cabras		
f) Ovejas		
g) Gallinas		
h) Caballos		

i) Otro(s), ¿Cuál(es)? _____ _____		
7. ¿Tiene mascotas? ¿Cuál(es)? _____ _____		

8. ¿Cuántas horas al día tiene contacto directo con bovinos? En su residencia: _____ En su trabajo: _____
9. ¿Cuántas horas al día tiene contacto directo con animales diferentes a los bovinos? En su residencia: _____ En su trabajo: _____

	i	o
10. ¿Alguna de sus mascotas duerme al interior de la casa? ¿Cuál(es)? _____ _____		
11. ¿Algún animal de su residencia ha tenido abortos? ¿Cuál(es)? _____		
12. ¿Algún animal de su trabajo ha tenido abortos? ¿Cuál(es)? _____		
13. ¿Ha estado expuesto, presenciado o ayudado en algún parto de animales en los últimos 6 meses? ¿Cuál(es) animal(es)?: _____		

<p>14. ¿Ha estado expuesto, presenciado o ayudado en algún parto de humanos en los últimos 6 meses?</p>		
<p>15. El agua de consumo en su residencia es tratada</p> <p>Por el encargado del suministro Si: _____ No: _____</p> <p>Es tratada por usted en el hogar Si: _____ No: _____ En caso de que usted la trate, ¿cómo lo hace? _____</p>		
<p>16. En su lugar de trabajo ha visto o ha encontrado</p>		
<p>a) Roedores</p>		
<p>b) Cucarachas</p>		
<p>c) Moscas</p>		
<p>d) Mosquitos</p>		
<p>e) Pulgas</p>		
<p>f) Ácaros</p>		
<p>g) Tábanos</p>		
<p>h) Garrapatas</p>		
<p>i) Otras plagas, Cuales _____</p>		
<p>17. En su vivienda ha visto o ha encontrado:</p>		
<p>a) Roedores</p>		
<p>b) Cucarachas</p>		
<p>c) Moscas</p>		
<p>d) Mosquitos</p>		
<p>e) Pulgas</p>		
<p>f) Ácaros</p>		

g) Tábanos		
h) Garrapatas		
i) Otras plagas, Cuáles _____		
18. ¿Le han picado los zancudos en el último mes?		
19. ¿Alguna vez ha sido picado o mordido por una garrapata? ¿Cuántas veces? _____		
20. ¿Hace cuánto tiempo fue la última picadura o mordedura por garrapatas? Días _____ Meses _____ Años _____		
21. ¿Sabe si algún familiar que vive con usted ha sido mordido por una garrapata? ¿Quién(es): _____ — ¿En qué parte del cuerpo? _____		
22. ¿Ha encontrado garrapatas en su vivienda o en su lugar de trabajo? ¿En _____ dónde? _____ — ¿En _____ quién(es)? _____		
23. ¿Ha recibido transfusión de sangre?		
24. ¿Hace cuánto tiempo (años y/o meses) fue la última transfusión? Meses _____ Años _____		
25. ¿Ha recibido trasplante de órgano sólido?		

26. ¿Hace cuánto tiempo (años y/o meses) recibió el trasplante? Meses _____ Años _____		
27. ¿Ha viajado en los últimos dos meses? ¿A _____ dónde? _____ _____		

A los siguientes hábitos responda de acuerdo con la frecuencia que lo hace de la siguiente manera: 1: Nunca, 2: Casi nunca, 3: Ocasionalmente, 4 Casi siempre y 5: Siempre

Hábito	1				
28. ¿Se lava sus manos antes de comer?					
29. ¿Se lava sus manos antes de preparar los alimentos?					
30. ¿Se lava sus manos después de ir al baño?					
31. ¿Consume leche cruda?					
En caso de consumir leche cruda indique la frecuencia de acuerdo con el animal de donde proviene					
a) Cabra					
b) Bovinos					
c) Búfalos					
d) Otro ¿Cuál(es)? _____ _____					
32. ¿Consume carne cruda o poco cocida?					

En caso de consumir carne cruda o poco cocida indique la frecuencia de acuerdo con el animal de donde proviene				
a)	Bovino (res)			
b)	Búfalo			
c)	Cerdo			
d)	Pollo			
e)	Otro ¿Cuál(es)? _____ _____			
33. ¿Consume carne tres cuartos de?				
a)	Bovino (res)			
b)	Búfalo			
c)	Cerdo			
d)	Pollo			
e)	Otro ¿Cuál(es)? _____ _____			
34. ¿En su casa preparan productos derivados de la leche cruda, tales como queso o mantequilla?				
35. ¿Usted consume productos derivados de la leche cruda, tales como queso o mantequilla?				

Responda las siguientes preguntas de la 36 a la 47 sólo SI TRABAJA CON ANIMALES:

		i	o
36.	Cuando usted está trabajando con los animales utiliza:		
a)	Guantes		
b)	Tapabocas o máscara facial		
c)	Gafas		
d)	Botas		
e)	Otro(s) implemento(s) protección, ¿Cuál(es)? _____		
37.	¿Se lava sus manos después de trabajar o tener contacto físico con los animales?		
38.	Cuando se lava las manos luego del contacto con los animales usa:		
a)	Agua solamente		
b)	Agua y jabón		
c)	Agua, jabón y desinfectante		
d)	Desinfectante (jabón antimaterial, alcohol)		
e)	Otro(s), ¿Cuál(es)? _____		
39.	En su labor, con cuáles de los siguientes fluidos corporales de los animales tiene contacto		
a)	Sangre		
b)	Fluidos vaginales		
c)	Semen		

d)	Saliva		
e)	Orina		
f)	Materia fecal		
g)	Leche		
h)	Otro(s), _____	¿Cuál(es)?	
40. En su trabajo usted tiene contacto frecuente con:			
a)	Placenta		
b)	Lana o pieles		
c)	Heno – Paja		
d)	Compost		
e)	Estiércol		
41. Donde usted trabaja, qué signos y síntomas se han presentado en los animales:			
a)	Tumores (linfosarcomas o linfoma maligno)		
b)	Exoftalmia		
c)	Ganglios preescapulares y femorales agrandados		
d)	Enflaquecimiento progresivo (Caquexia)		
e)	Disminución progresiva de la producción de leche		
f)	Otro(s), _____	¿Cuál(es)?	
42. Donde usted trabaja, qué enfermedades se han presentado en los animales:			
a)	Brucellosis		
b)	Diarrea viral bovina		
c)	Neosporosis bovina		

d)	Leptospira		
e)	Rinotraqueitis infecciosa Bovina (IBR)		
f)	Otra(s), _____	¿Cuál(es)?	
43.	¿En el trabajo con los animales usted ha tenido accidentes con agujas?		
44.	¿Hace cuánto tiempo ocurrió el accidente con agujas? Meses_____ Años_____		
45.	¿En el trabajo con los animales usted ha tenido accidentes al manipular material quirúrgico?		
46.	¿Hace cuánto tiempo ocurrió el accidente con material quirúrgico? Meses_____ Años_____		
47.	Cuando se muere un animal en su vivienda, o en el lugar en el que trabaja ¿Cómo es la disposición de este?		
a)	Se entierra		
b)	Se lleva a la fosa de cadáveres		
c)	Se deposita en una compostera		
d)	Se deja hasta descomposición A campo abierto: Si _____ No _____ Cerca de su vivienda: Si _____ No _____		
e)	Se incinera		
f)	Se dispone como residuo biológico		
g)	Se da para alimentar a otros animales		
h)	Se deja para el consumo humano		

i) Otro(s), _____	¿Cuál(es)?	
----------------------	------------	--

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (autoreporte)

48. Peso en kilos: _____

49. Talla en centímetros: _____ (tomarla de la cédula)

Antecedentes o condiciones previas	i	o
50. Enfermedades o condiciones de base		
a) Diabetes		
b) Hipertensión		
c) Embarazo		
d) Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)		
e) VIH A, B, 1, 2		
f) Enfermedades autoinmunes		
g) Esplenectomía		
h) Enfermedad hepática		
i) Inflamación testicular		
j) Extirpación de testículo		
k) Le han diagnosticado CA de próstata		
l) Cáncer de seno		
m) ¿Otro tipo de cáncer? Diga cual _____		

n)	¿En su familia existen antecedentes de cáncer?		
¿Qué tipos de cáncer?			
o)	En su familia existen antecedentes de cáncer de seno		
51.	Que personas de su familia han sido diagnosticadas con cáncer de seno _____		
52.	Alguna vez, le han diagnosticado:		
a)	Hepatitis		
b)	Neumonía		
c)	Endocarditis		
d)	Malaria		
e)	Dengue		
f)	Chicungunya		
g)	Zika		
h)	Tuberculosis		
i)	Coronavirus		
j)	Cáncer de seno		
k)	Linfomas		
l)	Otro tipo de Cáncer diga cual _____		
m)	Otra(s), ¿Cuál(es)? _____		
53.	Antecedentes		

a) Fuma Número máximo de cigarrillos por día: _____		
b) Consumo de licor		
c) Consumo de sustancias psicoactivas (marihuana, cocaína, perico)		

<p>54. ¿Usted considera que ha presentado episodios febriles frecuentemente? Duración de la FIEBRE en días: _____</p>		
<p>Considera que con frecuencia ha presentado (sin diagnóstico médico):</p>		
55. Escalofríos		
56. Sudoración profusa		
57. Náuseas		
58. Fatiga (Sensación de cansancio) Duración en días: _____		
59. Anorexia		
60. Mialgias		
61. Artralgias		
62. Cefalea		
63. Diarrea		
64. Vómito		
65. Conjuntivitis		
66. Exantema maculopapular (Erupción cutánea con máculas o pápulas)		

67. Adenopatías ¿Cuál(es)?: Cervicales ___ Axilares ___ Inguinales ___ Epitrocleares ___		
68. Parálisis facial		
69. Tos Duración en días: _____		
70. Expectorcación		
71. Disnea		
72. Congestión nasal		
73. Rinorrea		
74. Coluria		
75. Ictericia (percepción del paciente de que está amarillo)		
76. Dolor en hipocondrio derecho		
77. Prurito		
78. Dolor retroocular		

Profesional que diligenció esta información

Nombre:

Fecha: DD/MM/AAAA

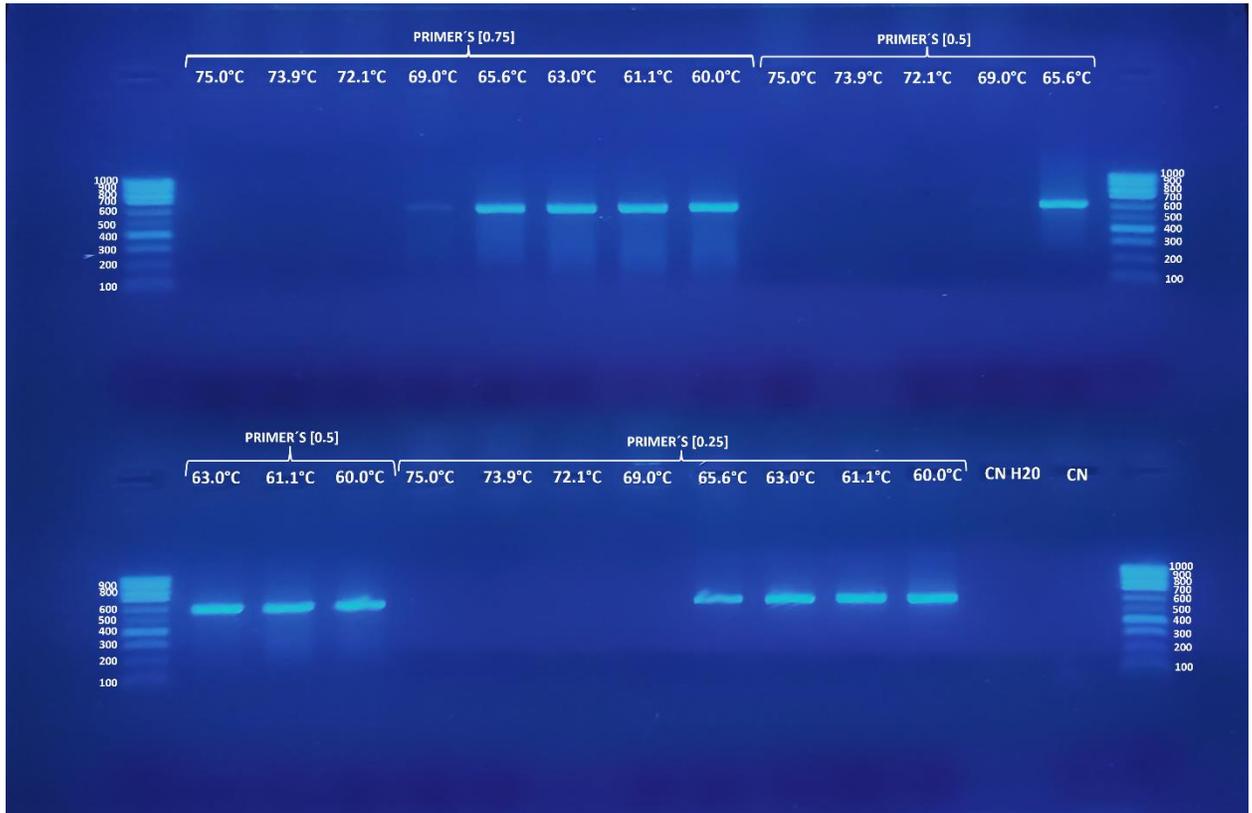
Anexo 4. Secuencias incluidas en el análisis filogenético

Nro acceso GenBank	Nombre de la secuencia	Origen geografico	Genotipo	Hospedero	Referencia
OR 636720	OR636720	Antioquia_En terrios	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636721	OR636721	Antioquia_Ea nta Rosa	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636722	OR636722	Antioquia_Be lmira	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636723	OR636723	Antioquia_Sa n Antonio De Prado	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636724	OR636724	Antioquia_Ri onegro	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636725	OR636725	Antioquia_Sa n José	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636726	OR636726	Antioquia_En terrios	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636727	OR636727	Antioquia_Sa nta Rosa	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636728	OR636728	Antioquia_Sa n Pedro	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636729	OR636729	Antioquia_Sa n Pedro	1	Hom o Sapiens	Este estudio
OR 636730	OR636730	Antioquia_Gi rardota	1	Hom o Sapiens	Este estudio
MH 041991	MH041991 _BLV_G1_COL	Cundinamarc a_Subachoque	1	Bos Taurus	Figueroa et al, 2020
MH 042003	MH042003 _BLV_G1_COL	Cundinamarc a_Subachoque	1	Bos Taurus	Figueroa et al, 2020
OP 345017	OP345017 _BLV_G1_CO	Antioquia_Sa nta Rosa	1	Bos Taurus Holstein	Úsuga- Monroy et al, 2018

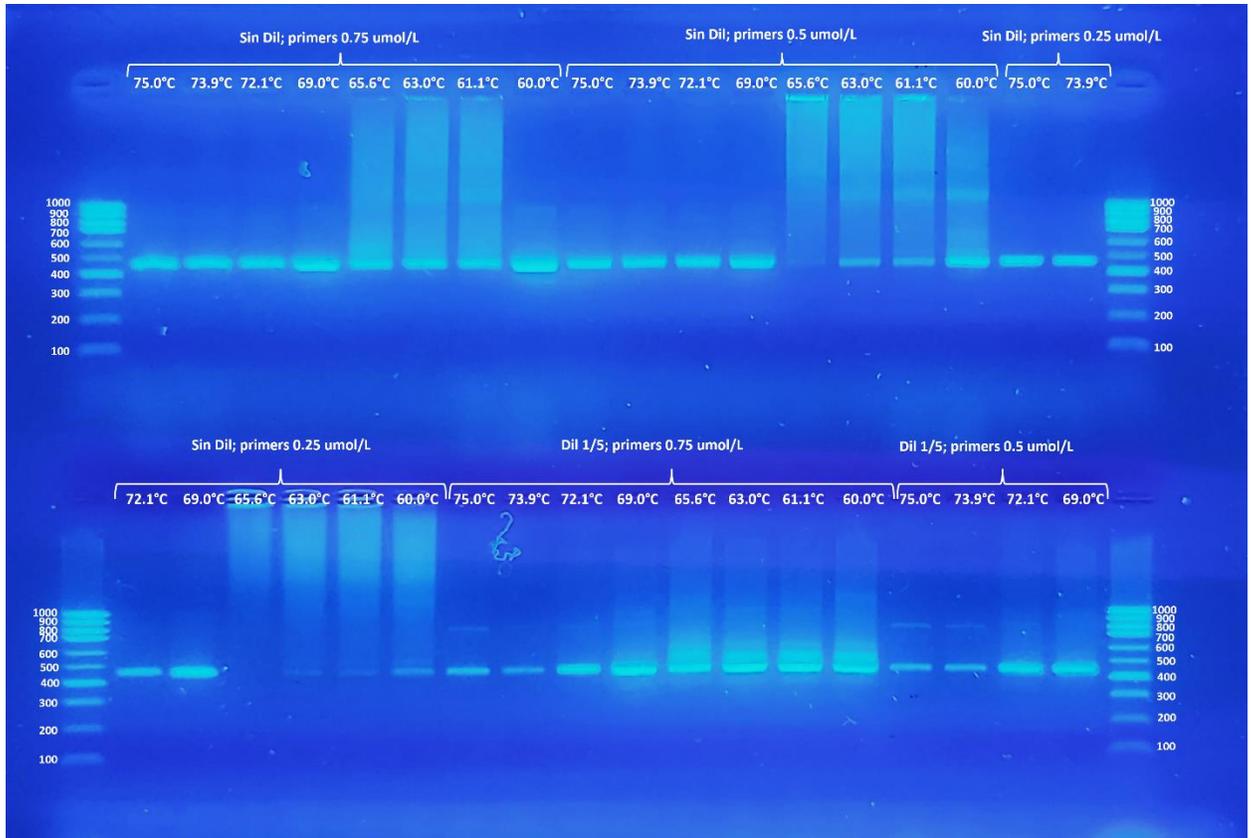
OP	OP345015	Antioquia_Sa		Bos	Úsuga-
345015	_BLV_G1_CO	n Pedro	1	Taurus Holstein	Monroy et al, 2018
OP	OP345014	Antioquia_Ri		Bos	Úsuga-
345014	_BLV_G1_CO	onegro	1	Taurus Holstein	Monroy et al, 2018
OP	OP345008	Antioquia_En		Bos	Úsuga-
345008	_BLV_G1_CO	trerrios	1	Taurus Holstein	Monroy et al, 2018
OP	OP345002	Antioquia_Be		Bos	Úsuga-
345002	_BLV_G1_CO	Imira	1	Taurus Holstein	Monroy et al, 2018
MT	MT452070	Antioquia_M		Bos	Úsuga-
452070	_BLV_G1_CO	edellin	1	Taurus Holstein	Monroy et al, 2018
MT	MT452066	Antioquia_Be		Bos	Úsuga-
452066	_BLV_G1_CO	llo	1	Taurus Holstein	Monroy et al, 2018
FM	FM209469	Uruguay		Bos	Moratorio
209469	_BLV_G1_UY		1	Taurus	et al, 2010
LC0	LC080654_	Perú/Lima		Bos	Polat et al,
80654	BLV_G2_PE		2	Taurus	2016
FJ8	FJ808583_	Argentina		Bos	Rodriguez
08583	BLV_G2_AR		2	Taurus	M et al, 2009
OP	OP345019	Antioquia_Be		Bos	Úsuga-
345019	_BLV_G3_CO	Imira	3	Taurus Holstein	Monroy et al, 2018
LC0	LC007993_	Japón/Miyaz		Bos	Mekata et
07993	BLV_G3_JP	aki	3	Taurus	al, 2015
JQ6	JQ686093_	Rusia		Bos	Lomakina,
86093	BLV_G4_RU		4	Taurus	2012
AF3	AF399702_	Brazil/Minas		Bos	Camargos
99702	BLV_G5_BR	Gerai	5	Taurus	et al, 2002
EF0	EF065645_	Estados		Bos	Zhao et al,
65645	BLV_G5_US	Unidos	5	Taurus	2007

FJ8 08582	FJ808582_ BLV_G6_AR	Argentina	6	Bos Taurus	Rodríguez M et al, 2009
KU2 33562	KU233562_ _BLV_G6_TH	Tailandia/Sar aburi	6	Bos Taurus	Lee at al, 2016
AY5 15274	AY515274_ _BLV_G7_CL	Chile/Arauca nia	7	Bos Taurus	Felmer et al, 2005
S83 530	S83530_B LV_G7_IT	Italia	7	Bos Taurus	Molteni et al, 1996
GU 724606	GU724606_ _BLV_G8_HR	Croacia	8	Bos Taurus	Lojkic, 2010 (Sin publicar)
JQ6 75759	JQ675759_ BLV_G8_RU	Rusia/ Moscú	8	Bos Taurus	Lomakina, 2012
LC0 80670	LC080670_ BLV_G9_CL	Chile/Arauca nia	9	Bos Taurus	Polat et al, 2016
LC0 80663	LC080663_ BLV_G9_BO	Bolivia	9	Bos Taurus	Polat et al, 2016
KU2 33541	KU233541_ _BLV_G10_TH	Tailandia/Na khon Sawan	10	Bos Taurus	Lee at al, 2016
KU2 33547	KU233547_ _BLV_G10_TH	Tailandia/Ph ayao	10	Bos Taurus	Lee at al, 2016
KU7 64747	KU764747_ _BLV_G11_CN	China	11	Bos Taurus	Yu C et al, 2019
OK 945974	OK945974_ _BLV_G12_KJ	Kazajistán/Sr edigornoje	2	Bos Taurus	Sultanov et al, 2022
OK 945976	OK945976_ _BLV_G12_KJ	Kazajistán/D orodnica	2	Bos Taurus	Sultanov et al, 2022

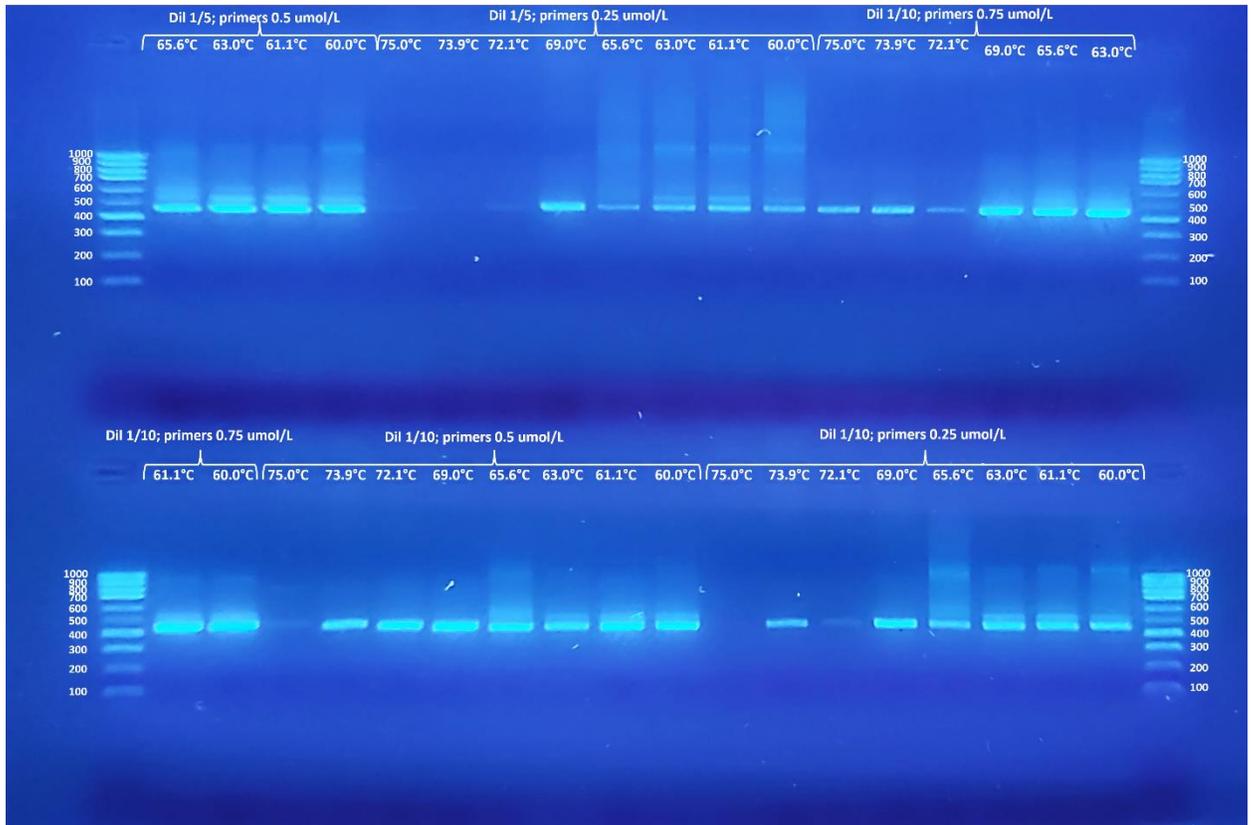
Anexo 5. Gradiente de concentración y temperatura de los primers



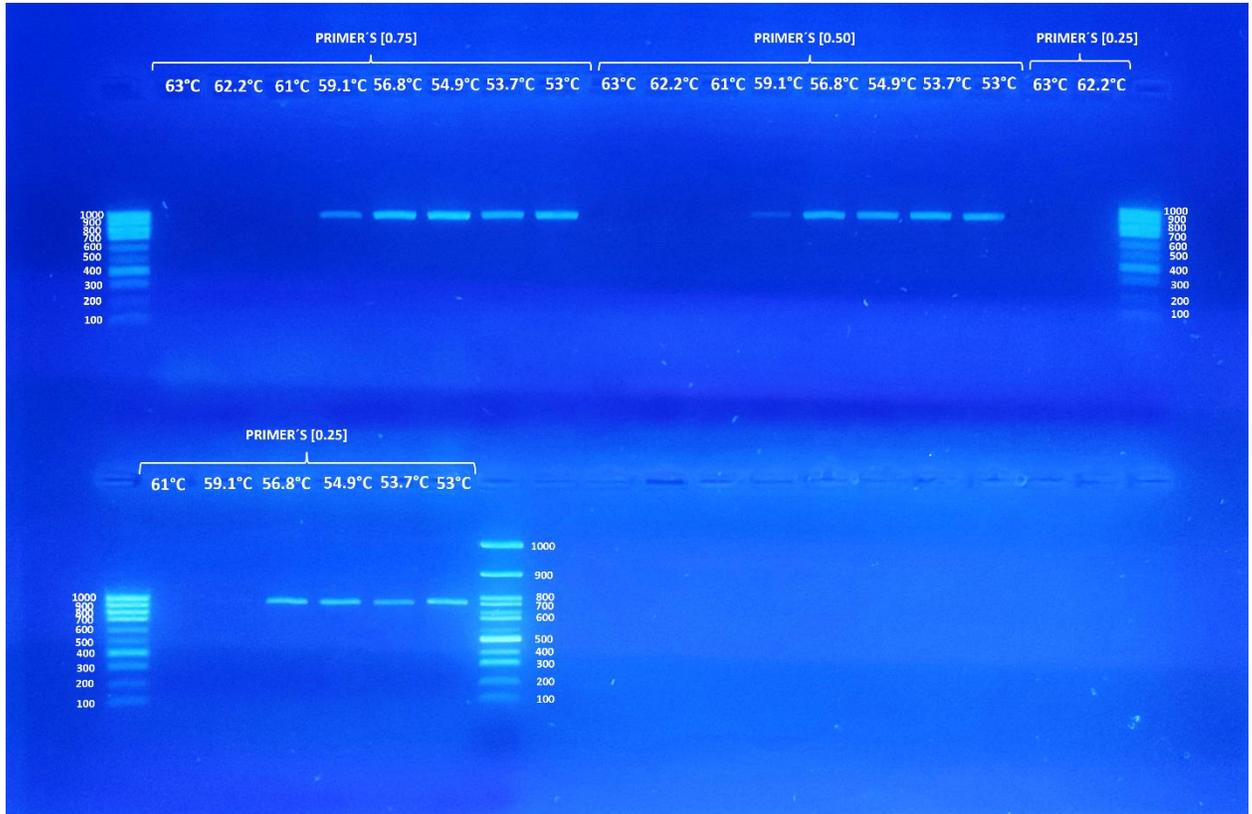
Gradiente T°: 60°C-75°C vs concentración primer's: 0.75 umol/L, 0.5 umol/L, 0.25umol/L. Primers Env BLV, ronda # 1 (Tamaño de banda esperado: 598 pb). Agarosa 2%. Ladder 100pb – 1000pb



Gel #1. Gradiente de T°:60-75°C vs concentración de primers: 0.75umol/L, 0.5umol/L, 0.25umol/L vs amplicon sin diluir, dil 1/5, dil 1/10. Primers Env BLV, ronda # 2 (Tamaño de banda esperado: 444 pb). Agarosa 2%. Ladder 100pb – 1000pb



Gel #2. Gradiente de T°:60-75°C vs concentración primers: 0.75umol/L, 0.5umol/L, 0.25umol/L vs amplicon sin diluir, dil 1/5, dil 1/10. Primers Env BLV, ronda # 2 (Tamaño de banda esperado: 444 pb). Agarosa 2%. Ladder 100pb – 1000pb



Gradiente T°: 53°C-63°C vs concentración primer's: 0.75 umol/L, 0.5 umol/L, 0.25umol/L. Primers tax BLV (Tamaño de banda esperado: 898 pb). Agarosa 2%. Ladder 100pb – 1000pb

Anexo 6. Gráfico de amplificación de una PCR en tiempo real (qPCR) dirigida al gen constitutivo de la enzima GAPDH

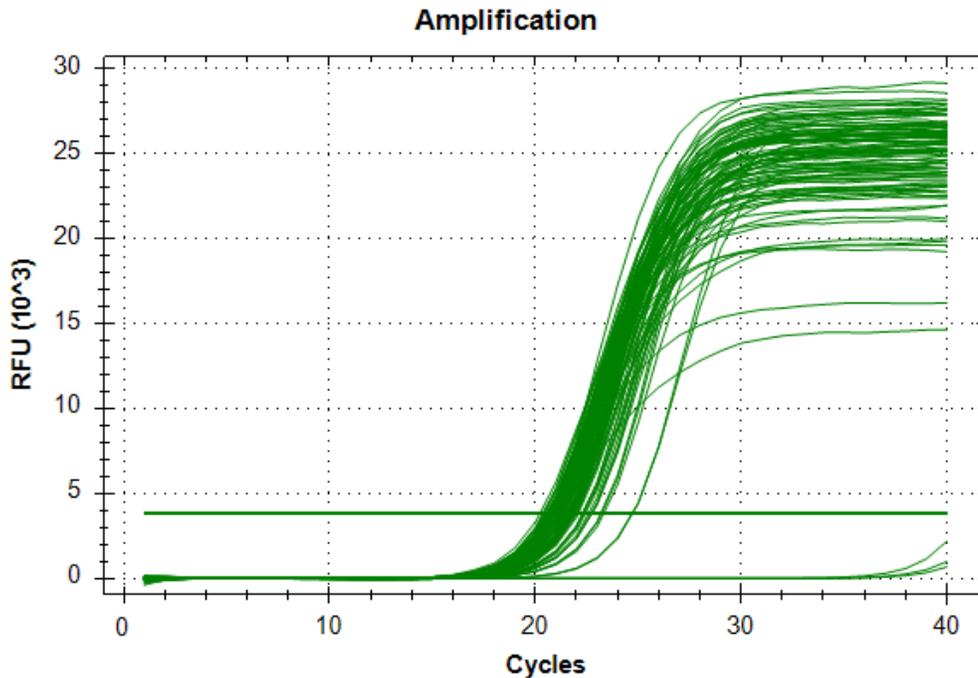


Gráfico de amplificación de una PCR en tiempo real (qPCR) dirigida al gen constitutivo de la enzima GAPDH. Las muestras de ADN en las que no se observó curva de amplificación o que cruzaron el umbral de detección en un ciclo de PCR > a 30 fueron descartadas y sometidas nuevamente a proceso de extracción de ADN y verificación de la calidad.

Anexo 7. Electroforesis de la PCR anidada dirigida al gen *env* del BLV

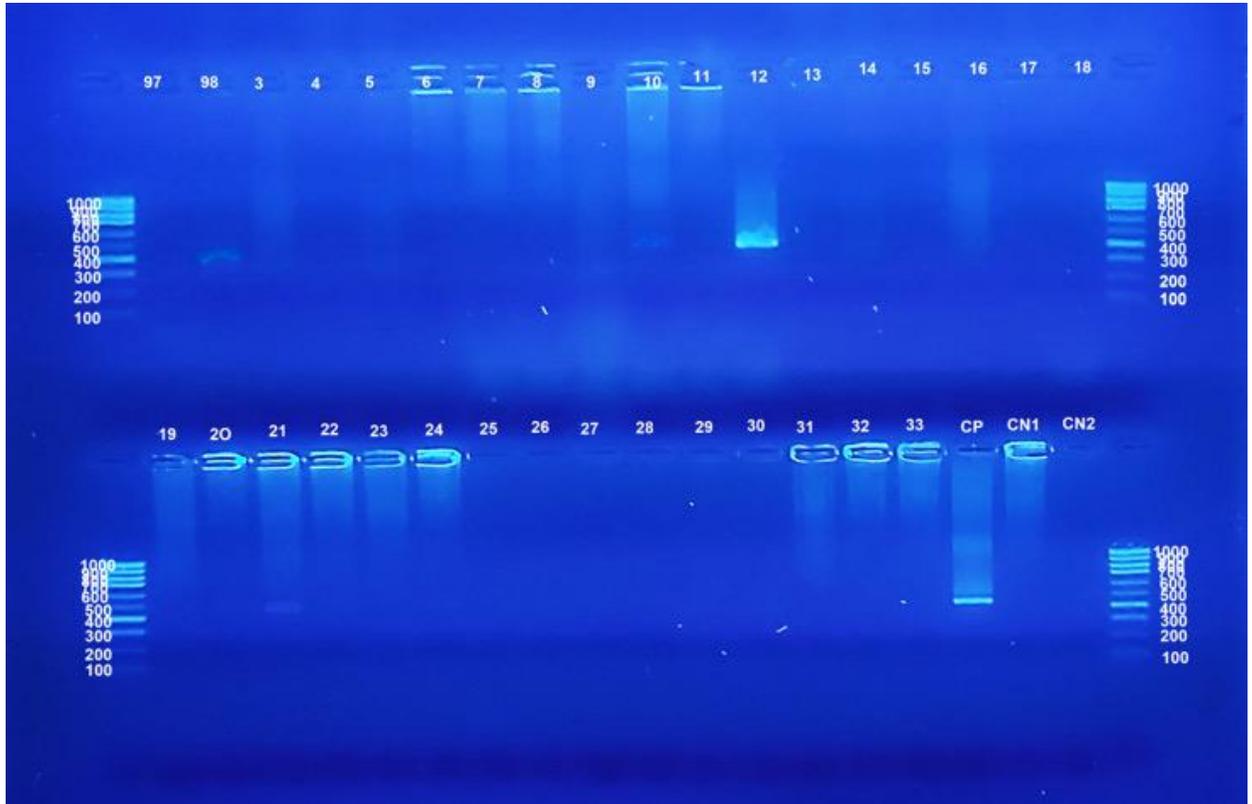


Imagen del gel de agarosa #1 bajo luz UV de la PCR anidada #1 del gen env del BLV. Tamaño de banda esperado: 444 pb. Participantes: 97,98, 3 al 33. CP: Control positivo, CN1: Control negativo ronda #1, CN2: Control negativo ronda #2. Ladder 100pb – 1000pb. Se consideraron positivas las muestras que presentan el tamaño de banda esperado: 98, 10, 12, 21

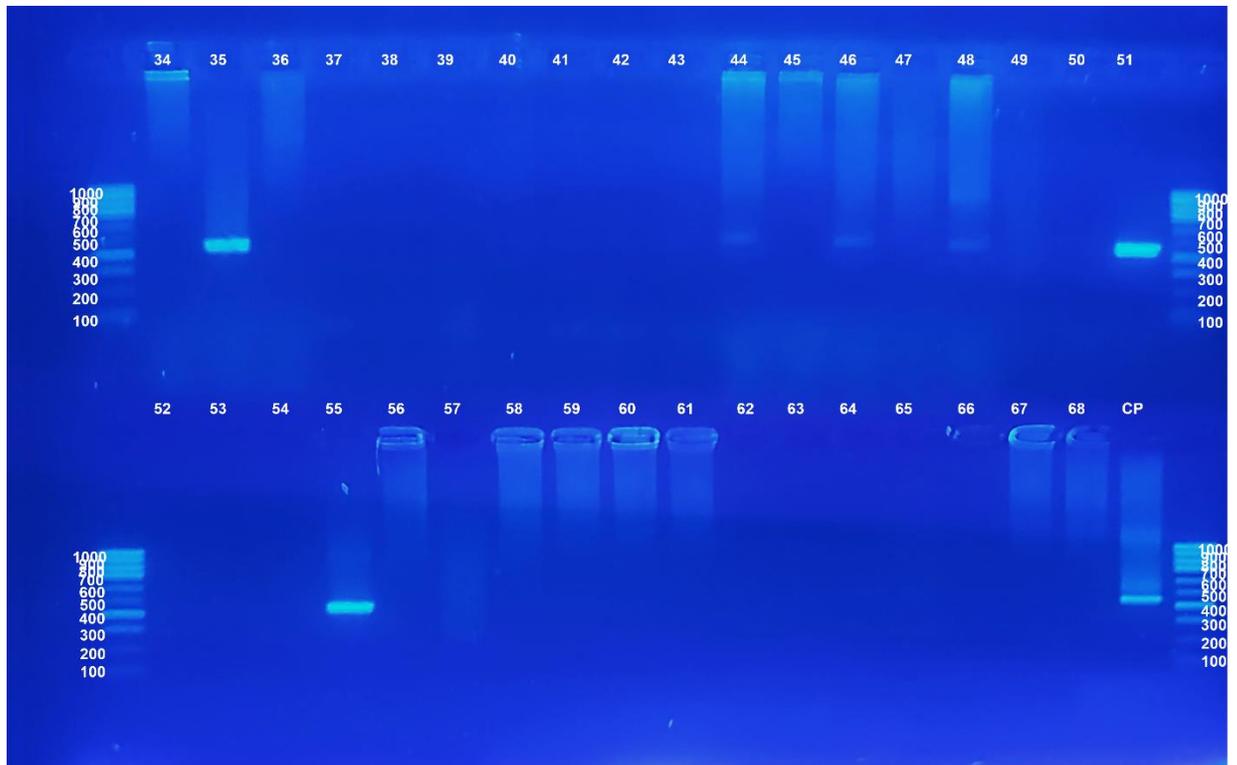


Imagen del gel de agarosa #2 bajo luz UV de la PCR anidada #1 del gen env del BLV. Tamaño de banda esperado: 444 pb. Participantes: 34 al 68. CP: Control positivo. Ladder 100pb – 1000pb. Se consideran positivas las muestras que presentaron un tamaño de banda esperado: 35, 44,46, 48, 51, 55

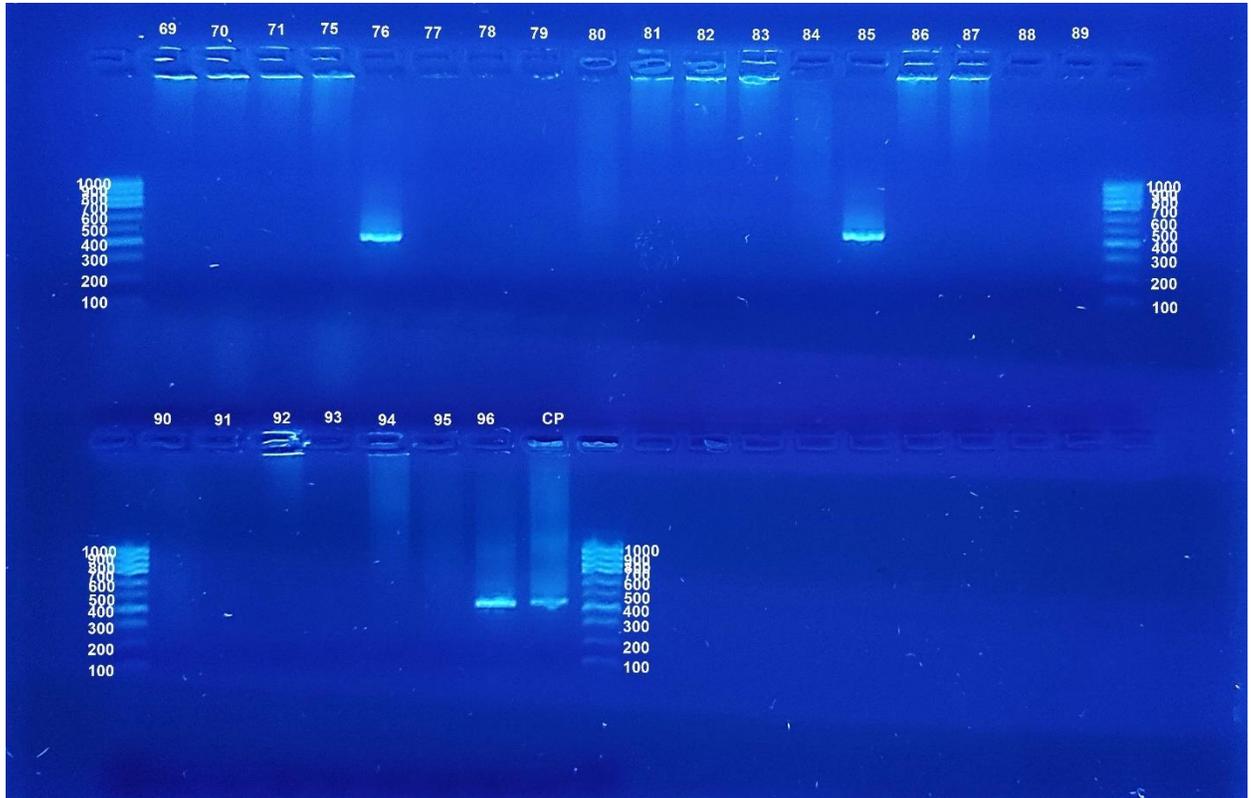


Imagen del gel de agarosa #3 bajo luz UV de la PCR anidada #1 del gen env del BLV. Tamaño de banda esperado: 444 pb. Participantes: 69 al 96. CP: Control positivo. Ladder 100pb – 1000pb. Se consideraron positivas las muestras que presentaron el tamaño de banda esperado: 76, 85, 96

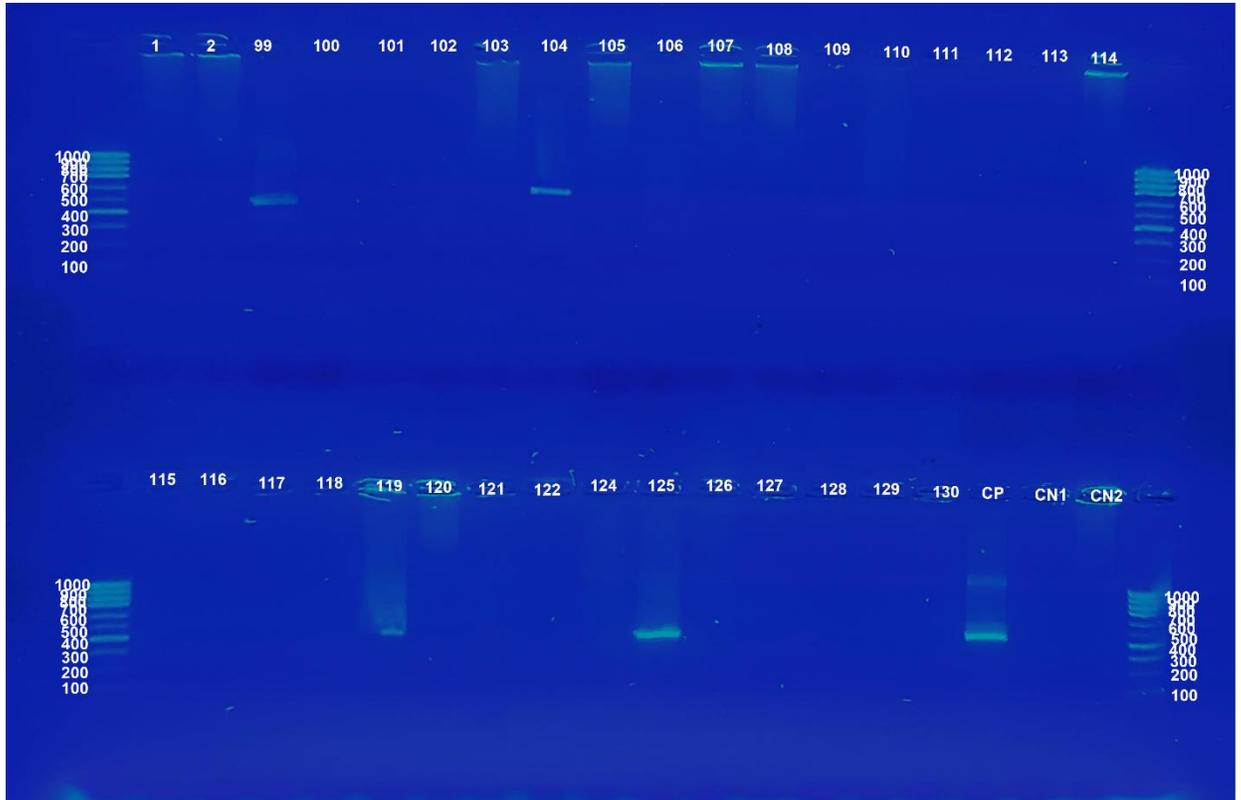


Imagen del gel de agarosa #1 bajo luz UV de la PCR anidada #2 del gen *env* del BLV. Tamaño de banda esperado: 444 pb. Participantes: 1, 2, 99 al 130. CP: Control positivo, CN1: Control negativo ronda #1, CN2: Control negativo ronda #2. Ladder 100pb – 1000pb. Se consideraron positivas las muestras que presentan el tamaño de banda esperado: 99,104,119, 125

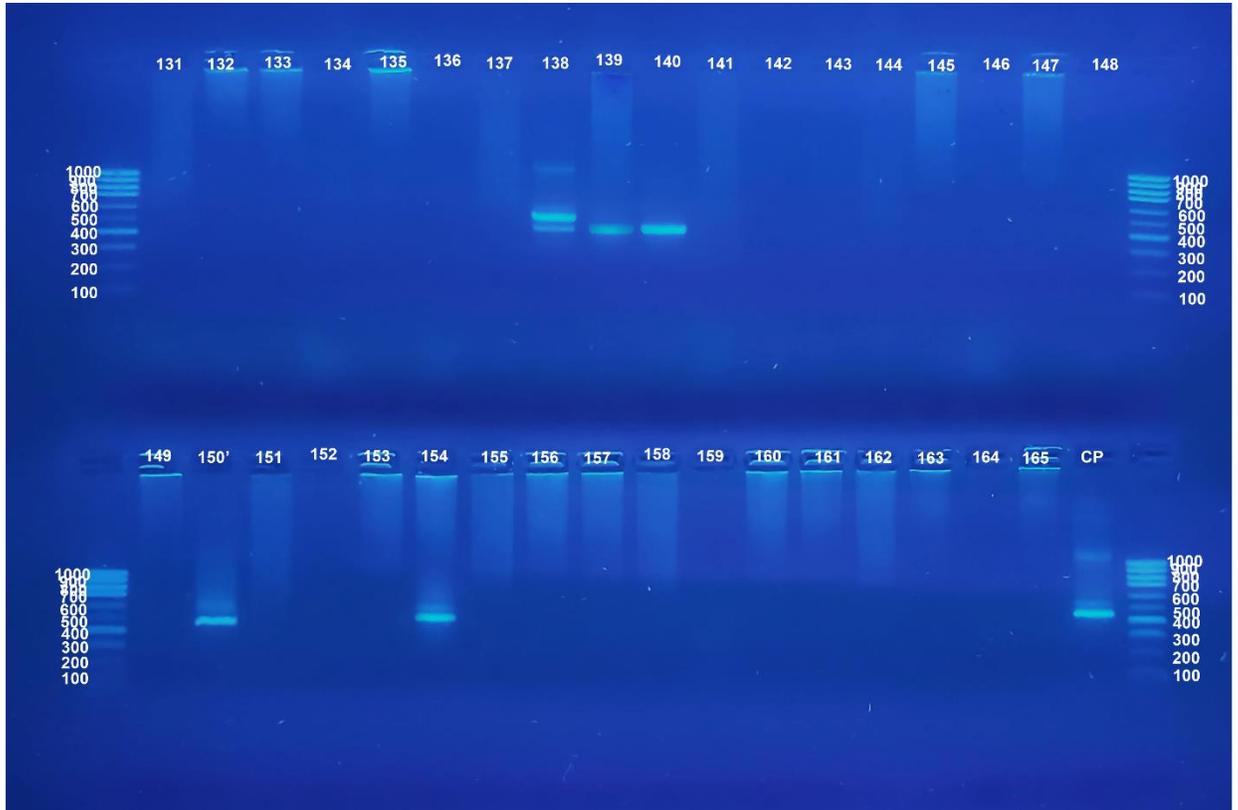


Imagen del gel de electroforesis #2 bajo luz UV de la PCR anidada #2 del gen env del BLV. Tamaño de banda esperado: 444 pb. Participantes: 131 al 165. CP: Control positivo. Ladder 100pb – 1000pb. Se consideraron positivas las muestras que presentaron el tamaño de banda esperado: 138, 139 140, 150, 154

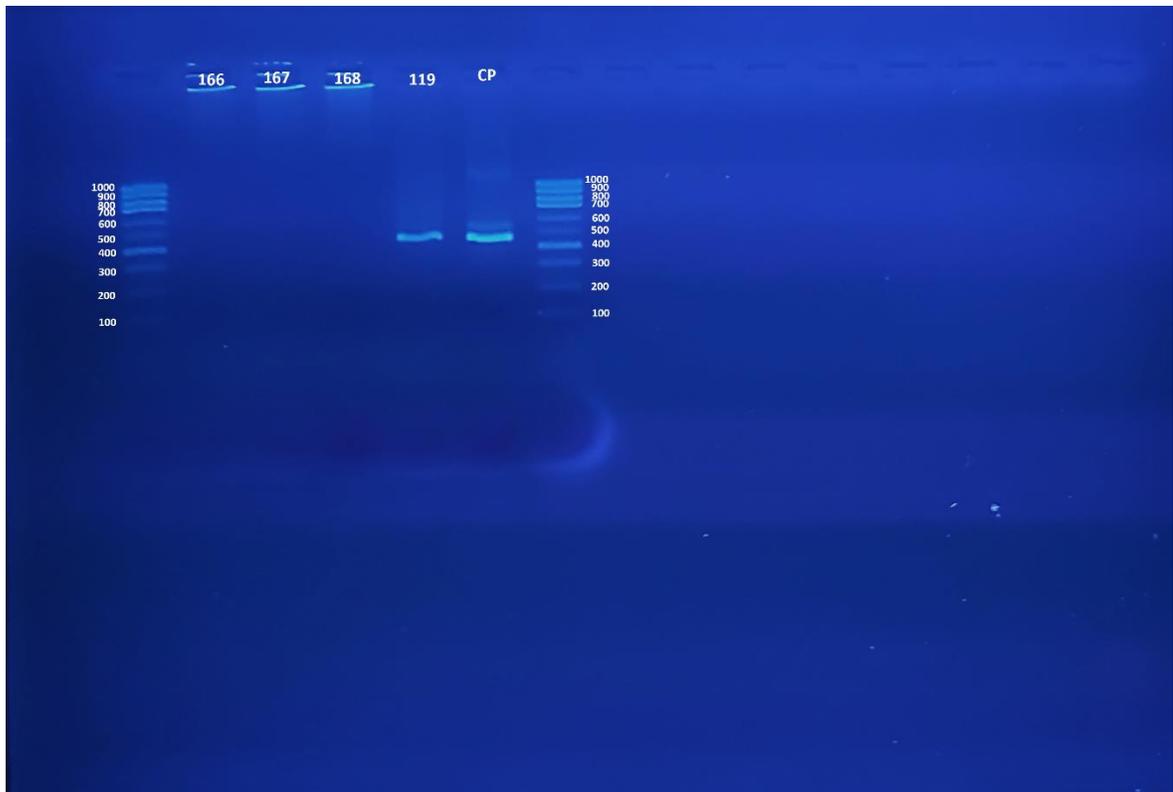


Imagen del gel de agarosa #3 bajo luz UV de la PCR anidada #2 del gen env del BLV. Tamaño de banda esperado: 444 pb. Participantes: 166 al 168, 119 (repetición). CP: Control positivo. Ladder 100pb – 1000pb

Anexo 8. Electroforesis de la PCR convencional dirigida al gen *tax* del BLV

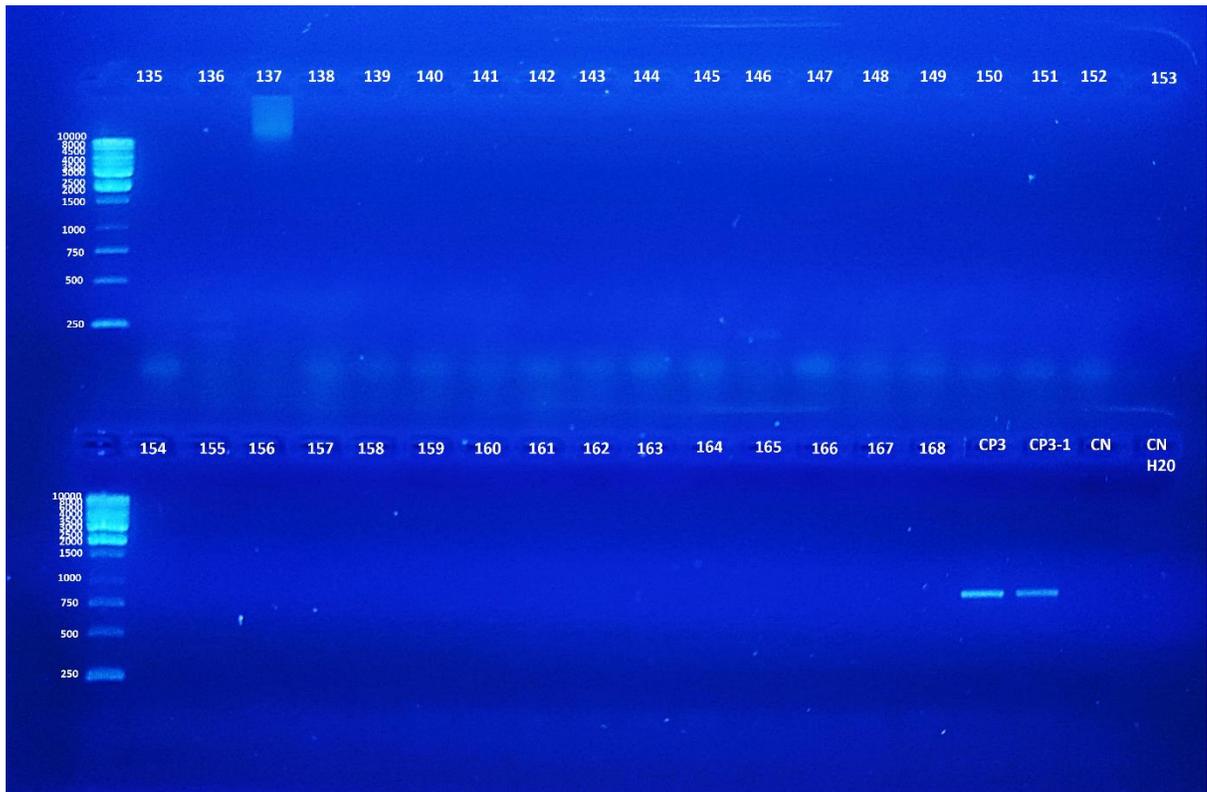


Imagen del gel de agarosa al 2% bajo luz UV de una PCR convencional del gen *tax* del BLV. Tamaño de banda esperado: pb. Participantes: 135 al 168. CP3: Control positivo, CP3-1: Repetición del control positivo. CN: Control negativo solo con Máster Mix, CNH2O: Control negativo con agua MiliQ. Ladder 250pb – 10000pb

Anexo 9. Matriz de distancias de las secuencias obtenidas en este estudio

	R63672	R63672	R63672	R63672	R63672	R63672	C R636726	C R636727	C R636728	C R636729	C R636730	P_B LV
	0	1	2	3	4	5						
R636720												
R636721	.000											
R636722	.000	.000										
R636723	.000	.000	.000									
R636724	.012	.003	.002	.003								
R636725	.000	.000	.000	.000	.002							
R636726	.002	.003	.002	.003	.019	.002						
R636727	.000	.000	.000	.000	.003	.000	.003	0				
R636728	.000	.000	.000	.000	.016	.000	.005	.000	0	0		
R636729	.000	.000	.000	.000	.003	.000	.003	.000	.000	0		
R636730	.005	.006	.005	.006	.008	.005	.008	.006	.006	.005	0	
P_BLV	.000	.000	.000	.000	.012	.000	.002	.000	.000	.000	.005	0

Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias. Los análisis se realizaron utilizando el modelo de distancias p. Este análisis involucró 12 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de los codones incluidas fueron 1st+2nd+3rd++No codificantes. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 495 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 11.

Anexo 10. Productos de apropiación social del conocimiento. Ponencia oral en evento científico internacional



A:

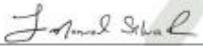
MENDOZA WILLINGTON, ISAZA JUAN PABLO, LÓPEZ LUCELLY, LÓPEZ ALBEIRO, GUTIÉRREZ LINA A.

Por su valiosa participación en la presentación del trabajo en modalidad Oral:

Detección molecular del Virus de la Leucosis Bovina y genotipos circulantes en trabajadores de hatos lecheros de Antioquia, Colombia

durante la XLVIII Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C., y la XXVII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal, llevada a cabo en las instalaciones del Palacio de Convenciones del Estado de Zacatecas, con un valor curricular de 10 hrs.

Zacatecas, Zac., 28 de Abril de 2023


Dr. José Manuel Silva Ramos
Director UAMVZ


M. Sc. Abelardo Conde Pulgarín
Presidente ALPA


Dr. José Herrera Camacho
Presidente AMPA

Anexo 11. Productos de apropiación social del conocimiento. Ponencia modalidad cartel en evento científico nacional



UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA

Campus **Santa Marta**

Certificado de Ponencia

El Comité Organizador del **X Simposio Colombiano & VI Congreso Latinoamericano de Virología**, certifica que:

Mendoza Willington

Participó en calidad de **PONENTE** en modalidad cartel, del trabajo titulado:

Detección molecular del Virus de la Leucosis Bovina, genotipos circulantes y factores asociados en trabajadores de hatos lecheros de Antioquia, Colombia.

Mendoza Willington^{1,*}, Isaza Juan Pablo¹, López Lucelly², López-Herrera Albeiro³, Gutiérrez Lina A¹

El evento se llevó a cabo en la ciudad de Santa Marta, entre el 29 de noviembre y 1 de diciembre de 2023.

Salín Ramón Touchie Meza
Salín Ramón Touchie Meza
Decano, Facultad de Medicina
Universidad Cooperativa de Colombia

José Aldemar Usme Ciro
José Aldemar Usme Ciro
Comité Organizador
Simposio ACV 2023

Jaime Eduardo Castellanos Parra
Jaime Eduardo Castellanos Parra
Presidente, 2021-2023
Asociación Colombiana de Virología

X Simposio Colombiano & VI Congreso Latinoamericano de Virología



Anexo 12. Productos de apropiación social del conocimiento. Ponencia modalidad oral en evento científico nacional



The certificate is issued by the Universidad Cooperativa de Colombia, Campus Santa Marta. It certifies the participation of Cristina Úsuga-Monroy as a speaker at the X Colombian & VI Latin American Congress of Virology. The topic of her presentation is 'Effect of the circulation of the virus of bovine leukosis in the specialized dairy of Antioquia, Colombia'. The event took place in Santa Marta from November 29 to December 1, 2023. The certificate is signed by Salín Ramón Touchie Meza (Dean of the Faculty of Medicine), José Aldemar Usme Ciro (Organizing Committee), and Jaime Eduardo Castellanos Parra (President of the Colombian Association of Virology).

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA
Campus **Santa Marta**
Certificado de Ponencia

El Comité Organizador del **X Simposio Colombiano & VI Congreso Latinoamericano de Virología**, certifica que:
Cristina Úsuga-Monroy

Participó en calidad de **PONENTE** en modalidad oral, del trabajo titulado:
Efecto de la circulación del virus de leucosis bovina en la lechería especializada de Antioquia, Colombia

Cristina Úsuga-Monroy^{1,*}, Daniela Castillo-Rey¹, Cristian Rúa², Willington Mendoza³, Juan Pablo Isaza³, Lucelly López⁴, Tatiana Ruiz-Cortés², Lina A. Gutiérrez³, Albeiro López-Herrera¹

El evento se llevó a cabo en la ciudad de Santa Marta, entre el 29 de noviembre y 1 de diciembre de 2023.

Salín Ramón Touchie Meza
Salín Ramón Touchie Meza
Decano, Facultad de Medicina
Universidad Cooperativa de Colombia

José Aldemar Usme Ciro
José Aldemar Usme Ciro
Comité Organizador
Simposio ACV 2023

Jaime Eduardo Castellanos Parra
Jaime Eduardo Castellanos Parra
Presidente, 2021-2023
Asociación Colombiana de Virología

X Simposio Colombiano & VI Congreso Latinoamericano de Virología



Anexo 13. Productos de generación de nuevo conocimiento. Artículo científico publicado.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199186>



Bovine leukemia virus detection in humans: A systematic review and meta-analysis

Willington Mendoza ^a, Juan Pablo Isaza ^a, Lucelly López ^b, Albeiro López-Herrera ^c,
 Lina A. Gutiérrez ^{a,*}

^a Grupo Biología de Sistemas, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Circular 1a N°70-01, Bloque 11C - Oficina 417, Medellín, Colombia

^b Grupo de Investigación en Salud Pública, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

^c Grupo de Investigación Biodiversidad y Genética Molecular (BIOGEM), Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:
 Bovine leukemia virus
 Humans
 Epidemiology
 Risk factors

ABSTRACT

To review the available studies on the frequency of detection of the bovine leukemia virus in human samples, a systematic review with meta-analysis of the scientific literature was carried out, including papers published in English, Spanish, and Portuguese in 5 multidisciplinary databases. We collected information from different populations following a detailed and reproducible search protocol in which two researchers verified the inclusion and exclusion criteria. We identified 759 articles, of which only 33 met the inclusion criteria. Analyzed studies reported that the presence of the virus was measured in human samples, such as paraffin-embedded breast tissue and peripheral blood from 10,398 individuals, through serological and molecular techniques. An overall virus frequency of 27% (ranging between 17 and 37%) was observed, with a high-frequency data heterogeneity between studies. The presence of this virus in different human biological samples suggests the need to investigate further its transmission route to humans and its potential role in developing and progressing diseases.

1. Introduction

Bovine Leukemia Virus (BLV) belongs to the *Deltaretrovirus* genus and *Retroviridae* family; it is closely related to human T-cell lymphotropic virus 1 (HTLV-1) (Pluta et al., 2020). Morphologically, the viral particle has a diameter that ranges between 60 and 125 nm. Like all retroviruses, BLV possesses the genes *gag*, *pro*, *pol*, and *env*, which encode the internal structural proteins, viral protease, reverse transcriptase, and envelope glycoproteins of the virion, respectively, which are essential to produce infectious viral particles. Two identical long terminal repeats (LTRs) are flanking these genes (Chameettachai et al., 2023). Moreover, BLV and HTLV-1 have a pX sequence between the *env* gene and the 3'LTR region that encodes the regulatory proteins Tax and Rex. In BLV and HTLV-1, the Tax protein acts as an activator of transcription with oncogenic potential, while Rex interferes with the exportation of messenger RNA of both viruses from the nucleus (Derse, 1987; Felber et al., 1989; Willems et al., 1987; Willems et al., 1990).

BLV can naturally infect cattle, capybaras, and sheep. Nevertheless, *in vitro*, BLV can infect different cell types from various species,

including humans, such as human lung embryonic cells (WI-38), human tumor (ARH77 and K562), and neural-origin human cells are also highly susceptible to BLV infection (Altaner et al., 1989; Camargos et al., 2004; Delarmelina et al., 2020). For many years, it was believed that humans were not exposed; however, various reports have emerged in the last decades about the presence of BLV in humans for the reason that the identification of different biological markers and gene fragments in the proviral stage (Giovanna et al., 2013; Buehring et al., 2014; Khalilian et al., 2019), proteins (Uribe et al., 2006) and antibodies reactive against the virus as a sample of exposure to this virus (Buehring et al., 2003). It is now known that BLV may be present in the breast (Buehring et al., 2014; Khalilian et al., 2019; Schwingel et al., 2019; Baltzell et al., 2018; Lendez et al., 2018; Buehring et al., 2017; Buehring et al., 2015), lung (Robinson et al., 2016), and blood cells (Buehring et al., 2019) in humans.

Studies published since 1976 demonstrated the ability of BLV to infect various human cell lines. Cell cultures from humans, primates (Chimpanzees and Rhesus monkeys), canines, sheep, goats, and bats were infected with BLV-infected cell lines and by inoculation with cell-

* Corresponding author.
 E-mail address: lina.gutierrezb@upb.edu.co (L.A. Gutiérrez).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199186>

Received 17 May 2023; Received in revised form 26 July 2023; Accepted 30 July 2023
 Available online 10 August 2023

0168-1702/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Anexo 14. Productos de generación de nuevo conocimiento. Artículo científico publicado.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107253>



Bovine Leukemia Virus molecular detection and associated factors among dairy herd workers in Antioquia, Colombia

Willington Mendoza ^a, Juan Pablo Isaza ^a, Lucelly López ^b, Albeiro López-Herrera ^c, Lina A. Gutiérrez ^{a,*}

^a Grupo Biología de Sistemas, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

^b Grupo de Investigación en Salud Pública, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

^c Grupo de Investigación Biodiversidad y Genética Molecular (BIOGEM), Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:
 Zoonosis
 Bovine leukemia virus
 Livestock
 Humans
 Genotype

ABSTRACT

The Bovine Leukemia Virus (BLV) affects mainly cattle, is transmitted by exposure to contaminated biological fluids, and generates lymphomas in 5 % of infected animals. The zoonotic potential of BLV has been studied, and it is currently unknown if it circulates in human workers on dairy herds in Antioquia. Objective: To determine the frequency of BLV detection, the genotypes of the virus, and the factors associated with its detection in workers for dairy herds in Antioquia, Colombia. Through a cross-sectional study in 51 dairy herds, 164 adults were recruited. A peripheral blood sample was collected from each participant for molecular detection of the BLV *env* and *tax* genes, and associated factors were explored through bivariate and multivariate mixed Poisson model analyses. The analysis showed that 82 % (134/164) of the participants were men, with an average age of 40. Using qPCR, the constitutive gene GAPDH was amplified to evaluate the presence of amplification inhibitors in the DNA samples. Using nested PCR, the amplification of the *env* viral gene was obtained in 13 % (22/164) of the total samples analysed, while all the samples tested negative for *tax*. The amplicons of the *env* gene were sequenced, and the identity compatible with BLV was verified by BLAST analysis (NCBI). Using molecular phylogeny analysis, based on maximum likelihood and haplotype network analysis, it was identified that BLV genotype 1 is present in the evaluated population. 16 % (26/164) of the participants reported having ever had an accident with surgical material during work with cattle; this variable was associated with BLV positivity even after adjusting for other variables (OR = 2.70, 95 % CI = 1.01 - 7.21). Considering that other studies have reported the circulation of BLV genotype 1 in cattle from this same region and the present report in humans from dairy herds, the results suggest a possible zoonotic transmission of BLV genotype 1 in Antioquia, reinforcing the need to continue investigating to determine the potential role of this virus as an etiological agent of disease in livestock farmers in the department.

1. Introduction

Bovine Leukemia Virus (BLV) belongs to the *Retroviridae* family. It is classified within the *Deltaretrovirus* genus with the T-cell lymphotropic viruses of both simians and humans (PTLV-1, 2 y 3) (ICTV, 2022). BLV primarily affects cattle, causing enzootic bovine leukemia disease (EBL). This disease occurs as a chronic infection in cattle related to persistent lymphocytosis (PL) and the subsequent development of leukemias and lymphomas in a low percentage of infected bovines in the disease's most advanced stages. It has been estimated that approximately 5 to 10 % of

animals infected with BLV develop clinical symptoms 3 to 5 years after infection (Barré et al., 2015).

Recent studies report that the prevalence of EBL worldwide, in countries outside Europe, is increasing and that the infection is more frequent in cattle destined for dairy production (Bartlett et al., 2020). The virus's behavior in South America is endemic, ranging from 27 % to 77 % (Polat et al., 2017). In Colombia, in 2016, a BLV seroprevalence of 42 % (3423/8150) was reported using the ELISA technique to detect anti-gp51 antibodies in peripheral blood samples of bovines from 7 country departments (Ortega et al., 2016). Subsequently, Corredor

* Corresponding author at: Grupo Biología de Sistemas, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Circular 1a No 70-01, Bloque 11C - Oficina 417, Medellín, Colombia.

E-mail address: lina.gutierrez@upb.edu.co (L.A. Gutiérrez).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107253>

Received 17 January 2024; Received in revised form 10 March 2024; Accepted 15 May 2024

Available online 21 May 2024

0001-706X/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Anexo 15. Productos de apropiación social del conocimiento. Jornada de socialización de los resultados con los participantes



RESULTADOS DE LA DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN HUMANOS DE LECHERIAS DE ANTIOQUIA

Willington Mendoza Uribe
Microbiólogo, MSc(e)



- Antecedentes de detección del BLV en humanos
- Objetivos del estudio
- Metodología
- Resultados
- Conclusiones y recomendaciones

