



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Detección molecular y genotipificación del virus de la leucemia  
bovina en los estados de Hidalgo, Jalisco y México**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

Nayely Cancino Heinecke

ASESOR:

Dr. Hugo Ramírez Álvarez

COASESOR:

Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente al Ing. Oscar Cárdenas porque sin su ayuda yo no hubiera podido seguir siendo parte de la comunidad UNAM ni mucho menos de la FESC, por ello le debo mi carrera completa.

También quiero agradecer a mi mamá y hermana por su apoyo incondicional y por ser mi fuente de inspiración y motivación; a mis familias putativas López, Cárdenas, Moreno y Amezcua y amigos Alma y Salvador, porque sin su ayuda nunca hubiera podido llegar hasta el final, por ser mi sustento, por su compañía, por las aventuras y por llenarme el alma y el espíritu.

Te agradezco Alberto Castillo por salvarme la vida (fundamental para terminar la tesis y seguir dando lata), por abrirme las puertas de tu casa y de tu corazón.

Le agradezco especialmente al Dr. Hugo Ramírez Álvarez y al Dr. Humberto A Martínez Rodríguez por permitirme subir a su barco, aun cuando los vientos eran agresivos, por confiar en mí, por apoyarme y ayudarme a hacer de éste un mejor trabajo (espero no haberlos defraudado); agradezco a mi sensei Víctor David González por instruirme en el arte de la PCR, por tus enseñanzas, tu apoyo y tu amistad.

De igual forma quiero agradecer al apoyo brindado por la Dra. Lucía A García y del Dr. Gerardo García Tovar, el cual fue una luz al final del túnel, así como a los helados esperanzadores de Juan en los sábados y a veces domingos fallidos y; a los muy apreciados concejos del Dr. German Garrido.

Este trabajo no hubiera podido salir sin la ayuda de los ganaderos que amablemente nos proporcionaron las muestras, sin la colaboración de mis compañeros del laboratorio de virología, genética y biología molecular de la FES Cuautilán y sin el soporte del Proyecto Conacyt 221285 “Genotipificación del gen *env* de retrovirus que impactan la salud de rumiantes domésticos”, a los cuales agradezco rotundamente.

Finalmente quisiera poder agradecer a cada una de las personas que han sido parte fundamental de mi desarrollo personal y académico, y a las cuales estoy eternamente agradecida, pero quiero concluir agradeciéndole a la vida misma por haberlos incluido en mi camino y permitirme llegar hasta aquí. De nuevo mil gracias.

“El camino del conocimiento se anda a la mala. Para aprender necesitamos que nos echen espuelas. En el camino del conocimiento siempre estamos peleando con algo, evitando algo, preparados para algo; y ese algo es siempre inexplicable, más grande y poderoso que nosotros”.

Don Juan

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1. Leucosis Enzoótica Bovina	11
a. Epidemiología	11
b. Transmisión	12
c. Cuadro clínico	13
d. Mecánica molecular de la infección y patogenia	14
e. Diagnóstico	16
f. Prevención y control	17
2. Virus de Leucemia Bovina (BLV)	18
a. Clasificación	18
b. Estructura del virión	19
c. Organización del genoma	20
d. Variabilidad genética	21
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
METODOLOGÍA	26
1. Población de estudio	26
2. Procesamiento de muestras	26
3. Diseño de iniciadores y estandarización de la PCR	26
4. Purificación y secuenciación	27
5. Análisis filogenético	27
6. Análisis estadístico	28
RESULTADOS	29
1. Detección de la infección del BLV	29

a. Detección serológica	29
b. Detección molecular	30
i. Características de los iniciadores diseñados	30
ii. Amplificación mediante PCR	30
c. Concordancia entre pruebas	32
d. Secuenciación nucleotídica y confirmación de la infección	32
e. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias	35
f. Análisis filogenético	36
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	47
ANEXOS	52

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BLV	Virus de Leucemia Bovina
CA	Cápside
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
D.O.	Densidad óptica
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
EUA	Estados Unidos de América
FBL	Células de pulmón fetal bovino
gp30	Glicoproteína 30
gp51	Glicoproteína 51
HTLV-1	Virus de la Leucemia de Células T de Humanos Tipo 1
IDGA	Inmunodifusión en gel agar
IN	Integrasa
LEB	Leucosis Enzoótica Bovina
LP	Linfocitosis persistente
LSP	Linfocitos de sangre periférica
LTR	Secuencias largas de terminación repetidas (Long Terminal Repeat)
MA	Matriz
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
NC	Nucleocápside
nt	Nucleótidos
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT	Transcriptasa Reversa
SU	Proteína de superficie

**RESUMEN**

**Introducción:** El virus de la leucemia bovina (BLV, por su siglas en inglés) es un virus oncogénico del género *δ-retrovirus* causante de la leucosis enzoótica bovina (LEB), el cual ha sido reportado en todo el mundo. Estudios previos han clasificado secuencias del gen *env* del BLV en diez grupos genéticos. En México no existe información sobre la variabilidad genética y las herramientas de diagnóstico son limitadas.

**Objetivos:** El principal propósito de este estudio fue el establecimiento de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN proviral del BLV y determinar la variabilidad genética de una región del gen *env*.

**Metodología:** Los iniciadores utilizados en la PCR fueron diseñados haciendo un análisis *in silico* de secuencias del gen *env* del BLV reportadas en el GenBank. Para detectar la infección se analizaron 201 muestras de sangre provenientes de bovinos de siete hatos lecheros de los estados de Jalisco, México e Hidalgo, se evaluaron tanto por PCR (para detectar un segmento de la gp30 del gen *env*), como por la prueba comercial de ELISAi (que detecta anticuerpos anti-gp51); el coeficiente de kappa de Cohen fue utilizado para evaluar la concordancia entre pruebas. Veintisiete productos positivos por PCR fueron secuenciados de manera bidireccional y comparados con secuencias del BLV previamente asociadas a un genotipo viral realizando análisis filogenéticos.

**Resultados:** Se detectó ADN proviral y anticuerpos contra el BLV en 118 muestras (58.7%), el índice de kappa de Cohen fue de 0.651, mostrando una concordancia entre pruebas adecuada. Las secuencias nucleotídicas obtenidas tuvieron 99% de similitud con secuencias previamente reportadas. Los análisis filogenéticos ubicaron a las secuencias obtenidas en el presente trabajo en el genotipo 1; además de que se pudo identificar 5 mutaciones aminoacídicas, la mayoría localizadas en el dominio citoplasmático de la transmembrana (CTM) de 8 secuencias virales.

**Conclusiones:** Este es el primer estudio transversal realizado en México que demuestra la utilidad de la PCR como una prueba potencial de diagnóstico para la detección del BLV y en mostrar filogenéticamente la asociación de una región del gen de la envoltura con el

genotipo 1, presente en los estados de Jalisco, México e Hidalgo. Es necesario realizar estudios adicionales para caracterizar el escenario real de distribución de los genotipos del BLV en el ganado bovino mexicano.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** *Bovine Leukemia Virus* (BLV) is a  $\delta$ -retrovirus associated with oncogenic illness in cattle described as enzootic bovine leucosis, it has been reported worldwide. Previous studies have classified the *env* sequences of BLV provirus in ten genetic groups. There is not current information of BLV genetic variability in Mexico and diagnosis tools are limited.

**Objectives:** The aim of this study was to develop a Polymerase Chain Reaction (PCR) method for BLV proviral detection and to determine the genetic variability by focusing on a 463bp product of the envelope gene.

**Methods:** *In silico* analyses of BLV *env* sequences was followed by PCR primer design. To detect of BLV infection, 201 samples from seven dairy farms located in Hidalgo, Mexico and Jalisco states were examined by both, PCR for a segment of gp30 *env* gene and ELISA commercial test for anti-gp51 antibodies; Cohen's kappa was used to estimate inter-assay concordance. 27 positive PCR products were subjected to bidirectional sequencing and compared to previously reported BLV strains for infection confirmation and subsequent phylogenetic analysis.

**Results:** 118 samples (58.7%) for both BLV proviral DNA and antibodies were positive, inter-assay concordance for Cohen's kappa was 0.651. The nucleotide sequences obtained were 99% similar from those reported by GenBank database. Phylogenetic analysis reported that these sequences obtained cluster in genotype 1. Furthermore, 5 substitutions mostly located in cytoplasmic transmembrane domain (CTM) of amino acid analysis were showed on eight sequences.

**Conclusions:** This is the first known cross-sectional study set in Mexico that presents PCR as a potential assay for BLV infection diagnosis and shows a phylogenetic analysis of the

envelope gene that suggests genotype 1 infecting cattle of Hidalgo, Mexico and Jalisco states. To characterize the real scenario of the distribution of BLV genotypes of Mexican cattle population additional studies are necessary.

## **INTRODUCCIÓN**

El virus de la leucemia bovina (BLV), nomenclatura según el comité internacional de taxonomía viral (ICTV, 2015), es un virus oncogénico ARN del género *δ-retrovirus* causal de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB), enfermedad que afecta con mayor frecuencia a los bovinos en sistemas de producción lechera [1].

El primer caso descrito de LEB fue reportado en 1871 por Leisering [2], quien detectó la presencia de nódulos amarillos en el bazo inflamado de una vaca. El trastorno al bazo es consecutivo a la formación de tumores, lo cual es una de las manifestaciones clínicas más peligrosas de la LEB, aunque menos frecuente que la linfocitosis persistente (LP) que en un 70% de vacas infectadas se llega a presentar; sin embargo, la mayoría del ganado infectado con el BLV permanece asintomático [1].

La importancia de la LEB radica en las pérdidas económicas directas e indirectas debidas a la infección. Las directas están ocasionadas con los costos por la reducción de la producción de leche, la reducción de la eficiencia reproductiva y el aumento de los costos de reemplazo por muerte o sacrificio[3]. Las indirectas se dan por los costos asociados con las pérdidas de ingresos debido a las limitaciones que ocasiona para la exportación de ganado, semen y embriones [4, 5] en algunos países europeos y no europeos como Australia y Nueva Zelanda donde se ha enfatizado seriamente la erradicación de la infección por BLV [5].

Para México la enfermedad está clasificada dentro del grupo 3 del acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, en este grupo se encuentran enfermedades enzoóticas que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y del comercio nacional e internacional. Es de notificación

mensual obligatoria a las autoridades competentes de sanidad animal del país [6]; mientras que para la OIE la infección es de declaración obligatoria [7].

## **1. Leucosis Enzoótica Bovina**

### **a. Epidemiología**

La LEB es una enfermedad frecuente en los países que crían ganado vacuno en todo el mundo. El primer caso descrito de LEB fue reportado en 1871 por Leisering [2] y se cree que el origen fue de los países de la costa del este del Báltico; desde entonces, la enfermedad se ha propagado a través del comercio de animales vivos y se extendió al continente americano durante la primera mitad del siglo XX; pudo haber regresado a Europa y ser introducida a otros países por primera vez, dada la importación de ganado de Estados Unidos de América [8], lo que resulta en su actual distribución en varios países de todo el mundo. Aunque la enfermedad es cosmopolita, la Unión Europea declaró en su “Reporte anual sobre enfermedades bovinas y porcinas” del 2014, que la mayoría de los países de Europa incluyendo al Reino Unido, Alemania, Francia, España, países escandinavos y países bajos se encuentran oficialmente libres de LEB [9]. Sin embargo, en otras partes del mundo la tasa de prevalencia de la LEB ha aumentado reportando valores superiores al 50% en el ganado vacuno lechero infectado en países como Brasil (60.8%) [10], Colombia (83.3%) [11] y Argentina (84%) [12], lo que además origina importantes pérdidas económicas en la producción lechera y en la exportación de ganado [13]. Otro país donde se han reportado tasas de seroprevalencias del 89% es en EUA, con pérdidas económicas anuales estimadas en 525 millones de dólares por disminución en la producción de leche [5].

En México los primeros estudios relativos a la enfermedad datan de 1967 [14]. Tiempo después, la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Salud Animal (SARH) informó de 220 casos clínicos de 1969 a 1982 en la República Mexicana [15]. Dentro de dicho periodo, en 1979, Vilchis [16] demostró que el ganado bovino Holstein importado y localizado en Tulancingo Hidalgo, presentaba una mayor tasa de seropositividad (22.5%) respecto al ganado nacional (12.5%). En 1983, Suzan [17] demostró una tasa de 36.1 % (541/1498) de seropositividad, empleando la técnica de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) para nueve estados de México. Posteriormente, Monroy [15] reportó variaciones de

entre el 8% y 58% de seropositividad en los estados de Puebla, Veracruz, Oaxaca, Yucatán y Tamaulipas, mediante la detección de anticuerpos contra el BLV, en 1987. Para 1995, Avalos [18] reportó un 42% (423/1007) de seropositividad en el estado de Nuevo León, mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el cual encontró que esta prueba fue más sensible que la IDGA. No obstante, desde entonces son escasos los estudios seroepidemiológicos sobre la LEB y los reportes de prevalencias de otras regiones del país, varían de entre un 16 % hasta un 66% en los estudios más recientes [19, 20] (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Antecedentes de estudios para la detección de BLV en México<sup>a</sup>.**

Autor	Prueba	# bovinos	% positivos	Estado	Año
Vilchis, M.C.	ID	240	22.5	México	1979
Suzan, M.V.	ID	1498	36.1	10*	1983
Salman, M.D.	ID	8148	36.5	B.C.	1990
Monroy, B.J.	IDAG	1947	9.8	5*	1993
Avalos, R.R.	ELISA	1007	42	N.L.	1995
Osuna, A.S.	ELISA	460	16	Sonora	2003
Zavaleta, H.J.N.	ELISAI	80	66	Hidalgo	2009

10\* Estados de Mich., B.C., Hgo., Jal., NL, Qro., Dgo., Méx., Mor. Y Gto.

5\* Estados de Pue., Tamps., Oax., Ver. Y Yuc.

<sup>a</sup> Estudios referidos en [15, 17-21]

## **b. Transmisión**

La transmisión del BLV ocurre tanto de manera horizontal como vertical (madre a hijo); el contagio natural tiene lugar por la transferencia de células infectadas ya sea en sangre, exudados o tejidos, por ejemplo, durante el parto. También se produce el contagio artificial, especialmente por el uso compartido de agujas, equipo quirúrgico, guantes usados en exámenes rectales, etc. contaminados con sangre. Dicha infección de origen iatrogénico es el principal mecanismo de transmisión del virus en la mayoría de los hatos [22]. El nivel de contagio horizontal en ausencia de estos factores suele ser bajo [23], como en el caso de la transmisión mecánica por insectos hematófagos y la transmisión vertical que representan sólo una pequeña proporción de los casos [24]. Los antígenos virales y el ADN proviral se pueden identificar en semen, leche, calostro, orina y exudados vaginales de animales infectados [22, 25].

La infección natural por BLV sólo tiene lugar en el ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) aunque algunos estudios sugieren que los búfalos de agua también son infectados de forma natural [1]. De manera experimental la infección puede ser transmitida a varias especies incluyendo conejos, ratas, cerdos, cabras y ovejas. Las ovejas a menudo desarrollan tumores a una edad más temprana que en el ganado bovino por lo que se han utilizado como modelo de estudio de la enfermedad [1].

### **c. Cuadro clínico**

La infección por BLV se caracteriza por tres etapas progresivas de la enfermedad: la subclínica, también llamada aleucémica; la linfocitosis persistente (LP) y el linfoma. La mayoría del ganado infectado con el BLV es subclínico, por lo que la infección sólo puede ser reconocida y confirmada mediante pruebas serológicas o moleculares. Aproximadamente el 30% de los bovinos infectados desarrollan LP, que se caracteriza por el incremento en el número de linfocitos B circulantes en sangre al inicio de la enfermedad (por encima de 10,000 / mm<sup>3</sup>) [26]. La LP por sí misma es una característica subclínica, pero estos animales pueden sufrir una desregulación inmunológica, debido a que los linfocitos B se vuelven más abundantes que los linfocitos T, lo que provoca una inversión de la relación B/T, que junto a la regulación positiva de moléculas de receptores inhibitorios en las células T, inducida por el BLV, juegan un papel en la progresión de la enfermedad y la susceptibilidad a infecciones oportunistas [27-29].

En los pocos animales que desarrollan la enfermedad (menos del 10%), los signos clínicos se aprecian después de un largo periodo de latencia en animales adultos de entre 4 y 8 años de edad. Estos animales desarrollan linfosarcomas en ganglios linfáticos, abomaso, corazón, bazo, riñones, útero, meninges espinales, región retrobulbar del ojo y cerebro [1]. Por ello, la manifestación clínica depende de los órganos afectados. Por ejemplo, en casos de afección cardíaca, se presenta una insuficiencia congestiva derecha y arritmia en los últimos estadios de la enfermedad; mientras que, en una afección de meninges a nivel lumbar, provoca una parálisis progresiva de los miembros posteriores. Las infiltraciones leucocitarias en el útero, pueden causar infertilidad, aborto o distocia. Cuando las

tumoraciones afectan el bazo, se puede producir una hemorragia intra-abdominal fatal. El incremento del tejido retrobulbar puede culminar en una exoftalmia [30] (Figura 1).



Figura 1. Caso clínico de exoftalmia asociado a LEB encontrado en la población de estudio.

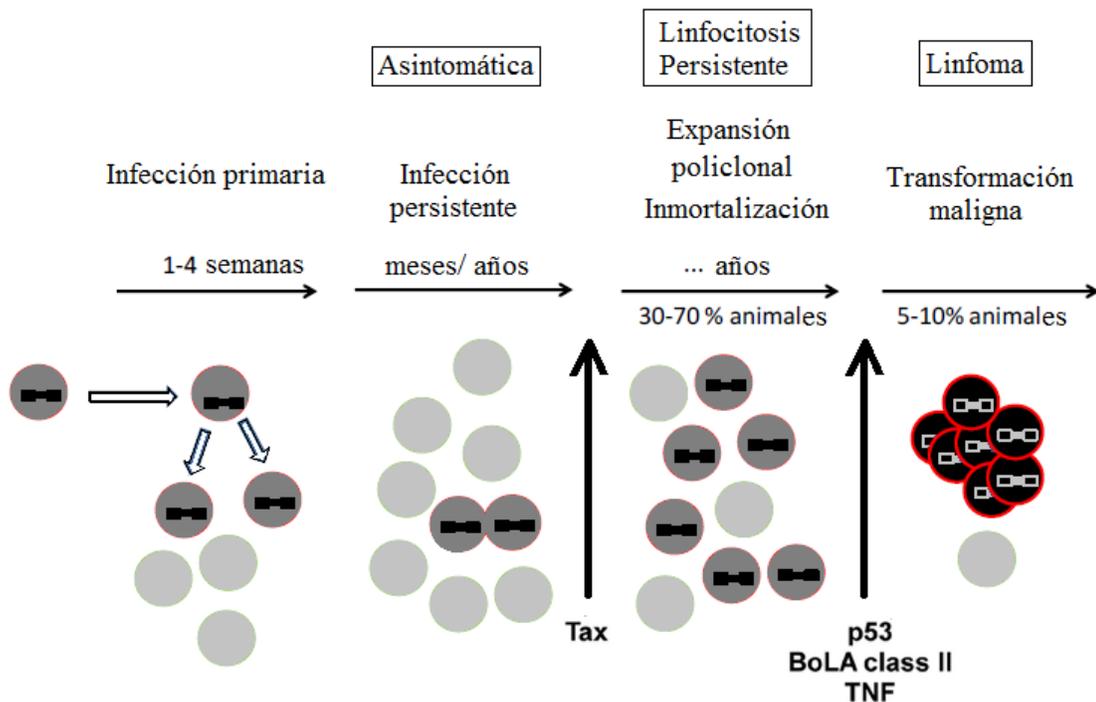
#### **d. Mecanismos moleculares de la infección y patogenia**

El BLV ocasiona infecciones persistentes debido a que este se aloja en el interior del linfocito B (principal célula diana, aunque también infecta monocitos y macrófago) e inserta su genoma en el ADN cromosómico de la célula hospedera [1] (Figura2). El genoma del BLV puede replicarse cada vez que la célula hospedadora se divide, así como, transcribirse para formar proteínas víricas que formen nuevos viriones que pueden infectar a las células adyacentes; generando una respuesta de anticuerpos continua [1].

Después de la infección, ocurre una expansión policlonal de linfocitos, que es probablemente promovida por el virus para favorecer su propagación. Sin embargo, la expresión viral es bloqueada a nivel transcripcional, estableciéndose así largos periodos de latencia. Tal mecanismo de represión parece ser muy importante para la evasión del sistema inmune, y de esta forma dar lugar, eventualmente, al desarrollo de un proceso oncogénico [31].

La transformación de los linfocitos (a diferencia de los géneros *Alpharetrovirus* y *Gammaretrovirus*) no es el resultado de uno de los dos mecanismos conocidos para inducir

tumores, como la activación de un "oncogén viral" o la inserción del provirus como un "proto-oncogén" dentro de secuencias celulares (c-oncogenes) particulares [32], [1]. En lugar de ello, el virus de la leucemia bovina produce la proteína Tax, que induce inmortalidad (mediante la inhibición de apoptosis) y proliferación celular, lo que conduce en última instancia a la aparición de células transformadas. Cabe destacar que la expansión de las células transformadas ocurre de manera mono u oligoclonal, lo que sugiere que sólo una única o unas pocas células infectadas generan el tumor después de múltiples divisiones [29]. Sin embargo, la proteína Tax no tiene la capacidad de transformar a las células, por lo que el desarrollo de un linfoma requiere también de factores del hospedero tales como la mutación en el gen supresor de tumores p53 [33], los polimorfismos en la región promotora del gen del TNF  $\alpha$  (que se cree podría al menos en parte, contribuir a la progresión de linfoma en la infección por el BLV) [34] y las variaciones genéticas del antígeno leucocitario bovino (BoLA-DRB3) que influyen sobre la resistencia o la susceptibilidad al linfoma [35] y a la LP [35, 36], así como influyen sobre la carga proviral del BLV [37].



**Figura 2. Evolución clínica de la infección por el BLV.** La infección primaria implica la transmisión de una célula infectada con el provirus del BLV de un animal a otro; posteriormente el provirus se expresa formando partículas virales que infectan a otras células (principalmente linfocitos B). Durante la infección persistente, las células

portadoras de provirus se expanden principalmente por mitosis debido a la presencia de una respuesta inmune activa; esta fase es subclínica y puede durar por varios meses o años. La proteína Tax inmortaliza una parte de dichas células e induce la expansión policlonal, dando lugar a la linfocitosis persistente, en aproximadamente un 30 a 70% de los animales infectados. En la fase del linfoma, una célula infectada es sometida a mutaciones genéticas en un 10 % de los animales infectados. Para la transformación del linfoma a un tumor maligno se han visto involucrados factores del hospedero, como los polimorfismos del BoLA de clase II y del TNF- $\alpha$ , además de mutaciones en la p53. Adaptado de Gutiérrez [29] y Aída [38].

#### **e. Diagnóstico**

Los métodos más usados para la detección de anticuerpos contra el BLV son el ELISA y la IDGA, ambas son pruebas oficiales reconocidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el comercio internacional [39]. En muchos países estas pruebas constituyen la base de las políticas de erradicación [40-43]. La mayor parte de las pruebas rutinarias IDGA y ELISA detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, ya que son de aparición temprana y son detectables por primera vez de 3 a 16 semanas post-infección [39].

La prueba serológica de ELISA, en particular la que utiliza anticuerpos monoclonales es más sensible que la prueba de IDGA; pero esta última tiene la ventaja de ser menos costosa y más fácil de realizar. La prueba de ELISA es ventajosa cuando se trata de realizar un gran número de pruebas en animales usando leche en lugar de sangre, por su habilidad para detectar niveles bajos de anticuerpos anti-BLV o anticuerpos lácteos contra el BLV [44].

A partir de la década de los noventa se comenzaron a aplicar métodos moleculares para la identificación del BLV y se han descrito algunas ventajas en la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR), como ser 10% más sensible que ELISA y 17.7% más sensible que IDGA ya que puede detectar ADN proviral en linfocitos e identificar animales infectados que no han generado anticuerpos específicos contra el BLV o son de origen calostrado [45]. De ahí que la OIE propone a la nPCR como una prueba alternativa para el comercio internacional, cuyo método descrito se basa en el uso de iniciadores que se unen al gen *env*, que codifica para la glicoproteína gp51 [39]. Este gen está muy conservado, y tanto el gen como el antígeno están generalmente presentes en todos los animales infectados a lo largo de las fases de la infección.

El aislamiento del virus se puede hacer a partir de linfocitos de sangre periférica co cultivados con células de pulmón fetal bovino (FBL) en un medio mínimo esencial (MEM) que contenga un 20% de suero fetal bovino durante 3 a 4 días. El virus genera la formación de sincitios en la monocapa celular; los antígenos p24 y gp51 pueden detectarse en el sobrenadante de los cultivos mediante ELISA o IDGA [39].

Para determinar la linfocitosis persistente en los bovinos se debe hacer un conteo linfocitario cuya interpretación toma en cuenta las claves hematológicas de Bendixen, Güttinger y Theilen, que consideran el número de linfocitos y la edad del animal para clasificarlos como negativos, sospechosos o positivos, esta última categoría se establece cuando el aumento de los linfocitos persiste por más de 2 a 3 meses [46-48].

#### **f. Prevención y control**

La metodología y el tiempo requerido para obtener un rebaño libre de virus dependen de la tasa de animales infectados en el hato, la infraestructura del establecimiento y las prácticas de manejo. Si la tasa de prevalencia de la infección es demasiado alta como para permitir la eliminación de todos los animales seropositivos, la segregación de animales positivos y negativos se puede intentar. Por otra parte, los terneros de madres infectadas deben ser aislados e introducidos en el grupo de seronegativos sólo si se prueba su seronegatividad a los 6 meses de edad; así mismo, se deben establecer estrictas medidas de control en todas aquellas prácticas que involucren transferencia accidental de cualquiera de los fluidos biológicos. Las medidas de control y prevención deberían incluir:

- a) Uso de materiales desechables como agujas, jeringas, mangas obstétricas.
- b) Esterilización de instrumentos utilizados en procedimientos, tales como el descorné, tatuaje, castración o aplicación de marcas auriculares.
- c) Desinfección de las máquinas de ordeño.
- d) Uso de pasteurización de calostro de vacas infectadas con BLV o sustituto de la leche.
- e) Inseminación artificial y transferencia de embriones con vacas y toros libre de BLV.

- f) Monitoreo serológico periódico de todos los animales seronegativos mayores de seis meses.
- g) En la medida de lo posible del establecimiento se deben eliminar los animales positivos. Como una primera fase se sugiere identificar y eliminar a los bovinos con LP.
- h) De ser posible, las vacas identificadas como seropositivas deben ser ordeñadas al final.

Si la tasa de infección es baja (menor de 10%), es conveniente eliminar a los animales positivos, implementar las medidas de manejo higiénico-sanitarias ya descritas y realizar el monitoreo serológico a intervalos de dos a tres meses para ir descartando los positivos [42].

Cuando no haya animales con serología positiva, se debe realizar un control anual, manteniendo siempre las medidas de higiene en las prácticas semiológicas y quirúrgicas habituales. En los casos donde todos los animales hayan resultado negativos en dos controles consecutivos, el establecimiento podrá declararse libre de leucosis. A partir de ese momento se hará un seguimiento serológico anual. Todos los bovinos que se incorporen deben ser serológicamente negativos y se mantendrán aislados del resto. Si a los tres meses resultasen negativos a una nueva prueba podrán incorporarse al hato. Cabe destacar que las medidas preventivas por sí solas no logran la eliminación completa del virus. Un enfoque alternativo es la identificación de animales infectados mediante PCR y ELISA, así como la eliminación de los mismos del hato. La evidencia de la eficacia de esta estrategia se ilustra con el éxito de erradicación de la enfermedad en varios países de Europa Occidental [40-43]

Pese a los avances en la investigación con vacunas experimentales, no existen todavía vacunas comercializadas para el control de la LBE [29, 39].

## **2. Virus de la Leucemia Bovina**

### **a. Clasificación**

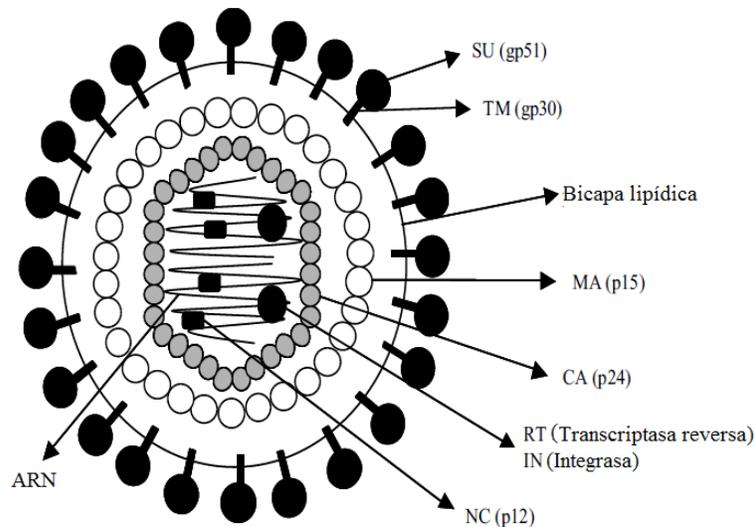
El BLV pertenece al género *Delaretrovirus*, a la subfamilia *Orthoretrovirinae* y la familia *Retroviridae*, con los cuales comparte dos características particulares:

- 1) Invierten el orden del dogma central de la biología molecular en el que naturalmente fluye la información genética en los sistemas biológicos, ya que cuenta con una transcriptasa reversa para convertir su ARN genómico en ADN.
- 2) Integra su genoma en el genoma del hospedero. Este proceso se encuentra mediado por una enzima denominada integrasa; la forma integrada de un retrovirus es denominada provirus y sus genes son expresados por mecanismos de la célula hospedera que sintetizan las nuevas partículas virales.

El BLV comparte su organización genómica con los virus linfotrópicos de células T de humanos tipo 1 (HTLV-1) [32].

#### **b. Estructura del virión**

Bajo el microscopio electrónico se observa que la partícula viral del BLV es de morfología esférica, su diámetro va de entre 90 y 120 nm, contiene un nucleoide central de 60 a 90 nm, rodeado por una envoltura celular con proteínas virales [1, 26]. El virión presenta en su interior dos subunidades de un genoma ARN simple de polaridad positiva, con una longitud de 8700 nucleótidos aproximadamente. Las proteínas de la cápside (CA), también denominadas p24, contienen el ARN viral en interacción con proteínas de la nucleocápside (NC), también denominada p12, y las proteínas enzimáticas retrotranscriptasa (RT) e integrasa (IN) requeridas para la transcripción reversa y la integración del genoma viral respectivamente. La proteína de matriz (MA) (p15) interconecta la cápside con la envoltura. La envoltura está formada por una bicapa lipídica de origen celular junto con un complejo de proteínas virales insertadas en ella: la glicoproteína de superficie (SU), también denominada gp51 y la glicoproteína de transmembrana, TM (gp30) que intervienen en el reconocimiento, la adsorción y la penetración a la célula blanco [26] (Figura 3).

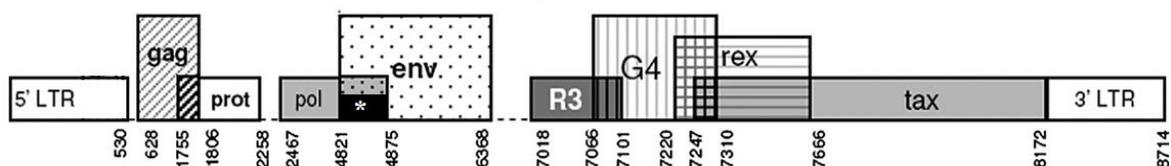


**Figura 3. Representación esquemática del BLV.** Dos subunidades de ARN genómico se empaquetan en la cápside junto con las proteínas de la nucleocápside p12 (NC) y dos proteínas enzimáticas (RT e IN) necesarias para la transcripción reversa y la integración del genoma viral. Las proteínas p24 (CA) que forman la cápside se interconectan con la envoltura a través de las proteínas de matriz p15 (MA). La envoltura está formada por una bicapa lipídica de origen celular en la que se integra un complejo de proteínas virales: la glicoproteína de membrana gp30 (TM) y la de superficie gp51 (SU). Adaptado de Gillet [26].

### c. Organización del genoma

El genoma viral está formado por dos moléculas de ácido ribonucleico de aproximadamente 9kb. Todos los retrovirus son codificados por los genes estructurales y enzimáticos *gag*, *pro*, *pol* y *env*. Los cuales están flanqueados por dos secuencias idénticas de repetidos terminales largos (LTR) (Figura 4). El gen *gag* es transcrito y traducido como el precursor, Pr70 Gag, y es procesado en tres proteínas estructurales internas del virión: la proteína de matriz p15 (MA), la proteína de la cápside p24 (CA) que es la más abundante y la proteína de la nucleocápside p12 (NC) [49]; *pro* codifica para la proteasa viral (p14); *pol* da lugar a la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa [26], [49]; y el gen *env* codifica para las glicoproteínas de la envoltura del virión: la glicoproteína de superficie gp51 (SU) y la de membrana gp30 (TM) [49], y juega un papel crucial en la determinación de la infectividad viral y la formación de sincitios [50]-[51]. Adicionalmente y a diferencia de otros retrovirus, el genoma del BLV contiene una región pX situada entre el gen *env* y la LTR '3 [26, 38], en la cual se codifican al menos cuatro proteínas reguladoras: Tax, Rex, R3 y G4 (Figura 4). La proteína Tax es un activador transcripcional de la expresión viral y

se cree que juega un papel importante en la formación de la leucemia [52]. Rex es responsable de la exportación nuclear del ARN viral y la traducción del ARN mensajero viral en células infectadas con BLV [53]. Las proteínas R3 y G4 contribuyen al mantenimiento de una carga viral elevada [54] y particularmente la G4 es relevante para la leucemia, ya que puede immortalizar fibroblastos primarios embrionarios [55].



**Figura 4. Representación esquemática del genoma del BLV.** La ubicación de cada región del genoma se indica en la parte inferior. El rectángulo negro sólido marcado con un asterisco se refiere a la región del gen *env* compartida con los genes *rex* (nt 4821-4871) y *tax* (nt 4868-4871). Adaptado de Zhao [56].

#### d. Variabilidad genética

La mutación es un mecanismo clave en la generación de variabilidad genética en los virus ARN, la cual se debe mayoritariamente a la carencia de corrección de errores de las ARN polimerasas, por lo que típicamente se exhibe una tasa de error de  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-5}$ , es decir, que introduce una mutación por cada mil o cien mil nucleótidos copiados en cada ciclo replicativo; dicha mutación, es responsable de la generación de un gran número de variantes virales en el curso de una infección [57].

A pesar de que el BLV es un virus ARN, los estudios sobre la variabilidad genética del gen *env* de diferentes virus aislados en varias partes del mundo, han demostrado que el BLV no sólo presenta una baja variabilidad genética sino que posee secuencias o regiones conservadas [58, 59]. Sin embargo, la clasificación filogenética actual del BLV presupone la existencia de 10 grupos genéticos que se correlacionan con el origen geográfico de los aislamientos [60-63] lo que sugiere que el BLV es más diverso de lo que se había previsto anteriormente [45, 64], [65].

La distribución mundial de los genotipos del BLV muestra al genotipo 1 como el más dominante del mundo, siendo hasta ahora identificado en Australia, Irán, EUA, Argentina, Brasil, Uruguay, Costa Rica, Japón, Corea y Alemania. El segundo genotipo más ampliamente distribuido es el tipo 4 que se encuentra con más frecuencia en Europa y América. El genotipo 3 sólo ha sido reportado en tres regiones geográficas: EUA, Japón y Corea. Los genotipos 5, 6 y 9 se encuentran exclusivamente en sudamérica y centroamérica (Costa Rica, Argentina, Brasil y Uruguay), región con mayor diversidad genética (G1, G2, G4, G5, G6, G7 y G9). Los genotipos 7, 8 y 10 se encuentran en su mayoría en zonas de Europa y Asia como Rusia, Ucrania, Croasia, Polonia, Tailandia e Italia, a excepción de Corea y Japón cuyo genotipo está más relacionado con el de EUA [12].

## **JUSTIFICACIÓN**

En México no se realiza el diagnóstico de LEB de manera rutinaria, por lo que la introducción de ganado infectado de Norteamérica durante los últimos 15 años ha generado un incremento de la infección y por ende el aumento de casos clínicos (Zabaleta, 2009). No existen datos epidemiológicos actualizados sobre la incidencia y prevalencia de la infección y se desconocen los tipos genéticos del BLV que infectan al ganado lechero mexicano. Por lo anterior, el presente trabajo pretende evaluar una prueba de detección molecular, así como determinar el o los genotipos del BLV presentes en algunas unidades de producción lechera ubicados en los estados de Jalisco, Hidalgo y México.

## **HIPÓTESIS**

El diseño de una prueba molecular como la reacción en cadena de la polimerasa que detecte los diferentes genotipos reportados para el BLV, permitirá la amplificación de ADN proviral del virus de la leucemia bovina, con lo que será posible detectar la infección y realizar un análisis filogenético de las variantes virales presentes en los estados de México, Jalisco e Hidalgo.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Detectar y genotipificar el Virus de Leucemia Bovina en hatos lecheros de 3 estados del país (Hidalgo, Jalisco y México).

### **Particulares**

- Colectar muestras de sangre de bovinos ubicados en explotaciones lecheras del Estado de México, Jalisco e Hidalgo.
- Detectar anticuerpos contra el Virus de la Leucemia Bovina en el plasma utilizando una prueba comercial de ELISA.
- Diseñar iniciadores que se unan a una región del gen *env* para la detección de ADN proviral en LSP con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Secuenciar los productos de amplificación positivos y analizar las secuencias nucleotídicas para determinar el genotipo o genotipos prevalentes en los bovinos de estudio.

## **METODOLOGÍA**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular (L-504) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; ubicado en la Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

### **1. Población de estudio**

A partir de un banco de muestras de sangre completa colectadas en tubos con anticoagulante (Heparina BD vacutainer) por venopunción coccígea de 485 bovinos (hembras con más de seis meses de edad, de raza Holstein con y sin cuadros clínicos sugestivos de la infección), provenientes de siete unidades de producción lechera cooperantes ubicadas en los estados de México, Hidalgo y Jalisco; se eligieron 201 bovinos tanto positivos como negativos mediante una selección aleatoria simple usando el software Excel 2010®.

### **2. Procesamiento de las muestras**

Las muestras de sangre completa se centrifugaron para obtener dos fracciones: la fracción líquida (plasma) y el paquete celular del cual se recuperaron leucocitos de sangre periférica siguiendo el protocolo de Gorodezky [66] (Anexo 1).

Con el plasma obtenido se realizaron pruebas de ELISAi siguiendo las indicaciones del kit comercial VMRD© para la detección de anticuerpos contra el BLV (Anexo 2).

De los leucocitos de sangre periférica se extrajo el ADN genómico de acuerdo a las indicaciones del Kit comercial FavorGen© (Anexo3). El ADN fue cuantificado a una absorbancia de 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop® y almacenado a -70°C en un ultracongelador hasta su uso.

### **3. Diseño de iniciadores y estandarización de la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Para el diseño de los iniciadores a utilizar en la PCR, se realizó un análisis *in silico* con los programas bioinformáticos BioEdit© y Primer3 Input© considerando las secuencias nucleotídicas del gen *env* de los diferentes genotipos reportados al momento del diseño del

BLV disponibles en el GenBank; de las cuales se obtuvieron secuencias consenso con las que se diseñaron los iniciadores en regiones conservadas con la finalidad de poder ampliar el espectro de detección a todos los genotipos. Los iniciadores fueron sintetizados por los laboratorios de Integrate DNA Technologies (IDT®) bajo un pedido comercial.

Cada PCR fue realizada con una mezcla de reacción que contuvo: Buffer 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 280 µM de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP), 600 nM de cada iniciador, 2.5 U/reacción de Taq ADN polimerasa y 600 ng de ADN por reacción en un volumen final de 30 µl. Las condiciones encontradas para la amplificación por PCR fueron las siguientes: Desnaturalización inicial por 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización a 95°C por 30 segundos; hibridación a 52°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 50 segundos, finalizando con una extensión a 72°C por 7 minutos en un termociclador PCR Gene Mate Series (Anexo 4). Al finalizar la PCR, el producto fue analizado mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5%, conteniendo 10µl de bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador con luz UV.

Las amplificaciones que comparadas con el marcador de pares de bases correspondieran con el amplicón esperado de 674 pares de bases, se consideraron positivas.

#### 4. Purificación y secuenciación

Veintisiete productos de PCR positivos de interés, fueron recuperados del gel y purificados siguiendo las indicaciones del kit comercial FavorPrep™ (Anexo 5). El amplicón purificado fue almacenado a -20°C hasta su posterior secuenciación nucleotídica, la cual fue realizada de forma bidireccional por el método de Sanger en el Laboratorio de Bioquímica Molecular. UBIPRO. FES Iztacala UNAM, ubicado en la Av. de los Barrios No.1 Tlalnepantla Estado de México bajo una solicitud de servicio.

Los cromatogramas recibidos fueron analizados *in silico* mediante el uso de la paquetería del software Chromas® y editadas con el software Bioedit® para la obtención de secuencias limpias.

#### 5. Análisis filogenético

Las 27 secuencias obtenidas fueron sometidas a un alineamiento múltiple usando el algoritmo Clustal W del software Bioedit® y comparadas con 53 secuencias tomadas de la base de datos del GenBank, representantes de todos los genotipos reportados del BLV. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el software MEGA 7® usando el algoritmo de máxima verosimilitud bajo el modelo de sustitución de Tamura- Nei con 462 nucleótidos del gen *env* de las 80 secuencias antes mencionadas y con un soporte estadístico de 1000 bootstrap.

Para el cálculo de distancia génica entre los principales genotipos se estimó basado en el modelo de Kimura-2, utilizando la paquetería del software de MEGA 7®. En contraste, se estimó el grado de similitud entre las secuencias obtenidas en el presente trabajo y aquellas con las que se agruparon en el árbol filogenético, ello mediante una matriz de identidad obtenida con el software Bioedit®.

#### 6. **Análisis estadístico**

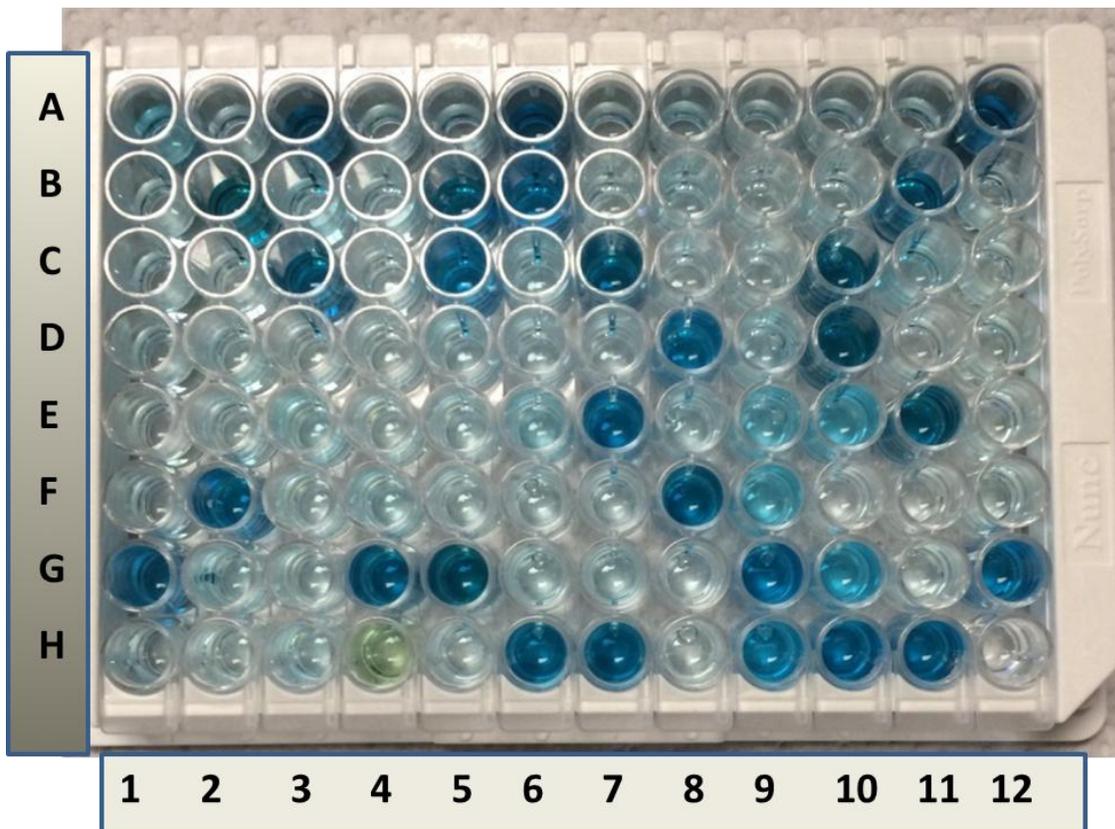
Para la comparación de la eficiencia entre las pruebas de ELISAi y PCR se calculó el índice kappa de Cohen con un nivel de confianza del 95%, utilizando la herramienta de diagnóstico: concordancia entre pruebas del programa informático Working in Epidemiology disponible en <http://www.winepi.net/sp/index.htm>, con la cual también se determinó la especificidad y sensibilidad de la prueba de PCR, así como la prevalencia real para cada estado, utilizando la herramienta de diagnóstico: evaluación de una prueba diagnóstica.

## RESULTADOS

### 1. Detección de la infección del BLV en la población de estudio

#### a. Detección serológica

Para la detección de anticuerpos contra la gp51 del BLV se evaluaron 201 muestras de plasma mediante un ELISAi comercial (Figura 5), cuyos resultados se muestran en el cuadro 3.



**Figura 5. Placa de ELISAi comercial mostrando resultados de un panel de muestras para la detección de anticuerpos contra el BLV. La posición A1 y H12 muestran al control positivo y negativo respectivamente; el resto de los 94 pozos contienen muestras tanto positivas como negativas.**

## b. Detección molecular

### i. Características de los iniciadores diseñados

Las características de los iniciadores se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Características de los iniciadores diseñados.**

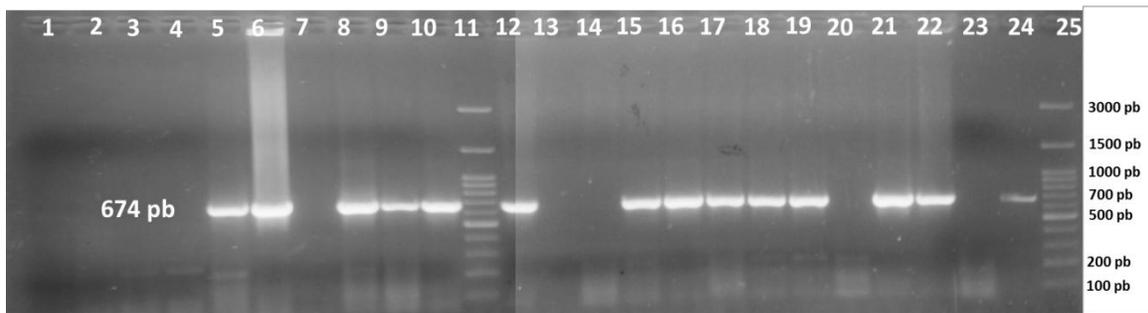
Iniciador	Secuencia 5'	Inicio <sup>a</sup>	Tamaño	GC %	Tm <sup>b</sup>	Amplicón
Fw	ACGCTTGATCACAGCAATTA	5852	20	40	52.4°C	674 pb
Rv	TCTCTGCGCTACACTCAGTC	6525	20	55	56.3°C	

<sup>a</sup> Inicio de la posición del iniciador basado en una secuencia de referencia (Número de acceso en el GenBank: K02120) usada en el software Primer3 Input© para validar la propuesta.

<sup>b</sup> Tm propuesta por el fabricante posterior a la síntesis de los iniciadores (IDT®).

### ii. Amplificación mediante PCR

Estandarizada la técnica de PCR (Ver anexo 4) para la detección de ADN proviral del BLV, los productos positivos amplificaron bandas de 674 pares de bases de nucleótidos (Figura 6). Los resultados para las 201 muestras analizadas se muestran en el cuadro 3.



**Figura 6. Visualización de productos de amplificación de 674 pb de un fragmento del gen *env* del BLV teñido con bromuro de etidio y separados en un gel de agarosa al 1.5%. Los carriles 25 y 11 contienen marcador de pares de bases, el carril 23 y 24 contienen el control negativo y positivo respectivamente y del carril 1 al 22 contienen productos de amplificación (30µl por pozo) positivos y negativos de diferentes animales.**

**Cuadro 3. Ubicación geográfica de hatos bovinos estudiados, número de animales positivos al BLV y porcentajes obtenidos en las pruebas de ELISA y PCR de 201 muestras analizadas.**

Estado	Hato	N	Positivos (%)		ELISA/PCR*			
			ELISA	PCR	+/+	+/-	-/+	-/-
<b>Jalisco</b>								
	A	25	7 (28.0)	11 (44.0)	6 (24.0)	1 (4.0)	5 (20.0)	13 (52.0)
	B	38	23 (60.5)	23 (60.5)	18 (47.3)	5 (13.2)	5 (13.2)	10 (26.3)
	C	46	35 (76.1)	33 (71.7)	31 (67.4)	4 (8.7)	2 (4.3)	9 (19.5)
	Total	109	65 (59.6)	67 (61.5)	55 (50.5)	10 (9.1)	12 (11.0)	32 (29.4)
<b>México</b>								
	D	23	14 (60.9)	12 (52.2)	12 (52.2)	2 (8.7)	0 (0.0)	9 (39.1)
	E	17	10 (58.8)	10 (58.8)	9 (52.9)	1 (5.9)	1 (5.9)	6 (35.3)
	F	4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (100.0)
	Total	44	24 (54.5)	22 (50.0)	21 (47.7)	3 (6.8)	1 (2.2)	19 (43.2)
<b>Hidalgo</b>								
	G	48	29 (60.4)	29 (60.4)	25 (52.1)	4 (8.3)	4 (8.3)	15 (31.3)
Total evaluados		201	118(58.7)	118(58.7)	101(50.2)	17 (8.5)	17 (8.5)	66(32.8)

\*Resultado obtenido en el ELISA o PCR y expresado como positivo (+) o negativo (-), mostrando siempre al ELISA por la izquierda.

Porcentaje en negrita dentro de paréntesis y número de muestra por la izquierda del paréntesis.

De un total de 201 muestras evaluadas para cada prueba se detectaron 118 (58.7%) muestras positivas al BLV, de las cuales sólo 101 (50.2%) coincidieron ser positivas tanto para ELISAi como para PCR, con una diferencia del 8.5% por prueba. De este modo, se puede establecer que el porcentaje real de infección del BLV detectado en el total de bovinos evaluados para cada estado considerando ambas pruebas fue de: 52.1 % para Hidalgo, 50.5% para Jalisco y el 47.7% para el Estado de México.

### c. Concordancia entre pruebas

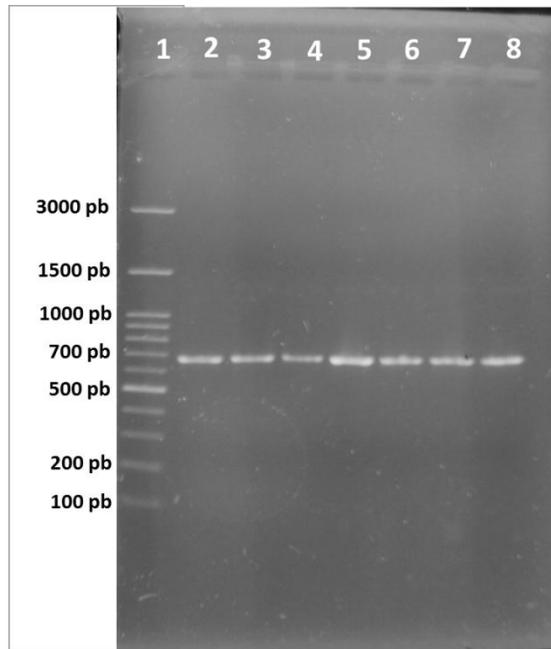
El índice kappa de Cohen calculado con un nivel de confianza del 95% fue de 0.651 entre la prueba de PCR y el ELISA comercial, lo que demuestra un nivel de concordancia adecuado entre pruebas (Figura 7). Así mismo, se determinó una sensibilidad de 85.6% y una especificidad de 79.5% para la prueba de PCR evaluada, así como una fiabilidad del 83.1 %.

	PCR +	PCR -
ELISA+	101	17
ELISA-	17	66

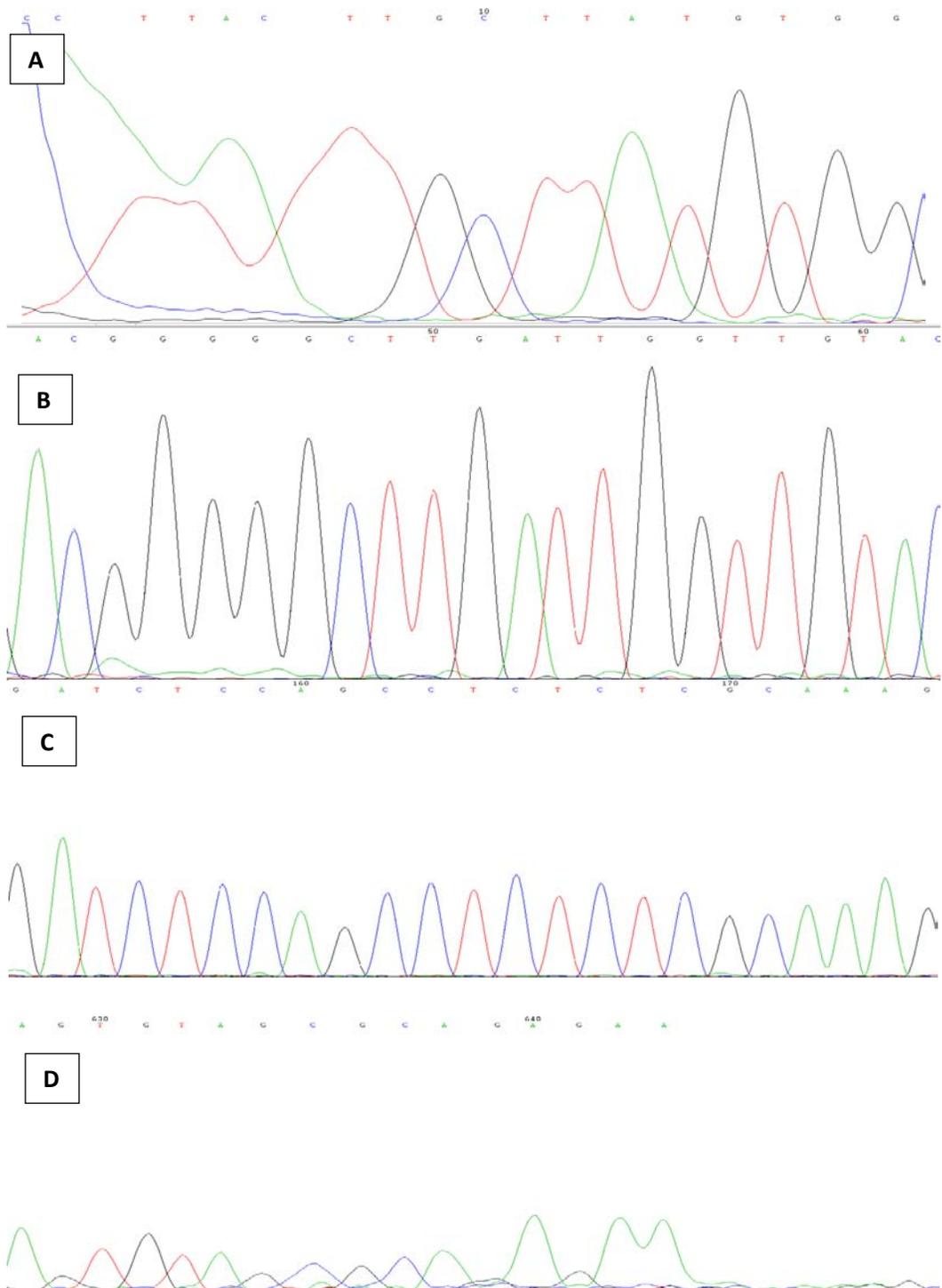
**Figura 7. Tabla de contingencia de 2x2 para evaluar la concordancia entre la prueba de ELISAi y PCR para la identificación de la infección por el BLV.**

### d. Secuenciación nucleotídica y confirmación de la infección por el BLV

A partir de productos de 674 nt amplificados por PCR los cuales posteriormente fueron purificados (Figura 8) y secuenciados, se obtuvieron en promedio 602 nt por muestra (Figura 9) post análisis *in silico* y edición. Cabe destacar que las 27 secuenciadas obtenidas en el presente trabajo se encontraron entre la posición 5904 y la 6505 del genoma del BLV referido por Sagata [67] en la secuencia con número de acceso K02120 en el GenBank, y mostraron una similitud del 99% con ella. Las secuencias comprenden una porción final de la gp30 de TM del gen *env* y una porción inicial del gen pX del BLV.



**Figura 8. Visualización de productos de amplificación de 674 pb de un fragmento del gen *env* del VBL purificado y separados en un gel de agarosa al 1.5%. Carril 1 marcador de pares de bases y del carril 2 al 8 muestras purificadas (2  $\mu$ l) de productos positivos por PCR del BLV.**



**Figura 9. Cromatograma de una secuencia parcial del gen *env* del BLV.** La figura A y D muestran respectivamente el inicio y el final de la lectura de una secuencia obtenida por el método Sanger. La figura B y C muestran partes intermedias de la misma. Los colores indican la base nucleotídica identificada, rojo (T), negro (G), verde (A) y azul (C).



#### f. Análisis filogenético

El árbol filogenético construido con el algoritmo de máxima verosimilitud incluyó 80 secuencias de una longitud de 462 pb de un fragmento de la gp30 del gen *env*: 27 obtenidas del presente estudio y 53 representantes de diferentes genotipos (excepto el 7, 8 y 10) obtenidas de la base de datos del GenBank. El árbol fue construido bajo el modelo de sustitución de Tamura- Nei con un soporte estadístico de 1000 bootstrap.

El árbol clasificó a las 27 secuencias obtenidas de los tres diferentes estados de la República dentro del genotipo 1, al igual que a las secuencias de referencia para este genotipo (Cuadro 4), con excepción de la secuencia Australiana DOO647 (reportada como genotipo 1) que se agrupó dentro del genotipo 4, con un valor de bootstrap de 740. De igual forma, las secuencias de Costa Rica reportadas previamente como genotipo 5, en el árbol construido en el presente estudio se agrupó dentro del genotipo 1, con valores de bootstrap de 990 (Figura 11).

**Cuadro 4. Distribución de genotipos basados en secuencias parciales de la gp51 referidas<sup>a</sup>.**

País	Número de acceso	Genotipo	Referencia
	GenBank		
Paraguay	LC080651	1	[62]
	LC080652	1	[62]
	LC080655	1	[62]
	LC080656	6	[62]
	LC080657	6	[62]
	LC080658	6	[62]
	LC080653	1	[62]
	LC080651	1	[62]
Bolivia	LC080659	9	[62]
	LC080660	9	[62]
	LC080662	9	[62]
	LC080670	9	[62]

**Cuadro 4. Distribución de genotipos basados en secuencias parciales de la gp51 referidas<sup>a</sup>. (continuación)**

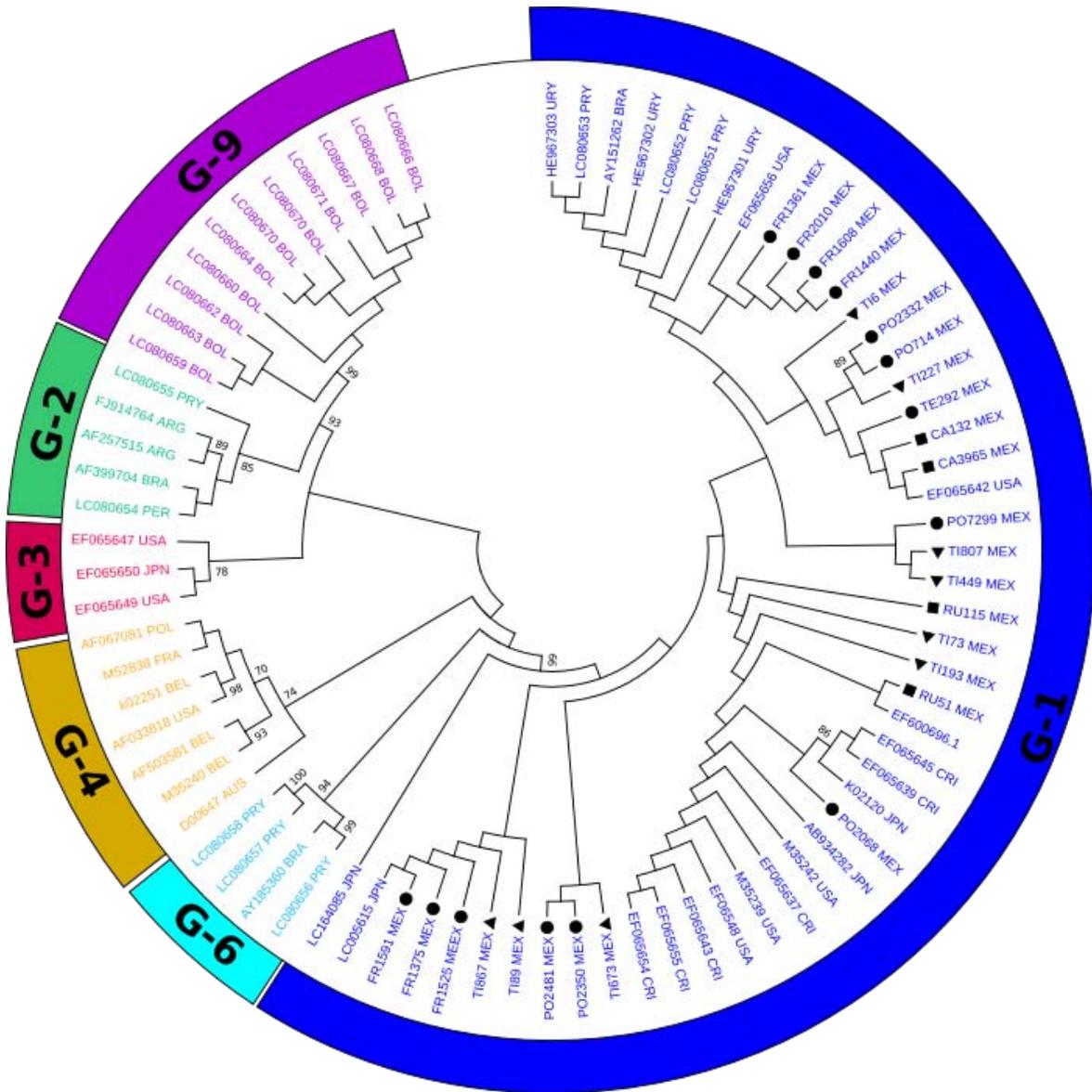
Bolivia	LC080667	9	[62]
	LC080664	9	[62]
	LC080668	9	[62]
	LC080666	9	[62]
	LC080671	9	[62]
	LC080663	9	[62]
Perú	LC080654	2	
Brasil	AF399704	2	[10]
	AY151262	1	[10]
	AY185360	6	[10]
Argentina	AF257515	2	[68]
	FJ914764	2	[69]
Uruguay	HE967301	1	[70]
	HE967302	1	[70]
	HE967303	1	[70]
Japón	LC164085	No clasificado	*
	LC005615	No clasificado	*
	K02120	1	[67]
	AB934282	1	*
	EF065650	3	[56]
Costa Rica	EF065637	1	[56]
	EF065645	5	[56]
	EF065639	5	[56]
	EF065643	5	[56]
	EF065655	5	[56]
	EF065654	5	[56]
Australia	D00647	1	[45]
USA	M35242	1	[71]

**Cuadro 4. Distribución de genotipos basados en secuencias parciales de la gp51 referidas<sup>a</sup>. (continuación)**

USA	EF600696.1	1	[72]
	EF065642	1	[56]
	EF065647	3	[56]
	EF065649	3	[56]
	EF06548	3	[56]
	AF033818	4	*
	M35239	4	[71]
Bélgica	AF503581	4	[73]
	K02251	4	[74]
	M35240	4	[71]
Francia	M52838	4	[71]
Polonia	AF067081	4	*

<sup>a</sup> Genotipos reportados por [60], [61], [62], [75], [12], [70], [23], [76] y [77].

\*Registrado directo en el GenBank.



**Figura 11. Árbol filogenético construido con el algoritmo de máxima verosimilitud que incluyo secuencias parciales del gen *env* del BLV reportadas de diferentes países del mundo.** Las secuencias en este árbol se muestran con su número de acceso y el país de origen. Las secuencias obtenidas en este estudio están marcadas de acuerdo a su origen: Jalisco (▲), Estado de México (●) e Hidalgo (■). Los genotipos 1, 2, 3, 4 ,6 y 9 están indicados con números alrededor del árbol y con colores azul marino, verde, rosa mexicano, amarillo, azul claro y morado respectivamente. Solo se muestran los números en los nodos con valores de bootstraps de 700 o superiores.

La distancia genética analizada con las secuencias parciales de un fragmento final de la gp30 de la TM del gen *env*, que se utilizaron como representantes de los genotipos para la construcción del árbol filogenético, mostraron una distancia génica entre los genotipos 5 y 1, fue de 0.7. La mayor distancia la tuvieron los genotipos 2 y 6 con un valor de 5.5 (Cuadro 5). Cabe destacar que la clasificación filogenética reportada para el BLV se basa en secuencias de la proteína gp51 de SU del gen *env*.

**Cuadro 5. Resultados expresados en porcentaje de la distancia genética entre los principales genotipos usados en el presente trabajo basado en el modelo de Kimura - 2.**

	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	G-6
G-1						
G-2	4.2					
G-3	3.7	2.9				
G-4	4.1	4.6	3.3			
G-5	<b>0.7</b>	4.1	3.6	4.0		
G-6	4.4	<b>5.5</b>	4.6	5.0	4.5	
G-9	4.7	2.4	2.8	4.4	4.7	5.4

Distancia genética de 80 secuencias de 462 nt de longitud de la gp30 parcial, agrupados según los genotipos reportados para cada secuencia (Cuadro 4).

La máxima y mínima divergencia está representada en negritas.

El grado de similitud obtenido entre las secuencias de los diferentes estados en el presente trabajo, tuvo un rango del 98.2 al 100%. Mientras que el grado de similitud entre las secuencias generadas en el presente estudio y las secuencias disponibles en el GenBank que se agruparon en el genotipo 1 en el árbol filogenético construido, variaron en un rango de 98.4 al 100%, reportando que las secuencias mexicanas tuvieron una mayor similitud a secuencias de EUA (99,1 al 100%) y una mayor divergencia con las secuencias reportadas en Japón (98.4 al 99.5%).

## DISCUSIÓN

El BLV es un patógeno del ganado vacuno presente en todo el mundo. Hasta ahora, estudios moleculares muestran una diversidad genética relativamente alta [60], [61], [62], [77] del BLV considerando que tiene una baja tasa de mutación (0.009% de cambios nucleotídicos por año para el gen *env*) [78]. En este estudio fueron seleccionados 201 bovinos provenientes de tres estados de México evaluados por pruebas serológicas y moleculares, con la finalidad de comparar los métodos de detección y caracterizar genéticamente el gen *env* del BLV de 27 muestras.

Del total de 201 bovinos evaluados provenientes de los estados de Jalisco, México e Hidalgo, se obtuvo una prevalencia aparente de 58.7 % (n=118 animales), determinado tanto por una prueba de ELISA comercial como por la PCR implementada en el laboratorio. La prevalencia real estimada fue del 50.2%, mientras que la prevalencia a nivel de explotaciones por estados oscilo entre un 24% y un 67.6%, los que revela un nivel de infección de moderado a alto entre explotaciones. Es igualmente evidente el incremento de la infección por el BLV con respecto a los últimos estudios serológicos reportados para Jalisco por un lado, y por otro el sostenimiento de los niveles altos de infección para Hidalgo; ya que en el presente trabajo se encontró un 59.6% (n=109) de animales infectados con BLV en Jalisco, que contrasta con estudios previos donde se reportó un 22.3% (n=216 animales) en 1990 [79], mientras que para Hidalgo, de un 66 % (n=80 animales) reportado en 2009 [20], se encontró un 60.6% (n= 48) de animales infectados en el presente. La diferencia observada en Jalisco, puede deberse al uso de diferentes métodos de diagnóstico, ya que Pérez [79] utilizó la prueba de IDGA, la cual tiene menor sensibilidad que el ELISA [80]. Sin embargo, es posible que el aumento sea real y que las altas prevalencias encontradas en las explotaciones sean consecuencia directa de la despreocupación o desconocimiento de los productores con respecto a las medidas de control que se pueden aplicar para evitar la infección. Así mismo, el poco interés de los productores se puede asociar a la ausencia de un programa oficial de control obligatorio para el BLV o a la falta de incentivos económicos por parte de las industrias en el país. Por ejemplo, en EUA, la entrega de incentivos por controlar la infección, se vio reflejada en una disminución de las prevalencias [5]; mientras que en Finlandia, la clave de la erradicación

del BLV, estuvo en la compensación económica que se dio a los ganaderos por el sacrificio de los animales seropositivos por parte del estado [42]. Sin embargo, la implementación de nuevos programas de control para infecciones del ganado no es sencillo para un país como México, como lo evidencian las campañas de control y erradicación para dos infecciones causadas por bacterias, las cuales siguen siendo un problema vigente desde hace varios lustros [81].

Los resultados obtenidos entre las pruebas de PCR y ELISA mostraron una concordancia adecuada en la detección de animales infectados y libres de infección. Sin embargo, las ligeras diferencias obtenidas entre los resultados de ambas técnicas no pueden ser interpretadas de manera concreta debido a la información insuficiente obtenida de algunos animales respecto a la edad o estado fisiológico, ya que como se ha señalado [82], la detección de anticuerpos mediante ELISA no discrimina entre inmunidad pasiva o activa en terneros jóvenes, además la toma de muestras en vacas cercanas al periparto afecta la detección del BLV en pruebas de ELISA, debido a la baja de anticuerpos circulantes, que han sido transportados a la glándula mamaria para la producción de calostro [82, 83]. Por ello, en los casos donde se identificaron animales positivos a ELISA, pero negativos a PCR (Cuadro 3), aunque las muestras se tomaron de animales mayores a los 6 meses, es factible pensar que se muestrearon terneras jóvenes cuyos resultados positivos a ELISA estuvieran relacionados con los anticuerpos maternos remanentes de la inmunidad pasiva, en lugar de los anticuerpos producidos por la replicación viral. Así como, dichos animales carentes de ADN proviral detectable, pero seropositivos, podrían explicarse por fluctuaciones en el número de linfocitos infectados [80] o por una carga proviral menor a  $10^4$  copias por cada  $10^5$  células indetectables por PCR [84].

En contraste, los resultados positivos a PCR y negativos a ELISA que se observan en los bovinos, podrían explicarse por el posible muestreo de vacas cercanas al periparto o que se encuentren cruzando el periodo de latencia necesario para generar respuesta inmune específica relacionada a la presencia de anticuerpos después de la infección [85]. Así como, podría deberse a la presencia de animales inmunotolerantes al BLV [80]. Otros estudios proponen que las diferentes respuestas antivirales relacionados con la ocurrencia de falsos negativos, podrían estar relacionadas con el estado de infección y otros factores del

hospedador, como la expresión del gen BoLA DRB3.2, el cual ha sido asociado a la susceptibilidad o resistencia del hospedador al aumento de la carga viral [35], [12].

Cabe destacar que el nivel más alto de infección detectado para el BLV se observó en el hato C (ubicado en el Estado de Jalisco), cuya prevalencia real fue de 67.4% y dentro de los hatos lecheros muestreados fue uno de los más grandes en cabezas de ganado, seguidos por los hatos D (ubicado en el Estado de México) y B (Ubicado en el Estado de Jalisco), coincidiendo con la tendencia reportada de altas prevalencias en grandes explotaciones lecheras [13], [84]. Es posible que dicha tendencia se deba a que en este tipo de hatos se lleva a cabo una mayor cantidad de prácticas de riesgo que en los hatos de menor tamaño donde se realizan con menor frecuencia o no se realizan. Estas prácticas riesgosas corresponden, por ejemplo, a palpaciones de diagnóstico reproductivo, exámenes post parto, inseminación artificial, aplicación de vacunas, tomas de muestras de sangre, entre los más predominantes [22]; lo que podría contribuir a la diseminación de la infección, si éstas no se realizan con la higiene adecuada. Otro factor que podría influenciar sobre el alto nivel de infección en las granjas lecheras sería la transmisión por leche residual presente en la máquina de ordeño durante este proceso, como lo reportan Thompson y Miller [86].

Como consecuencia a la falta de datos las interpretaciones son limitadas. Sin embargo, es evidente que los niveles altos de prevalencia sugieren la necesidad de una mayor difusión de medidas de prevención y control contra el BLV.

Por otro lado, dado que la concordancia entre ambas metodologías de diagnóstico mostró un grado de acuerdo adecuado, es posible sugerir el uso de PCR como método de diagnóstico complementario en aquellos animales detectados como negativos con pruebas de ELISA y en los cuales se quiera confirmar la presencia de ADN proviral. En este sentido el uso de la PCR puede constituir un aporte a los programas de control del BLV.

Los resultados filogenéticos realizados en el presente estudio revelaron la presencia del genotipo 1 en bovinos lecheros del país, lo que tiene una alta relación con las importaciones frecuentes de ganado de EUA, en cuyo país se ha detectado ganado infectado con el BLV genotipo 1 y cuyas secuencias presentaron un mayor grado de similitud (99.1 al 100%) con las secuencias reportadas en el presente escrito, que con las secuencias descritas para

bovinos de Japón (98.4% al 99.5%) Esto sugiere que es necesario evaluar los animales o derivados biológicos que se introducen al país para disminuir las reinfecciones o ingreso de nuevos genotipos. Por otro lado, el análisis filogenético que incluyó una porción del gen relacionado con la proteína de transmembrana (gp30) ubicó a las secuencias de Costa Rica (EF065639, EF065645, EF065654, EF065643 y EF065655) dentro del genotipo 1, las cuales previamente utilizando secuencias de la región genética de la proteína de superficie (gp51) fueron clasificadas en el genotipo 5 (Cuadro 3). Este cambio en la ubicación del grupo genético puede ser asociado con la poca distancia génica que existió entre ambos genotipos (0.7%) en el fragmento de la porción de la gp30 estudiada (Cuadro 4). Esta discrepancia puede explicarse porque dentro de las dos regiones del gen *env*, la mayoría de las mutaciones ocurren dentro de los epítomos de la proteína de superficie gp51 [87], región implicada en la capacidad del BLV para unirse a los receptores celulares [71], y que se ha utilizado en los diversos estudios filogenéticos del BLV que han reportado la identificación de 10 genotipos [60], [61], [62], [63]. Lo que hace evidente la necesidad de utilizar secuencias nucleotídicas derivadas de la región genética de la gp51 para corroborar la presencia de genotipo 1 o la posible existencia del genotipo 5.

Los promedios obtenidos de la distancia génica calculada entre los diferentes genotipos utilizados para la construcción del árbol, no exceden el 6% de acuerdo con estudios anteriores [88]. La mayor distancia génica que se obtuvo fue entre el genotipo 2 (G-2) y el genotipo 6 (G-6) que fue de 5.5% y la distancia entre el G-6 y el G-9 que fue de 5.4%. Por otro lado, el grado de similitud reportado entre las secuencias obtenidas en el presente trabajo (98.2 al 100%) concuerda con los bajos niveles de variabilidad genética antes mencionados, que no reflejan barreras geográficas, pero tal vez indican un único origen de infección de BLV o la importación internacional de ganado a través de la frontera de varios países [88].

El análisis de las sustituciones en 463 pb de las 27 secuencias nucleotídicas parciales amplificadas (5904-6365) de la subunidad gp30 de la TM del gen *env* del BLV, dio lugar a la identificación de 24 sustituciones: 19 de las cuales fueron sustituciones silenciosas y 5 dieron lugar a sustituciones de aminoácidos (Figura 6). La mayoría de dichas sustituciones se originaron dentro del dominio citoplásmico de la transmembrana. En el motivo de 20aa

sin carga (438-457) que se cree que involucra la membrana de la célula huésped previo a la gemación [74]. Se encontró una sustitución cuyo aminoácido mutado carece también de carga (F-447-C), manteniéndose así la hidrofobicidad de la secuencia [56]. El primer residuo cargado positivamente (K-547) seguido de la secuencia de 20 aa sin carga, que funge como señal para detener la transferencia de las cadenas de péptidos a través de la membrana lipídica, no mostró variación en ninguna de las muestras analizadas, al igual que los motivos YXXL de la CTM, los cuáles se reportan como motivos altamente conservados de la TM [56], ya que son requeridos para la entrada viral del BLV y la incorporación de la proteína viral *env* dentro de viriones [51], así como están implicados en la baja regulación a la exposición de la superficie de la *env* del BLV, ayudando en la evasión viral de la inmunidad adaptativa [89]. En resumen, ninguno de los cambios de aminoácidos encontrados se dio en una región con una función biológica específica. Es importante mencionar que en el presente trabajo no se determinó si las secuencias nucleotídicas obtenidas provenían de virus infecciosos, para lo cual es necesario realizar aislamiento viral.

El promedio de sustitución de las secuencias aisladas en relación con la secuencia M35242 de EUA del genotipo 1, fue de 5.6%, similar al promedio que se puede encontrar en secuencias del gen *env* de aislados de Brasil y Argentina, lo cual demuestra una alta conservación del gen [10, 75], en contraste con otros retrovirus, por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) [90]. La alta conservación del gen *env* del BLV puede deberse a una restricción evolutiva o a una buena adaptación en el huésped [23]. Otras razones pueden ser el menor número de ciclos de replicación, una baja presión inmunológica, una retrotranscriptasa inversa menos propensa a cometer errores y la mínima expresión de los genes estructurales *in vivo* [91], [92]. En contraste, un gran número de mutaciones en el gen *env* de los retrovirus puede afectar a la replicación viral, la capacidad para infectar a nuevos huéspedes, la capacidad para formar sincitios, el procesamiento de glicoproteínas precursoras y alterar la expresión de glicoproteínas de la superficie celular [93], [78].

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró la presencia del genotipo 1 en bovinos lecheros de hatos ubicados en los estados de México, Jalisco e Hidalgo, a partir de 27 secuencias y su comparación con secuencias de la gp30 de todo el mundo.

La nula distancia génica encontrada entre el genotipo 1 y el genotipo 5 para la gp30 del gen *env*, hace evidente la necesidad de analizar la gp51 para corroborar la presencia del genotipo 1 o la posible existencia del genotipo 5 en el país.

Se demostró que la técnica de PCR estandarizada es un método eficiente en la detección de la infección por el BLV, similar al que se obtuvo con una prueba comercial de ELISA, por lo que se recomienda el uso de ambas de forma complementaria.

Los niveles altos de infección reportados en los diferentes hatos de los diferentes estados evaluados, sugieren la necesidad de la difusión de medidas de prevención y control del BLV tales como la mejora de prácticas de manejo al momento del descorne y palpaciones rectales de la administración de vacunas, de la introducción de nuevos animales al hato, así como del control de insectos hematófagos como garrapatas, moscas y mosquitos. En este sentido el diagnóstico por PCR puede constituir un aporte a los programas de prevención y control del BLV.

Sería interesante como una perspectiva a futuro evaluar si las mutaciones encontradas en las secuencias del BLV, tienen un efecto sobre la patogenicidad o infectividad viral.

## REFERENCIAS

1. Fenner, F., *Virología veterinaria*. 2ª ed, ed. Acribia. 2011, España. 264-266.
2. Leisering, A., *Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der Milz*. Bericht über das Veterinarwesen im Königreich Sachsen, 1871. **16**: p. 15-16.
3. Pelzer, K.D., *Economics of bovine leukemia virus infection*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 1997. **13**(1): p. 129-141.
4. Rhodes, J.K., K.D. Pelzer, and Y.J. Johnson, *Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds*. J Am Vet Med Assoc, 2003. **223**(3): p. 346-352.
5. Ott, S.L., R. Johnson, and S.J. Wells, *Association between bovine leukosis virus seroprevalence and herd level productivity on US dairy farms*. Prev Vet Med, 2003. **61**(4): p. 249-262.
6. D.O.F., *Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos.*, in *Diario Oficial de la Federación* 2016, Disponible en [http://dof.gob.mx/nota\\_to\\_doc.php?codnota=5436016](http://dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5436016). Fecha de consulta 12/11/16.
7. *Enfermedades de la Lista de la OIE* in <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016>, Fecha de consulta 11/12/ 2016.
8. Johnson, R. and J.B. Kaneene, *Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis*. Veterinary Bulletin (United Kingdom), 1992. **62**(287-288).
9. *Annual report of European Union on bovine and swine diseases 2013* in *Chapter 2, Enzootic Bovine Leukosis*. p. 8-11, Disponible en [http://ec.europa.eu/food/animals/docs/la\\_bovine\\_final\\_report\\_2014.pdf](http://ec.europa.eu/food/animals/docs/la_bovine_final_report_2014.pdf). Fecha de consulta 12/11/2016.
10. Camargos, M.F., et al., *Partial Sequencing of env Gene of Bovine Leukaemia Virus from Brazilian Samples and Phylogenetic Analysis*. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 2002. **49**(7): p. 325-331.
11. Hernández-Herrera, D.Y., et al., *Bovine leukemia virus detection in Creole Colombian breeds using nested-PCR*. Acta Agronómica, 2011. **60**(4): p. 312-318.
12. Licursi, M., et al., *Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan*. Vet Microbiol, 2003. **96**(1): p. 17-23.
13. Kobayashi, S., 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): p. 47-53.
14. Uruchurtu, A., *Incidencia de linfosarcoma en bovinos de D.F. Tesis Licenciatura*, in *Esc. Nal. de Med. Vet. y Zoot.* 1967, UNAM: México, D.F.
15. Monroy, B.J., et al., *Estudio seroepizootiológico de la leucosis enzoótica bovina en México*. Tec. Pec. en México, 1987. **25**(2): p. 151-154.
16. Vilchis, C., *Determinación de anticuerpos contra el virus de leucosis bovina por la técnica de inmunodifusión*. Tesis de Licenciatura, in *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* 1979, UNAM: México.
17. Suzan, V.M., et al., *Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico*. Jpn. J. Vet. Res., 1983. **31**(3-4): p. 125-132.
18. Avalos, R.R., *Detección serológica y molecular del virus de la leucosis bovina (VLB) en el noreste de México*. Tesis Maestría, in *Facultad de ciencias biológicas*. 1995, UANL: Nuevo León.

19. Osuna, A.S., *Determinación de la presencia de anticuerpos contra el virus de la leucosis en bovinos productores de leche del municipio de Cajeme, Sonora. Tesis licenciatura.* 2003, Instituto Tecnológico de Sonora: Obregón.
20. Zavaleta, H.J.N., *Respuesta serológica, carga viral y linfocitosis persistente en bovinos infectados por el virus de la leucosis enzoótica bovina (vLEB). Tesis Maestría, in FESC.* 2009, UNAM: México.
21. Salman, M.D., J.A. Hernandez, and I. Braun, *A seroepidemiological study of five bovine diseases in dairy farms of the coastal region of Baja California, Mexico.* Preventive veterinary medicine, 1990. **9**(2): p. 143-153.
22. Kobayashi, S., et al., *Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan.* BMC Vet Res, 2010. **6**: p. 1.
23. Monti, G., R. Schrijver, and D. Beier, *Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle.* Archives of Virology, 2005. **150**(3): p. 443-458.
24. Hopkins, S.G. and R.F. DiGiacomo, *Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle.* Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1997. **13**(1): p. 107-128.
25. Santos, M.a.J.D., et al., *Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples.* Veterinary Microbiology, 2007. **119**(1): p. 10-18.
26. Gillet, N., et al., *Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human.* Retrovirology, 2007. **4**(1): p. 1-32.
27. Suzuki, S., et al., *Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle.* Microbiology and immunology, 2013. **57**(8): p. 600-604.
28. Okagawa, T., et al., *Increased bovine Tim-3 and its ligand expressions during bovine leukemia virus infection.* Veterinary research, 2012. **43**(1): p. 1.
29. Gutierrez, G., et al., *Vaccination against delta-retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm.* Viruses, 2014. **6**(6): p. 2416-2427.
30. Stober, M., *The clinical picture of the enzootic and sporadic forms of bovine leukosis.* Bovine Pract, 1981. **16**: p. 119-129.
31. Pierard, V.r., et al., *DNA cytosine methylation in the Bovine Leukemia Virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line potential involvement of direct inhibition of cAMP-responsive element (cre)-binding protein/cre modulator/activation transcription factor binding.* Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(25): p. 19434-19449.
32. Aida, Y., et al., *Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus.* Animal model studies on viral infections, 2013. **4**(328): p. 68.
33. Tajima, S., et al., *Function and conformation of wild-type p53 protein are influenced by mutations in bovine leukemia virus-induced B-cell lymphosarcoma.* Virology, 1998. **243**(1): p. 735-746.
34. Konnai, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha up regulation in spontaneously proliferating cells derived from bovine leukemia virus infected cattle.* Arch Virol, 2006. **151**(2): p. 347-360.
35. Juliarena, M.A., et al., *Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene.* Anim Genet, 2008. **39**(4): p. 432-438.
36. Xu, A., et al., *Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus.* J Immunol, 1993. **151**(12): p. 6977-6985.
37. Miyasaka, T., et al., *Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle.* Tissue Antigens, 2013. **81**(2): p. 72-82.

38. Aida, Y., et al., *Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 328.
39. OIE, *Manual de la OIE sobre animales terrestres*, in *Capítulo 2.04.11 Leucosis enzoótica bovina*. 2008, Disponible en [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.04.11\\_Leucosis\\_bovina\\_enzo%C3%B3tica.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.11_Leucosis_bovina_enzo%C3%B3tica.pdf). Fecha de consulta 12/11/2016.
40. Maresca, C., et al., *Enzootic bovine leukosis: Report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8 year period (2005-2012)*. Preventive veterinary medicine, 2015. **119**(3): p. 222-226.
41. Burgu, I., et al., *Control and eradication programme of enzootic bovine leucosis (EBL) from selected dairy herds in Turkey*. DEUTSCHE TIERARZTLICHE WOCHENSCHRIFT, 2005. **112**(7): p. 271.
42. Nuotio, L., et al., *Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland*. Preventive veterinary medicine, 2003. **59**(1): p. 43-49.
43. Acaite, J., et al., *The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania*. Preventive veterinary medicine, 2007. **82**(1): p. 83-89.
44. Nguyen, V.K. and R.F. Maes, *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk*. Journal of clinical microbiology, 1993. **31**(4): p. 979-981.
45. Fechner, H., et al., *Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle*. Virology, 1997. **237**(2): p. 261-269.
46. Bendixen, H.J., *Epizootiology, diagnosis and control of bovine leukosis*. Bull Off Int Epizoot, 1967. **68**(1): p. 73.
47. Tolle, A., *Zur Beurteilung quantitativer hämatologischer Befunde im Rahmen der Leukose Diagnostik beim Rind*. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B, 1965. **12**(4): p. 281-290.
48. Theilen, G.H. and D.L. Dungworth, *Bovine lymphosarcoma in California. 3. The calf form*. American journal of veterinary research, 1965. **26**: p. 696-709.
49. Sagata, N., et al., *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): p. 3231.
50. Johnston, E.R. and K. Radke, *The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemia virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2930-2935.
51. Inabe, K., et al., *The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1293-12301.
52. Willems, L., 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 1992. **89**(9): p. 3957-3961.
53. Felber, B.K., et al., *Cross-activation of the Rex proteins of HTLV-I and BLV and of the Rev protein of HIV-1 and nonreciprocal interactions with their RNA responsive elements*. New Biol, 1989. **1**(3): p. 318-328.
54. Willems, L., et al., *Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames*. Proc Natl Acad Sci 1994. **91**(24): p. 11532-11536.
55. Lefebvre, L., et al., *Oncoviral bovine leukemia virus G4 and human T-cell leukemia virus type 1 p13II accessory proteins interact with farnesyl pyrophosphate synthetase*. Journal of virology, 2002. **76**(3): p. 1400-1414.

56. Zhao, X. and G.C. Buehring, *Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape*. *Virology*, 2007. **366**(1): p. 150-165.
57. Bartenschlager, R. and V. Lohmann, *Replication of hepatitis C virus*. *Journal of General Virology*, 2000. **81**(7): p. 1631-1648.
58. Camargos, M.F., et al., *Genetic variation of bovine leukemia virus (BLV) after replication in cell culture and experimental animals*. *Genet Mol Res*, 2002. **13**(1): p. 1717-1723.
59. Coulston, J., et al., *Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates*. *J Gen Virol*, 1990. **71** (8): p. 1737-1746.
60. Rodriguez, S.M., et al., *Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades*. *J Gen Virol*, 2009. **90**(Pt 11): p. 2788-2797.
61. Balic, D., et al., *Identification of a new genotype of bovine leukemia virus*. *Arch Virol*, 2012. **157**(7): p. 1281-1290.
62. Polat, M., 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**: p. 4.
63. Lee, E., et al., *Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016. **41**: p. 245-254.
64. Licursi, M., et al., *Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts*. *Virus Res*, 2002. **86**(1-2): p. 101-110.
65. Asfaw, Y., et al., *Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan*. *Arch Virol*, 2005. **150**(3): p. 493-505.
66. Gorodezky, C., *Manual de Técnicas XIII. Curso teórico-práctico de genética molecular*, in *Depto de Inmunogenética de INDRE*. 1998, sector salud: México.
67. Sagata, N., et al., *Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(3): p. 677-681.
68. Dube, S., et al., *The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina*. *Virology*, 2000. **277**(2): p. 379-386.
69. Dube, S., et al., *The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain*. *Virol J*, 2009. **6**: p. 120.
70. Moratorio, G., et al., *Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes*. *Archives of Virology*, 2010. **155**(4): p. 481-489.
71. Mamoun, R.Z., et al., *Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins*. *J Virol*, 1990. **64**(9): p. 4180-4188.
72. Derse, D., et al., *Nucleotide sequence and structure of integrated bovine leukemia virus long terminal repeats*. *Virology*, 1985. **141**(1): p. 162-166.
73. Willems, L., et al., *Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastain variability*. *J Virol*, 1993. **67**(2): p. 1086-1089.
74. Rice, N.R., et al., *The nucleotide sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus*. *Virology*, 1984. **138**(1): p. 82-93.
75. Camargos, M.F., et al., *Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine leukemia virus*. *Virus Genes*, 2007. **34**(3): p. 343-350.
76. Felmer, R., et al., *Molecular analysis of a 444 bp 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): p. 39-47.

77. Lee, E., et al., *Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle*. Infection, Genetics and Evolution. **41**: p. 245-254.
78. Willems, L., et al., *In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants*. Journal of virology, 1993. **67**(7): p. 4078-4085.
79. Pérez, R.M., *Seroepizootiología de la Leucosis Enzoótica Bovina en Ganado Lechero de los Municipios de Aranas, Tepatitlán y Acatic, Jalisco. Tesis Licenciatura.*, in Fac. de Med. Vet. y Zoot. 1990, Universidad de Guadalajara: Guadalajara.
80. Monti, G.E., et al., *Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle*. J Vet Diagn Invest, 2005. **17**(5): p. 451-457.
81. Carrillo, E., *Importancia y repercusión de las campañas zoonosológicas contra Tuberculosis Bovina y Brucelosis de los animales*, in *RelbCi*. 2015. p. 45-52.
82. Rama, G., *Aspectos sobre el diagnóstico de Leucosis Enzoótica Bovina*, in *Facultad de ciencias*. 2009, Universidad de la República: Montevideo, Uruguay.
83. BurrIDGE, M.J., et al., *Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period*. Can J Comp Med, 1982. **46**(3): p. 270-271.
84. Polat, M., et al., *Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle*. Arch Virol, 2015. **160**(1): p. 285-296.
85. Nagy, D.W., J.W. Tyler, and S.B. Kleiboeker, *Timing of seroconversion and acquisition of positive polymerase chain reaction assay results in calves experimentally infected with bovine leukemia virus*. Am J Vet Res, 2007. **68**(1): p. 72-75.
86. Thompson, P.D. and R.H. Miller, *Retrograde Flow of Milk Within Machine-Milked Teats*. Journal of Dairy Science, 1974. **57**(12): p. 1489-1496.
87. Portetelle, D., et al., *Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH2 part of the envelope glycoprotein gp51*. Virology, 1989. **169**(1): p. 27-33.
88. Lee, E., et al., *Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates*. Virol J, 2015. **12**: p. 64.
89. Novakovic, S., E.T. Sawai, and K. Radke, *Dileucine and YXXL motifs in the cytoplasmic tail of the bovine leukemia virus transmembrane envelope protein affect protein expression on the cell surface*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8301-8311.
90. Liu, Y., et al., *Selection on the human immunodeficiency virus type 1 proteome following primary infection*. Journal of virology, 2006. **80**(19): p. 9519-9529.
91. Haas, L., T. Divers, and J.W. Casey, *Bovine leukemia virus gene expression in vivo*. Journal of virology, 1992. **66**(10): p. 6223-6225.
92. Mansky, L.M. and H.M. Temin, *Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus*. Journal of virology, 1994. **68**(1): p. 494-499.
93. Pique, C., T. Tursz, and M.-C. Dokhelar, *Mutations introduced along the HTLV-I envelope gene result in a non-functional protein: a basis for envelope conservation?* The EMBO journal, 1990. **9**(13): p. 4243.

## **Anexo 1**

Protocolo de extracción de células blancas de sangre periférica.

Método de Gorodezky [66].

1. Centrifugar el tubo de sangre con anticoagulante a 3000 rpm durante 15 minutos para la separación de plasma.
2. Transferir con una pipeta Pasteur el plasma a un microtubo y la capa blanca de leucocitos a un tubo Falcon de 14 ml.
3. Agregar 10 ml de solución de lisis I al tubo Falcon y agitar con el vibro mezclador suavemente por un minuto.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, desechar cuidadosamente el sobrenadante por decantación.
5. Repetir los pasos 3 y 4 con solución de lisis II.
6. Agregar 7 ml de PBS al paquete de células blancas. Si es necesario, se le puede agregar 3 ml de agua bidestilada para lisar los glóbulos rojos restantes de manera adicional.
7. Homogenizar y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
8. Decantar y recuperar entre 200 y 300  $\mu$ l del botón de células blancas del fondo y colocar en un tubo Eppendorf estéril. Etiquetar y almacenar a -20 °C hasta su uso.

## **Anexo 2**

Protocolo para la detección de anticuerpos del BLV mediante ELISA indirecto (kit comercial VMRD©).

### Descripción General

Este ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISAi) detecta anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del virus de leucemia bovina (BLV) en suero bovino. Los anticuerpos en suero se unen a las moléculas gp51 del BLV con las que están sensibilizados los pozos de plástico de la placa. La unión de estos anticuerpos del suero (inmunoglobulinas bovina) es detectada por la acción en contra de los anticuerpos bovinos con anticuerpos de cabra marcados con peroxidasa (HRP). Las uniones de los anticuerpos marcados con HRP son detectadas por adición del sustrato de la enzima que se evidencia por el cambio de color azul producido. La intensidad del color producido indica la presencia de anticuerpos contra la gp51 del BLV en la muestra de suero. El desarrollo de un color muy débil o su ausencia indica la ausencia de anticuerpos contra la gp51 del BLV en la muestra de suero.

### Preparaciones previas

- a. Atemperado de reactivos: someter las muestras, reactivos y placas a temperatura ambiente  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  previo al inicio de la prueba.
- b. Preparado de controles y muestras: las muestras de suero deben ser diluidas 1/25 con el buffer de dilución de suero (G). Se recomienda realizar estas diluciones en una placa de transferencia sin sensibilizar o en tubos de ensayo. Se requiere al menos 65  $\mu\text{l}$  de cada muestra diluida por pozo considerando el error de pipeteo. Homogenizar la muestra mediante pipeteo o vibro mezclador. Los controles positivos y negativos están listos para su uso, por lo tanto, no deben ser diluidos. Cuando se utilice la totalidad de los pozos de la placa, es mejor colocar los controles en pozos en los extremos distante (A1 y H12 respectivamente). Los controles se deben correr en cada placa.
- c. Preparado de placas. Retire las columnas de las placas removibles (A) en caso de no ocupar todos los pozos. Si aplica, devolver las columnas sin utilizar a su caja cubiertas con papel auto-adherible. Poner atención en la orientación de la placa.

- d. Preparado del conjugado. Preparar conjugado peroxidasa-anticuerpo a 1 x diluyendo una parte del conjugado peroxidasa-anticuerpo 100x (D) en 99 partes del buffer de dilución del conjugado (E). Ejemplo: para 96 pozos mezclar 60 µl del conjugado peroxidasa-anticuerpo 100x (D) con 5.940 ml de buffer de dilución del conjugado (E) para preparar 6 ml de conjugado 1X. Se necesita 50 µl por pozo.
- e. Preparado de la solución de lavado. Preparar solución de lavado 1x diluyendo una parte del concentrado de la solución para lavado 10X (F) en 9 partes de agua desionizada o destilada. Se necesitan aproximadamente 1.5 ml por pozo. Preparar una porción extra considerando posibles pérdidas en el pipeteo.

#### Procedimiento para la prueba

1. Carga de controles y muestras de suero: usando una pipeta de 50 µl, colocar los controles y las muestras de suero dentro de la placa sensibilizada con antígeno (A). Las muestras de suero y controles deben ser cargados dentro de la placa (A) tan rápido como sea posible. Cuando se corran más de dos columnas desmontables, se recomienda que las muestras de suero y los controles sean cargados primero en una placa de transferencia y después transferirlos a la placa (A) usando una pipeta multicanal. El volumen de muestra en la placa de transferencia debe estar por arriba de los 50 µl con la finalidad de transferir 50 µl a la placa (A). Golpear ligeramente la placa por los lados varias veces para asegurar que las muestras toquen el fondo de los pozos. Procurar no salpicar las muestras contenidas en el pozo para evitar contaminación. Incubar la placa 20 minutos a temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C).
2. Lavado de pozos: después de la incubación, lavar tres veces los pozos de la placa. Para ello vacíe el contenido de los pozos en la tarja y remueva los remanentes de suero y controles golpeando la placa invertida 4 veces sobre una servitoalla, golpeando en un lugar limpio por cada ocasión. Inmediatamente llene cada pozo con solución de lavado 1X usando una pipeta multicanal. Vacíe la solución de lavado y remueva los remanentes golpeando la placa invertida en una servitoalla, golpeando en un lugar limpio por cada ocasión. Repita el procedimiento de lavado dos veces más (Tres lavados en total).

3. Adición del conjugado: agregar 50 µl del conjugado Peroxidasa-Anticuerpo diluido a 1X en cada pozo. Golpear ligeramente la placa por los lados varias veces para asegurar que el sustrato alcance el fondo. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavado de pozos: después de la incubación, lavar la placa tres veces como en el paso 2.
5. Adición del sustrato: añadir 50 µl del sustrato (H) a cada pozo. Golpear ligeramente los lados de la placa varias veces para asegurar que el sustrato alcance el fondo. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar que la placa sea expuesta a la luz del sol. En este paso no se vacían los pozos.
6. Adición de solución de paro: añadir 50 µl de solución de paro (I) a cada pozo. Golpear los lados de la placa varias veces para asegurar que se mezclen las soluciones de sustrato con la de paro. PELIGRO: en este paso no se vacían los pozos.
7. Lectura y registro de los resultados. Inmediatamente después de añadir la solución de paro, la placa debe ser leída en un espectrofotómetro de absorbancia para placas. Ajustar la Densidad Óptica (D.O.) para leer longitudes de ondas de 620, 630 nm.

#### Validación de la prueba

El control positivo debe generar una D.O.  $\geq 0.250$  y  $< 2.000$ .

El control negativo debe generar una D.O.  $< 0.200$ .

#### Interpretación de resultados

Las muestras son positivas para anticuerpos contra el BLV si ellas producen una densidad óptica mayor que o igual a la referida por la D.O. del control positivo.

Las muestras de la prueba son negativas a la presencia de anticuerpos contra el BLV si ellas producen una densidad óptica menor que la referida por la D.O. del control negativo.

### **Anexo 3**

Protocolo de extracción de ADN genómico (Kit comercial FavorGen©).

Minikit para extracción de ADN genómico de tejidos

#### Descripción general

Es un kit comercial que ofrece un método rápido y económico para purificar ADN total de muchos tipos de tejido animal. Algunos protocolos especialmente modificados son desarrollados para otras muestras como bacterias, tejidos fijados y levaduras. Esta tecnología primero lisa las células y desnaturaliza la proteína usando sales caotrópicas y proteinasa K, luego se captura el ADN mediante membranas basadas en sílice, se lava con buffer de lavado que contiene etanol y después se eluye con una solución baja en sales o agua bidestilada.

Comparado con otros procedimientos más complejos y que requieren mayor tiempo para realizarlos, dicho kit acorta el tiempo del procedimiento en menos de una hora (el tiempo de lisis varía dependiendo del tipo de tejido procesado). El tamaño del ADN purificado es por arriba de 50 KB. La mayor longitud del ADN mejora la eficiencia durante la reacción de PCR.

#### Procedimiento de la prueba

##### **Paso 1**

Previamente centrifugar el microtubo con células en suspensión a 4000 rpm por 1 minuto y eliminar el sobrenadante por decantación.

1. Agregan 200 µl de buffer FATG1, se homogeniza la muestra de tejido y se macera con un micropestillo.

##### **Paso 2: Lisis**

2. Agregar 20 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) a la muestra obtenida. Mezclar por agitación.

3. Incubar a 60 °C por 15 minutos, esto con la finalidad de que el tejido se lise completamente.
4. Centrifugar brevemente (spin) el tubo para remover los residuos de la tapa.
5. Agregar 200 µl de buffer FATG2 a la muestra y mezclar a fondo por homogenización e incubar a 70 °C por 10 minutos.
6. Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas de la tapa; si existe material insoluble presente, centrifugar a máxima velocidad y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

### **Paso 3: Unión al ADN**

7. Agregar 200 µl de etanol grado biología molecular a la muestra y homogenizar la mezcla.
8. Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas de la tapa.
9. Colocar una minicolumna de FATG en un tubo colector, transferir la mezcla de la muestra cuidadosamente a la columna.
10. Centrifugar por un minuto a 14000 rpm y desechar el fluido que pasó a través de ella hacia el tubo colector.

### **Paso 4: Lavado**

11. Lavar la columna FATG con 500 µl de buffer W1, centrifugar por un minuto y desechar el líquido restante. Es importante asegurar que el etanol fue añadido por primera vez al buffer W1.
12. Lavar la columna FATG con 750 µl de buffer de lavado y centrifugar por un minuto; desechar el restante y centrifugar la columna adicionalmente por 3 minutos para secar la misma.

Paso importante! Este paso evita que el líquido residual inhiba las reacciones enzimáticas subsecuentes.

### **Paso 5: Elución del ADN (Homogenización)**

13. Colocar la columna FATG en un tubo de elución y añadir 30  $\mu$ l de buffer de elución o agua desionizada (pH 7.5-8.5) al centro de la membrana de la columna. Dejar reposar por 3 minutos.
14. Centrifugar por 2 minutos para eluir el ADN total en un volumen final de 50  $\mu$ l. Para una elución efectiva, asegurarse que la solución de elución sea colocada en el centro de la membrana y se absorba por completo. Si la muestra tienen baja cantidad de ADN, reducir el volumen de elución para incrementar su concentración.
15. Repetir el paso 14 por tres ocasiones.
16. Conservar el ADN total a 4 C o -20 C.

#### Anexo 4

Protocolo de la técnica de PCR para la detección parcial del gen *env* y *px* (674 nt).

Protocolo estandarizado por Cancino, 2016.

#### Concentraciones requeridas por reacción.\*

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10X	1X
Deoxinucleótidos trifosfatos	10 mM	280 µM
Mg Cl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM
Iniciador Fw <sup>a</sup>	10 µM	600 nM
Iniciador Rv <sup>b</sup>	10 µM	600 nM
Taq ADN polimerasa	5 U/µl	2.5 U/ por reacción
ADN molde		600 ng

\* Para un volumen final de 30 µl.

<sup>a</sup> 5-ACGCTTGATCACAGCAATTA-3

<sup>b</sup> 5-TCTCTGCGCTACTCAGTC-3

#### Condiciones para el termociclador.

No. Ciclos	Reacción	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
40	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Hibridación	52 °C	40 segundos
	Extensión	72 °C	45 segundos
1	Extensión final	72 °C	7 minutos

Amplicón esperado de 674 nucleótidos

## Anexo 5

### Protocolo de purificación PCR/Gel (Kit FavorPrep™)

Para extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

1. Cortar con un bisturí limpio, la fracción del gel que contenga el fragmento de ADN de interés, procurando tomar la mínima cantidad de gel fuera de la muestra.
2. Transferir el gel (no más de 300 mg) a un tubo de microcentrífuga.
3. Añadir 500 µl de buffer FAGP y mezclar con un vibro mezclador. Para geles de agarosa > 2% agregar 1000 µl del buffer FAGP.
4. Incubar a 55 °C por 5 - 10 minutos (homogenizar con el vibro mezclador cada 2 - 3 minutos hasta disolver el gel durante la incubación).
5. Enfriar la muestra a temperatura ambiente y colocar una columna de FADF dentro de un tubo colector.
6. Transferir 800 µl de la muestra mezclada a la columna FADF. Centrifugar a 13 000 rpm por 30 segundos y desechar el fluido del tubo colector. Si la muestra mezclada es mayor a los 800 µl repetir el paso para el resto de la muestra.
7. Añadir 750 µl del buffer de lavado a la columna FADF. Centrifugar por 30 segundos. Desechar el fluido del tubo colector. Asegurar que el etanol (96 -100%) haya sido añadido a la solución de lavado.
8. Centrifugar de nuevo a máxima potencia por 3 minutos para secar la columna. Paso Importante! El líquido residual debe ser eliminado completamente en este paso.
9. Colocar la columna FADF a un nuevo tubo para microcentrífuga.
10. Agregar 15 µl del buffer de elución o ddH<sub>2</sub>O en el centro de la membrana de la columna FADF. Esperar un minuto.

Paso importante: Para una elución eficaz, asegurarse de que la solución de elución sea colocada en el centro de la membrana y absorbida por completo.

11. Centrifugar por un minuto.