



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Genotipificación del virus de leucemia bovina en ganado de carne en la
República Mexicana

Tesis

Que para optar por el grado de:

Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal

Presenta:

Carmen Adriana Gaitán Peredo

Tutor Principal

José Ivan Sánchez Betancourt
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comité Tutor

Rosa Elena Sarmiento Silva
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Hugo Ramírez Álvarez
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Junio 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al CONACYT, proyecto No. 254244 "Aislamiento, genotipificación y caracterización de las cepas virales que producen el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) circulantes en México"

A la Unidad de Investigación de la FMVZ de la UNAM por la facilidad y préstamo de equipos para la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Virología, Genética, y Biología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Al comité tutor por su paciencia y guía durante este proyecto.

Y, por último, pero no menos importante a mi familia sin su apoyo no hubiera sido posible.

RESUMEN

El virus de leucemia bovina es un virus de distribución mundial, clasificado en diez diferentes genotipos, en México estudios realizados en ganado lechero han identificado la presencia y circulación del genotipo 1 y 3. Sin embargo en ganado de carne se desconocen los genotipos que circulan, aún sabiendo que la enfermedad está presente. En el presente trabajo se obtuvieron muestras de hisopo nasal (453) y sangre completa (141) de bovinos de carne destinados a la engorda de diferentes Estados de la República Mexicana, en total se obtuvieron 594 muestras; por medio de la técnica de PCR punto final dirigida hacia la glicoproteína de superficie gp51 del gen de envoltura y PCR en tiempo real, se lograron obtener 31 muestras positivas al virus de leucemia bovina, de las cuales solo tres muestras originarias del Estado de Colima se pudieron secuenciar. Al obtener las secuencias se realizó un análisis filogenético utilizando secuencias de los diez genotipos de todo el mundo reportadas anteriormente; una de las secuencias obtenidas se agrupó en el genotipo 1, siendo el que tiene mayor distribución a nivel mundial y dos se agruparon al genotipo 5 nunca antes reportado en nuestro país. Se realizó un análisis de identidad presentando una similitud con secuencias que se agruparon en el mismo clado de 98.087% y entre clado y clado, es decir entre genotipo 1 y 5 de 94.084%. Este es el primer reporte de genotipos 1 y 5 de leucemia bovina en ganado destinado a la producción de carne en la República Mexicana.

ABSTRACT

The bovine leukemia virus (BLV) is a virus with global distribution, classified in ten different genotypes; studies in México performed in dairy cattle have identified the presences and circulation of genotype one and three. However, in beef cattle the genotypes that circulate are unknown, even though the disease is present. Samples of nasal swabs (453) and whole blood (141) were obtained from beef cattle from different states of the Mexican Republic, a total of 594 samples; using the polymerase chain reaction technique (PCR) of the surface glycoprotein gp51 of the envelope gene, 31 positive samples were identified. From these only three samples from Colima could be sequenced. A phylogenetic analysis was carried out using sequences of ten genotypes from all over the world previously reported. One of the sequences obtained grouped in genotype 1, being the one with the largest distribution worldwide and two grouped in genotype 5 never before reported in our country. An identity analysis was performed and they have a homology between those grouped in the same clade of 98.087% and between clade 1 and 5 of 94.084%. The results obtained in this work are the first report of genotype 1 and 5 of bovine leukemia virus in beef cattle in the Mexican Republic.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	VI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD	1
IMPORTANCIA E IMPACTO ECONÓMICO	1
AGENTE ETIOLÓGICO	2
<i>Clasificación</i>	2
<i>Características estructurales y organización genómica</i>	3
<i>Replicación</i>	6
SIGNOS CLÍNICOS	8
TRANSMISIÓN	9
DIAGNÓSTICO	10
<i>Diagnóstico serológico</i>	10
<i>Identificación del agente etiológico</i>	11
EPIDEMIOLOGÍA	11
REPORTES DE LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA A NIVEL MUNDIAL	12
<i>Distribución por genotipos</i>	12
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE MUESTRAS	15
DETECCIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS	17
<i>PCR tiempo real</i>	17
ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR	18
ELECTROFORESIS	19
SECUENCIACIÓN	20
ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS, FILOGENIAS Y GENOTIPIFICACIÓN	20
RESULTADOS	21
ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA DE INTERÉS	21

Estandarización del PCR con los oligonucleótidos diseñados en DMZC y en Laboratorio de Virología de la FES-C.....	27
Muestras positivas.....	31
<i>Primer muestreo</i>	31
<i>Segundo muestreo</i>	33
Secuenciación.....	35
Identidad.....	36
Filogenias.....	37
Evaluación de secuencias obtenidas.....	42
DISCUSIÓN	47
REFERENCIAS	53

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN DE LA FAMILIA RETROVIRIDAE.....	3
FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LEUCEMIA BOVINA (BLV).....	4
FIGURA 3. GENOMA DE BLV.....	6
FIGURA 4. CICLO DE REPLICACIÓN.....	7
FIGURA 5. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LEUCOSIS BOVINA.....	9
FIGURA 6. SECUENCIA DE AA DE LA PROTEÍNA ENV DEL BLV.....	22
FIGURA 7. GRÁFICA Y CUADRO DE RESULTADOS DE LA PROTEÍNA GP30.....	23
FIGURA 8. GRÁFICA CON RESULTADO DEL ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA GP51.....	24
FIGURA 9. GRÁFICA POSIBLES SITIOS DE N-GLICOSILACIÓN PARA GP51.....	26
FIGURA 10. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2%.....	28
FIGURA 11. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2%,.....	31
FIGURA 12. ELECTROFORESIS DE GEL DE AGAROSA 2%.....	34
FIGURA 13. EJEMPLO DE UN CROMATOGRAMA OBTENIDO POR MEDIO DE LA SECUENCIACIÓN POR SANGER.....	35
FIGURA 14. BLAST EN NUCLEÓTIDOS UTILIZANDO LA SECUENCIA MÉXICO/COLIMA/FMVZUNAM/01/2018.....	36
FIGURA 15. BLASTP DE LA SECUENCIA OBTENIDA MÉXICO/COLIMA/FMVZUNAM/01/2018.....	37

FIGURA 16. ÁRBOL FILOGENÉTICO NEIGHBOR JOINING	41
FIGURA 17. PREDICCIÓN DE SITIOS DE N-GLICOSILACIÓN EN LA SECUENCIA MÉXICO/COLIMA/FMVZUNAM/01/2018.....	42
FIGURA 18. PREDICCIÓN DE POSIBLES SITIOS ANTIGÉNICOS DE LA SECUENCIA MÉXICO/COLIMA/FMVZUNAM/01/2018,.....	43
FIGURA 19. PREDICCIÓN DE SITIOS DE N-GLICOSILACIÓN EN LA SECUENCIA MÉXICO/COLIMA/FMVZUNAM/02/2018,.....	43
FIGURA 20. PREDICCIÓN DE POSIBLES SITIOS ANTIGÉNICOS DE LA SECUENCIA MÉXICO/COLIMA/FMVZUNAM/02/2018.....	44
FIGURA 21. PREDICCIÓN DE SITIOS DE N-GLICOSILACIÓN EN LA SECUENCIA MÉXICO/COLIMA/FMVZUNAM/03/2018.....	45
FIGURA 22. PREDICCIÓN DE POSIBLES SITIOS ANTIGÉNICOS DE LA SECUENCIA MÉXICO/COLIMA/FMVZUNAM/03/2018,.....	46
CUADRO 1. ESTADOS Y NÚMERO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE BLV DE HISPOSO NASALES, PERIODO DE MUESTREO AGOSTO 2015 A AGOSTO 2016.....	16
CUADRO 2. OLIGONUCLEÓTIDOS LABORATORIO DE VIROLOGÍA MOLECULAR FES CUAUTITLAN.....	19
CUADRO 3. RELACIÓN NÚMERO DE MUESTRAS Y SU ORIGEN	20
CUADRO 4. LOCALIZACIÓN DE SITIOS ANTIGÉNICOS PARA GP51.....	25
CUADRO 5. LOCALIZACIÓN DE SITIOS ANTIGÉNICOS DE GP30.....	25
CUADRO 6. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA GP51 BLV.....	27
CUADRO 7. CUANTIFICACIÓN DE LAS EXTRACCIONES DE HISPOSOS POSITIVOS A BLV.	29
CUADRO 8. NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS PRIMER MUESTREO.	32
CUADRO 9. NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS SEGUNDO MUESTREO.	33

INTRODUCCIÓN

Antecedentes de la enfermedad

Se tienen reportes de signología clínica asociada a la Leucosis Enzoótica Bovina desde inicio del siglo XIX. En el año de 1874 en Alemania, Bollinger describe por primera vez la enfermedad, sin embargo, es hasta 1969 que se logra aislar y se designa como virus de la Leucosis Bovina (Barez *et al.* 2015; Lee *et al.* 2016; Rodríguez *et al.* 2011; Zhao and Buehring 2007).

El primer reporte que se tiene de la presencia de esta enfermedad en el continente americano es en Brasil en 1943 (Pluta *et al.* 2017).

En México entre los años 1980 y 1989 en la cuenca lechera de Tizayuca se encontró una seropositividad de aproximadamente el 1.22% en 523 animales estudiados (Garrido Sierra, 1991).

Importancia e impacto económico

La importancia económica por infecciones causadas por este virus se debe a varios factores como: pérdida de mercados de exportación ya que en algunos países es necesario comprobar que los animales estén libres de esta enfermedad, el costo del diagnóstico, tratamiento paliativo, el sacrificio de animales y la penalización en el precio de canal por la presencia de tumores (Ludmilla *et al.*, 2013).

La Leucosis Enzoótica Bovina en México según el acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos publicado en el diario oficial de la federación el día 29 de noviembre de 2018, se encuentra ubicada en el grupo tres, que incluye enfermedades presentes en el territorio nacional y representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico y de salud pública, pese a esto la enfermedad de

Leucosis Enzoótica Bovina es de notificación obligatoria mensual en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (Diario Oficial de la Federación)

En contraste, para la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) pertenece al grupo B, el cual está constituido por enfermedades transmisibles importantes desde el punto de vista socioeconómico y sanitario con repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal (OIE, 2018).

El impacto económico en América del Norte se estima en aproximadamente 7 millones de dólares al año en ganado lechero (Chamizo Pestana, 2015), para el ganado de carne no se encuentran estudios hasta el momento.

Agente etiológico

Clasificación

La LEB es provocada por un oncovirus de ARN de cadena sencilla del género *Deltaretrovirus*, familia *Retroviridae* y orden *ortervirales* (Heinecke *et al.* 2017; Khudhair *et al.* 2016; Lee *et al.* 2015; Polat *et al.* 2016). Dentro de esta familia también se encuentran los géneros *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Spumavirus* y los *Lentivirus*. El virus de Leucemia Bovina (vLB) comparte su organización genómica con los virus HTLV-1, HTLV-2 de humanos, STLV-1, STLV-2 y STLV-3 que afectan principalmente a los simios (figura 1). Una característica de esta familia viral es que poseen la capacidad de la regulación de la expresión de sus genes por medio de la síntesis de proteínas a partir de su propio genoma (ICTV, 2017).

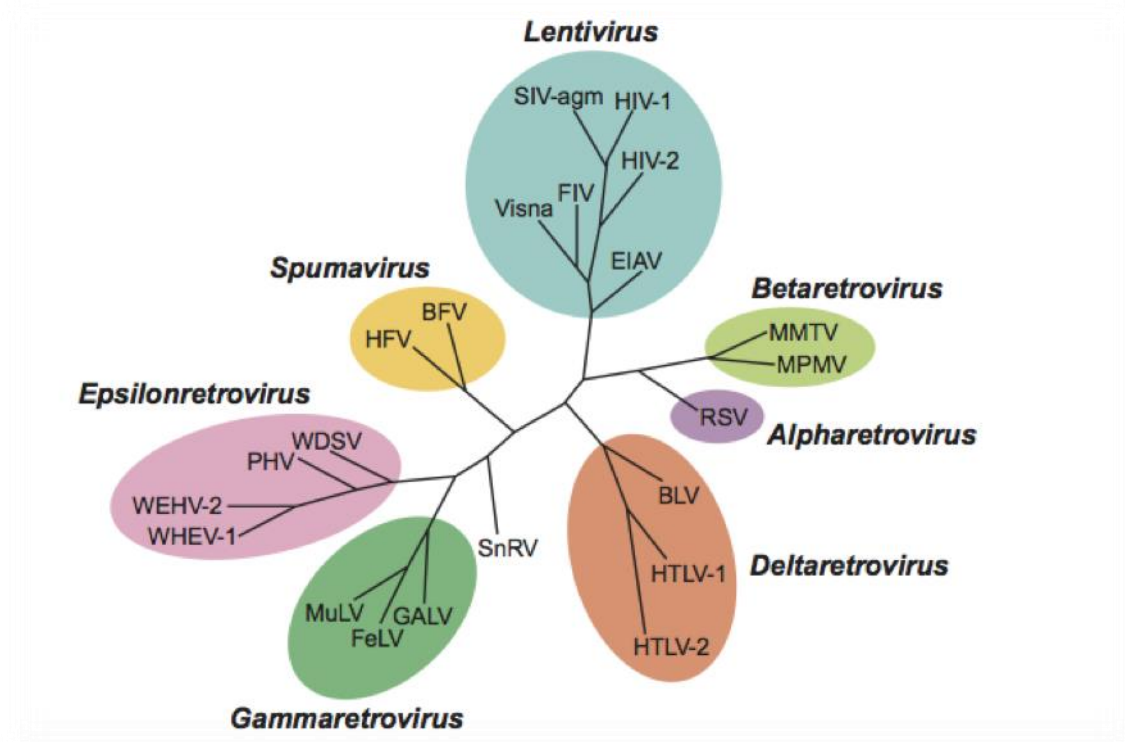


Figura 1. Géneros de la familia *Retroviridae* (ICTV 2017).

Características estructurales y organización genómica

El virus de leucemia bovina (vLB) mide entre 80-120 nm de diámetro, es un virión envuelto y de forma esférica. La partícula viral se puede encontrar de dos formas: la fase infecciosa o virión maduro y en forma proviral el cual esta integrado al genoma de la célula infectada.

El genoma completo del virus de la LEB consta de 8714 nucleótidos (figura 2) (De Brogniez *et al.* 2017.; Lee *et al.* 2015; Willems *et al.* 1996).

Las partículas virales de la LEB poseen cuatro genes principales los cuales están flanqueados tanto en su extremo 5' como 3' por secuencias terminales repetidas o LTR's (Long Terminal Repeat) por sus siglas en inglés, quedando distribuido de la siguiente manera: **5'LTR-gag-pro-pol-env-LTR3'**, entre la región del gen *env* y la LTR 3' existe una región llamada pX dentro de la cual se encuentran cuatro genes accesorios: *R3*, *G4*, *Rex* y *Tax* (figura 2)(Barez *et al.*, 2015; Polat *et al.*, 2016).

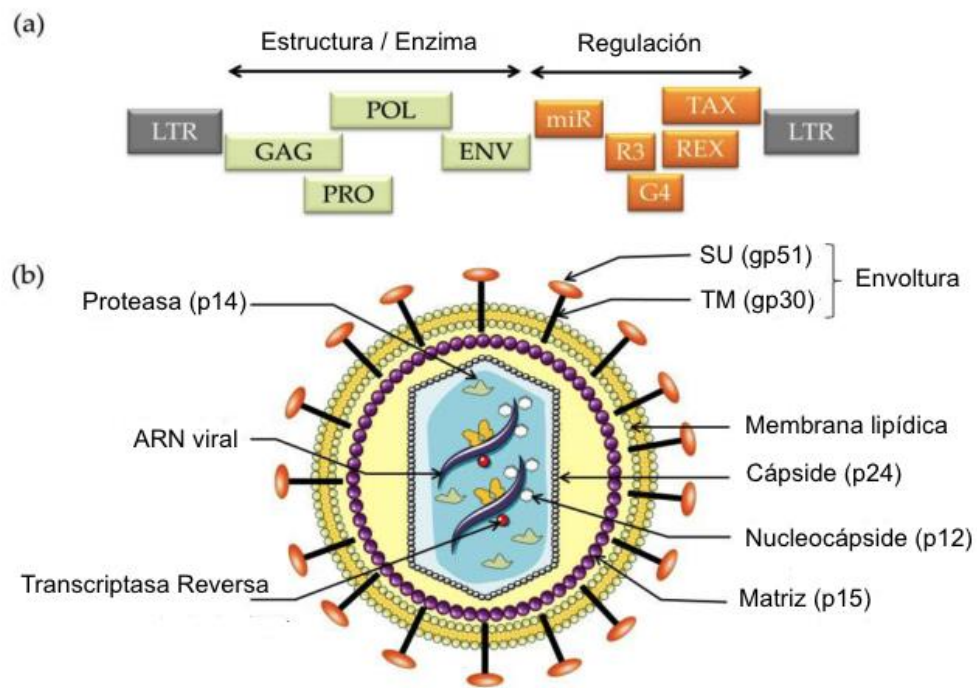


Figura 2. a. Estructura del virus de Leucemia Bovina. b. Partícula viral. Modificado de Barez et al. 2015.

El promotor de la transcripción se encuentra en la LTR proviral la cual está compuesta de las siguientes regiones U₃, R y U₅. En la región U₃ ubicada en el extremo 3' se encuentran elementos importantes para la actividad del promotor conocidos como sitios de unión a factores de transcripción (Lospitao, Holguín, and Soriano 2003; Zhao *et al.*, 2007).

El gen *gag* llamado así por su significado en inglés **Group Associated Antigen** está formado por 1178 nucleótidos y es altamente conservado. Codifica para una poliproteína, la cual va a dar lugar a tres proteínas no glicosiladas: p24 (cápside), p15 (proteína de matriz) y p12 (nucleocápside) (figura 2b).

El gen *pro* es el encargado de codificar a la proteasa viral o p14, la cual es la encargada de la maduración y realizar los cortes a la poliproteína del gen *gag* (figura 2b) (Polat *et al.*, 2016; Polat, Takeshima, and Aida, 2017).

El gen *pol* por su abreviatura polimerasa codifica a la transcriptasa reversa (RT) necesaria para la transcripción reversa e integrasa (IN) la cual tiene un papel fundamental en la integración del genoma viral.

El gen de envolutra (*env*) consta de una secuencia de 1493 nucleótidos y codifica para una poliproteína precursora llamada gp72, la cual es incidida en tres en el aparato de Golgi: el péptido señal que va de los aminoácidos 1-33, proteína de superficie o gp51 que va de los aminoácidos 34-301 y la proteína de transmembrana o gp30 que va de los aminoácidos 302-515 (figura 3) (Zhao and Buehring, 2007).

La proteína gp51 es el objetivo de los anticuerpos neutralizantes, en la región N terminal de esta proteína se encuentran tres epítomos conformacionales denominados como F, G y H; en la región C terminal presenta tres epítomos lineales A, B, D, E razón por la cual esta proteína es la más utilizada para realizar análisis de genotipificación. Además, se cree que la gp51 es la proteína que contiene el sitio de unión al receptor (Johnston and Radke, 2000).

Actualmente se ha logrado clasificar al virus de Leucemia Bovina en diez genotipos utilizando el gen que codifica la proteína de envoltura (Khudhair *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2015; Polat *et al.*, 2016).

La región px la cual se localiza entre el gen *env* y la región LTR 3' contiene cuatro marcos de lectura abiertos (ORF), los más grandes codifican para la proteína TAX (Trans-activator-Protein) y REX, ambas proteínas reguladoras que actúan en la regulación de la transcripción viral, en la inducción de la leucogénesis y en el transporte del ARN viral hacia el núcleo. Además, en la región px se encuentran dos ORFs pequeños que son llamados R3 y G4 los cuales expresan proteínas accesorias que van a contribuir al mantenimiento de una carga viral elevada (Johnston, Albritton, and Radke, 2002; Polat *et al.*, 2017; Zhao and Buehring, 2007).

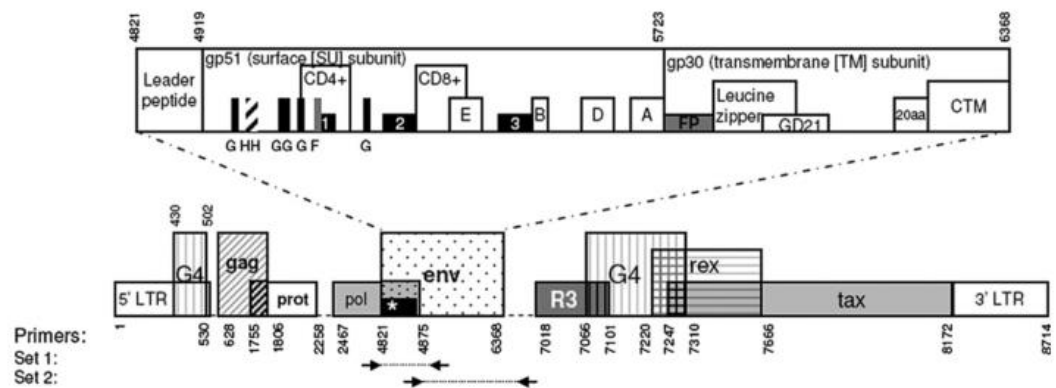


Figura 3. Genoma del vLB y características de la región genética *env* (Zhao and Buehring, 2007).

Replicación

Las células blanco del vLB principalmente son los linfocitos, pero estudios han demostrado que también es capaz de infectar a monocitos y macrófagos. La entrada a la célula blanco es propiciada por medio de la interacción de las proteínas codificadas por el gen *env*, gp51 y gp30, estas proteínas están unidas por un enlace disulfuro CX₆CC en gp30 (transmembrana) y CXXC en gp51 (De Brogniez *et al.*, 2017).

La interacción receptor-ligando se da mediante la gp51, mientras que la gp30 contiene una región denominada sitio de activación. Una vez que se lleva a cabo la unión, el puente disulfuro entre gp30 y gp51 se rompe, permitiendo así la exposición del péptido de fusión, que se encuentra en gp30, esto desestabiliza la membrana lipídica del virión y permite la liberación del material genético en el citoplasma de la célula huésped (Johnston and Radke, 2000; Zhao and Buehring, 2007).

Liberada la nucleocápside, el ARN se transcribe en ADN por la transcriptasa reversa, resultando la fase proviral, la cual de forma aleatoria se va a incorporar al ADN genómico por medio de la integrasa viral quien mediante un corte al ADN y una ligación del ADN tanto viral como del huésped logra hacer la integración. En esta fase, llamada de latencia, los provirus se pueden replicar y mantenerse dentro del hospedero por medio de mitosis (Lairmore, 2014; Marawan, 2017).

El otro camino que pueden seguir es una vez integrado en forma proviral requiere de la maquinaria celular para iniciar la transcripción a ARN virales. Estos factores de transcripción se unen al promotor del vLB y junto con TAX activan la transcripción. Después REX va a facilitar el transporte de los ARN's mensajeros del núcleo al citoplasma, para la traducción de las proteínas virales de ensamble (Brooks, Cockerell and Nyborg, 1998 Tajima and Aida, 2002).

Las proteínas maduras de *env* son transportadas a la superficie de la membrana celular, en donde son insertadas. Las partículas virales se unen en estos sitios de inserción en donde adquieren la envoltura junto con las proteínas del gen *env* (figura 4) (Zhao and Buehring, 2007).

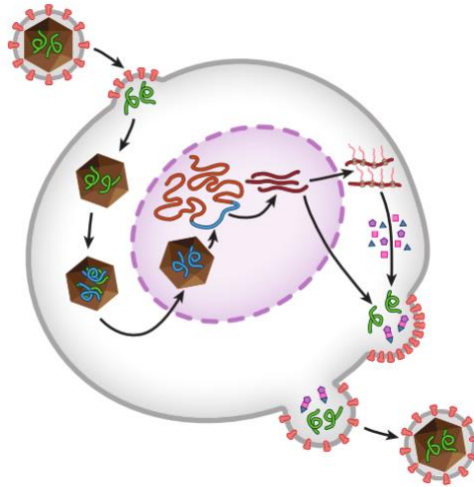


Figura 4. Ciclo de replicación del virus de leucemia bovina (Lairmore, 2014).

Signos clínicos

Se han descrito tres formas de Leucosis Bovina, de etiología desconocida (forma juvenil, tímica y cutánea), que afectan principalmente a animales jóvenes (Garrido Sierra, 1991).

La Leucosis Enzoótica Bovina que afecta a animales de entre 4 y 8 años de edad es la presentación de la forma adulta o multicéntrica producida por el vLB. El signo clínico principal es la presencia de masas tumorales en los linfonodos femorales, supramamarios, prescapulares o maxilares principalmente, otro signo característico de la enfermedad es la linfocitosis persistente, se considera esta fase cuando por lo menos dos muestras de sangre con un intervalo de tres meses presentan un aumento en el nivel de leucocitos, este signo no se presenta en todos los animales. Además, de las masas tumorales los animales presentan pérdida de peso progresiva, los demás signos van de acuerdo al sitio de ubicación de los linfosarcomas (Chamizo, 2005).

Transmisión

La transmisión de esta enfermedad puede ser tanto de forma vertical como horizontal (figura 5).

La transmisión horizontal se puede dar por contacto directo o indirecto por ejemplo por medio de agujas, examen tocológico y material quirúrgico, siendo esta la principal causa de transmisión. Manet *et al.*, (1989) demostraron que el virus también puede transmitirse por los tábanos (*Tabanus spp.*) (Manet *et al.* 1989).

El virus es capaz de atravesar la barrera trasplacentaria y se puede transmitir por calostro o leche. Los animales infectados pueden presentar la enfermedad de tres maneras:

- Portadores asintomáticos
- Con linfocitosis persistente
- Linfoma

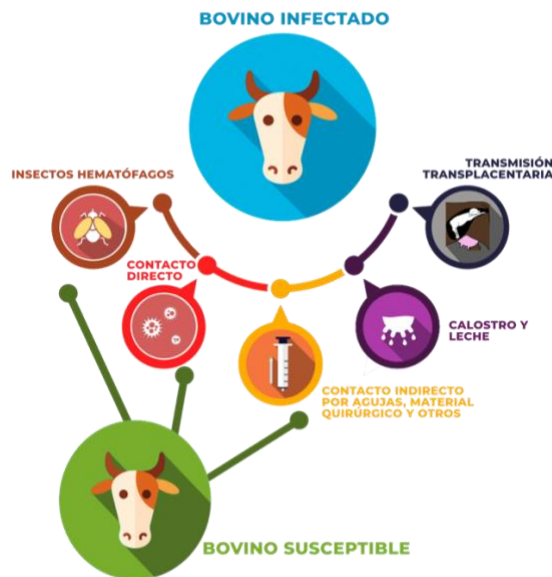


Figura 5. Mecanismos de transmisión de Leucosis Enzoótica Bovina.

Diagnóstico

Un gran número de técnicas se han desarrollado para el diagnóstico del vLB. En general se pueden dividir en diagnóstico serológico o en la identificación del agente.

Diagnóstico serológico

La mayoría de los diagnósticos a nivel mundial se basan en la detección de anticuerpos y de forma indirecta van a identificar la presencia del virus. Estas pruebas van dirigidas hacia p24 o proteína de cápside y hacia la gp51 o proteína de superficie. Esto es porque los anticuerpos hacia éstas proteínas se producen poco tiempo después de la infección y pueden ser detectados de 2-3 semanas post-infección, y quedan detectables de por vida (Polat *et al.*, 2017).

Se usan técnicas convencionales de diagnóstico serológico como: la inmunodifusión en gel de agar o AGID por sus siglas en inglés, sin embargo, en terneros los anticuerpos maternos pueden tardar en desaparecer de 6 a 7 meses y esta prueba no distingue los anticuerpos maternos y los originados a partir de una infección activa (OIE,2018).

Otras pruebas serológicas que se utilizan para el diagnóstico de LEB es la prueba de ELISA, la cual es más sensible que la AGID, pero los animales en una etapa temprana de infección no son detectados y las muestras generan falsos negativos (Barez et al. 2015).

En general las técnicas de diagnóstico serológico no pueden ser utilizadas en animales de menos de seis meses de edad por la presencia de anticuerpos maternos, lo cual podría generar falsos positivos (Polat *et al.*, 2017).

Identificación del agente etiológico

El empleo de las técnicas diagnósticas utilizadas en serología en conjunto con técnicas para identificar el genoma del agente como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) pueden favorecer la detección de la infección.

Se pueden utilizar varios métodos de PCR, como PCR punto final, PCR tiempo real o PCR anidado. Una de las ventajas de estos métodos es que permiten la identificación del agente incluso semanas antes de que los anticuerpos sean detectables. La prueba de PCR nos permite no solo identificar al agente sino también la diseminación, el progreso que ha tenido la infección, incluso permite la identificación de la carga proviral en secreciones nasales y saliva (Polat et al., 2017).

Además de la técnica de PCR que es la más utilizada, se puede realizar western blot para la detección de las proteínas virales, cultivo celular para aislamiento viral identificando la formación de sincitios o inmunofluorescencia para la detección del antígeno viral (Khudhair et al. 2016).

Epidemiología

Los huéspedes naturales de la infección por el vLB son principalmente tres especies: *Bos Taurus*, *Bos Indicus* y *Bubalus bubalis*, además de estas especies se ha comprobado que las ovejas, cabras, cerdos, ratas y conejos pueden ser infectados experimentalmente por el virus y desarrollar la enfermedad de una forma más rápida y aguda (Barez et al. 2015).

Un estudio realizado en el 2001 en EUA en el Estado de Michigan demostró que la seroprevalencia en ganado lechero para LEB fue del 48%, mientras que para el ganado de carne del 10% .

El virus de LEB tiene una distribución mundial y la Unión Europea ha hecho esfuerzos para la erradicación de este virus en el ganado, lo cual ha tenido éxito

en la mayoría de los países de Europa del Este; Dinamarca, Finlandia, Holanda y Polonia son libres de esta infección. Un ejemplo del éxito de estos programas es Australia, el cual fue empleado por primera vez en 1983 y para el año 2013, 99.7% del ganado fue declarado libre de esta infección (Nuotio *et al.* 2003; Rola-Łuszczak *et al.* 2013).

En EUA un estudio de prevalencia demostró que existe una seroprevalencia en ganado lechero de 83.9% y en ganado de carne del 39%. En Canadá el mismo estudio arrojó una prevalencia de 37.2%. En México está presente el virus tanto en ganado de carne como en ganado de leche; un estudio realizado entre los años 1980 y 1989 se calculó una seroprevalencia en ganado lechero de 1.22% (Garrido Sierra, 1991).

Reportes de leucosis enzoótica bovina a nivel mundial

Distribución por genotipos

Los estudios de genotipificación e identificación del vLB lo clasifican en diez diferentes genotipos. Estos estudios se han basado en el gen *env*, en particular en la proteína de superficie gp51, por entre otras razones ser el objetivo de los anticuerpos neutralizantes. En el año 2007, se hizo la asignación de los primeros siete genotipos, posteriormente el genotipo ocho fue identificado y aislado en Croacia. Fue hasta el año 2016 cuando los genotipos nueve y diez fueron identificados en Bolivia, Tailandia y Myanmar (OIE, 2018).

Se ha identificado que los genotipos 1, 4 y 6 tienen una distribución a nivel mundial; dentro de éstos el genotipo 1 es el genotipo con mayor distribución, se encuentra en casi todos los continentes (Europa, América, Asia y Australia). El genotipo 4 es el segundo con mayor distribución y ha sido detectado principalmente en Europa y América (Polat *et al.* 2017).

Se cree que el genotipo 6 tuvo su origen en América del Sur y logró ser diseminado hacia Asia por el comercio. El genotipo 2 se encuentra en América del Sur y en Japón, mientras que el genotipo 8 es específico de Europa. El genotipo 7

está distribuido en áreas geográficas dispersas, mientras que los genotipos 10 y 5 se encuentran en regiones específicas o en aquellas con las que se tiene comercio. En Europa se han encontrado que circulan cinco genotipos, 1, 3, 4, 7 y 8; en la población bovina europea también circulaba el genotipo 4, pero gracias a los programas de erradicación ya no se encuentra presente.

En Norte América han sido detectados los genotipos 1, 3 y 4, en Costa Rica se detectó la presencia del genotipo 1 y 5, en Argentina se detectaron los genotipos 1, 2, 4 y 6, en Brasil los genotipos 1, 2, 5, 6 y 7 y Bolivia 1, 2, 6 y 9 (Polat *et al.*, 2017).

En el continente asiático se han encontrado los genotipos 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 10.

En México Heinecke *et al.* en 2017 identificaron por medio de un análisis del gen *env* que codifica para la proteína de transmembrana gp30, la circulación del genotipo 1 en ganado lechero (Heinecke *et al.*, 2017).

JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento en México no existen reportes de los genotipos del Virus de Leucosis Enzoótica Bovina que circulan en el ganado de carne, sin embargo, se sabe que esta enfermedad provoca pérdidas económicas importantes en la industria ganadera. Por lo cual, para mejorar las técnicas de prevención, diagnóstico, control y erradicación de este agente, se debe conocer cuáles son los genotipos circulantes en el país.

HIPÓTESIS

Se encontrarán variaciones genéticas en el virus de la leucemia bovina entre las secuencias obtenidas de muestras positivas a nivel nacional, identificando más de un genotipo.

OBJETIVOS

1. Analizar y diseñar oligonucleótidos para amplificar por PCR la región de la gp51 en el gen de envoltura del vLB.
2. Detectar bovinos destinados a la producción de carne positivos al virus de Leucemia Bovina y su origen.
3. Identificar por análisis filogenéticos los genotipos del vLB existentes en bovinos de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Determinación del número de muestras

Se realizó un primer muestreo en un centro de engorda en el Estado de Michoacán (cuadro 1), la frecuencia calculada estimada de la enfermedad fue de 1.23, con lo cual se aplicó la siguiente fórmula para obtener el tamaño de muestra:

$$n = [1 - (1 - a)^{1/D}] \times [N - (D - 1) / 2]$$

Donde,

n = Tamaño de la muestra

a = Nivel de confianza

D = Número de animales enfermos en la población

N = Tamaño de la población

$$n = (1 - (1 - 0.95)^{1/4691}) \times (378611 - (4691 - 1) / 2) =$$

$$n = (1 - 0.999) \times (376266) =$$

$$n = (0.001) \times (376266) = 376.26 \approx 377 + 75 \text{ (20\% de pérdidas)} = \mathbf{452 \text{ animales a muestrear.}}$$

Las 452 muestras se obtuvieron de 20 estados de la República Mexicana (cuadro 1).

En total se obtuvieron muestras de ocho Estados del país y del propio centro de engorda.

Cuadro 1. Estados del país y número de hisopos nasales obtenidos de bovinos destinados a la producción de carne para la detección del vLB, periodo de muestreo agosto 2015 a agosto 2016.

Estado	Número de muestras
Aguascalientes	4
Campeche	34
Chiapas	98
Colima	4
Estado de México	4
Guanajuato	4
Guerrero	33
Hidalgo	4
Jalisco	62
Michoacán/ Centro de engorda	31
Morelos	4
Nayarit	4
Oaxaca	37
Puebla	4
Quintana Roo	4
San Luis Potosí	4
Tabasco	61
TOTAL	453

Detección de muestras positivas

PCR tiempo real

La detección de muestras positivas se realizó a partir de hisopados nasales (primer muestreo) utilizando una PCR tiempo real con un kit comercial (FIND-IT, BioTecMol, México) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El ensayo emplea como blanco de amplificación un segmento de la polimerasa, la cual es una región conservada del virus.

La técnica empleada, PCR tiempo real, es una herramienta sensible y específica; ésta se basa en la amplificación de un segmento del genoma viral por PCR y su detección específica mediante el uso de una sonda tipo TaqMan, la cual al hibridar con el ADN diana es degradada por la Taq polimerasa lo que favorece la emisión de fluorescencia. Esta fluorescencia es detectada por el equipo (termociclador) la cual es directamente proporcional a la del fluoróforo liberado y la cantidad de ADN presente en la reacción.

Para las muestras sanguíneas (segundo muestreo) se utilizó la técnica de PCR punto final para la detección de positivos a partir de oligonucleótidos diseñados en este trabajo junto con el apoyo del Laboratorio de Virología Molecular de FES-Cuautitlán.

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos se identificó y analizó la región genética de interés. Estudios previos han clasificado al vLB en 10 diferentes genotipos basado en el gen *env* (Polat et al., 2016), este gen codifica para dos proteínas, la gp51 o proteína de superficie (SU) y la gp30 o proteína de transmembrana (TM) (De Brogniez *et al.*, 2017).

Existen publicaciones en donde se utiliza el marco de lectura abierto para la proteína gp30 y en otros más la gp51. Es por ello que antes de dirigir el diseño de los oligonucleótidos hacia una sola región de este gen, se realizó un análisis para encontrar la zona idónea para poder genotipificar las muestras obtenidas. Con programas bioinformáticos se hizo el análisis *in silico* para localizar la región para el diseño de los oligonucleótidos, se considerará que sea una región que presente posibles sitios antigénicos, que no sea trasmembrana, que considere a los épitopos previamente reportados.

Las características de los oligonucleótidos consideradas para el diseño fueron:

- Que tuvieran una longitud de entre 15 a 30 nucleótidos, que entre ellos la diferencia no fuera mayor a ± 3 nucleótidos.
- Que la T_m tanto para el oligonucleótido sentido (fw) como para el antisentido (rv) no tuvieran una diferencia mayor a 5°C .
- Que el porcentaje de G-C fuera entre un 40-60%.
- Que las G y C estuvieran distribuidas de forma uniforme a lo largo del oligonucleótido.
- Que no formaran estructuras secundarias.
- Que no fueran complementarios entre sí.

Estandarización de la PCR

Para la estandarización de la PCR se utilizó inicialmente un plásmido y un juego de oligonucleótidos (proporcionados por el laboratorio de virología de la FES-Cuautitlán) que amplifican la región deseada (cuadro 2). Realizando las pruebas pertinentes se observó que era posible realizar combinaciones entre los oligonucleótidos diseñados y los proporcionados por el laboratorio de virología.

Cuadro 2. Oligonucleótidos proporcionados por el Laboratorio de Virología de la FES-Cuautitlán (Cerón, 2018).

Secuencia	Tm	Producto esperado
Fw – CCAAGGGCTCTGATAAACTC	58°C	749pb
Rv – ATGATGTGACAGAGGGAACC		

Se realizó un PCR de gradientes con un rango de temperaturas de 57 a 64° C, el protocolo fue el siguiente:

- Un ciclo de desnaturalización inicial a 95° C por 15 minutos.
- Treinta ciclos de:
 1. Desnaturalización a 94° C por 30 segundos.
 2. Alineación a 57-64° C gradientes por 1 minuto.
 3. Extensión a 72° C por 2 minutos.
 4. Extensión final a 72° C por 10 minutos.

Electroforesis

La electroforesis para la observación de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 2% teñidos con Red Gel y sometidos a 100 volts durante 50 minutos.

En julio del 2018 se realizó una segunda colección de 141 muestras de los mismos estados donde se habían detectado animales positivos al vLB (cuadro 3), las muestras obtenidas en esta ocasión fueron de sangre completa.

Cuadro 3. Relación del número de muestras de sangre completa y su origen para la detección del vLEB, periodo de muestreo julio 2018.

Estado	Número de muestras
Campeche	30
Guerrero	22
Chiapas	30
Colima	30
Centro de engorda (enfermerías)	29

Secuenciación

Los productos de PCR positivos fueron enviados a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM; donde se purificaron y secuenciaron utilizando secuenciación SANGER.

La secuenciación SANGER se basa en la habilidad de la ADN polimerasa de incorporar 2'3' dideoxynucleótidos que no tienen el grupo hidroxilo 3' el cual es esencial para la formación del enlace diéster, por lo que la cadena no puede continuar elongándose, es aquí donde entra el cebador o primer que va a proporcionar el grupo hidroxilo en el extremo 3' que necesita la ADN polimerasa para comenzar a elongar.

Análisis de las secuencias, filogenias y genotipificación

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con los programas bioinformáticos: MEGA7, MAFFT, GENEIOUS PRIME y SNAPGENE para establecer el genotipo al que pertenecen.

RESULTADOS

Análisis de la proteína de interés

a. Obtención de la secuencia del virus completo del vLB y del marco de lectura abierto (ORF) del gen *env*.

La secuencia que se utilizó como referencia se obtuvo del GenBank con el número de acceso K02120.1, a partir de esta se buscó el marco de lectura abierto para el gen *env*. Esta identificación se hizo por medio de dos herramientas, la primera facilitada por el mismo GenBank y por medio de una herramienta bioinformática en línea gratuita NebCutter, el genoma de la secuencia obtenida es de 8714 nucleótidos, con un porcentaje de GC de 54% y de AT de 46%.

b. Obtención de la secuencia de aminoácidos

El programa NebCutter permitió obtener la secuencia de aminoácidos codificados por el gen *env*, la cual consta de 515 aminoácidos (aa). De acuerdo a Brogniez *et al*, (2016) la proteína de superficie gp51 presenta en los aminoácidos 104-123 y del 218 al 237 sitios de unión a zinc y en la región que codifica para la proteína de transmembrana presenta en los aminoácidos del 1-33 el péptido de fusión y un péptido de inmunosupresión de la proteína transmembrana. Con la secuencia de aminoácidos se identificaron las regiones mencionadas por Brogniez *et al.*, (2016), identificando estas secuencias se comprueba que: en primer lugar, el gen seleccionado corresponde al gen *env* del vLB (Figura 6). Para identificar que las dos regiones que comprenden este gen, es decir la región de superficie y una región transmembranal, se utilizó el programa TMHMM en su versión en línea para la identificación de los sitios de transmembrana en

una proteína. En dicho programa se ingresaron por separado las secuencias de aminoácidos de la proteína gp51 (SU) y la gp30 (TM).

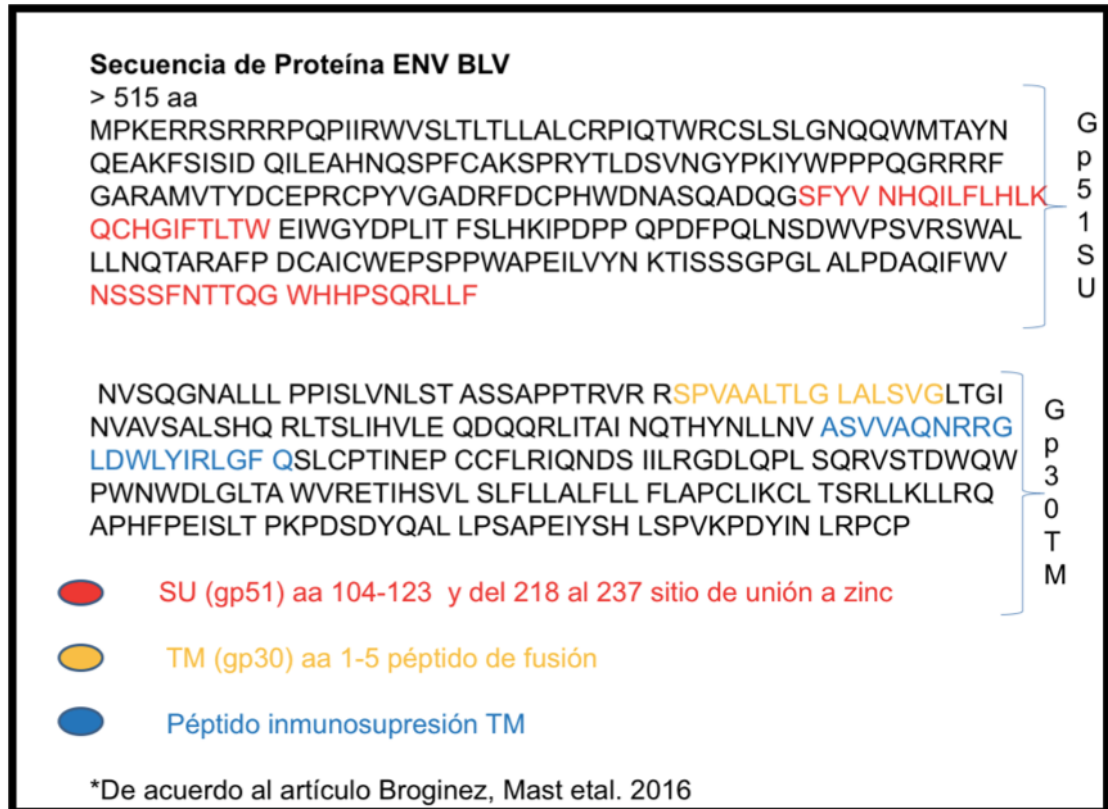


Figura 6. Secuencia de aa de las proteínas codificadas por el gen *env* del vLEB: gp51 (SU) y gp30 (TM).

Se realizó un análisis de identificación de sitios de transmembrana para la proteína gp30, la cual está clasificada dentro de la estructura del virus como una proteína de transmembrana, con este análisis se pudo comprobar que en efecto se trata de una proteína transmembranal, ya que el número de aminoácidos en la transmembrana es de 45.20, cuando este valor es mayor a 18 la probabilidad de que se trate de una proteína de transmembrana es muy elevado, la posibilidad que el lado N-terminal este del lado citoplasmático es muy baja de tan sólo 0.3149, en la gráfica se observa como existen dos regiones principales que se encuentran de forma transmembranal (Figura 7), estos resultados corroboran lo reportado en

diferentes artículos donde se considera a la gp30 como una proteína de transmembrana.



Figura 7. Gráfica y cuadro mostrando los resultados que corroboran que la proteína gp30 del vLB es una proteína de transmembrana.

En los resultados obtenidos para gp51 se muestra que tiene una longitud de 270 aa y señala que es posible que esta proteína tenga tan solo un sitio transmembrana al inicio, los cuales coinciden con el sitio de unión a zinc reportado (Figura 8).

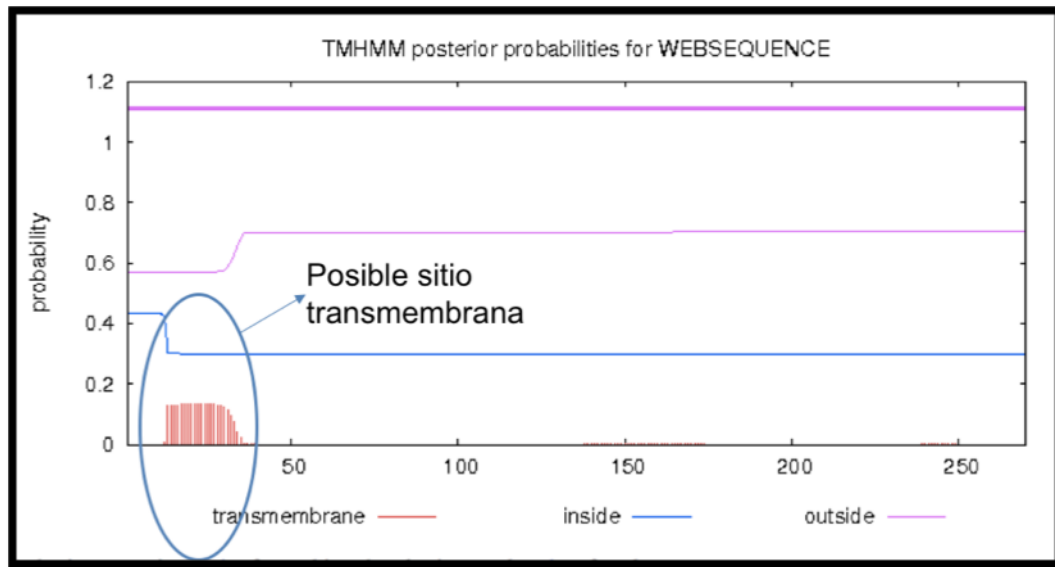


Figura 8. Gráfica con resultado del análisis de la proteína gp51 del vLB.

Con el uso de herramientas bioinformáticas se realizó un análisis para encontrar posibles sitios antigénicos de la proteína gp51, cabe señalar que dicho análisis utiliza predicciones para epítopos de origen humano y el porcentaje de confianza es de tan solo 75%.

El resultado que mostró el programa fue que en la secuencia del vLB para gp51 existen 11 sitios antigénicos (Cuadro 4).

Cuadro 2. Localización de sitios antigénicos lineales para la gp51 del vLB.

n	Start Position	Sequence	End Position
1	11	PQPIIRWVSLTLTLLALCRP	30
2	32	QTRWRCLSL	40
3	53	AKFSISIDQILEA	65
4	67	NQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWP	92
5	104	AMVTYDCEPRCPYVGADRFDC	124
6	135	QGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTL	158
7	164	GYDPLITFSLHKIPDPPQPDFPQ	186
8	188	NSDWVPSVRSWALLLN	203
9	208	AFPDCAICWE	217
10	219	SPPWAPEILVYN	230
11	236	SGPGLALPDAQIFWVNS	252

Mientras que en el mismo análisis para la gp30 mostró que esta proteína presentó 7 posibles sitios antigénicos los cuales se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 3. Probables sitios antigénicos lineales de gp30 del vLB.

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	QGNALLPPISLVNLSTASS	23
2	30	RRSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLE	70
3	84	HYNLLNVASVVA	95
4	101	LDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLR	125
5	128	NDSIILRGDLQPLSQR	143
6	162	VRETIHSVLSLFLALFLLFLAPCLIKCLTSRLLKLLRQAPHFPEISLTP	211
7	215	SDYQALLPSAPEIYSHLSPVKPDYINL	241

Además de los potenciales sitios antigénicos un punto clave para poder hacer la elección adecuada de la región genética relacionada con la proteína de interés

para realizar el diseño de oligonucleótidos y su posterior genotipificación, es la predicción de sitios de N-glicosilación en las dos proteínas de interés.

El análisis realizado para la gp51 indicó que la proteína sí es glicosilada y que presenta seis posibles sitios de N-glicosilación, sin embargo, sólo cuatro lograron atravesar el punto de corte (Figura 9).

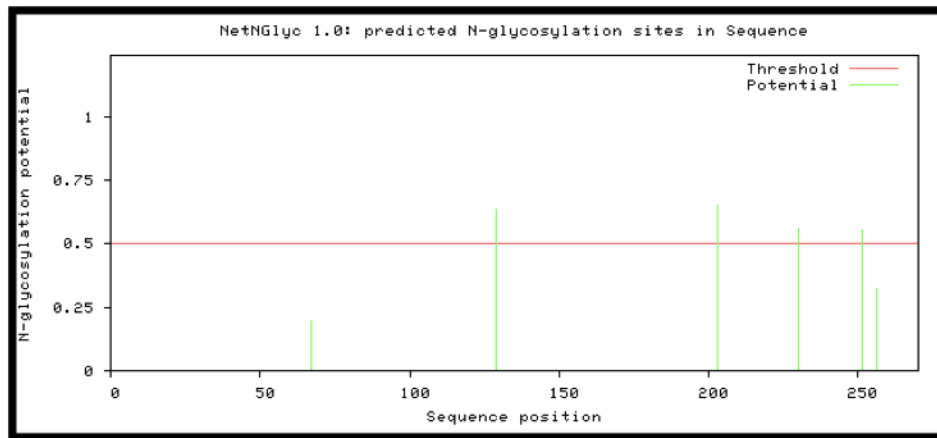


Figura 9. Gráfica de posibles sitios de N-glicosilación para gp51 del vLB.

Después del análisis realizado al gen *env* de vLB se decidió realizar el diseño de los oligonucleótidos para la proteína gp51.

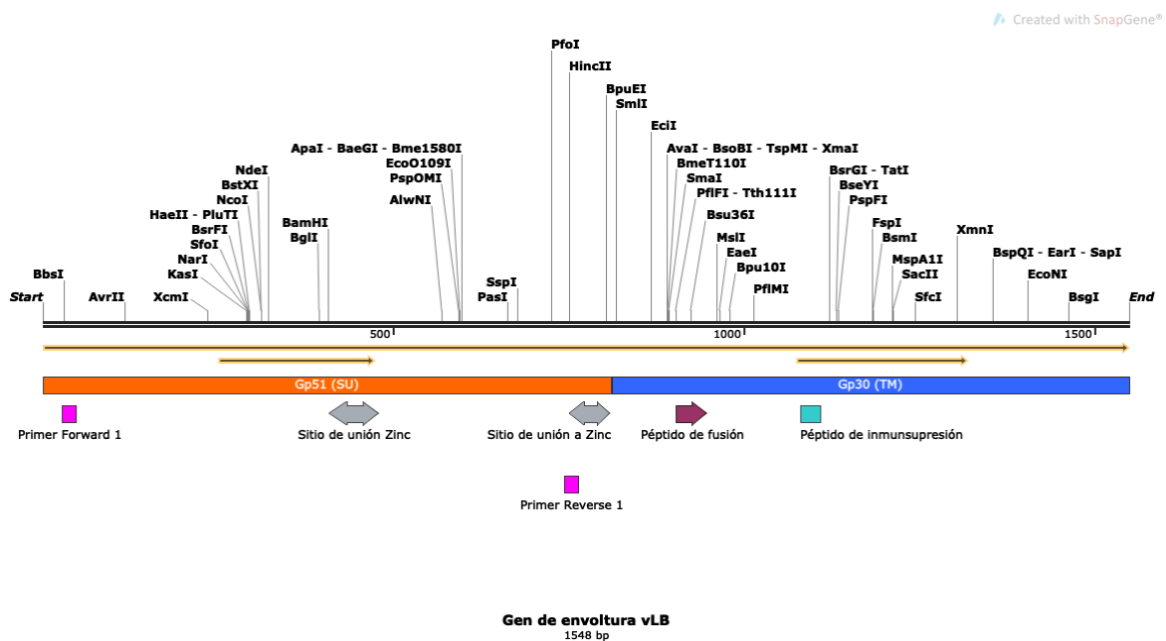
Este mismo análisis se realizó para las secuencias obtenidas y se comparó con los genotipos reportados.

Estandarización del PCR con los oligonucleótidos diseñados en DMZC y en el Laboratorio de Virología de la FES-C.

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR abarcan toda la proteína gp51. El tamaño del amplicón esperado es de 831 pares de bases (bp).

Cuadro 4. Diseño de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de la gp51 del vLB. Los valores de TM fueron calculados en el sitio IDT. Ubicación de los oligonucleótidos dentro del gen de *env*

	Forward 1	Reverse 1
Secuencia	5'- TGCCTAAAGAACGACGGTCC - 3'	5'- AGGCGTTGCCTTGAGAAA CA -3'
Longitud	20	20
% de CG	55%	50%
TM	57.2 °C	57.5 °C



Los oligonucleótidos diseñados tanto el *forward* como el *reverse* a pesar de formar estructuras tipo horquilla (hairpin), los enlaces se rompen a temperaturas menores que la temperatura de alineación del oligo (Cuadro 6). En este caso los oligonucleótidos no son complementarios entre sí, ni forman estructuras de heterodímeros, además se realizó una búsqueda de similitudes en BLASTn para verificar que en efecto reconocían y se alinean a las secuencias que codifican la gp51 del virus de leucemia bovina.

Para la estandarización se utilizó como muestra positiva, una obtenida a partir de un hisopo nasal del primer muestreo proveniente del Estado de Chiapas con un CT en PCR tiempo real de 16.7 copias por reacción. Se realizó con los oligonucleótidos diseñados para amplificar toda la región genética que codifica la gp51 del vLB obteniendo lo siguiente:

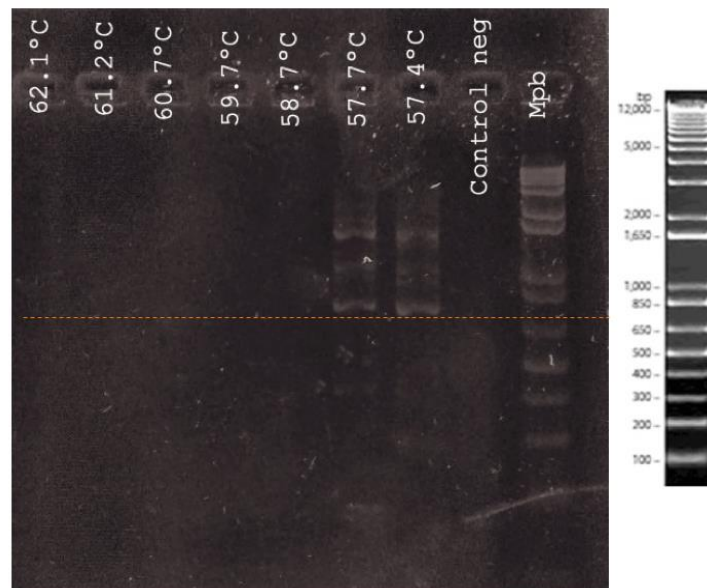


Figura 10. Electroforesis con gel de agarosa al 2%, teñido con Red Gel, se observan bandas en las temperaturas 57.4° C y 57.7° C con un tamaño de entre 650 y 850bp. El tamaño del amplicón esperado fue de 831bp.

Las muestras de ADN obtenidas de hisopos nasales fueron amplificadas por PCR a temperatura de hibridación de 57.4° C y 57.7° C y no se logró obtener la banda

específica esperada. Se realizó la cuantificación de ADN en el Departamento de Genética y Bioestadística de la FMVZ con el equipo EPOCH. Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Cuantificación de las extracciones de ADN de los hisopos positivos por PCR en tiempo real al vLB

Consecutivo	Número de muestra	Estado	*µg/ml
1	93	Campeche	14.157/23.82
2	101	Colima	63.459/73.458
3	113	Colima	11.979/30.096
4	345	Chiapas	10.032/14.322
5	349	Chiapas	20.427
6	391	Chiapas	8.943/10.296/98.01
7	401	Chiapas	228.558
8	413	Chiapas	7.326/58.872
9	437	Chiapas	20.097
10	473	Chiapas	35.937
11	477	Chiapas	15.093
12	489	Chiapas	15.51
13	777	Guerrero	23.793/45.078
14	821	Engorda	14.124
15	827	Engorda	14.982
16	833	Engorda	13.068
17	862	Engorda	11.781
18	864	Engorda	18.77
19	866	Engorda	19.503
20	872	Engorda	22.473
21	884	Tabasco	13.53
22	888	Tabasco	9.47/22.08
23	927	Engorda	9.174/14.817
24	945	Engorda	25.047
25	975	Engorda	19.008
26	1252	Guerrero	77.385
27	1309	Guerrero	49.104
28	1255	Engorda	12.211

Debido a la baja concentración de ADN no se pudo repetir y obtener la banda con la muestra que previamente había resultado positiva. Para asegurar que los oligonucleótidos diseñados en realidad se unían de forma específica, se utilizó un control positivo previamente reportado por Heinecke (2017) utilizado y clonado por Cerón (2018).

El primer *forward* (Fw) de los oligonucleótidos previamente diseñados sería capaz de hibridar y amplificar el fragmento del plásmido, por lo cual se probaron diferentes combinaciones, que a continuación, se describen:

1. Plásmido + Oligonucleótidos FES-C
2. Plásmido + Fw + Rv FES-C
3. Plásmido + Oligonucleótidos FES-C
4. Plásmido + Fw + Rv FES-C
5. Control Negativo (mix)

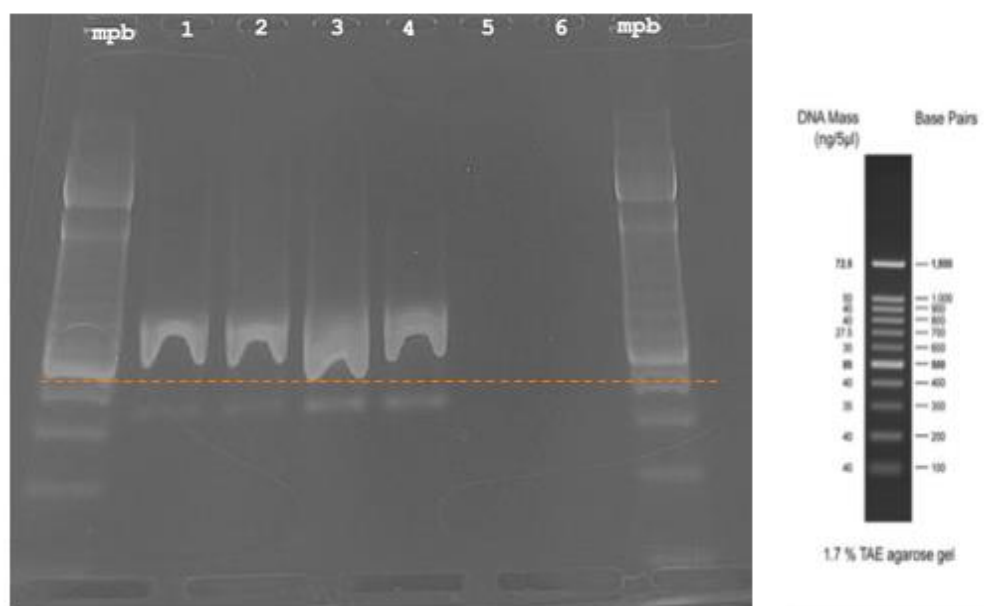


Figura 11. Electroforesis con gel de agarosa 2%, teñido con Red Gel, se observan bandas del tamaño esperado en los carriles “Oligos FES-C y Plásmido” y en el carril “Oligos Fw y Rv FES-C. Los números superiores representan las siguientes combinaciones: 1. Plásmido + Oligos FES-C, 2. Plásmido + Fw + Rv-FES-C, 3. Plásmido + Oligos FES-C, 4. Plásmido + Fw + Rv FES-C, 5 y 6. Control Negativo (mix). La línea horizontal indica 500pb.

Muestras positivas

Primer muestreo

De las 451 muestras de hisopo nasal obtenidas en el primer muestreo (agosto 2015 a agosto 2016) por medio de PCR tiempo real se obtuvieron 28 muestras positivas a vLB de los siguientes Estados.

Cuadro 6. Estados del país, número de muestras totales y positivas para el vLEB por PCR tiempo real de hisopado nasal, periodo de muestreo agosto 2015 a agosto 2016.

Estado	Número de muestras	Número de muestras positivas
Aguascalientes	4	0
Campeche	34	1
Chiapas	98	9
Colima	4	2
Estado de México	4	0
Guanajuato	4	0
Guerrero	33	3
Hidalgo	4	0
Jalisco	62	0
Michoacán/ Centro de engorda	31	11
Morelos	4	0
Nayarit	4	0
Oaxaca	37	0
Puebla	4	0
Quintana Roo	4	0
San Luis Potosí	4	0
Tabasco	61	2
Veracruz	49	0
Total	453	28

Segundo muestreo

Se obtuvieron más muestras de los Estados (Chiapas, Guerrero, Colima y Campeche) que resultaron previamente positivos por PCR en tiempo real y del propio centro de engorda de animales que presentaban alguna signología compatible con leucosis enzoótica bovina. En total se obtuvieron 141 muestras de sangre en tubos con EDTA (Cuadro 9). Las cuales fueron procesadas por medio de PCR punto final.

Cuadro 9. Relación del número de muestras obtenidas por Estado para la detección por PCR del vLB

Estado	Número de muestras
Campeche	30
Guerrero	22
Chiapas	30
Colima	30
Centro de engorda (enfermerías)	29

Se realizó la extracción de ADN a partir de la sangre completa. La extracción se realizó por medio de un kit comercial QIAMP cadador Pathogen Mini Kit. La PCR punto final fue realizada con la combinación de oligonucleótidos estandarizados previamente.

Se obtuvieron dos muestras positivas con un amplicón de 749pb provenientes del Estado de Colima (Figura 12).

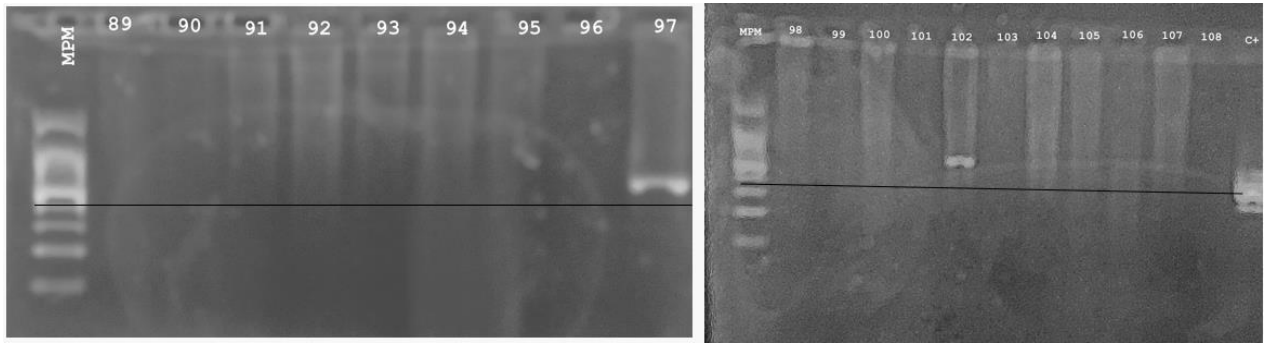


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con Gel Red, se observa la muestra 97 y 102 con una banda de amplificación, la línea horizontal negra representa 500pb, el número superior en cada carril corresponde al número consecutivo de la muestra.

Una vez obtenidas las muestras positivas se realizó una nueva PCR con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos: en una reacción se utilizó el primer Fw diseño propio + Rv FESC y en otra reacción se utilizaron los oligonucleótidos Fw y Rev FESC.

En total se pudieron obtener tres secuencias de forma bidireccional identificadas como:

1. México/Colima/FMVZUNAM/01/2018
2. México/Colima/FMVZUNAM/02/2018
3. México/Colima/FMVZUNAM/03/2018

Los productos de PCR 1 y 2 se obtuvieron utilizando la combinación de los oligonucleótidos y la muestra tres se obtuvo utilizando los oligonucleótidos de FESC.

Secuenciación

Las muestras positivas se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM; donde se purificaron y secuenciaron utilizando secuenciación tipo SANGER.

Para la muestra uno se obtuvieron 560 bases, para la muestra dos 560 y para la muestra tres 715 bases (Figura 13).

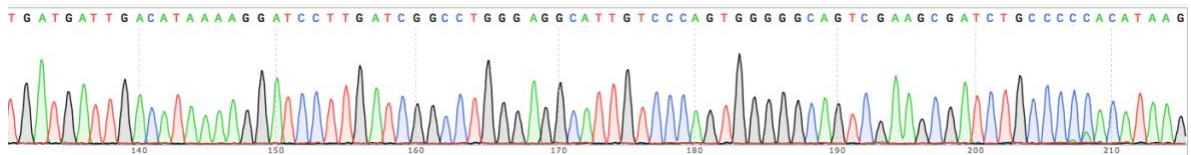


Figura 13. Ejemplo de la secuenciación nucleotídica de una muestra y el cromatograma obtenido por medio de la secuenciación por Sanger.

Identidad

La comparación de identidad de las secuencias obtenidas se realizó utilizando el programa BLASTn del NCBI. Se obtuvieron resultados de una identidad de 99% con respecto a las secuencias nucleotídicas reportadas de la proteína de envoltura del virus de leucemia bovina en el GenBank y un E value de 0.0 (Figura 14).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus isolate MX-AGU-8A envelope glycoprotein (env) gene, complete cds	1007	1007	98%	0.0	99%	MG678770.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: pvAN013	1007	1007	98%	0.0	99%	AP018030.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus strain Pt24-G5 envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	KU233560.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus strain Pt2-G2 envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	KU233557.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus strain Pt1-G1 envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	KU233556.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus strain Lb11-B5 envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	KU233533.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus strain Lb5-B4 envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	KU233532.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus strain GNCN-8 envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	KP201481.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus strain GNCN-4 envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	KP201476.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus proviral env gene for gp51, partial cds, strain: 781-T99	1007	1007	98%	0.0	99%	LC007984.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus proviral env gene for gp51, partial cds, strain: 53-K110	1007	1007	98%	0.0	99%	LC007983.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus proviral env gene for gp51, partial cds, strain: 76-T69	1007	1007	98%	0.0	99%	LC007982.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus isolate AL-220 envelope glycoprotein (env) gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	FJ808576.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus isolate AL-112 envelope glycoprotein (env) gene, partial cds	1007	1007	98%	0.0	99%	FJ808572.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus isolate CRAG-2 envelope glycoprotein gene, complete cds; pol protein, R3 protein, rex protein and tr	1007	1007	98%	0.0	99%	EF065640.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus isolate MX-ABOMASUM-3 envelope glycoprotein (env) gene, complete cds	1002	1002	98%	0.0	99%	MG678787.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus isolate MX-HEART-8 envelope glycoprotein (env) gene, complete cds	1002	1002	98%	0.0	99%	MG678786.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus isolate MX-HEART-1 envelope glycoprotein (env) gene, complete cds	1002	1002	98%	0.0	99%	MG678781.1
<input type="checkbox"/> Bovine leukemia virus isolate MX-GUA-14A envelope glycoprotein (env) gene, complete cds	1002	1002	98%	0.0	99%	MG678774.1

Figura 14. BLAST de nucleótidos obtenido para la secuencia México/Colima/FMVZUNAM/01/2018, se observa un valor de identidad del 99% y un E value de cero, así como todos los resultados arrojados por el análisis se asociaron al gen de la glicoproteína de envoltura del vLB.

Para dar más certeza de este análisis se realizó la deducción de las secuencias nucleotídicas a aminoácidos y se realizó un BLAST (blastp) en donde se obtuvo un porcentaje de identidad del 98 al 100% y un E value de $1e-130$, este valor varía debido al tamaño de la secuencia (Figura 15); dentro de este mismo análisis se detectaron dominios conservados que corresponden a la superfamilia de poliproteínas *env*.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	378	378	96%	9e-131	100%	AMR72287.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	377	377	96%	1e-130	100%	AMR72291.1
<input type="checkbox"/>	gp51 [Bovine leukemia virus]	377	377	96%	1e-130	100%	BAP81663.1
<input type="checkbox"/>	gp51 [Bovine leukemia virus]	377	377	96%	1e-130	100%	BAP81667.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	377	377	96%	1e-130	100%	AMR72263.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	377	377	96%	2e-130	100%	AKE80855.1
<input type="checkbox"/>	gp51 [Bovine leukemia virus]	377	377	96%	2e-130	100%	BAP81662.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein precursor gPr72 [Bovine leukemia virus]	375	375	96%	3e-130	100%	AFQ60903.1
<input type="checkbox"/>	gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	3e-130	99%	BAP81666.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	3e-130	99%	AMR72290.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	4e-130	99%	AKE80843.1
<input type="checkbox"/>	gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	4e-130	99%	BAP81665.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	4e-130	99%	AKE80835.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	4e-130	99%	AKE80846.1
<input type="checkbox"/>	gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	4e-130	99%	BAP81669.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	4e-130	99%	AKE80848.1
<input type="checkbox"/>	gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	5e-130	99%	BAP81657.1
<input type="checkbox"/>	gp51 [Bovine leukemia virus]	376	376	96%	6e-130	99%	CAR64531.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	375	375	96%	7e-130	99%	AKE80851.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp51 [Bovine leukemia virus]	375	375	96%	7e-130	99%	AMR72289.1

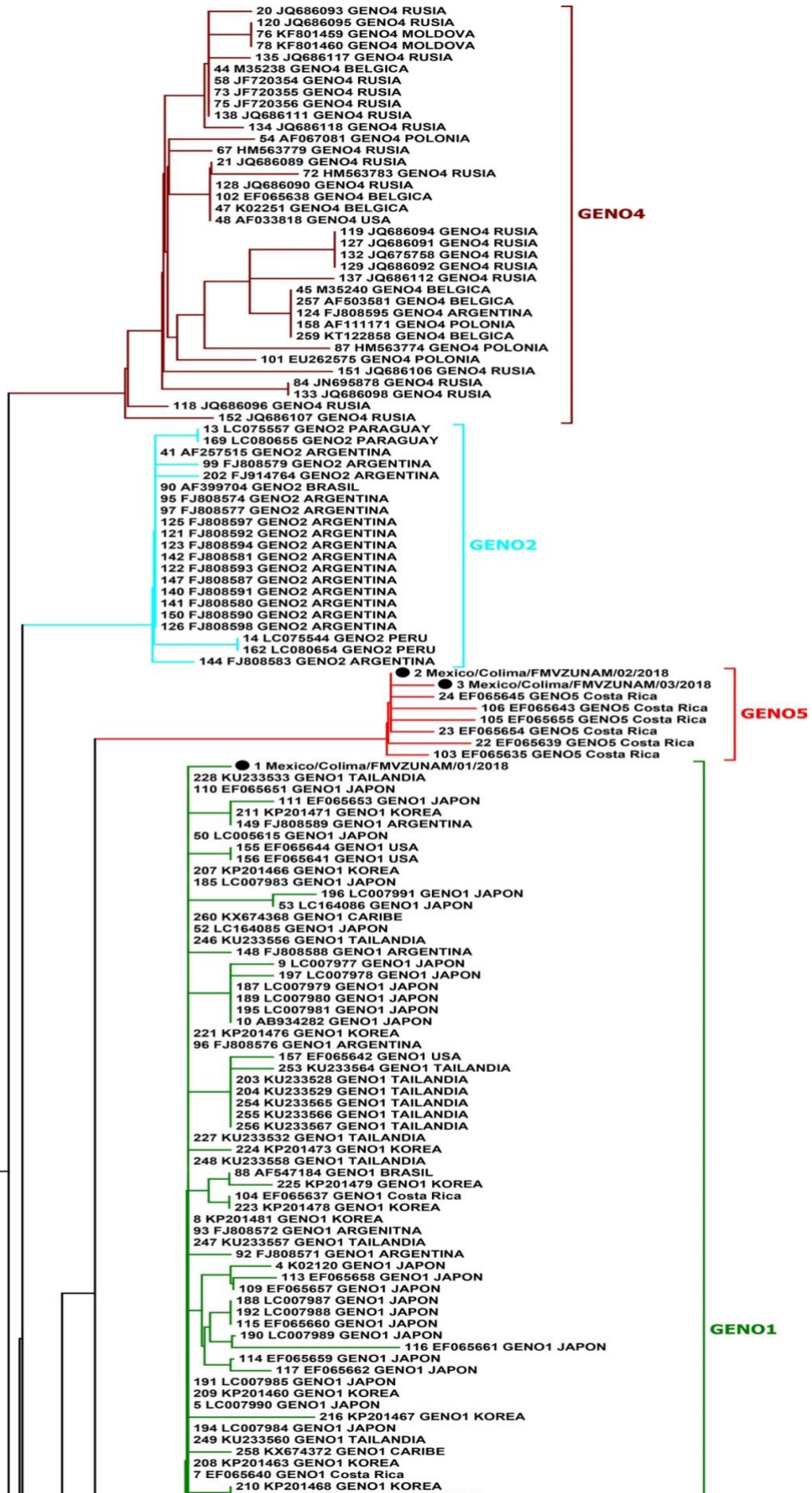
Figura 15. Blastp (proteína a proteína) de la secuencia deducida de México/Colima/FMVZUNAM/01/2018, se observa un porcentaje de identidad del 99 al 100% y un E value variable.

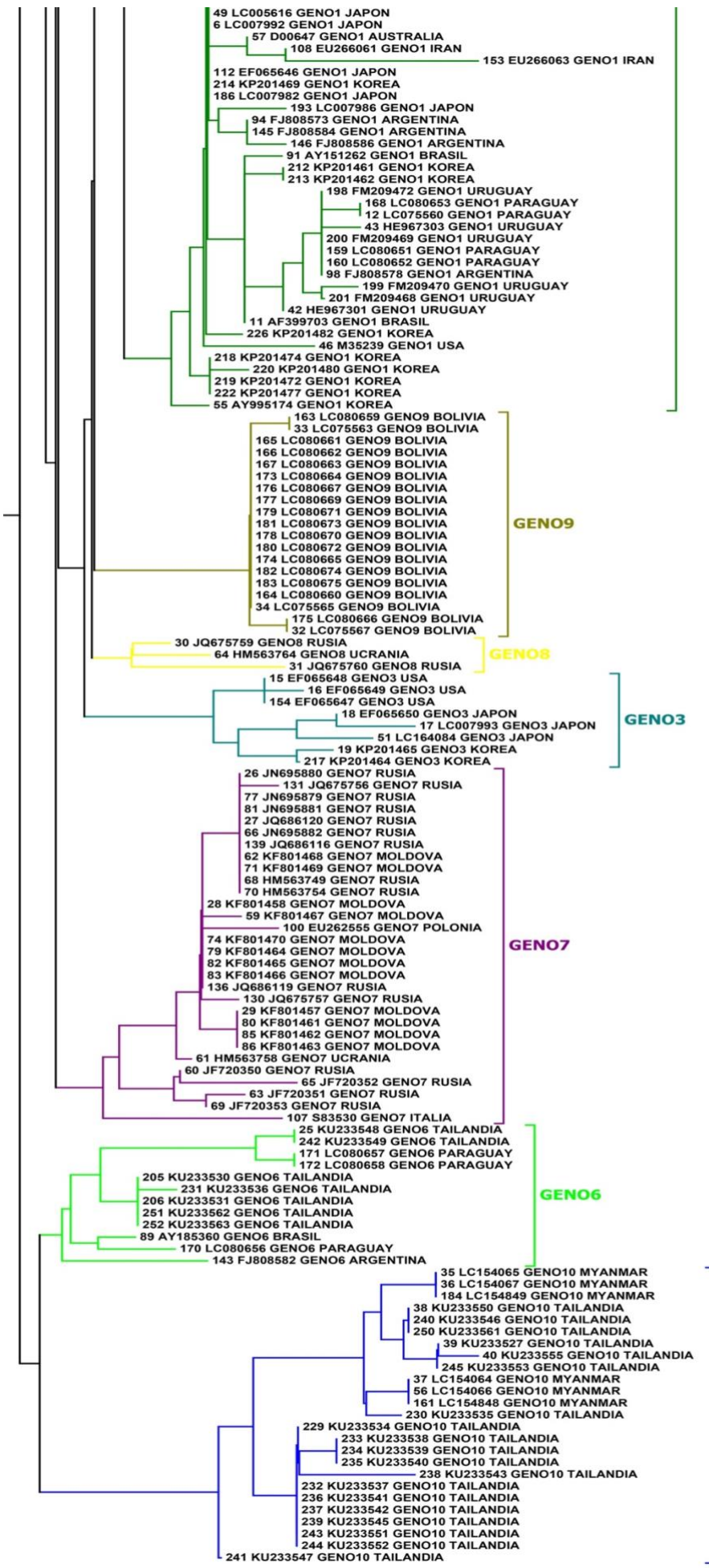
Pero tanto en aminoácidos como en nucleótidos las secuencias obtenidas tuvieron una similitud con secuencias del gen de *env* de virus de leucemia bovina reportados previamente.

Filogenias

Polat Meripet *et al.*, en el 2017 y Pluta Aneta *et al.*, en el 2018, publicaron dos artículos en donde utilizan secuencias del gen de envoltura de los diez genotipos existentes del virus de leucemia bovina de diferentes partes del mundo, estas fueron la referencia para la predicción y construcción del árbol filogenético para determinar el genotipo de las secuencias obtenidas.

El análisis se realizó utilizando el programa MAFFT versión 7 (Multiple alignment program for aminoacid or nucleotide sequences) en su versión en línea; el árbol filogenético fue construido con el algoritmo Neighbor Joining con valores de bootstrap de 1000 repeticiones empleando como modelo de sustitución Jukes-Canto y editado en el programa MEGA7 (Figura 16).





0.005

- 49 LC005616 GENO1 JAPON
- 6 LC007992 GENO1 JAPON
- 57 D00647 GENO1 AUSTRALIA
- 108 EU266061 GENO1 IRAN
- 153 EU266063 GENO1 IRAN
- 112 EF065646 GENO1 JAPON
- 214 KP201469 GENO1 KOREA
- 186 LC007982 GENO1 JAPON
- 193 LC007986 GENO1 JAPON
- 94 FJ808573 GENO1 ARGENTINA
- 145 FJ808584 GENO1 ARGENTINA
- 146 FJ808586 GENO1 ARGENTINA
- 91 AY151262 GENO1 BRASIL
- 212 KP201461 GENO1 KOREA
- 213 KP201462 GENO1 KOREA
- 198 FM209472 GENO1 URUGUAY
- 168 LC080653 GENO1 PARAGUAY
- 12 LC075560 GENO1 PARAGUAY
- 43 HE967303 GENO1 URUGUAY
- 200 FM209469 GENO1 URUGUAY
- 159 LC080651 GENO1 PARAGUAY
- 160 LC080652 GENO1 PARAGUAY
- 98 FJ808578 GENO1 ARGENTINA
- 199 FM209470 GENO1 URUGUAY
- 201 FM209468 GENO1 URUGUAY
- 42 HE967301 GENO1 URUGUAY
- 11 AF399703 GENO1 BRASIL
- 226 KP201482 GENO1 KOREA
- 46 M35239 GENO1 USA
- 218 KP201474 GENO1 KOREA
- 220 KP201480 GENO1 KOREA
- 219 KP201472 GENO1 KOREA
- 222 KP201477 GENO1 KOREA
- 55 AY995174 GENO1 KOREA
- 163 LC080659 GENO9 BOLIVIA
- 33 LC075563 GENO9 BOLIVIA
- 165 LC080661 GENO9 BOLIVIA
- 166 LC080662 GENO9 BOLIVIA
- 167 LC080663 GENO9 BOLIVIA
- 173 LC080664 GENO9 BOLIVIA
- 176 LC080667 GENO9 BOLIVIA
- 177 LC080669 GENO9 BOLIVIA
- 179 LC080671 GENO9 BOLIVIA
- 181 LC080673 GENO9 BOLIVIA
- 178 LC080670 GENO9 BOLIVIA
- 180 LC080672 GENO9 BOLIVIA
- 174 LC080665 GENO9 BOLIVIA
- 182 LC080674 GENO9 BOLIVIA
- 183 LC080675 GENO9 BOLIVIA
- 164 LC080660 GENO9 BOLIVIA
- 34 LC075565 GENO9 BOLIVIA
- 175 LC080666 GENO9 BOLIVIA
- 32 LC075567 GENO9 BOLIVIA
- 30 JQ675759 GENO8 RUSIA
- 64 HM563764 GENO8 UCRANIA
- 31 JQ675760 GENO8 RUSIA
- 15 EF065648 GENO3 USA
- 16 EF065649 GENO3 USA
- 154 EF065647 GENO3 USA
- 18 EF065650 GENO3 JAPON
- 17 LC007993 GENO3 JAPON
- 51 LC164084 GENO3 JAPON
- 19 KP201465 GENO3 KOREA
- 217 KP201464 GENO3 KOREA
- 26 JN695880 GENO7 RUSIA
- 131 JQ675756 GENO7 RUSIA
- 77 JN695879 GENO7 RUSIA
- 81 JN695881 GENO7 RUSIA
- 27 JQ686120 GENO7 RUSIA
- 66 JN695882 GENO7 RUSIA
- 139 JQ686116 GENO7 RUSIA
- 62 KF801468 GENO7 MOLDOVA
- 71 KF801469 GENO7 MOLDOVA
- 68 HM563749 GENO7 RUSIA
- 70 HM563754 GENO7 RUSIA
- 28 KF801458 GENO7 MOLDOVA
- 59 KF801467 GENO7 MOLDOVA
- 100 EU262555 GENO7 POLONIA
- 74 KF801470 GENO7 MOLDOVA
- 79 KF801464 GENO7 MOLDOVA
- 82 KF801465 GENO7 MOLDOVA
- 83 KF801466 GENO7 MOLDOVA
- 136 JQ686119 GENO7 RUSIA
- 130 JQ675757 GENO7 RUSIA
- 29 KF801457 GENO7 MOLDOVA
- 80 KF801461 GENO7 MOLDOVA
- 85 KF801462 GENO7 MOLDOVA
- 86 KF801463 GENO7 MOLDOVA
- 61 HM563758 GENO7 UCRANIA
- 60 JF720350 GENO7 RUSIA
- 65 JF720352 GENO7 RUSIA
- 63 JF720351 GENO7 RUSIA
- 69 JF720353 GENO7 RUSIA
- 107 S83530 GENO7 ITALIA
- 25 KU233548 GENO6 TAILANDIA
- 242 KU233549 GENO6 TAILANDIA
- 171 LC080657 GENO6 PARAGUAY
- 172 LC080658 GENO6 PARAGUAY
- 205 KU233530 GENO6 TAILANDIA
- 231 KU233536 GENO6 TAILANDIA
- 206 KU233531 GENO6 TAILANDIA
- 251 KU233562 GENO6 TAILANDIA
- 252 KU233563 GENO6 TAILANDIA
- 89 AY185360 GENO6 BRASIL
- 170 LC080656 GENO6 PARAGUAY
- 143 FJ808582 GENO6 ARGENTINA
- 35 LC154065 GENO10 MYANMAR
- 36 LC154067 GENO10 MYANMAR
- 184 LC154849 GENO10 MYANMAR
- 38 KU233550 GENO10 TAILANDIA
- 240 KU233546 GENO10 TAILANDIA
- 250 KU233561 GENO10 TAILANDIA
- 39 KU233527 GENO10 TAILANDIA
- 40 KU233555 GENO10 TAILANDIA
- 245 KU233553 GENO10 TAILANDIA
- 37 LC154064 GENO10 MYANMAR
- 56 LC154066 GENO10 MYANMAR
- 161 LC154848 GENO10 MYANMAR
- 230 KU233535 GENO10 TAILANDIA
- 229 KU233534 GENO10 TAILANDIA
- 233 KU233538 GENO10 TAILANDIA
- 234 KU233539 GENO10 TAILANDIA
- 235 KU233540 GENO10 TAILANDIA
- 238 KU233543 GENO10 TAILANDIA
- 232 KU233537 GENO10 TAILANDIA
- 236 KU233541 GENO10 TAILANDIA
- 237 KU233542 GENO10 TAILANDIA
- 239 KU233545 GENO10 TAILANDIA
- 243 KU233551 GENO10 TAILANDIA
- 244 KU233552 GENO10 TAILANDIA
- 241 KU233547 GENO10 TAILANDIA

GENO9

GENO8

GENO3

GENO7

GENO6

GENO10

Figura 16. Árbol filogenético construido con neighbor joining utilizando secuencias parciales del gen *env* del BLV identificadas en todo el mundo. Las secuencias representan a los diez diferentes genotipos hasta ahora descritos. Las secuencias están identificadas con su número de acceso y país de origen. Los genotipos se indican mediante números a la derecha de la figura. Se realizaron mil repeticiones para calcular los valores de bootstrap. Las secuencias obtenidas están identificadas con un círculo de color negro en el genotipo 1 y 5.

En la filogenia se observó que las secuencia México/Colima/FMVZUNAM/02/2018 y México/Colima/FMVZUNAM/03/2018 se agrupan en el clado del genotipo 5, dentro de ese genotipo únicamente se habían reportado secuencias de Costa Rica, siendo la primera vez que se reporta la presencia de este genotipo en nuestro país.

La secuencia México/Colima/FMVZUNAM/01/2018, se agrupó en el clado del genotipo 1, el cual tiene una distribución mundial, se agrupó con secuencias de Tailandia y Japón reportadas en el año 2013 y 2007 respectivamente. Las secuencias utilizadas de la base de datos van desde el año 2000 al 2017.

Evaluación de secuencias obtenidas

Adicionalmente a las tres secuencias obtenidas en este trabajo se evaluaron los posibles sitios de glicosilación, así como los posibles determinantes antigénicos y se compararon con los reportados en la literatura previamente. Los resultados se enlistan a continuación:

México/Colima/FMVZUNAM/01/2018

Para el caso de esta secuencia que en el árbol filogenético se agrupó en el genotipo 1 se encontró un posible sitio de glicosilación en el aminoácido 117, el cual coincide con un posible sitio encontrado en el análisis previo de la proteína para el diseño de los oligonucleótidos (Figura 17).

En la predicción de posibles sitios antigénicos se encontraron siete posibles sitios; dentro de estos dos coinciden con dos epítomos previamente reportados, epítomo para CD4 el cual se encuentra entre los aminoácidos 61-70 y para CD8 que se encuentra del aminoácido 131-140 (Figura 18).

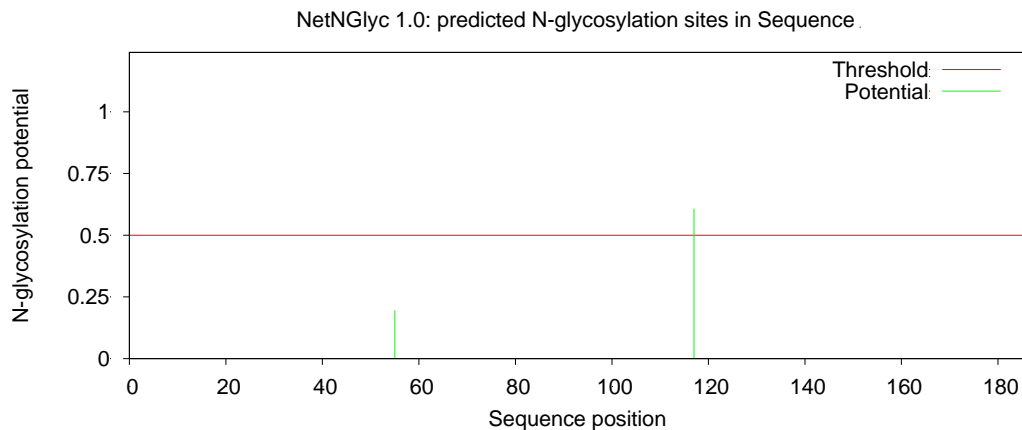


Figura 17. Predicción de sitios de N-glicosilación en la secuencia México/Colima/FMVZUNAM/01/2018, se observa un posible sitio de glicosilación en la posición 117.

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	GSLTLTLLALCRP	16
2	18	QWRCSLSL	26
3	39	AKFSISIDQILEA	51
4	53	NQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWP	78
5	90	AMVTYDCEPRCPYVGADRFDC	110
6	121	QGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTL	144
7	150	GYPDLITFSLHKIPDPPQPDFPQ	172

Figura 18. Predicción de posibles sitios antigénicos de la secuencia México/Colima/FMVZUNAM/01/2018, el posible determinante antigénico número cuatro corresponde a un epítipo para CD4 (aa 61-70) reportado anteriormente, el número 6 corresponde a uno reportado para CD8 (aa 131 a 140).

1. México/Colima/FMVZUNAM/02/2018

La secuencia México/Colima/FMVZUNAM/02/2018, la cual se agrupó en el clado del genotipo 5, con 560 bases obtenidas. Se encontró un sitio de glicosilación en el aminoácido 117, y ocho posibles epítopos, coincidiendo al identificado como número siete el cual va del aminoácido 121 al 144 dentro de esta región se encuentra el reportado para CD8 que comprende de los aminoácidos 131-140 (Figura 20 y 21).

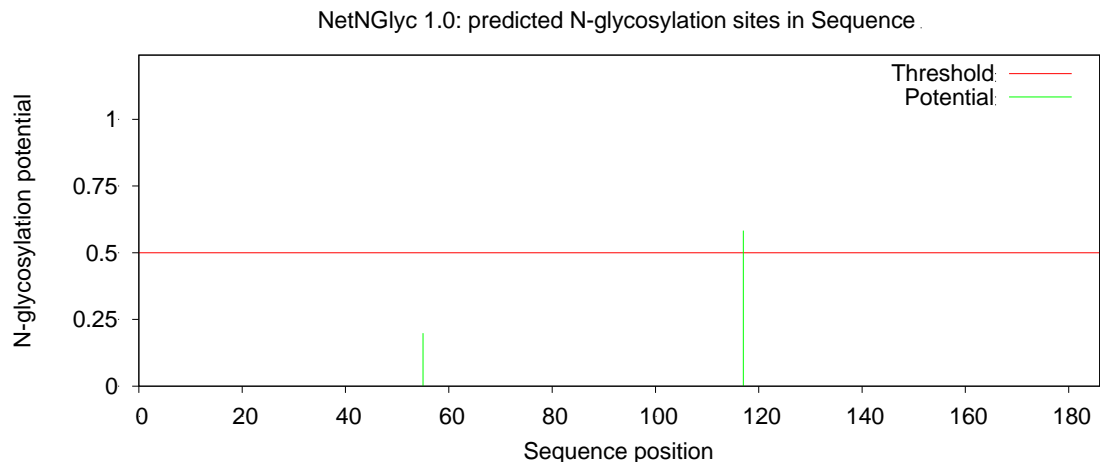


Figura 19. Predicción de sitios de N-glicosilación en la secuencia México/Colima/FMVZUNAM/02/2018, se observa un posible sitio de glicosilación en la posición 117.

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	GSLTLTVLALCQP	16
2	18	QWRCSSLSL	26
3	39	AKFSISIDQILEA	51
4	53	NQSPFCAR	60
5	62	PRYTLDFVNGYPKIYWP	78
6	90	AMVTYDCEPRCPYVGADRFDC	110
7	121	QGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTL	144
8	150	GYPDPLITFSLHKIPDPPQPDFPQ	172

Figura 20. Predicción de posibles sitios antigénicos de la secuencia México/Colima/FMVZUNAM/02/2018, el posible determinante antigénico número siete corresponde a uno reportado para CD8 (131-140).

2. México/Colima/FMVZUNAM/03/2018

Para la secuencia México/Colima/FMVZUNAM/03/2018 agrupada en el clado cinco, se obtuvieron los siguientes resultados: la predicción de sitios antigénicos se obtuvo un posible sitio de glicosilación en el aminoácido 114 (figura 21). En la predicción de los determinantes antigénicos se obtuvieron en total siete posibilidades de las cuales el número cuatro y seis corresponden a los epítomos para CD4 y CD8 respectivamente (Figura 22).

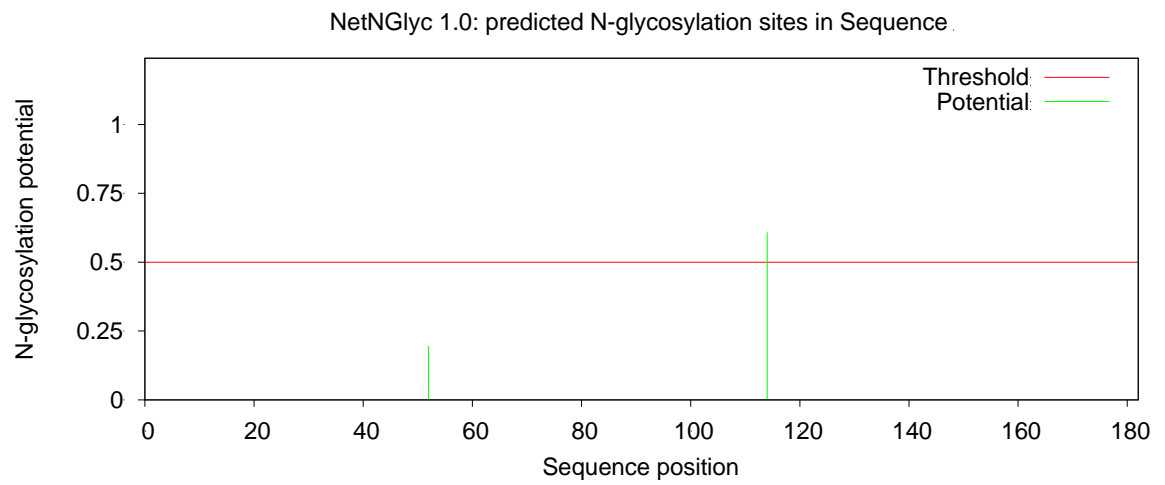


Figura 21. Predicción de sitios de N-glicosilación en la secuencia México/Colima/FMVZUNAM/03/2018, se observa un posible sitio de glicosilación en la posición 114.

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	SLTLTLLALCRP	15
2	17	QWRCSLSL	25
3	38	AKFSISIDQILEA	50
4	52	NQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWP	77
5	89	AMVTYDCEPRCPYVGADRFDC	109
6	120	QGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTL	143
7	149	GYDPLITFSLHKIPDPPQPDFPQ	171

Figura 22. Predicción de posibles sitios antigénicos de la secuencia México/Colima/FMVZUNAM/03/2018, el sitio cuatro y seis coinciden con los epítomos para CD4 y CD8 respectivamente.

Adicionalmente se realizó una matriz de identidad para conocer el porcentaje de similitud entre las secuencias obtenidas en este trabajo. Entre las secuencias México/Colima/FMVZUNAM/01/2018 y México/Colima/FMVZUNAM/02/2018 se obtuvo un porcentaje de similitud del 94.643% similar al obtenido entre las secuencias México/Colima/FMVZUNAM/01/2018 y México/Colima/FMVZUNAM/03/2018 que presentaron un valor de 94.084%; el valor entre estas secuencias es el esperado debido a que pertenece a un genotipo diferente. El porcentaje de identidad obtenido entre las secuencias que se enraizaron al mismo clado fue de 98.087%.

DISCUSIÓN

Desde la identificación y las primeras aproximaciones que se han realizado para la genotipificación del virus de leucemia bovina se han empleado diversas herramientas moleculares como PCR-RFLP en donde en una primera clasificación se nombraron siete genotipos de la A-G, posteriormente se realizó secuenciación y se pudieron obtener genotipos del 1-8 estos utilizando la glicoproteína gp51 para su clasificación y siendo la referencia para la genotipificación de nuevas secuencias, esto por ser el objetivo de anticuerpos neutralizantes y ser indispensable para la entrada del virus a la célula huésped (Polat *et al.*, 2017). Gracias a estas aproximaciones se pudo conocer que existen genotipos con distribución mundial, como el genotipo 1, y genotipos de ubicación geográfica endémica como el genotipo 9 y 10 que únicamente han sido descritos en Bolivia y Tailandia respectivamente (Polat *et al.*, 2016).

En México Heinecke (2017) y Cerón (2018) obtuvieron secuencias y lograron genotipificar e identificar la presencia del genotipo 1 y 3 en ganado destinado a la producción de leche. Sin embargo, aún permanecía la incógnita de lo que sucedía en ganado de carne en nuestro país. En Colombia un estudio realizado en 2013 por medio de una ELISA indirecta reportó una seroprevalencia en ganado de carne del 15% y en un estudio de correlación no encontró diferencia estadística significativa de prevalencia asociadas a las variables de raza o edad (Hernández-Herrera *et al.* 2011) además de generar pérdidas económicas por reducción en la producción y ser un limitante para la exportación (Gutiérrez *et al.*, 2014).

En el presente trabajo las muestras de hisopo nasal fueron trabajadas por medio de la técnica de PCR tiempo real y se obtuvieron 28 muestras positivas. El resto de las muestras es decir las 141 correspondían a muestras de sangre completa las cuales para su diagnóstico fueron trabajadas con PCR punto final de las cuales dos fueron positivas.

La diferencia del porcentaje de muestras positivas de uno a otro muestreo quizá se deba a la técnica diagnóstica empleada ya que el PCR tiempo real es una técnica con mayor sensibilidad, es decir, posee la capacidad de detectar a una muestra positiva con menor concentración o presencia de material genético; en cambio, la PCR punto final es una técnica diagnóstica un poco menos sensible que la PCR tiempo real ya que para que una banda sea visible en el gel de agarosa y posteriormente en el transiluminador es necesaria una mayor concentración de material genético. Sin embargo, pese a que se utilizaron dos técnicas de diagnóstico diferentes el objetivo siempre fue la detección de la fase proviral del virus.

Hopkins en 1997 señala que las muestras de sangre, calostro y leche van a tener un conteo mayor de linfocitos en comparación con muestras de semen, saliva, secreciones nasales orina y heces a menos que el animal curse con otra infección (Hopkins and DiGiacomo, 1997) por lo que el tipo de muestra obtenida en este estudio no se considera la ideal para la detección de este agente viral. Diversos autores señalan que la muestra ideal para la identificación de vLB son los leucocitos de sangre periférica o sangre completa esto por el tropismo viral (Lee, 2016).

Estudios moleculares indican que el virus de leucemia bovina presenta una alta diversidad genética a pesar de tener una tasa de mutación para el gen *env* de 0.009%, la cual es considerada baja (Polat, *et al* 2016, Willems, *et al* 1993).

En el presente estudio en total se obtuvieron tres secuencias las cuales se agrupan dos de ellas en el genotipo 5 y una en el genotipo 1. La presencia del genotipo 1 ya había sido reportada en nuestro país en ganado lechero y es uno de los genotipos más estudiados ya que tiene presencia a nivel mundial. Sin embargo, el genotipo 5 solo se había descrito en Costa Rica y en 2017 en Brasil se detectaron dos secuencias pertenecientes a este genotipo por PCR anidado y para su genotipificación realizaron un análisis tipo neighbor joining (Gregory *et al.*, 2017), el cual fue el mismo análisis realizado en este estudio. Siendo la primera vez que se reporta la circulación del genotipo 5 en nuestro país. El porcentaje de

similitud entre las secuencias enraizadas en el clado del genotipo 5 fue de 98.07% y entre las secuencias del genotipo 1 y 5 el porcentaje fue de 94.643%. Estos valores no coinciden con los obtenidos por Heinecke *et al.*, (2017) quienes en un estudio dirigido hacia la porción transmembranal del gen *env* (gp30), reportan una alta similitud del 98.9%-99.7% entre las secuencias del genotipo 1 y 5. Las secuencias previamente reportadas como genotipo 5 se agruparon en el árbol filogenético en el clado del genotipo 1, reportando una distancia genética entre estos clados del 0.7%. Sin embargo, Lee en 2016 en un estudio dirigido a la proteína de superficie del gen (gp51) reporta una distancia genética entre genotipo 1 y 5 del 4.09% (Lee *et al.*, 2016), así como estudio realizado en Moldova en el cual se hace la secuenciación de la glicoproteína gp51 de la envoltura se encuentra una variabilidad de entre el 0-2.9% entre las secuencias del mismo genotipo (Pluta *et al.*, 2017) ambos resultados coinciden con los resultados obtenidos. Adicionalmente, Polat en 2016 construyó árboles filogenéticos utilizando secuencias parciales del gen *env* y secuencias del genoma completo de vLB, obteniendo en la filogenia de secuencias parciales los diez genotipos reportados y en él de genoma completo únicamente se agruparon los genotipos 1,2, 4, 6, 9 y 10 (Polat *et al.*, 2016). La diferencia de los valores y clasificación obtenidos en estos estudios remarca la importancia de la elección del gen de interés para el momento de realizar estudios de genotipificación de este virus ya que no es algo que este homologado.

Las pruebas de diagnóstico son fundamentales para la detección, control y erradicación de la infección, por tal motivo este estudio aporta una invaluable herramienta de diagnóstico en México, así como la detección de dos variantes virales detectadas en ganado de carne por secuenciación. Las prácticas comunes de manejo en el ganado generan la transmisión de forma horizontal dentro de los cuales está el tatuaje y aretado, los cuales son un manejo común en ganado de carne; la sangre puede contaminar la aretadora y como a muchos animales se les realiza ese procedimiento al mismo tiempo la transmisión de vLB puede existir. Un

estudio realizado de forma experimental en ovejas, quienes son susceptibles a la infección y desarrollo de enfermedad la cual la presentan de una forma más rápida y aguda, fueron tatuadas después de hacerlo con ganado infectado con el vLB y en 21 de 24 ovejas tatuadas presentaron seroconversión (Lassauzet *et al.*, 1990). Otro manejo utilizado es la palpación rectal en la cual al igual que en el caso anterior es usual que el examinador evalúe a diferentes animales sin cambiar de guantes de palpación, estas circunstancias pueden favorecer la transmisión del por medio de pequeñas cantidades de sangre presente en la mucosa rectal de animales infectados a otros si el examinador no lava o cambia los guantes, en México esta práctica es común en los hatos lecheros para detectar la preñez por medio de palpación rectal a los 40 ó 45 días posteriores al último servicio, ya sea por inseminación artificial o por monta natural, si es que no hay repetición de celo y se tiene que realizar una confirmación entre los 60 y 70 días posteriores (Robles Camargo, 2011). En Holanda un estudio demostró que animales sanos expuestos al virus de leucemia bovina por un guante infectado con 30 mL de sangre de un animal positivo, los resultados fueron que seis animales presentaron la infección (Wentink *et al.*, 1993).

Por lo que un análisis cuidadoso de los diferentes procedimientos y manejos, así como las condiciones medio ambientales del ganado es una ventana de oportunidad para desarrollar programas efectivos para la prevención y control de esta infección. De esta forma se llegó a la erradicación de esta enfermedad en Finlandia, donde tardaron mas de treinta años en erradicarla a través de programas de manejo, diagnóstico oportuno y colaboración entre gobierno y ganaderos (Nuotio *et al.*, 2003). En México el control de la leucosis enzoótica bovina es muy poco probable debido a que esta enfermedad no se encuentra en campaña, al conocer las formas más frecuentes de transmisión se podría implementar un plan de manejo y mejora dentro del centro de engorda para disminuir la incidencia y pérdidas económicas generadas por esta y otras enfermedades virales. Sin dejar de lado un diagnóstico oportuno, el cual para la OIE la técnica de diagnóstico de referencia es la inmunodifusión en gel agar, la

cual tiene algunas desventajas como la de no poder utilizarse en animales de menos de seis meses de edad porque la prueba no es capaz de diferenciar entre los anticuerpos maternos y anticuerpos generados por una infección activa. Otra técnica empleada es la técnica de ELISA la cual no se recomienda utilizarla en animales en una etapa temprana de infección, por que los anticuerpos no son detectados y pueden generar resultado falsos positivos, es por eso que hoy en día la técnica que se emplea es la técnica de reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) la cual ha demostrado ser una técnica eficaz para la detección del vLB, ya que el control y posible erradicación de esta enfermedad radica en el diagnóstico y sacrificio de animales positivos, esta herramienta que utilizamos en el presente trabajo puede ser una opción para la detección del vLB en la República Mexicana.

CONCLUSIONES

A partir de muestras de ganado de carne de la República Mexicana por medio de la técnica PCR punto final y secuenciación SANGER se obtuvieron del estado de Colima tres secuencias nucleotídicas del virus de leucemia bovina

A través del análisis filogenético las secuencias obtenidas se agruparon con secuencias del genotipo 1 y 5 del vLB, este último nunca antes reportado en nuestro país.

Las secuencias obtenidas en este trabajo son las primeras secuencias parciales derivadas de la glicoproteína de envoltura del virus de leucemia bovina obtenidas de ganado destinado a la producción de carne.

REFERENCIAS

- Barez, Pierre-Yves, Alix de Brogniez, Alexandre Carpentier, H el ene Gazon, Nicolas Gillet, Gerónimo Gutiérrez, Malik Hamaidia, Jean-Rock Jacques, Srikanth Perike, Sathya Neelature Sriramareddy, Nathalie Renotte, Bernard Staumont, Michal Reichert, Karina Trono, and Luc Willems. 2015. "Recent Advances in BLV Research." *Viruses* 7(11):6080–88.
- De Brogniez, Alix, Jan Mast, Luc Willems, and Andrew Tai. n.d. "Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis."
- Brooks, Patricia A., Gary L. Cockerell, and Jennifer K. Nyborg³. n.d. "Activation of BLV Transcription by NF-  and Tax."
- Cerón Téllez, Fernando (FESC-UNAM). 2018. "Secuenciación Del Gen Env Del Virus de Leucemia Bovina En Vacas Lecheras Con Diferentes Fases de Infección y Su Correlación Genotípica."
- Chamizo, E. G. 2005. "Leucosis Enzoótica. Revisión." *Revista Electrónica Veterinaria REDVET* VI(7).
- Gregory, Lilian, Nat lia Carrillo Gaeta, Jansen Araújo, Luciano Matsumiya Thomazelli, Ricardo Harakawa, Alice A. Ikuno, Liria Hiromi Okuda, Eliana de Stefano, and Edviges Maristela Pituco. 2017. "Bovine Leukaemia Virus Genotypes 5 and 6 Are Circulating in Cattle from the State of São Paulo, Brazil." *Journal of Medical Microbiology* (November).
- Gutiérrez, Ger onimo, Sabrina M. Rodríguez, Alix de Brogniez, Nicolas Gillet, Ramarao Golime, Ars ne Burny, Juan-Pablo Jaworski, Irene Alvarez, Lucas Vagnoni, Karina Trono, and Luc Willems. 2014. "Vaccination against  -Retroviruses: The Bovine Leukemia Virus Paradigm." *Viruses* 6(6):2416–27.
- Heinecke, Nayely, Jorge T rtora, Humberto A. Martínez, Víctor D. González-Fernández, and Hugo Ramírez. 2017. "Detection and Genotyping

of Bovine Leukemia Virus in Mexican Cattle.” *Archives of Virology* 162(10):3191–96.

- Hernandez-Herrera, Darwin, Andrés Mauricio Poss-Terranova, Javier Antonio Benavides, Jaime Eduardo Florez, Guillermo Giovambattista, and Luz Ángela Álvarez-Franco. 2011. “Detección Del Virus de La Leucosis Bovina En Ganado Criollo Colombiano Mediante PCR-Anidado.” *Acta Agronómica* 4:312–18.
- Hopkins, Sharon G. and Ronald F. DiGiacomo. 1997. “Natural Transmission of Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle.” *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 13(1):107–28.
- Johnston, E. R., L. M. Albritton, and K. Radke. 2002. “Envelope Proteins Containing Single Amino Acid Substitutions Support a Structural Model of the Receptor-Binding Domain of Bovine Leukemia Virus Surface Protein.” *Journal of Virology* 76(21):10861–72.
- Johnston, E. R. and K. Radke. 2000. “The SU and TM Envelope Protein Subunits of Bovine Leukemia Virus Are Linked by Disulfide Bonds, Both in Cells and in Virions.” *Journal of Virology* 74(6):2930–35.
- Khudhair, Yahia Ismail, Saleem Amin Hasso, Nahi Y. Yaseen, and Ahmed Majeed Al-Shammari. 2016. “Serological and Molecular Detection of Bovine Leukemia Virus in Cattle in Iraq.” *Emerging Microbes and Infections* 5(6):e56-6.
- Lairmore, Michael D. 2014. “Animal Models of Bovine Leukemia Virus and Human T-Lymphotropic Virus Type-1: Insights in Transmission and Pathogenesis.” *Annual Review of Animal Biosciences* 2(1):189–208.
- Lassauzet, MLG, MC Thurmond, and RW Walton. 1990. “Lack of Evidence of Transmission of Bovine Leukemia Virus by Rectal Palpation on Dairy Cows.” *American Vet Med Assoc* (195):1732.
- Lee, EunJung, Eun-Ju Kim, Ha-Kyung Joung, Bo-Hye Kim, Jae-Young Song, In-Soo Cho, Kyoung-Ki Lee, and Yeun-Kyung Shin. 2015. “Sequencing and Phylogenetic Analysis of the Gp51 Gene from Korean

Bovine Leukemia Virus Isolates.” *Virology Journal* 12(1):64.

- Lee, EunJung, Eun-Ju Kim, Jadsada Ratthanophart, Ratchaneekorn Vitoonpong, Bo-Hye Kim, In-Soo Cho, Jae-Young Song, Kyoung-Ki Lee, and Yeun-Kyung Shin. 2016. “Molecular Epidemiological and Serological Studies of Bovine Leukemia Virus (BLV) Infection in Thailand Cattle.” *Infection, Genetics and Evolution* 41:245–54.
- Lospitao, Eva, África Holguín, and Vicente Soriano. 2003. “Secuencias Largas Terminales Repetidas de Los Retrovirus: Estructura y Función.” *Medicina Clinica* 121(2):74–77.
- Manet, G., X. Guilbert, A. Roux, A. Vuillaume, and A. L. Parodi. 1989. “Natural Mode of Horizontal Transmission of Bovine Leukemia Virus (BLV): The Potential Role of Tabanids (*Tabanus* Spp.).” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 22(3):255–63.
- Marawan, Marawan Adel. 2017. “Molecular Studies on Bovine Leukemia Virus.” (May).
- Nuotio, L., H. Rusanen, L. Sihvonen, and E. Neuvonen. 2003. “Eradication of Enzootic Bovine Leukosis from Finland.” *Preventive Veterinary Medicine* 59(1–2):43–49.
- Pluta, Aneta, Marzena Rola-Łuszczak, Piotr Kubiś, Svetlana Balov, Roman Moskalik, Bhudipa Choudhury, and Jacek Kuźmak. 2017. “Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus from Moldovan Dairy Cattle.” *Archives of Virology* 162(6):1563–76.
- Polat, Meripet, Shin-nosuke Takeshima, and Yoko Aida. 2017. “Epidemiology and Genetic Diversity of Bovine Leukemia Virus.” *Virology Journal* 14(1):209.
- Polat, Meripet, Shin-nosuke Takeshima, Kazuyoshi Hosomichi, Jiyun Kim, Taku Miyasaka, Kazunori Yamada, Mariluz Arainga, Tomoyuki Murakami, Yuki Matsumoto, Veronica de la Barra Diaz, Carlos Javier Panei, Ester Teresa González, Misao Kanemaki, Misao Onuma, Guillermo Giovambattista, and Yoko Aida. 2016. “A New Genotype of Bovine

Leukemia Virus in South America Identified by NGS-Based Whole Genome Sequencing and Molecular Evolutionary Genetic Analysis.” *Retrovirology* 13(1):4.

- Robles, Camargo, Tirzo. 2011. “Diagnóstico de Gestacion Por Palpación Rectal En Bovinos.” *Memoria de Capacitación* 1–12.
- Rodríguez, Sabrina M., Arnaud Florins, Nicolas Gillet, Alix de Brogniez, María Teresa Sánchez-Alcaraz, Mathieu Boxus, Fanny Boulanger, Gerónimo Gutiérrez, Karina Trono, Irene Alvarez, Lucas Vagnoni, and Luc Willems. 2011. “Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV.” *Viruses* 3(7):1210–48.
- Rola-Łuszczak, Marzena, Aneta Pluta, Monika Olech, Irina Donnik, Maxim Petropavlovskiy, Anton Gerilovych, Irina Vinogradova, Bhudipa Choudhury, and Jacek Kuźmak. 2013. “The Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus Isolates from Eastern Europe and Siberia and Its Impact on Phylogeny.” *PLoS ONE* 8(3):e58705.
- Tajima, S. and Y. Aida. 2002. “Mutant Tax Protein from Bovine Leukemia Virus with Enhanced Ability To Activate the Expression of C-Fos.” *Journal of Virology* 76(5):2557–62.
- Thermo Fisher Scientific. 2016. *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Chemistry Guide*.
- Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía (Palmira), Darwin Yovanny, Andrés Mauricio Posso-Terranova, Javier Antonio Benavides, Jaime Eduardo Muñoz-Flórez, Guillermo Giovambattista, and Luz Ángela Álvarez-Franco. 1951. *Acta Agronomica (Palmira, Colombia)*. Vol. 60. Universidad Nacional de Colombia.
- Wentink, GH, JT Van Oirschot, and W. Pelgrim. 1993. “Experimental Transmission of Bovine Leukosis Virus by Rectal Palpation.” *Vet Re*, 132:135.
- Willems, Luc, Pierre Kerkhofs, -Arsene Burny, Marc Mammerickx, and Richard Keqq-Mann. 1996. “Lack of LTR and ENV Genetic Variation during

Bovine Leukemia Virus-Induced Leukemogenesis.” *VI ROLOGY* 206:769–72.

- Zhao, Xiangrong and Gertrude C. Buehring. 2007. “Natural Genetic Variations in Bovine Leukemia Virus Envelope Gene: Possible Effects of Selection and Escape.” *Virology* 366(1):150–65.
- Zhao, Xiangrong, Carlos Jimenez, Hiroshi Sentsui, and Gertrude C. Buehring. 2007. “Sequence Polymorphisms in the Long Terminal Repeat of Bovine Leukemia Virus: Evidence for Selection Pressures in Regulatory Sequences.” *Virus Research* 124(1–2):113–24.