



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

EVIDENCIA DE LA INFECCIÓN POR EL
VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA BOVINA
EN GANADO MEXICANO

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

VÍCTOR DAVID GONZÁLEZ FERNÁNDEZ

TUTOR: HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ (FES CUAUTITLÁN)

COMITÉ TUTORAL

DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA (FMVZ)

DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES (FMVZ)

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



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.

A Francisco González y Alejandra Fernández, mis padres

Al milagro termodinámico de la entropía

AGRADECIMIENTOS

Para la presentación de esta obra me permito externar mi sincera gratitud a:

- Los productores ganaderos, que amablemente nos permitieron trabajar con sus animales.
- Hugo Ramírez Álvarez, por ser mi Maestro en esta carrera.
- Mi comité tutorial, Rosa Elena Sarmiento Silva y Rogelio Alejandro Alonso Morales, por su tiempo y dedicación en estos últimos dos años.
- Martha García Flores, del IMSS por su asesoramiento en los ensayos serológicos.
- Jesús Zavaleta, Javier Hernández, Jorge Tórtora; por su ayuda en la gestión de la obtención de muestras.
- Amigos y compañeros del Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES- Cuautitlán.
- El CONACyT, por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.
- La UNAM, por todo. Es un honor vivir por y para la Universidad.

■ Este estudio fue llevado a cabo gracias al financiamiento de los proyectos:

Proyecto CONACyT 221285: Genotipificación del gen *env* de retrovirus que impactan la salud de rumiantes domésticos

Proyecto PAPIIT IT201217: “ELISAs basadas en el uso de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos para la detección serológica de lentivirus en caprinos”

RESUMEN

El *Virus de la inmunodeficiencia bovina* (BIV), perteneciente al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*, fue aislado originalmente (1972) en los Estados Unidos a partir de una vaca lechera con linfocitosis persistente, hiperplasia linfoide y encefalitis linfocítica. Muchos estudios indican que la infección por el BIV tiene distribución mundial, aunque se desconoce su presencia en México. En esta investigación se presenta la evidencia de infección por BIV en ganado mexicano. Se diseñó un péptido sintético corto (17 residuos) derivado de la proteína de transmembrana utilizando las secuencias de aminoácidos deducidas del BIV descritas previamente. El péptido se usó como antígeno de revestimiento en ensayos de ELISA. Un total de 1128 muestras de sangre periférica completa fueron recolectadas de ganado bovino (*Bos taurus*) en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Puebla, Querétaro y Tlaxcala, en México; el plasma y los leucocitos de sangre periférica (LSP) fueron separados. Las muestras de plasma se usaron para realizar ensayos de ELISA, el ADN genómico de los LSP se extrajo con un kit comercial. Se diseñó un par de oligonucleótidos para la amplificación de un producto de 519 pb de un fragmento del gen *env* para detectar el ADN proviral del BIV. Los amplicones positivos se purificaron usando un kit comercial y se sometieron a la secuenciación nucleotídica. Un total de 338 (28,94%) muestras de plasma evaluadas mostraron valores de OD > 0.3 (OD-450nm), esto sugiere la presencia de anticuerpos anti-BIV específicos en muestras de plasma de todos los estados estudiados. Además, los resultados de PCR mostraron 6 resultados positivos, la secuenciación nucleotídica y el análisis *in silico* de estas muestras confirmaron la identidad del BIV. Éste es el primer reporte de la presencia de BIV en ganado mexicano.

ABSTRACT

Bovine immunodeficiency virus (BIV), a member of the *Lentivirus* genus of *Retroviridae* family, was originally isolated (1972) in the USA from a dairy cow with persistent lymphocytosis, lymphoid hyperplasia, and lymphocytic encephalitis. Many studies indicated that BIV infection has worldwide distribution, although its presence in Mexico is unknown. In this investigation, we report evidence of BIV infection in Mexican cattle. For its use as coating antigen in ELISA assays, a short (17 residues) transmembrane-protein derived synthetic peptide was designed using deduced amino acid sequences of BIV described previously. A total of 1128 whole peripheral blood samples were collected from cattle (*Bos taurus*) in Aguascalientes, Chiapas, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de Mexico, Puebla, Querétaro and Tlaxcala states from Mexico; plasma and peripheral blood leukocytes (PBLs) were separated. Plasma samples were used to perform ELISA assays, genomic DNA was extracted from PBLs with a commercial kit. A pair of primers designed for the amplification of a 519-bp product of an *env* gene fragment were used to detect proviral DNA of BIV. Positive amplicons were purified using a commercial kit and submitted to Sanger nucleotide sequencing. A total of 338 (28.94%) tested plasma samples showed OD values >0.3 (OD-450nm), this suggest the presence of specific anti-BIV antibodies in plasma samples from every state. Furthermore, PCR results have already showed 6 positive results, nucleotide sequencing and *in silico* analysis of these samples confirmed the BIV identity. This is the first report for the presence of BIV in Mexican cattle.

There is nothing so stable as change.

Bob Dylan

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	1
LISTA DE FIGURAS	2
ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS	3
INTRODUCCIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIÓN	60
REFERENCIAS	61

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Recopilación de los datos disponibles respecto a estudios de presencia y/o prevalencia del BIV en diferentes países. ***Pág. 23***

CUADRO 2. Protocolo de PCR que amplifica una fracción de 373nt del gen SDHA. ***Pág 36***

CUADRO 3. Protocolo para la nPCR que ha demostrado amplificar ADN proviral del BIV generando un producto fina lde 298nt. del gen *pol*. ***Pág 36***

CUADRO 4. Protocolo de PCR que amplifica una fracción de 519nt del gen *env* del ADN proviral del BIV. ***Pág. 37***

CUADRO 5. Protocolo de PCR que amplifica una fracción de 355nt del gen *pol* de ADN proviral del BIV. ***Pág. 38***

CUADRO 6. Relación de las muestras obtenidas de agosto de 2015 a octubre de 2016 y resultados serológicos de la infección por el BLV ***Pág. 42***

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquematación de la filogenia de los lentivirus	Pág. 9
FIGURA 2. Mapa genómico del BIV	Pág. 10
FIGURA 3. Esquema del ciclo de replicación del BIV	Pág. 13
FIGURA 4. Esquematación de las regiones conservadas e hipervariables de la proteína de SU del gen <i>env</i> del BIV.	Pág.16
FIGURA 5. Distribución geográfica de la infección por el BIV.	Pág. 25
FIGURA 6. Diseño de un péptido sintético para la implementación de un ELISA de tercera generación.	Pág. 34
FIGURA 7. Situación de la infección por el Virus de Leucemia Bovina en una población de 1168 bovinos.	Pág. 41
FIGURA 8. Análisis serológico del BIV.	Pág. 45
FIGURA 9. OD (405nm) Ratio del análisis serológico	Pág. 46
FIGURA 10. Alineamientos de la pareja de iniciadores diseñados para amplificar un fragmento del gen <i>env</i> del BIV.	Pág. 47
FIGURA 11. Amplificación mediante PCR de una fracción del gen <i>env</i> a partir de muestra de ADN de bovinos de producción lechera.	Pág. 48
FIGURA 12. Detección molecular del Virus de Inmunodeficiencia Bovina	Pág.49
FIGURA 13. Alineamiento de la secuencia 39Coah con la secuencia de referencia y otras secuencias del BIV.	Pág. 50
FIGURA 14. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias aminoacídicas de las secuencias obtenidas.	Pág. 52

ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS

BIV	<i>Virus de Inmunodeficiencia Bovina</i>
BLV	<i>Virus de Leucemia Bovina</i>
cDNA	DNA complementario
Cf2Th	Línea celular de timo canino
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EIAV	<i>Virus de Anemia Infecciosa Equina</i>
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzimas
env-BIV	Gen <i>env</i> del BIV
EREp	Línea de células epiteliales embrionarias de conejo.
FIV	<i>Virus de Inmunodeficiencia Felina</i>
gag – BIV	Gen que codifica la proteína de cápside (p26) del BIV
HIV	<i>Virus de Inmunodeficiencia Humana</i>
HMBA	Bisacetamida hexametilén bovina (<i>bovine hexamethylene bisacetamide</i>)
ICTV	Comité internacional de taxonomía viral
iELISA	Ensayo Indirecto de Inmunoadsorción ligado a enzimas
IN	Enzima integrasa
JDV	<i>Virus de la enfermedad de Jembrana</i>
LSP	Leucocitos de sangre periférica
LTR	Secuencias largas terminales repetidas

ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS (continuación)

MA	Proteína de matriz (p18)
NC	Proteína de nucleocápside (p13)
nPCR	PCR anidada
ORF	Marco abierto de lectura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pol- BIV	Gen que codifica todas las enzimas del BIV
PR	Enzima proteasa
P-TEFb	Factor de elongación de la transcripción positiva (<i>positive transcription elongation factor</i>)
Rev	Gen regulador del virión (<i>Regulator of Virion</i>) regulador de la expresión viral)
ARN	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Enzima Retrotranscriptasa
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, en México

ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS (continuación)

SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIV	<i>Virus de inmunodeficiencia del simio</i>
SRLV	Lentivirus de pequeño rumiante
SU	Proteína de superficie (gp110)
TAR	Proteína trans-activadora (<i>trans-activating response element</i>)
tat	Proteína transactivadora de la transcripción genética
TM	Proteína de transmembrana (gp42)
TNRC6B	Complejo de silenciamiento inducido por microRNA (<i>microRNA induced silencing complex</i>)
UPL	Unidad de producción lechera
Vif	Factor de infectividad viral

1. INTRODUCCIÓN

El Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV)¹ clasifica al *Virus de inmunodeficiencia bovina* (BIV) como miembro del género *Lentivirus* de la subfamilia *Orthoretrovirinae* dentro de la familia *Retroviridae*. Los retrovirus se caracterizan por la expresión de la retrotranscriptasa, enzima que cataliza la transcripción de ADN de doble cadena a partir de ARN de cadena sencilla, este material genético se integra al genoma del hospedero en forma de “provirus”. El provirus permanece latente por mucho tiempo sin ocasionar trastornos patológicos aparentes al hospedero. Algunos factores predisponentes como la infección concurrente, edad o estrés, pueden reactivar el provirus que genera la síntesis de partículas virales infecciosas e inicia la patogénesis en el hospedero. El BIV ha sido asociado a diversos cuadros: linfadenopatía, linfocitosis, lesiones en sistema nervioso central, emaciación progresiva, baja en la producción de leche, baja en la respuesta blastogénica linfocítica y síndrome parapléjico bovino. El BIV puede causar disfunción inmune, haciendo a los bovinos vulnerables a infecciones secundarias, además de generar infecciones persistentes.

La vertiente actual de la investigación en torno al BIV desemboca en dos direcciones:

- El estudio de la biología molecular del virus para dilucidar el rol de diversos genes en la regulación de su replicación.
- La infección del BIV en ganado por su posible rol en una disfunción inmune. No hay mucha evidencia experimental en este campo, probablemente por el escaso número de aislados virales disponibles en el mundo.

Los estudios básicos del BIV están enfocados a la identificación de fragmentos del genoma viral que ayuden a comprender de mejor manera los mecanismos de patogenicidad de los lentivirus; dado que no representa un peligro biológico para el humano, el BIV es un buen modelo de estudio del *Virus de inmunodeficiencia humana* (HIV). Los lentivirus como el BIV tienen potencial para ser utilizados en

terapia génica ya que pueden infectar células que no se dividen y debido a que éste no es un virus patógeno para primates, puede representar un candidato más seguro para la terapia génica. Por otra parte, el estudio de su rol en la salud bovina sigue en progreso, por lo que su presencia no debe ser ignorada y necesita ser observada.

Contexto histórico

En 1969, Martin Van der Maaten reportó² en Lousiana (EUA), el caso de un bovino con una marcada emaciación, letargia, desórdenes neurológicos y un conteo elevado de leucocitos; se trataba de una vaca lechera gestante de ocho años de edad identificada como R-29. El posterior examen histopatológico de este caso reveló una hiperplasia folicular generalizada en los linfonodos e infiltrado perivascular en cerebro. El virus aislado indujo en el cultivo celular la formación de sincitios y fue estructuralmente similar al entonces nombrado *Virus de Maedi Visna* (hoy clasificado dentro de la especie *Lentivirus de pequeños rumiantes*, SRLV, según el ICTV¹), por lo que se le conoció como Virus bovino *visna-like*³. La biología de este virus no fue estudiada a fondo sino hasta el descubrimiento del *Virus de inmunodeficiencia humana* (HIV)⁴, en 1983, cuando se descubrió que el aislado R-29 era un lentivirus muy similar al HIV. La nomenclatura y clasificación taxonómica del BIV se basaron en sus características genéticas, morfológicas y serológicas similares al HIV y al *Virus de Inmunodeficiencia del Simio* (SIV)⁵⁻⁷. Existen otros tres retrovirus bovinos descubiertos: el *Virus sincitial bovino*, un espumavirus apatógeno; el *Virus de la leucemia bovina* (BLV), un delta-retrovirus, agente causal de la leucosis enzoótica bovina, enfermedad neoplásica de gran importancia en la producción bovina; y el *Virus de la enfermedad de Jembrana* (JDV), causante de una enfermedad aguda en ganado balinés, solo identificado en esta región geográfica y que no ha sido diferenciado serológicamente⁸. La generación y caracterización de las clonas cDNA infecciosas del BIV106 y del BIV127 derivadas del aislado R-29 permitieron estudios extensivos de la biología

molecular del BIV^{9,10}. Posteriormente, se realizaron dos aislamientos de campo denominados FL491 y FL112, asociados a un cuadro de linfocitosis¹¹. Sin embargo, la principal información sobre su comportamiento molecular, patológico y serológico se ha generado a partir del aislado R-29⁸.

El estudio de la complejidad genética del BIV comenzó en la década de 1990 con protocolos de *northern blotting* y con el estudio de cDNA utilizado para caracterizar transcritos virales, lo que, junto con la secuenciación nucleotídica íntegra del provirus, permitió a Gonda y cols. describir la organización genómica del BIV^{12,13}.

Relación con otros lentivirus

El género *Lentivirus* agrupa taxonómicamente por sus características al HIV, SIV, *Virus de Inmunodeficiencia Felina* (FIV), *Virus de la Anemia Infecciosa Equina* (EIAV), SRLV y en ganado bovino al JDV y el *Virus de Inmunodeficiencia Bovina*¹ (**FIGURA 1**). Los lentivirus inducen trastornos patológicos degenerativos y crónicos en sus hospederos, comúnmente asociados con el desarrollo de lesiones mediadas por el sistema inmune. En contraste con otros retrovirus, los lentivirus pueden replicar en las células que no están en división. Además, el genoma del lentivirus le ofrece una estructura compleja que incluye genes accesorios o regulatorios que codifican proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica. El lentivirus más estudiado es el HIV, agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), sin embargo los otros lentivirus constituyen modelos animales alternativos para la investigación del HIV¹⁴. Las relaciones serológicas del BIV con otros lentivirus (HIV-1, EIAV y el SIV) han sido estudiadas por Battles y cols¹⁵. En este estudio, un ensayo de *Western blot* demostró que el antisuero contra el antígeno de cápside de BIV tiene reacción cruzada con los correspondientes antígenos de cápside y antisueros contra el EIAV, SIV y HIV-1. El alineamiento aminoacídico de la secuencia predicha de proteínas de cápside del BIV, SIV, EIAV y HIV-1 reveló un dominio altamente conservado abarcando

diez aminoácidos (p10). Gracias a un ensayo de inmunoprecipitación de la proteína p24-HIV y de las p26, p23 y p10 del BIV con un antisuero preparado contra un fragmento de 20 aminoácidos de la proteína de cápside del BIV, se demostró que la reactividad cruzada en las proteínas de cápside del HIV-1, EIAV y el SIV fue debida a la p10¹⁶.

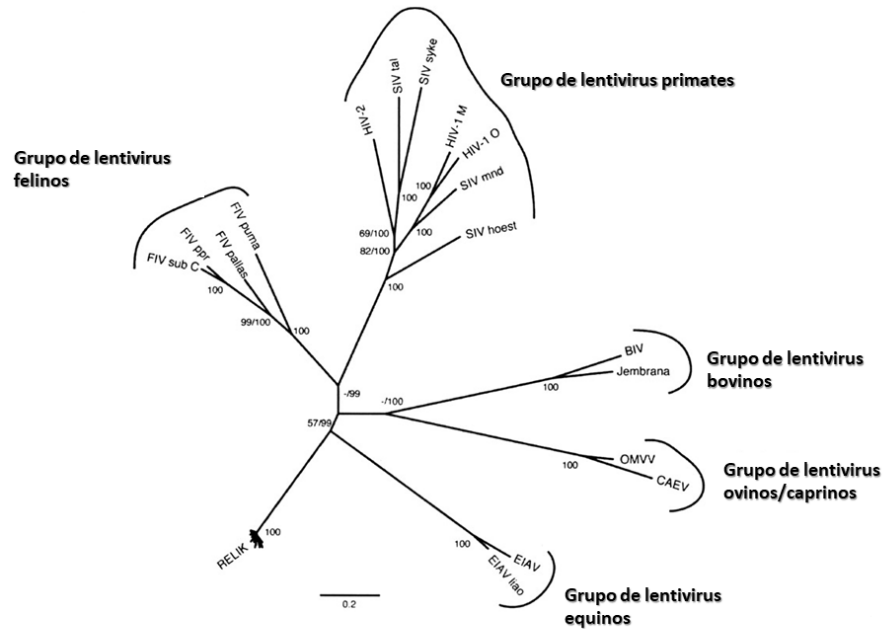


FIGURA 1. Esquematación de la filogenia de los lentivirus. Los valores de *bootstrap* y las posteriores probabilidades Bayesianas se indican a la izquierda y a la derecha de la barra diagonal, respectivamente. Destaca la similitud del BIV con el virus de la enfermedad de Jembrana, sin embargo éste solo ha sido descrito en ganado balinés. Modificado de¹⁷

Estructura genómica y función

El BIV es el lentivirus con la organización genómica más compleja conocida, esto por la cantidad de genes accesorios involucrados en la regulación de la expresión. El clonaje molecular y la secuenciación del provirus a partir del estudio de células infectadas permitió en 1995 el mapeo integral del genoma del BIV, disponible en el GenBank¹⁸ con el número de acceso M32690^{9,10}.

El virión contiene dos subunidades de ARN monocatenario con una longitud de 8960 bases de sentido positivo. Codifica los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, flanqueado en los extremos 5' y 3' por copias de la región repetida terminal larga (LTR), las cuales contienen secuencias promotoras, estimuladoras y finalizadoras de la transcripción. El BIV también contiene en la "región central" entre y a la vez superpuesta en los marcos de lectura de *pol* y *env*, esta región contiene exones de genes accesorios putativos no estructurales como el *vif* (factor de infectividad viral), *tat* (transactivador de la transcripción), *rev* (regulador de la expresión viral), *vpw*, *vpy* y *tmx* (**FIGURA 2**). Los productos de los genes accesorios *vif* y *tat* así como de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* del BIV han demostrado tener similitud en su secuencia con sus equivalentes en el HIV-1. Por otra parte, los genomas íntegros del BIV y del HIV-1 muestran una divergencia total, incluso cuando se observa gran similitud en los ORFs de *gag* y *pol*^{12,19}.

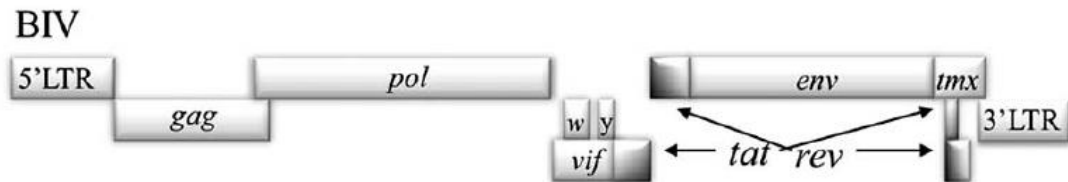


FIGURA 2. Mapa genómico del BIV. El BIV codifica los genes típicos de los retrovirus: *gag*, *pol* y *env*; sin embargo también destaca por tener la conformación genómica más compleja de los lentivirus, al codificar los genes accesorios *vpw*, *vpy*, *tmx*, *tat*, *rev* y *vif*. Modificado de²⁰.

La proteína Tat es una proteína no estructural con función reguladora. El gen *tat* del BIV codifica para la proteína Tat que básicamente potencializa (*enhancement*) la transcripción del ARN viral. Dos exones codifican para la proteína Tat, el primero ubicado en el extremo 5' del gen de la envoltura ubicado en las coordenadas nucleotídicas con rango de posición 5228-5236 y el segundo es codificado por un exón localizado en el gen de la envoltura en las posiciones 7657 – 7782^{21,22}. Después de su expresión en la célula hospedera, la proteína Tat se une a una estructura en forma de asa de ARN viral llamada elemento de respuesta trans-activadora (*trans-activating response element*, [TAR]) el cual está localizado en el extremo 5' de los transcritos del BIV. En asociación con el factor de elongación de la transcripción positiva (*positive transcription elongation factor* [P-TEFb])²³, la proteína Tat potencializa la producción de ARN viral genómico. También se ha reportado que la Tat-BIV tiene una función proapoptótica, lo cual ha sido correlacionado con los efectos citopáticos observados en cultivos celulares. La BIV Tat también influye en la dinámica de microtúbulos de la célula hospedera²⁴. La internalización de la Tat-BIV en células infectadas ayuda al BIV a influir en células vecinas, propiciando el ambiente celular para la replicación viral²⁵. Han sido descubiertas diversas funciones de la Tat-BIV mediante el análisis de la proteína TNRC6B, un componente del complejo de silenciamiento inducido por microRNA (*microRNA induced silencing complex*) en la multiplicación celular²⁶. También se sabe que el *knock-down* de la proteína inducida (BHEXIM1) por la bisacetamida hexametileno bovina (*bovine hexamethylene bisacetamide* [HMBA]) potencializa la replicación del BIV y compite con la Tat-BIV al unirse a la B-ciclina T1²⁷. Esta información pudiera ayudar en el entendimiento del ciclo vital latente del BIV. El trabajo científico enfocado al estudio de la proteína BIV-Tat-TAR a la vez también ha sido importante para conocer mecanismos de regulación o inhibición de la proteína TAR del HIV-1²⁸.

Ciclo del BIV

El ciclo de infección del BIV fue estudiado y descrito en la década de 1990 por Matthew Gonda y Steven Oberste^{7,9,12,13} y se puede resumir en el siguiente texto:

Durante el ciclo de infección las partículas virales libres se unen a receptores específicos de la membrana celular mediante la glicoproteína de envoltura. Subsecuentemente, la envoltura viral se fusiona a la membrana citoplasmática dejando libre el ARN genómico viral unido a las proteínas maduras del gen *pol* que se transfiere desde la matriz viral hacia el citoplasma de la célula hospedera. La retrotranscriptasa transcribe el ARN viral en ADN bicatenario, el cual es después transportado hacia el núcleo donde se incorpora al genoma hospedero con la ayuda de la enzima integrasa (IN). El provirus integrado permanece silencioso transcripcionalmente hasta que las señales celulares apropiadas activan la expresión génica de las LTRs virales. La expresión se potencializa por acción de la proteína Tat. El *splicing* de ARN genómico viral en mensajeros sub genómicos y el transporte de los mismos al citoplasma es llevado a cabo por la maquinaria de *splicing* propia de la célula y por la proteína viral 'Rev' (regulador de la expresión viral). Los mRNAs sub-genómicos se traducen en los ribosomas de la célula infectada. Los precursores virales de Gag (antígeno de grupo específico) y Gag-Pol se ensamblan a través de la membrana plasmática y rodean el ARN viral genómico durante la gemación. La envoltura viral se compone de las glicoproteínas de superficie (SU) y de transmembrana (TM). Después de la liberación, los precursores de Gag en la partícula inmadura se fraccionan en sus subunidades funcionales por acción enzimática de la proteasa (PR) viral; es en este momento que la partícula viral o virión se considera infecciosa y madura¹³.

El virión puede comenzar un nuevo ciclo mediante la unión a una célula virgen que exprese el receptor apropiado (**FIGURA 3**).

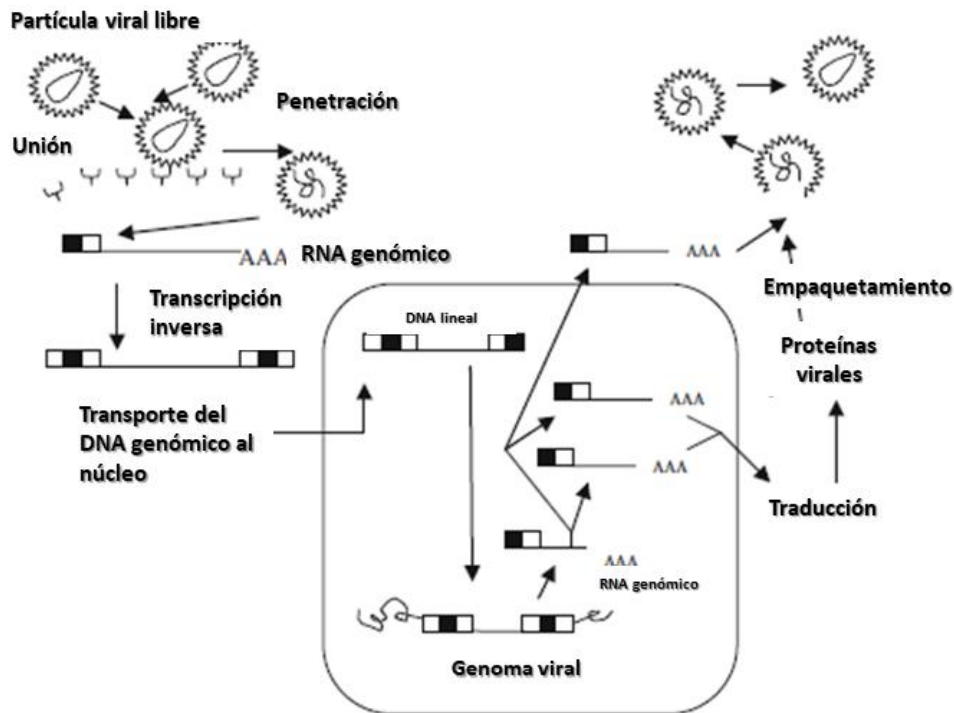


FIGURA 3. Esquema del ciclo de replicación del BIV. El ciclo de este virus es similar al de otros lentivirus, con la particularidad que la proteína de superficie (gp100) se une a los receptores CCR y CXCR de linfocitos y monocitos. Modificado de²².

Diversidad genética

El género *Lentivirus* se caracteriza por presentar variaciones antigénicas que evaden la respuesta inmune y así se replican rápidamente para producir una gran cantidad de partículas virales. La diversidad genómica en los lentivirus ha sido atribuida a mutaciones, eventos recombinantes y a la presión selectiva a la que son sometidos^{29,30}. La persistencia lentiviral en la célula hospedera es otro mecanismo para generar infecciones latentes. Hay varios reportes enfocados al estudio de la variación o conservación en ciertas regiones genómicas del BIV; se ha observado una variación limitada durante la fase de persistencia a largo plazo

en las células hospederas al comparar las secuencias del gen *env* del mismo virus aislado después de 4-5 años de la primo-infección³¹.

La variación genética ha sido reportada principalmente en las regiones genéticas *pol* y *env*^{11,32-35}. Suarez y cols¹¹ compararon secuencias nucleotídicas de la región RT del gen *pol* de trece aislados del BIV donde se demostró que había 10 % de divergencia en la homología nucleotídica y 11% en la de aminoácidos. No hubo variación de tamaño en la región RT de ningún aislado. La variación de la secuencia en esta región fue uniforme. Las regiones conservadas en el dominio RT del gen *pol* mantuvieron la identidad del BIV al compararse con secuencias del HIV-1. Dado que algunos estudios han demostrado la escasa presencia de sustituciones en el dominio RT y que éstas, en caso de suceder afectan evolutivamente al BIV, Cooper y cols.³² proponen que la existencia de cuasiespecies de *pol* es debida a la presencia de cambios aminoacídicos no conservativos.

La variación genética ha sido más observada en la proteína SU y cualquier cambio en ésta puede alterar el tropismo celular³⁶. La variación en el tamaño de la proteína SU es un fenómeno común debido a eventos recombinantes; los virus de tamaño variable tienen ventajas en la antigenicidad y multiplicidad³⁷. Suarez y cols^{11,34,38} describieron fenómenos de variación en la región SU, identificaron y caracterizaron seis regiones conservadas y seis regiones hipervariables, además de cinco sitios conservados en los sitios de N-glicosilación de distintos aislados y reportaron diferencias de gran tamaño (104 nucleótidos) en el gen SU, siendo más importantes en las regiones hipervariables V2, V4 y V6. En la comparación de secuencias del gen de la proteína SU del caso R-29 con aislados derivados de éste, se observó un 5% de divergencia. Las variaciones debidas a nueve cambios aminoacídicos se encontraron diseminadas a lo largo del gen que codifica para la proteína SU; siete de los nueve cambios fueron en regiones conservadas. Las regiones conservadas de la proteína SU han sido descritas como aquellas mayores a 12aa con menos del 10% de divergencia comparándose con la

secuencia consenso. Por otro lado, la región hipervariable se definió como la región con más de 12 aa y más del 30% de divergencia comparada con la secuencia consenso³⁴.

Se tiene información limitada de la variación en otras regiones genéticas del BIV.


```

C1                                     C2                                     V1
R29-127 MDQDLDAERGERGGGSEEL--LQEEINEGRILTAREALQTWINNGEIHPPWVLGMLSMGVGMLLGVYQQLPDTLIWILMF
R29-289 .....R.....K.....
FL112 .....RV...GE.R.D..RLLI..DLDL...TK.T.TA.S.....T.M.I.....M.NI.GPVT.L.I.I.
FL491 .....RV...GE.R.D..RLLI..DLDL...TT...A-S.....T.M.V.....M...SI.G.V..L.I.L
OK 14 .....RV...GE.R...RIL...D.GQD...T...TK.....I.....TP.SE...L.I.
OK 40 .....RV...GE.R...RIL...D.GQD...T...TK.....I.....TP.SE...L.I.S

*                                     V2
R29-127 QLCLYWLGLGETSRELDKDSWQWVTSVFIILQVLTMTAGTALADDDQSTLIPNIT.....KIPTRKDTPE
R29-289 .....K.....AT.....
FL112 .....I.LAF.....R.VN..N...G.L.G.....A.P.DTHSDPENITYKVDVPP-----
FL491 .....I.LA.....R.NG...N...G.I.MG...S...T.ESSRGVAP-----
OK 14 .....I.....K.RE..H.....L.....F...GDYVTS.ATAPLGLNETESPVFSTI.TL.N...
OK 40 .....I.....K.RE..H.....L.....I.F...EVY.AS.ATAPLDFNETVHPVSSTL.T.N...

C3
R29-127 GCTYPWI-----LILLILAFILGLIGIILVLRNSNSEDILAROTIOWLSAN
R29-289 -----
FL112 -----SVPENITREVINGSVDTDPCTGPCHTNMQDT..F.G.VC...F.V.IAM...PGG.S..AV.....
FL491 -----SVPENITPKDIKGS EDTD---PYHANMPYT.TI.G.VC...L.V.IAM...P.G.....AV.....
OK 14 PVP.T-----EPPVSSTKKPTPDGTESCHNYMQGT.TG..C.ST.V...V.AM.....G.....
OK 40 PV-FST.KTLTNDNEPPVSSTIKPTNGTESCHNYIQGT..G..CVST.V...V.AM.....G.....

* * *                                     C4
R29-127 QEIPPKFAPPIILISSPLAGIDYVYMERHLEIFKKGCCQICGSLSMWGMLEEIGRWLARREWNVSRVMVILLISFSWGM
R29-289 .D.....T.....R.....S.....V.....
FL112 K..L.TV.....TM.WF..K.YSKTLEG..F...L...V...R.TH..S..IV..F.....
FL491 K..L.TV.....M.F..DKYSK.L.G..F..I.L...I...R.TH..S..LV.....
OK 14 .V.L.Y.I..F.A.....-KYS.V.....A..L...MMV...R.TH..S..IV.L.....
OK 40 .V.L.Y.I..F.A.....-KYS.V.....A..L...M.V...R.TH..S..IV.L.....

* * *                                     V3
R29-127 YVNRVNA--SGSHVAMVTSPPGYRIVNNTSQAPWYCFSSAP IPTCSSQNGDKYFEKINETLVKQVYEQAAKHSRATWI
R29-289 N.....T.....
FL112 HISK.ERE--L.....K..F..N...S.R...G...Q..V.G.V...LIKK.EG.T.R..
FL491 .TSK.GVEAT.R.L.....K..FG..Q...S.R..A..G..YQ..V.S.V.E.LFKRIE...S..
OK 14 WTQG.G--E...I...F.L...KI...L.....RPL..EQ..YQG..ESKV.HKLSGW.E.Y...A..
OK 40 WAQ.G--E...I...F.L...KI...L.....RPT..EQ..YQGTLESKV.NELLKSSE.Y...

C5                                     * * *                                     V4
R29-127 EPDLLEEAVYELALLSANDSRQVVVENGTDVCCSSQNS-----STNKGHPMTLKLKQVSETWIGNSGL
R29-289 .....M..T.....
FL112 ...F..VI.....G.Y..K.S.D..I.DTS..SQDG-----DQT..R.D..NL.D.VW.....
FL491 ...F..VI.....G.Y..RAS.N..I.DTS..TQDG-----NQT..R.D.KENL.S..V.....
OK 14 ...F..VI.....G...TAT.N..M.NGSDTFQNT-----QT...D.NTPI.D.....
OK 40 .....V.....G...TAI.N..M.NESGTPKNQTDQTMMLNLTNQTSTQ.T..VN.TS.L.D..W.T...

* * *                                     V5
R29-127 QFCVQWPYVLVGLNNEED-SNISFNSGDWIATNCMHPITLNKSAQDLGKNFPRLTF--IQG--QLSOLKNTLCGHNTNCLK
R29-289 .....
FL112 ..G.H.HI...F.S.E-TPTD..NDT...S.D..Q...SEE.KN-LS.PISCVNSTITRVCGRND...Y.MD..N
FL491 ..G.H...I.Y...NITSGNY.ND...D..Q..Q.EK..E..-G.PISCVKKNITGWCVOAS...Y...
OK 14 T.....I.R.G.K-D--STP.LV...D..G.T.TKEE.E.L-S.F.PCSNNA--PGCK..E.Y...E
OK 40 NVWCPVA...I.T.G.K-E--STEN.....NS.S...REE...LPS...RCGDKT--SVCR.TG.I..YEA...

* * *                                     V6                                     C6
R29-127 FGNKSFSTNSLILCQDNPIGNDT-----FYSLSHSFSKQASARWILVKVPSYGFVVVNDIDTPPSLRIRKPR555
R29-289 .....L.....
FL112 ..KRAL...V..K.GTDD-----NNT.H...Y...Y...G.SLP.N...526
FL491 ..ERA.....R.ETSQG-----NETSNKI...HK...YA..P.N..R..576
OK 14 ..ERA.....PTANTD.S.CPTNNTDNSTANSP...Y...N.F...L..H...607
OK 40 ..ERA.....PKAN.D.G--PTNSTDNSTAYSP...Y...K.F.R...L..H...630

```

FIGURA 4 Esquematzación de las regiones conservadas e hipervariables de la proteína de SU del gen *env* del BIV. Las regiones conservadas se muestran con una línea gruesa y continua, nombradas de la C1 a la C6 y las hipervariables con una línea punteada, nombradas de la V1 a la V5. Tomado de³⁹.

Patogénesis

Como sucede con otros lentivirus, el BIV infecta células del sistema inmune, principalmente macrófagos/monocitos y linfocitos⁷. Algunos ensayos *in vitro* han demostrado que el virus puede tener un tropismo más amplio, observándose la replicación también en fibroblastos formando sincitios y muerte celular¹⁹. Se han podido establecer infecciones productivas en cultivos primarios a partir de tejidos bovinos como bazo, cerebro, pulmón, plexo coroideo, testículos, timo, riñón y membrana sinovial¹⁰. Además, se han utilizado líneas celulares de origen bovino, la línea EREp (epitelio embrionario de conejo) y la línea Cf2Th (timo de perro); se sabe que estas últimas pueden sostener una infección prolongada⁴⁰. En células mononucleares de sangre periférica (CMSP) colectadas de animales infectados naturalmente, el BIV ha demostrado infectar y transcribir su genoma en diferentes subconjuntos de células: CD3+, CD4+, CD8+, células T γ - δ , células B y monocitos^{35,41}.

La patología del BIV tiene mayor similitud a la de aquellos lentivirus que causan enfermedades inflamatorias crónicas como los SRLV (CAEV y MVV), comparado con aquellos que causan inmunodeficiencias severas como el HIV, el FIV y el SIV. Sin embargo, hay evidencia experimental que sugiere que el BIV puede causar disfunción inmune y predisponer infecciones secundarias: un estudio desarrollado a largo plazo (más de siete años) en un hato lechero de la *Louisiana State University* con alta seroprevalencia del BIV, reportó también una alta incidencia de enfermedades comunes que reducen la viabilidad económica lechera⁴². Este hato contaba con un alto porcentaje de vacas con encefalitis asociada con aletargamiento, estupor, alteración del sistema inmune asociado con infecciones bacterianas secundarias y lesiones inflamatorias crónicas en extremidades. La examinación histológica del cerebro de animales infectados por el BIV en este hato reveló un infiltrado perivascular no supurativo, sugestivo de meningo-encefalitis viral. Estas lesiones del sistema nervioso central fueron similares a aquellas descritas previamente por Van Der Maaten y cols.,³ y no pudieron ser

atribuidas a otras infecciones virales. Posteriormente, otros estudios fueron llevados a cabo para dilucidar la patogénesis del BIV^{3,11,43}. En estos se observó que la infección experimental de becerros con el aislado R-29 derivó en la inducción de una linfocitosis transitoria y de un cuadro de linfadenopatía sin otros signos clínicos aparentes. Se han llevado a cabo diversas investigaciones enfocadas a la disfunción inmune en animales infectados experimentalmente. Onuma y cols⁴¹ demostraron que la infección por BIV causa la reducción de respuesta de diversas funciones monocíticas sin un cambio en la relación CD4/CD8; Zhang y cols⁴⁴ observaron un descenso en la relación CD4/CD8 y un incremento en la proliferación linfocítica a las 2-6 semanas post –infección en becerros, sugiriendo una posible disfunción inmune. Los anticuerpos anti BHV-1 y aquellos inducidos por la vacuna contra la diarrea viral bovina fueron significativamente menores en becerros infectados que en los controles no infectados.

Se ha reportado también que el BIV favorece y potencializa la infección por el BLV: un estudio⁴⁵ con dos grupos experimentales infectados con el BLV, uno previamente infectado con el BIV y el otro sin infectarse, demostró que los valores de títulos de anticuerpos anti-BLV, el número de sincitios celulares inducidos por BLV, la carga proviral del BLV y la expresión del gen tax-BLV (factor asociado a cuadros neoplásicos) fueron considerablemente más altos en animales coinfectados con el BIV.

A la vez, en un estudio⁴⁶ reciente se sugiere que el BIV pudiera tener un potencial oncogénico, ya que se reporta la aparición de linfomas multicéntricos de células B en bovinos negativos al BLV pero positivos al BIV (incluso se encontraron secuencias provirales del BIV en los tejidos tumorales).

A pesar de la evidencia experimental tangible, hay autores que sugieren que la relevancia del papel del BIV en la salud del ganado bovino permanece controversial, ya que existen estudios que han mostrado pocos o nulos resultados

relevantes en pruebas de blastogénesis linfocítica, pruebas de función neutrofílica, análisis de subpoblaciones mononucleares y cambios histopatológicos^{43,47,48}.

Respuesta inmune

Respuesta humoral

Se han detectado anticuerpos específicos en becerros inoculados con la cepa R-29 del BIV a las dos semanas post inoculación y se ha demostrado que persisten por cuatro años⁴⁹. Mediante ensayos de *Western blot*, se ha descubierto que la primera respuesta humoral se monta contra la proteína p26, seguida de la gp110 (SU), p55 (poliproteína precursora Gag-Pol), gp42 (TM), p18 (MA) y p13 (NC). Hay estudios que demuestran que la p26 es la proteína más inmunodominante del BIV, al menos en animales infectados experimentalmente. Los anticuerpos pueden ser detectados a las dos semanas PI y pueden durar dos años. En contraste, anticuerpos anti-TM aparecen más tarde que los anti-p26 pero persisten por más de cuatro años⁵⁰⁻⁵². También se ha demostrado que el suero inmune de animales infectados con otros virus bovinos como el *Virus de la diarrea viral bovina* (BVDV) y BLV no son reactivos con el antígeno p26-BIV en *Western blot*, lo que evidencia la especificidad de los anticuerpos anti-p26⁵³. Debido a esto, se han desarrollado varias herramientas diagnósticas para la detección de estos anticuerpos.

Respuesta inmune celular.

La inmunidad mediada por células no ha sido evaluada a gran detalle, sin embargo existen estudios del efecto de la infección por el BIV en la respuesta de linfocitos T a los mitógenos y otros agentes virales. En becerros infectados, se ha observado un incremento significativo en la proliferación específica de linfocitos al antígeno Gag a las 2-6 semanas PI, mientras que no se observó un incremento en la proliferación de linfocitos a los mitógenos y a antígenos del Virus Herpes Bovino 1 (BHV-1) y BVDV. La relación CD4/CD8 también disminuyó durante 2-7 semanas PI sugiriendo una disfunción inmune⁴⁴. La reducción de la respuesta

linfoproliferativa a antígenos específicos o a mitógenos se demostró con células mononucleares de bovinos⁴⁸ y ovinos⁵⁴ expuestos experimentalmente al BIV.

Diagnóstico

Aislamiento viral

El aislamiento viral es considerado la prueba de oro para el diagnóstico de varios patógenos. El aislamiento del BIV, especialmente a partir de animales infectados naturalmente ha sido difícil y hasta ahora sólo se reportan cuatro aislamientos exitosos: el primero fue a partir de una vaca con linfocitosis persistente llamada R-29³. Los otros tres son el BIVCR1 de Costa Rica⁵⁵ y FL491 y FL112 de Florida, EUA¹¹. Los cuatro aislamientos se lograron por técnicas de co-cultivo utilizando PBMC de los animales infectados con células de bazo de feto bovino, células de pulmón de feto bovino o células embrionarias de conejo¹¹. Debido a las dificultades en el aislamiento, los métodos serológicos y moleculares han sido adoptados para el diagnóstico del BIV.

Diagnóstico molecular

El diagnóstico del BIV mediante PCR es considerado un método adecuado para detectar animales infectados. Desde la década de 1990 hasta la actualidad se han evaluado diversos ensayos de PCR para la detección de ADN proviral del BIV en células mononucleares, observándose también diversos resultados^{56,57}. Una PCR anidada (nPCR) dirigida a dos regiones de *pol* y *env* mostró ser más sensible que los ensayos de serología y aislamiento¹¹, además se observó que los iniciadores que hibridaron en el gen *env* tuvieron mayor especificidad, lo que sugiere una opción más apropiada para la evaluación de muestras de campo. En otro estudio, los iniciadores para amplificar un fragmento del gen *pol* fueron de 30 a 100 veces más sensible que los diseñados para el gen *env*⁵⁸. En un estudio llevado a cabo en India⁵⁹, fueron evaluados iniciadores específicos que hibridan en el gen *gag* para detectar BIV en muestras de sangre y leche; aunque en este estudio no se

estimó la sensibilidad, todas las muestras positivas fueron específicas al BIV mediante nPCR y análisis de restricción.

Diagnostico serológico

El aislado R-29 ha sido utilizado como fuente de antígeno para ensayos serológicos desde antes de la disponibilidad de antígenos recombinantes hasta 1999^{49,60-62}. Hay autores que han especulado que el uso exclusivo del antígeno derivado de BIV R-29 puede derivar en resultados falsos negativos en animales infectados con otras variantes^{9,15}. Posteriormente, el uso de proteínas virales recombinantes en sustitución de proteínas nativas facilitó el estudio de la seroepidemiología de la infección por el BIV^{52,63,64}. El ELISA indirecto basado en proteínas recombinantes de cápside o de la proteína de transmembrana expresada en baculovirus ha sido utilizado por algunos investigadores para el diagnóstico serológico^{51,64}. También se ha clonado el gen *gag* del BIV en un sistema de expresión en baculovirus y en sistemas procariontes como proteína de fusión⁶⁵. En el estudio de Zheng y cols⁶⁴ se cuantificó la parte bacteriana de la proteína de fusión en el sistema TrPE en un 50% del total de la proteína aislada, lo que ha implicado un problema para su uso en ensayos de ELISA. Por otro lado, utilizaron la proteína recombinante de cápside para llevar a cabo ensayos de *Western blot* y de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra BIV. Finalmente, utilizando anticuerpos monoclonales anti-cápside en ensayos de unión competitiva lograron la identificación de al menos tres distintos determinantes antigénicos en la proteína⁵³. No existen reportes referentes a la evaluación de pruebas con inmunodifusión en gel agar.

Epidemiología

Los reportes de seroepidemiología sugieren la presencia cosmopolita de la infección por el BIV. Debido a la falta de aislados del BIV y las dificultades para producir grandes cantidades de antígeno, hasta mediados de la década de 1990 sólo algunos países habían realizado evaluaciones serológicas. Posteriormente, el desarrollo de antígenos recombinantes facilitó los estudios serológicos. La expresión de la proteína p26 de cápside del BIV en sistemas procariotas y el uso de la proteína recombinante p26 en *Western blot* permitieron una exploración más sencilla de la seroepidemiología del BIV⁶³.

El tamizaje serológico en ganado seleccionado aleatoriamente utilizando el aislado R-29 como fuente de antígeno ha mostrado una distribución no uniforme en los EUA^{8,61}. Del sureste y suroeste de los EUA, aproximadamente un 4% de sueros dieron resultados positivos⁶⁶, mientras que aquellos provenientes del norte raramente han resultado positivos⁶⁷. Un ensayo de *Western blot* quimioluminiscente detectó anticuerpos anti-BIV en el suero de 5.5% de 928 vacas adultas en Ontario⁶⁸. En Alemania, las muestras de suero de 6.6% de 380 bovinos fueron positivas a las presencia de anticuerpos anti-BIV mediante cell-ELISA e inmunofluorescencia⁶⁹. En Francia, un antígeno recombinante de 53kDa del BIV R-29 se utilizó y mostró menor reactividad con estos sueros franceses, comparado con aquellos de Louisiana, lo que sugirió la presencia de variantes del virus entre ambas regiones⁷⁰. En Hokkaido, Japón, hay un reporte de la seroprevalencia del BIV de 7.5% en un hato de 120 bovinos⁷¹. Además de estos reportes, la evidencia serológica se ha reportado en Italia⁷², Australia⁷³, Corea del Sur, Brasil⁷⁴, Zambia⁷⁵ y Pakistán⁷⁶ (**CUADRO 1 y FIGURA 5**).

La transmisión del BIV ocurre tanto horizontal como verticalmente^{77,78}, ya que se ha determinado que este evento se presenta al compartir material contaminado con sangre entre bovinos (agujas, material quirúrgico etc.), o bien al transferirse vía transplacentaria o lactogénica. También se ha encontrado ADN proviral en muestras de leche y de semen de bovinos infectados⁷².

Por otra parte existe evidencia de que la inactivación del BIV se logra ante su exposición a 47°C por 30min y mediante condiciones de pasteurización a baja y alta temperatura⁷⁹.

CUADRO 1 (1ª parte). Recopilación de los datos disponibles respecto a estudios de presencia y/o prevalencia del BIV en diferentes países

Referencia	Ubicación geográfica del hato estudiado	Prueba utilizada	Población estudiada	Tasa de prevalencia en la población estudiada
69	Alemania	cell-ELISA	380 BPL	6.6%
80	Argentina	iELISA (antígeno p26)	589 BPL	42%
73	Australia	iELISA (antígeno p26)	690 bovinos	3.8%
81	Brasil	PCR (gen <i>pol</i>)	607 BA	4.4%
82	Camboya	Western blot (antígeno p26)	544 BPL 42 BA	26.3 16.7%
68	Canadá	Western blot quimioluminiscente	920 bovinos	5.5%
83	Corea del Sur	Western blot	260 BPC	33%
55	Costa Rica	Western blot	1 caso aislado	N/A
78	EUA	iELISA (antígeno p26)	442 BPL	50%
70	Francia	iELISA (antígeno p53)	398 BPL y BPC	3.8%
84	Gran Bretaña	iELISA (antígeno p26)	514 BPC 457 BPL	5.1% 5.9%

BPL: Bovinos destinados a la producción de leche

BPC: Bovinos destinados a la producción de carne

BA: Búfalos acuáticos

iELISA: Inmunoensayo de adsorción ligado a enzimas indirecto

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

IFA: Inmunofluorescencia

CUADRO 1 (2ª parte). Recopilación de los datos disponibles respecto a estudios de presencia y/o prevalencia del BIV en diferentes países

Referencia	Ubicación geográfica del hato estudiado	Prueba utilizada	Población estudiada	Tasa de prevalencia en la población estudiada
62	Holanda	iELISA (antígeno p26)	957 BPL y BPC	1.4%
59	India	PCR basado en gag	100 BPL	10%
85	Indonesia	iELISA (antígeno p26)	77 bovinos de raza balinés	36.4%
86	Irán	PCR (gen gag)	143	20.3%
72	Italia	IFA	3166 BPL 138 bovinos sementales	2.5% 5.1%
71	Japón	Western Blot	390 bovinos	11%
87	Nueva Zelanda	Western Blot	1 caso aislado	N/A
76	Pakistán	Western blot	370 búfalos acuáticos 76 BPL	10.3% 15.8%
88	Turquía	iELISA (antígeno p26)	300 bovinos	12.3%
75	Zambia	iELISA (antígeno p26)	262	11.4%

BPL: Bovinos destinados a la producción de leche

BPC: Bovinos destinados a la producción de carne

BA: Búfalos acuáticos

iELISA: Inmunoensayo de adsorción ligado a enzimas indirecto

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

IFA: Inmunofluorescencia

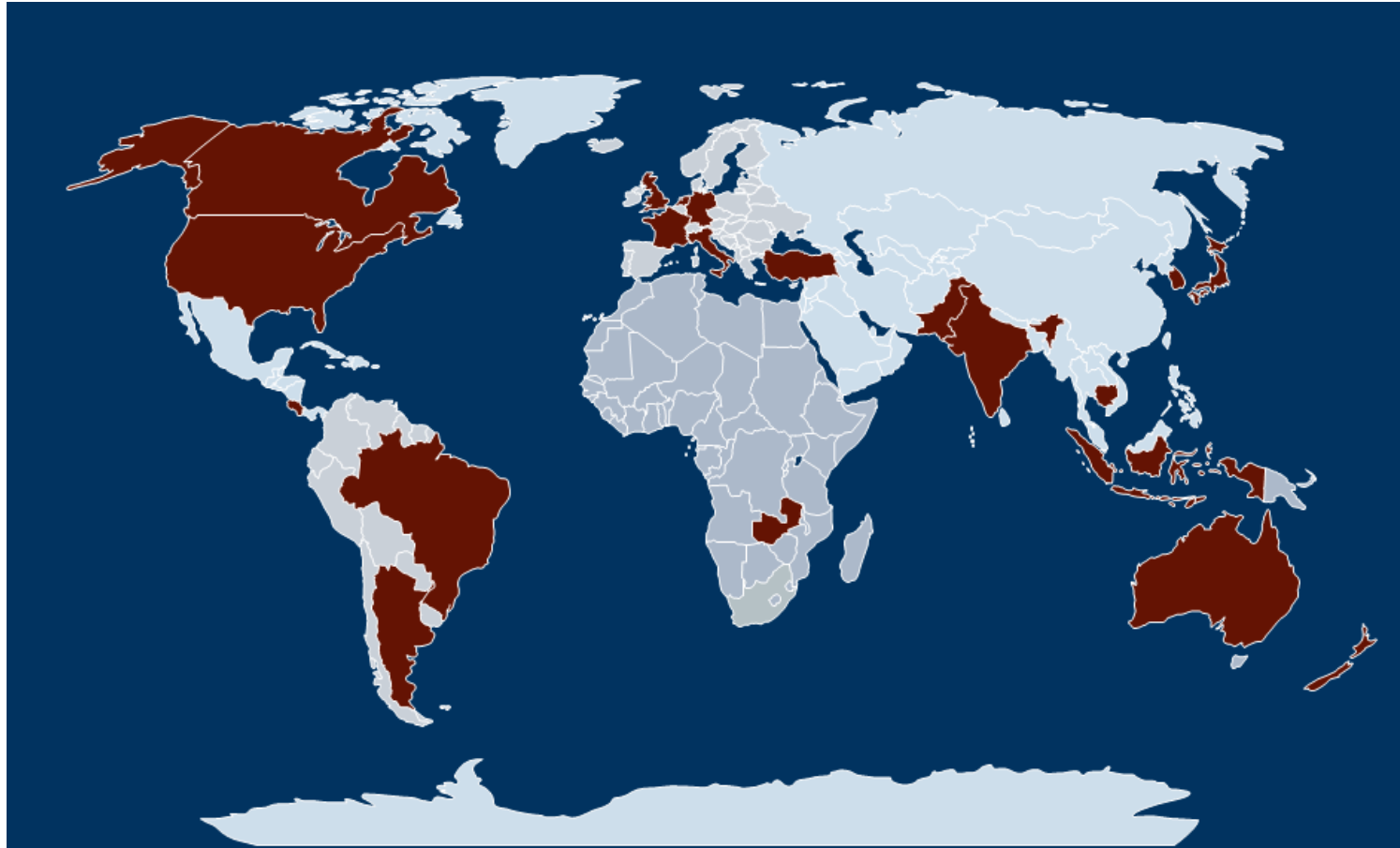


FIGURA 5. Distribución geográfica de la infección por el BIV. El BIV ha sido encontrado en todo país que lo haya buscado, por lo que se hipotetiza que su distribución es cosmopolita. Resaltados en marrón destacan los países que cuentan con al menos un reporte de la presencia y/o prevalencia de la infección por el BIV, la profundización de esta información y las referencias se encuentran en el **CUADRO 1**.

Estatus de la infección en México

Observando el escenario internacional se hipotetiza la presencia del BIV en todo el mundo, por lo que no sería sorpresa encontrar esta infección en ganado mexicano. Por otro lado, el monitoreo intermitente de la infección por el BIV en ganado puede ayudar a reconocer posibles cambios en el virus.

2. JUSTIFICACIÓN

En México no hay evidencia científica de la presencia de la infección por el BIV, sin embargo se han correlacionado los cuadros de leucosis enzoótica bovina (enfermedad clasificada por la SAGARPA como endémica de notificación obligatoria) con los de inmunodeficiencia bovina, principalmente en hatos lecheros de Estados Unidos de América y Canadá (donde además se ha reportado alta frecuencia de la infección), países de suma importancia en el aporte genético para el ganado bovino mexicano. Asimismo, la transmisión del virus se facilita por las recurrentes prácticas inadecuadas de manejo del ganado, principalmente aquellas que implican la utilización de material contaminado con sangre infectada. El cuadro de inmunodeficiencia progresiva asociado a la infección por el BIV representa una pérdida económica sustancial, además de favorecer infecciones secundarias que pueden enmascarar la posible participación del BIV como patógeno primario. Este aspecto hace necesario generar información que permita monitorear la posible presencia del virus infectando ganado lechero nacional. Por otra parte, no existe kit comercial para la identificación de la infección por el BIV, existen muy pocos aislamientos en el mundo y no es posible la obtención del virus mediante catálogos comerciales, por lo que es necesario el desarrollo y evaluación de herramientas de detección.

3. HIPÓTESIS

El *Virus de Inmunodeficiencia Bovina* está presente en México y es posible identificarlo mediante el uso de un diseño experimental con estrategias de detección serológica y molecular.

4. OBJETIVOS

□ General

- Identificar la presencia de la infección por el BIV en bovinos ubicados geográficamente en alguna unidad de producción dentro de territorio mexicano.

□ Particulares

- Determinar la presencia del BLV en diversos hatos del país, mediante el uso de un Kit de ELISA comercial para detectar posible animales infectados con BIV
- Realizar el diseño de un péptido sintético para su síntesis y posterior utilización como antígeno en una prueba de ELISA.
- Diseñar iniciadores que hibriden en el gen *env* del BIV para identificar ADN proviral en leucocitos de sangre periférica (LSP) mediante la técnica de PCR.
- Estandarizar las condiciones de la PCR para la detección del BIV y si se obtienen amplicones positivos secuenciarlos por el método de Sanger.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos experimentales del presente trabajo se realizaron en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular (L-504) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala. Cuautitlán Izcalli Estado de México, coordenadas 19.6954734, -99.1903910) perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.1 Obtención y procesamiento de las muestras

La población de estudio se conformó según un muestreo no probabilístico por conveniencia con productores cooperantes donde se consideraron bovinos hembras que provinieran de una unidad de producción lechera (UPL) (ver apartado de **RESULTADOS** para consultar la población conformada).

De cada bovino se obtuvo una muestra de sangre completa en tubos con anticoagulante (10ml, 15 μ sp de heparina sódica, Vacutainer™, EUA) mediante venopunción coccígea. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 2500rpm para obtener dos fracciones: la fracción acelular (plasma) se reservó para la detección de anticuerpos anti-gp51 del BLV y de anticuerpos anti-gp45 del BIV mediante un ensayo indirecto por inmunoadsorción ligado a enzimas (iELISA) para cada infección. La fracción celular fue sometida a lisis de eritrocitos⁸⁹ con la finalidad de recuperar los leucocitos de sangre periférica (LSP). De cada muestra sanguínea, tanto los plasmas obtenidos como los LSP recuperados se almacenaron en un ultracongelador (DW-86L728, Haier®, Qingdao, China) a -75°C con la finalidad de formar un banco tanto de plasmas como de ADN genómico.

De los LSP se extrajo el ADN genómico mediante adsorción en membranas de sílice con columnas utilizando un kit comercial (FavorPrep™ Tissue DNA Extraction Mini Kit, FavorGen® Biotech Corp., Pingtung, Taiwan). El ADN se

cuantificó en un espectrofotómetro de micro-volúmenes (Nanodrop Lite 2000[®], Thermo Scientific[®], Waltham, MA, Estados Unidos) y se almacenó a -75°C hasta su uso.

5.2 Análisis serológico

5.2.1 iELISA BLV

Con el fundamento de la asociación reportada entre la infección por el BIV y por el BLV, en primera instancia se consideró reconocer la infección por el BLV mediante la detección anticuerpos contra la proteína de superficie (gp51) de este virus con un kit comercial (VMRD[®] Inc, Pulman, WA, EUA). El análisis serológico se realizó en la totalidad (n= 1168) de muestras de plasma colectadas, se siguieron las instrucciones del fabricante; los resultados se expresaron como absorbancia a una longitud de onda de 405nm, determinada en un espectrofotómetro de microplacas (Stat Fax[®] 3200, Awareness Technology Inc., Palm City, Florida, EUA).

5.2.1 iELISA BIV

Para la identificación primaria de animales infectados por el BIV se planteó un protocolo de iELISA de tercera generación. Se realizó el diseño de un péptido sintético derivado de una fracción de la región de transmembrana (TM-BIV) para su utilización como antígeno. Para ello, a partir de la deducción aminoacídica del gen *env* (nt 5415 – nt 8129) de la secuencia de referencia (NC_03020, GenBank¹⁸) del BIV, se realizó un análisis *in silico* con las herramientas bioinformáticas proporcionadas en línea *Immune Epitope Database and Analysis Resource*⁹⁰; la predicción de epítomos inmunodominantes lineales se realizó con el algoritmo Kolaskar y Tongaonkar⁹¹ que identifica regiones antigénicas y con el algoritmo Parker⁹² que predice regiones hidrofílicas. La secuencia final fue sometida a alineamientos con el algoritmo Smith-Waterman^{93,94} en el software en línea

BLAST™ y con el algoritmo ClustalW⁹³ en el software Bioedit™ considerando las secuencias de referencia (**FIGURA 6**).

Para la realización de los ensayos de iELISA se sensibilizaron microplacas de poliestireno (Thermo Fisher Scientific®, Rochester, Nueva York, EUA) de 96 pozos con 1200ng del péptido sintético “FESCunam_BIV1” en buffer de carbonatos pH 9.6 (marca y país) durante 24 horas a 37° C. Considerando dos columnas con péptido (duplicado de la muestra) y una columna solo con buffer de bicarbonatos (control sin antígeno). El péptido fue diluido en buffer de carbonatos (pH9.6) a 4mg/mL y almacenado a -20°C hasta su uso.

Las placas sensibilizadas después de la incubación fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) suplementado con Triton X100 al 0.05% (Sigma Chemical Co ®, Missouri, EUA) y bloqueadas con caseína bovina al 2.5% (Sigma-Aldrich, país) por una hora a 37°C. Las muestras de plasma fueron diluidas en un factor 1/5 en buffer diluyente (PBS conteniendo 1.25% de caseína bovina) y depositadas en razón de 100µl por pozo y por triplicado con una posterior incubación a 37° durante 60 minutos. Se añadió Proteína G conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA, Rochester, Nueva York, EUA) (1/500 en buffer diluyente) y las placas se incubaron por 60 minutos a 37°C. Como sustrato, se agregó 100µl de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (EMD Milipore Corp ®, California, EUA) por pozo y la lectura de la placa se realizó a una longitud de onda de 405 nm (OD405) determinada en un espectrofotómetro de microplacas (Stat Fax® 3200, Awareness Technology Inc., Palm City, Florida, EUA) después de 30 minutos.

Se consideró como control positivo a la muestra proveniente de un animal positivo a PCR y a secuenciación nucleotídica que después de diversos ensayos de repetibilidad diera un valor de OD alto; mientras que el control negativo se consideró a la muestra proveniente de un animal negativo a PCR que después de diversos ensayos de repetibilidad diera un resultado de OD bajo.

Aquellas muestras con valores de OD superiores a 0.300 fueron consideradas para la posterior etapa de evaluación mediante PCR, dado que los valores altos de OD sugieren la presencia de anticuerpos específicos.

Por otra parte, considerando los valores de OD de los controles positivo y negativo de cada placa, se determinó el ratio de densidad óptica considerando la siguiente fórmula⁹⁵:

$$\text{Ratio OD} = \frac{OD_{\text{muestra}} - OD_{\text{control NEG}}}{OD_{\text{control POS}} - OD_{\text{control NEG}}}$$

Los resultados con un valor superior a 1.0 sugieren la presencia de anticuerpos específicos.

A

Alignments

Download GenPept Graphics

envelope polyprotein [Bovine immunodeficiency virus]
Sequence ID: NP_040566.1 Length: 904 Number of Matches: 1
[See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 746 to 762 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
59.2 bits(132)	2e-09	17/17(100%)	17/17(100%)	0/17(0%)

Query 1 MLRSCAKVSQNYQHLP 17
MLRSCAKVSQNYQHLP
Sbjct 746 MLRSCAKVSQNYQHLP 762

B

env gene

```

              710      720      730      740      750
NC_001413.1 BIV Complete genom  QDTFGLETSI FDHLVQLFDW TSWKDWIKII IVIIVLWLLI KILLGMLRSC
NP_040566.1 env polyprotein (B  QDTFGLETSI FDHLVQLFDW TSWKDWIKII IVIIVLWLLI KILLGMLRSC
PEPTIDO BIV                    -----MLRSC-----

              760      770      780      790      800
NC_001413.1 BIV Complete genom  AKVSNYQHL PAEERDGDTE PESSPARGDP ASGSLYENWL NKIGESKND
NP_040566.1 env polyprotein (B  AKVSNYQHL PAEERDGDTE PESSPARGDP ASGSLYENWL NKIGESKND
PEPTIDO BIV                    AKVSNYQHL PA-----

              810      820      830      840      850
NC_001413.1 BIV Complete genom  YRVWTEEYNS LRILFATCRW DLLTPQLLQL PFFLLTLLLK LLWDIFRHAP
NP_040566.1 env polyprotein (B  YRVWTEEYNS LRILFATCRW DLLTPQLLQL PFFLLTLLLK LLWDIFRHAP
PEPTIDO BIV                    -----
```

FIGURA 6. Diseño de un péptido sintético para la implementación de un μ ELISA de tercera generación. (A) Alineamiento con el software BLAST. La secuencia establecida de 17 aminoácidos alinea con una identidad del 100% con la secuencia de la proteína de envoltura del BIV. (B) Alineamiento con el algoritmo Clustal W. Se consideraron tanto la secuencia de referencia (NC_001413) como una secuencia que contara con la totalidad de la proteína de envoltura, la homología fue del 100%, en rojo y resaltado en rectángulos se muestra la secuencia del péptido diseñado que alinea en la región TM del gen *env*.

5.3 Detección molecular

5.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

A partir de muestras negativas a la infección por el BLV y con historial de linfocitosis (lo que podría sugerir la infección por otro virus), se evaluó la integridad genómica mediante el diseño de un ensayo de PCR (**CUADRO 2**) para la amplificación de un fragmento del gen SDHA. Una vez confirmada la integridad del ADN se evaluaron estas muestras para la detección de la infección por el BIV.

Para la detección del ADN proviral del BIV, se programaron ensayos de nPCR siguiendo los procedimientos de Meas y cols^{33,75,76,82}, este protocolo ha demostrado ser de utilidad para identificar la infección por el BIV en varios países. Las condiciones de ambas reacciones se muestran en el **CUADRO 3**.

Al finalizar la reacción, el producto fue separado mediante electroforesis zonal en un gel de agarosa al 1.5% conteniendo bromuro de etidio (bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio [IUPAC]) y visualizado en un transiluminador UV. Los productos que generaran bandas del tamaño esperado, serían identificados como positivos. Sin embargo ningún intento con este protocolo arrojó resultados exitosos.

Por otra parte, a partir de las muestras tamizadas (405 OD >0.3) con el iELISA-BIV, se utilizó el ADN genómico de LSP para la amplificación de un fragmento de la región SU del gen *env*. Es así que se consideraron regiones conservadas previamente descritas⁹⁶ de las secuencias del BIV disponibles en el GenBank¹⁸ para la realización del diseño *in silico* de iniciadores en la paquetería bioinformática del software BioEdit^{TM93} y Primer3 Input (versión 0.4.0)^{TM97}. La síntesis consecuente fue llevada por la compañía Integrated DNA Technologies[©] Inc (Coralville, Iowa, Estados Unidos). Las condiciones (**CUADRO 4**) de la reacción

fueron determinadas según las especificaciones de síntesis y el diseño experimental final.

CUADRO 2. Protocolo de PCR que amplifica una fracción de 373nt del gen SDHA

Fw 5' - AAGTTTCAGATGCGATCTCT – 3'		Rv 5' - TGGTAGATCTTCCCATCTTC - 3'		
Mezcla de la PCR (volumen de reacción de 25µl)		Condiciones para la PCR		
		Etapas	Temperatura	Tiempo
Buffer	1x	Desnaturalización inicial	95°C	4'
DNTPs	220µm			
MgCl ₂	1.5mM	Desnaturalización	95°C	30''
Primer Fw	600nM	Hibridación	51°C	30''
Primer Rv	600nM	Extensión	72°C	33''
Taq polimerasa	2.5U/ reacción	Extensión final	72°C	4'

* El ADN molde fue constituido por 400 ng.

CUADRO 3. Protocolo para la nPCR que ha demostrado⁸⁸ amplificar ADN proviral del BIV generando un producto final de 298nt. del gen *pol*

Secuencia de los iniciadores				
Primera PCR (425pb)				
Fw GTATCAGGCTCTTAAGGAAA		Rv TAATCTTCTGGGTGGTAGTC		
Segunda PCR (298pb)				
Fw TCCGAAGCTGCTTGGGATAA		Rv TTCCACTGGAACCTCTCTAT		
Concentraciones para la PCR (volumen de reacción de 30µl)		Condiciones para la PCR		
		Etapas	Temperatura	Tiempo
Tris-HCl	11mM	Desnaturalización inicial	95°C	3'
Sulfato de amonio	11mM			
MgCl ₂	4.5mM	Desnaturalización	95°C	30''
2-mercaptoetanol	6.7mM			
EDTA	4.4mM			
BSA	113µg/ml			35 ciclos
DNTPs	1mM			
Primer Fw	20pM	Hibridación	57°C	45''
Primer Rv	20pM	Extensión	72°C	30''
Taq polimerasa	2.5U/µl	Extensión final	72°C	7'

* El ADN molde fue constituido por ng

Fw: Iniciador sentido

Rv: Iniciador antisentido⁷⁵

CUADRO 4. Protocolo de PCR que amplifica una fracción de 519nt del gen *env* del ADN proviral del BIV

Mezcla de la PCR (volumen de reacción de 30µl)		Condiciones para la PCR		
		Etapa	Temperatura	Tiempo
Buffer	1x	Desnaturalización inicial	95°C	4'
DNTPs	220µM			
MgCl ₂	1.5mM	Desnaturalización	95°C	30''
Primer Fw	600nM	Hibridación	51°C	30''
Primer Rv	600nM	Extensión	72°C	33''
Taq polimerasa	2.5U/ reacción	Extensión final	72°C	4'

* El ADN molde fue constituido por 400 ng.

De igual manera, el producto fue analizado y separado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador con luz UV. El producto procedente de bandas que se ubicaron en el tamaño esperado (519pb) respecto al marcador de pares de bases fue purificado mediante adsorción en membranas de sílice con columnas utilizando un kit comercial (FavorPrep™ Gel Purification Mini Kit de Favorgen® Biotech Corp., Pingtung, Taiwan).

Adicionalmente, se diseñó el protocolo para la detección de un fragmento de 355nt de la región RT del gen *pol* (**CUADRO 5**)

CUADRO 5. Protocolo de PCR que amplifica una fracción de 355nt del gen *pol* de ADN proviral del BIV

Mezcla de la PCR (volumen de reacción de 30µl)		Condiciones para la PCR		
		Etapa	Temperatura	Tiempo
Buffer	1x	Desnaturalización inicial	95°C	4'
DNTPs	200µm			
MgCl ₂	1.7mM	Desnaturalización	95°C	30''
Primer Fw	500nM	Hibridación	47°C	30''
Primer Rv	500nM	Extensión	72°C	25''
Taq polimerasa	2.5U/ reacción	Extensión final	72°C	4'

* El ADN molde fue constituido por 400 ng.

5.3.2 Fragmento génico sintético

Con el propósito de establecer un control positivo para la detección molecular de un fragmento del gen *env* del BIV, se diseñó un fragmento génico de 550pb que contemplara la secuencia blanco para su construcción mediante síntesis en fase sólida (Integrated DNA Technologies[®] Inc, Coralville, IA, Estados Unidos). Los iniciadores que amplifican el fragmento se muestran en la **FIGURA 10**.

5.3.3 Secuenciación nucleotídica

Los amplicones provenientes de bandas con la longitud esperada fueron remitidos a la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM) para la secuenciación mediante el método Sanger utilizando el kit BigDye[®] (Applied Biosystems[™], CA, Estados Unidos).

5.3.4 Análisis *in silico* de las secuencias obtenidas

Los cromatogramas obtenidos a partir de la secuenciación se visualizaron utilizando el programa Chromas[®] y la identidad de cada secuencia fue confirmada utilizando un alineamiento con el algoritmo Smith-Waterman en el software en línea BLAST[™].

6. RESULTADOS

La población de estudio se conformó **de muestras de plasma y de LSP/ADN a partir de un total de 1168 bovinos** según un muestreo no probabilístico por conveniencia con productores cooperantes en el que se consideraron bovinos hembras que provinieran de una unidad de producción lechera dentro de territorio mexicano. El banco final constó de 1168 muestras de plasma y LSP/ADN; éstos animales se encontraron en 17 distintas unidades de producción (A - Q) distribuidas en diez entidades federativas dentro del territorio mexicano; la relación de estos datos se esquematiza con mayor detalle en el **CUADRO 6**.

La tasa de seroprevalencia del Virus de Leucemia Bovina fue de 55.5%. Con el banco de 1168 muestras de plasma bovino, se hizo un estudio serológico para detectar anticuerpos contra la glicoproteína 51 del BLV (anti-BLVgp51); se detectaron 648 animales positivos, que representan un 55.5% de la población estudiada; la tasa de prevalencia más alta (63.9%), se encontró en los animales provenientes de los hatos P y Q, ambos ubicados dentro de Coahuila (92/144), mientras que la más baja (0%) provino del hato H, ubicado en Chiapas, cabe destacar que en este caso la disposición de muestras fue muy limitada (n=15). El detalle de los resultados serológicos se muestra en el **CUADRO 6** y la **FIGURA 7**.

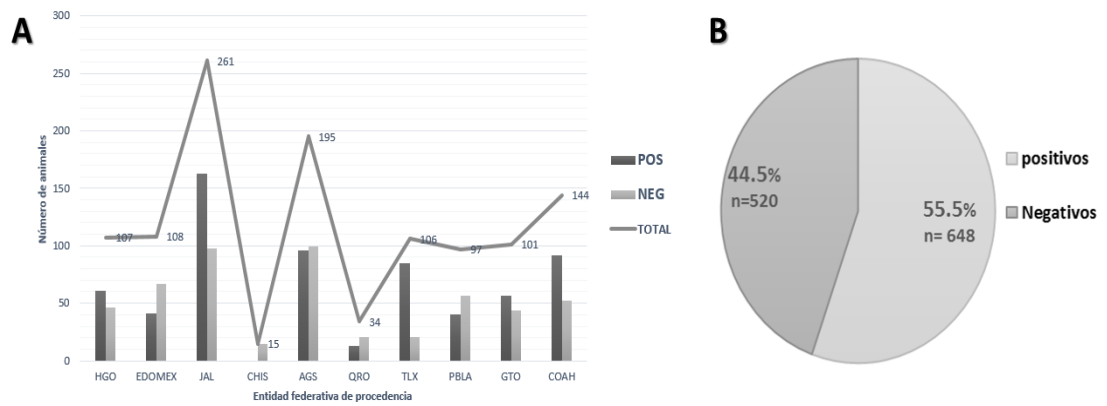


FIGURA 7. Situación de la infección por el Virus de Leucemia Bovina en una población de 1168 bovinos. Se detectaron anticuerpos anti-gp51 en el 55.5% de los bovinos estudiados. (A) Relación de la población de bovinos provenientes de diez entidades federativas de la República Mexicana. (B) Seroprevalencia del BLV en la población estudiada.

CUADRO 6. Relación de las muestras obtenidas de agosto de 2015 a octubre de 2016 y resultados serológicos de la infección por el BLV

Entidad federativa de Procedencia	UPL	n	Tasa de prevalencia hato estudiado	BLV (+)	BLV (-)
Hidalgo	A	107	57%	61	46
Total		107	57%	61	46
Estado de México	B	50	42%	21	29
	C	10	0%	0	10
	D	48	41.7%	20	28
Total		108	38%	41	67
Jalisco	E	61	36.1%	22	39
	F	101	82.2%	83	18
	G	99	58.6%	58	41
Total		261	62.5%	163	98
Chiapas	H	15	0%	0	15
Total		15	0%	0	15
Aguascalientes	I	100	32%	32	68
	J	95	67.4%	64	31
Total		195	49.2%	96	99
Querétaro	K	11	90.9%	10	1
	L	23	13%	3	20
Total		34	38.2%	13	21
Tlaxcala	M	106	80.2%	85	21
Total		106	80.2%	85	21
Puebla	N	97	40.2%	40	57
Total		97	40.2%	40	57
Guanajuato	O	101	56.4%	57	44
Total		101	56.4%	57	44
Coahuila	P	71	49.3%	35	36
	Q	73	78.1%	57	16
Total		144	63.9%	92	52
TOTAL (N)		1168	55.5%	648	520

BLV = Virus de Leucemia Bovina

UPL= Unidad de producción lechera

El iELISA diseñado permitió el tamizaje de animales con anticuerpos que reconocen un epítipo inmunodominante en la TM-BIV. Para identificar animales con anticuerpos específicos, se diseñó un iELISA basado en el uso del péptido sintético FESCunam_BIV1 como antígeno. En la población de 1168 plasmas provenientes de bovinos procedentes de unidades de producción lechera ubicadas dentro del territorio de diez entidades federativas de la República Mexicana, se hizo un estudio serológico para detectar anticuerpos que reconocen un epítipo inmunodominante en la TM-BIV; se detectaron 338 muestras con valores de densidad óptica superiores a 0.300 (OD 405), que sugieren la presencia de anticuerpos específicos, lo que permitió el discernimiento de muestras para su evaluación molecular. El detalle de los resultados serológicos se muestra en la **FIGURA 8**

Se evaluaron 1168 muestras de plasma, 338 de ellas mostraron valores que sugieren la presencia de anticuerpos específicos. El ensayo de ELISA nos permitió la sectorización de muestras a evaluar mediante PCR para la búsqueda de ADN proviral del BIV, el test serológico se realizó a todas las muestras colectadas en las regiones de producción bovina dentro del territorio mexicano (**FIGURA 9**).

El 31.02% de las muestras seropositivas al BLV muestran valores que sugieren la presencia de anticuerpos específicos contra el BIV. De las 648 muestras seropositivas al BLV, 201 muestras presentan altos valores de densidad óptica hacia el iELISA-BIV, esto representa el **17.21%** de la población estudiada, lo que sugiere la coinfección con ambos retrovirus.

No fue posible identificar ADN proviral del BIV mediante el protocolo de Meas y cols^{33,75,82}. Con la finalidad de realizar la detección primaria de animales infectados por el BIV y de seleccionar un control positivo interno, se realizó una serie de variaciones tanto en las concentraciones como en las condiciones de amplificación con la finalidad de generar secuencias de un fragmento del gen *pol*

como herramienta de tamizaje proviral, sin embargo, en ningún intento se logró reproducibilidad en los resultados o bien cuando se obtuvo una banda cercana al tamaño esperado, ésta fue tenue o bien al purificarla no se recuperaba el producto. Las pruebas se realizaron en muestras de ADN provenientes de animales que tuvieran un cuadro clínico sugestivo de la infección por el BLV.

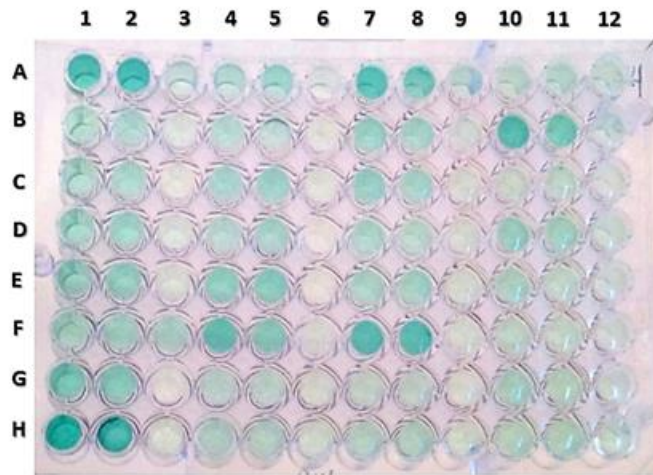
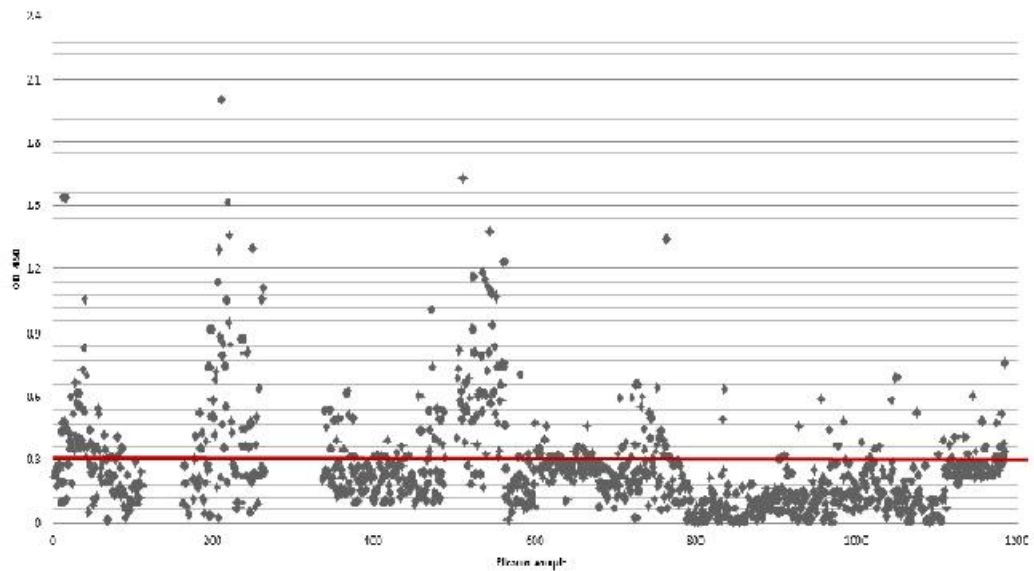
A**B**

FIGURA 8. Análisis serológico del BIV. Mediante el diseño de un protocolo de iELISA, se realizó un estudio de tamizaje en 1168 muestras de bovinos provenientes de UPLs ubicadas en diez diferentes entidades federativas de la República Mexicana. **(A)** Placa de iELISA basada en el uso del péptido FESCunam_BIV1. Las columnas 3, 6, 9, 12 representan pozos negativos que no fueron sensibilizados por el péptido FESCunam_BIV1. Las muestras están representadas por duplicado en dirección horizontal y en el eje vertical se representan diferentes muestras. **(B)** Reactividad de los plasmas de la población estudiada hacia el péptido FESCunam_BIV1. Las muestras con valores superiores a 0.300 OD fueron consideradas para ser evaluadas a PCR.

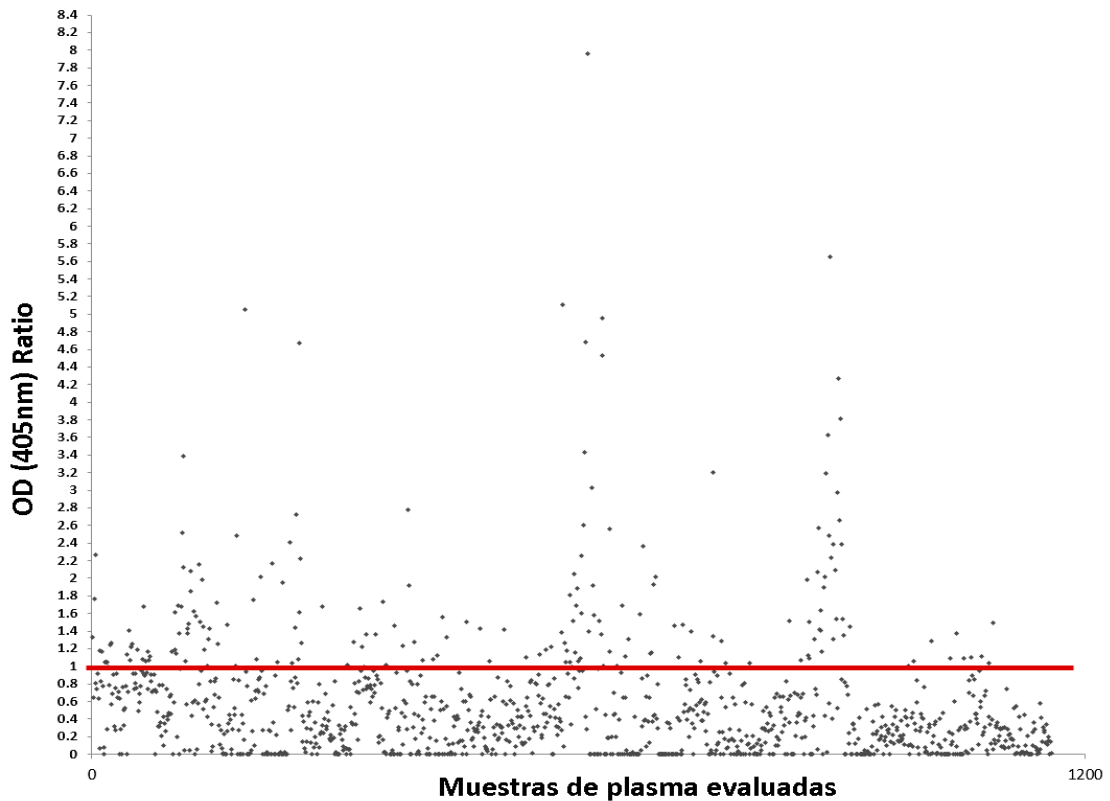


FIGURA 9. OD (405nm) Ratio del análisis serológico. Las muestras con valores de ratio superiores a 1.00 sugieren la presencia de anticuerpos específicos.

La PCR diseñada con iniciadores ubicados en la región SU del gen *env* permitió detectar el ADN proviral del BIV. Posteriormente se evaluaron los iniciadores diseñados para la amplificación de un fragmento de la región SU del gen *env* (**FIGURA 10**) del BIV (que al principio del diseño experimental se consideró como un paso posterior al tamizaje con la PCR del gen *pol*), y en este caso sí se logró reproducibilidad en los resultados y se logró la purificación de los productos obtenidos (**FIGURA 11**).

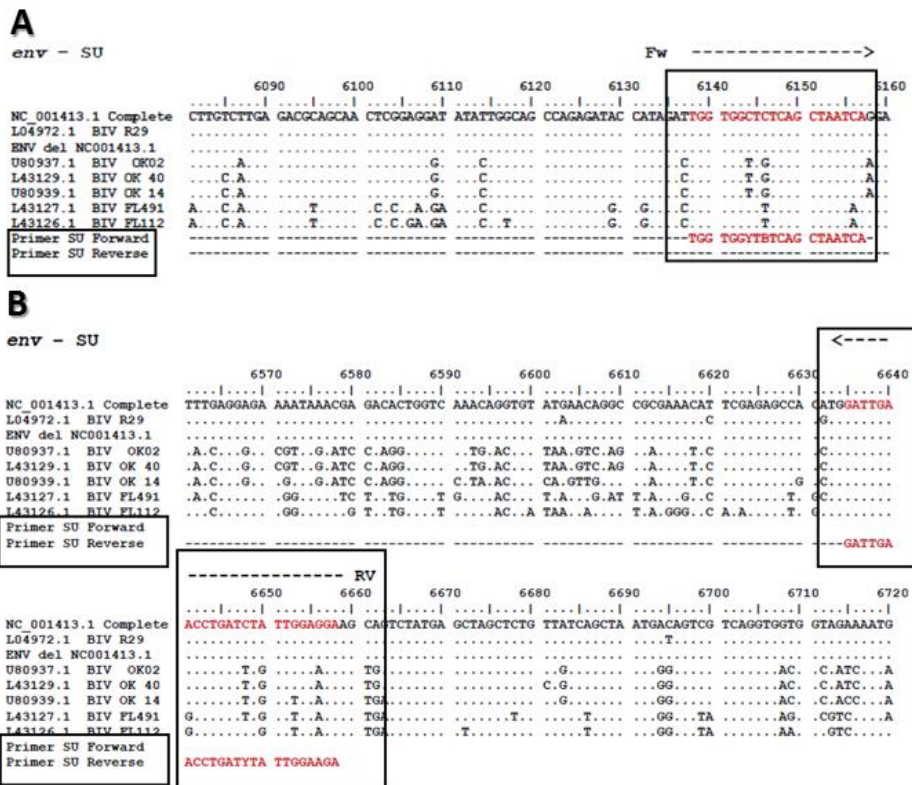


FIGURA 10. Alineamientos de la pareja de iniciadores diseñados para amplificar un fragmento del gen *env* del BIV. Las secuencias de la región de superficie (SU) disponibles en el GenBank se alinearon mediante el algoritmo ClustalW con la secuencia de referencia del BIV R29 (Número de acceso: NC_001413) y otras secuencias parciales del gen *env* con la finalidad de realizar un análisis in silico que permitiera diseñar una pareja de iniciadores que amplificaran una fragmento de la región SU. **(A)** Iniciador sentido. **(B)** Iniciador antisentido. A la izquierda de cada secuencia se muestra el número de acceso correspondiente en el GenBank. Este análisis también permitió el diseño de un fragmento génico sintético que funcionó como control positivo y como secuencia consenso.

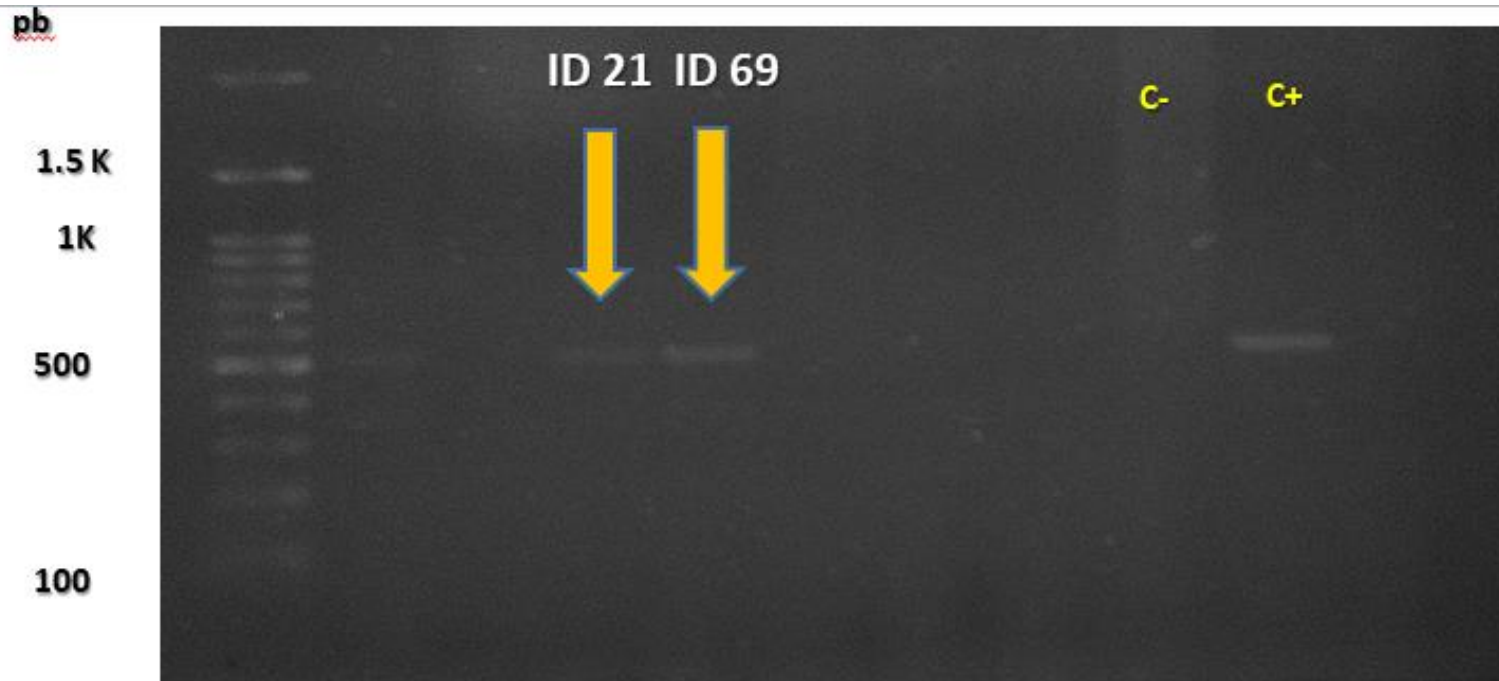


FIGURA 11. Amplificación mediante PCR de una fracción del gen *env* a partir de muestra de ADN de bovinos de producción lechera. Muestras proveniente de un bovino lechero proveniente de una UPL ubicada en Torreón, Coahuila. El tamaño esperado del amplicón es de 519 pb

Se evaluaron 338 muestras de ADN genómico mediante PCR, 6 resultaron positivas (1.8%). A partir de las muestras tamizadas mediante el ELISA, se evaluaron las muestras con valores de OD405 > 0.3 y se logró la amplificación por PCR en 6 de ellas.

La secuenciación nucleotídica de productos procedentes de la PCR-SU y el análisis *in silico* de las secuencias confirmaron la infección por el BIV. La amplificación de un producto de 519pb, la secuenciación nucleotídica y el alineamiento en el software BLAST de la secuencia proveniente de la muestra 39-Coah demuestra la similitud con el Virus de Inmunodeficiencia Bovina (**FIGURA 12 Y FIGURA 13**).

Bovine immunodeficiency-like virus, complete proviral genome
 Sequence ID: [M32690.1](#) Length: 8482 Number of Matches: 1

Range 1: 5966 to 6394 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
333 bits(180)	3e-87	349/432(81%)	6/432(1%)	Plus/Minus
Query 54	TTCTCCTGATAATATTTTGTCCCACTGGGTGGGCTACACGTTGGGATTGGAGCATCG	113		
Sbjct 6394	TTCTCCTCAAAATATTTGTCTCCCACTGAGAGGAACTACACGTTGGGATTGGTCCCGAG	6335		
Query 114	GAGAAGCAAACCAAGGTGCCTGGCTGGTATCATTCACTACTTGATACCCCTGGGGGGCTG	173		
Sbjct 6334	GAGAAGCAATACCAAGGTGCCTGGCTGGTATCATTCACTATGCGGTACCCCTGGAGGGCTG	6275		
Query 174	AGGATCATAGCCACATGTTGTTTTGTGGCATCTGCC-T-TTGATACATACATCCCCAAC	231		
Sbjct 6274	GTGACCATGGCTACATGTGACCCTGAGGCATTACCCATTG--ACATACATCCCCAAC	6217		
Query 232	T-AAGACTGATTA AAAAGAATAACTACTAGTCTACTAAGACTCCATCCCTGCGTGTGAGG	290		
Sbjct 6216	TGAAG-CTGATTAAGAGGATAACCATTACTCTACTAACATTCCATCCCTACGTGCGAGC	6158		
Query 291	CGCCTGCCAATTTCCACCAAAGCATTCCCCACATAAGACTAAGGCTCCCACAAAGTTGA	350		
Sbjct 6157	CACCTGCCAATTTCTTCCAAAAGCATTCCCCACATGCTGCTCAGGCTCCCACAAATTTGA	6098		
Query 351	CATCCACTTTTAAGGCTCTCTGGGTTCCCTTCCAGGACCCAGTATCCAATTATGCCCGCC	410		
Sbjct 6097	CATCCCTTTTGAAGATCTCTAAGTGCTTCCATGACATAATATCCTATTATGCCCTGCT	6038		
Query 411	AGAGGGGAAAGTATTAATATTATTGGAATAGTGACCTTTAGAGGTATTTCTTGATTAGCT	470		
Sbjct 6037	AGAGGGGAAAGATATTAATATTATTGGGAAAGCAAACCTTGGAGGTATTTCTTGATTAGCT	5978		
Query 471	GACATCCACCAA	482		
Sbjct 5977	GAGAGCCACCAA	5966		

FIGURA 12. Detección molecular del Virus de Inmunodeficiencia Bovina. La secuencia obtenida en de la amplificación por PCR a partir de ADN de LSP de la muestra 39 proveniente de un bovino lechero ubicado en Torreón, Coahuila; fue sometida a un alineamiento en el software BLAST confirmando la infección por el BIV. En el recuadro se resalta la similitud obtenida.

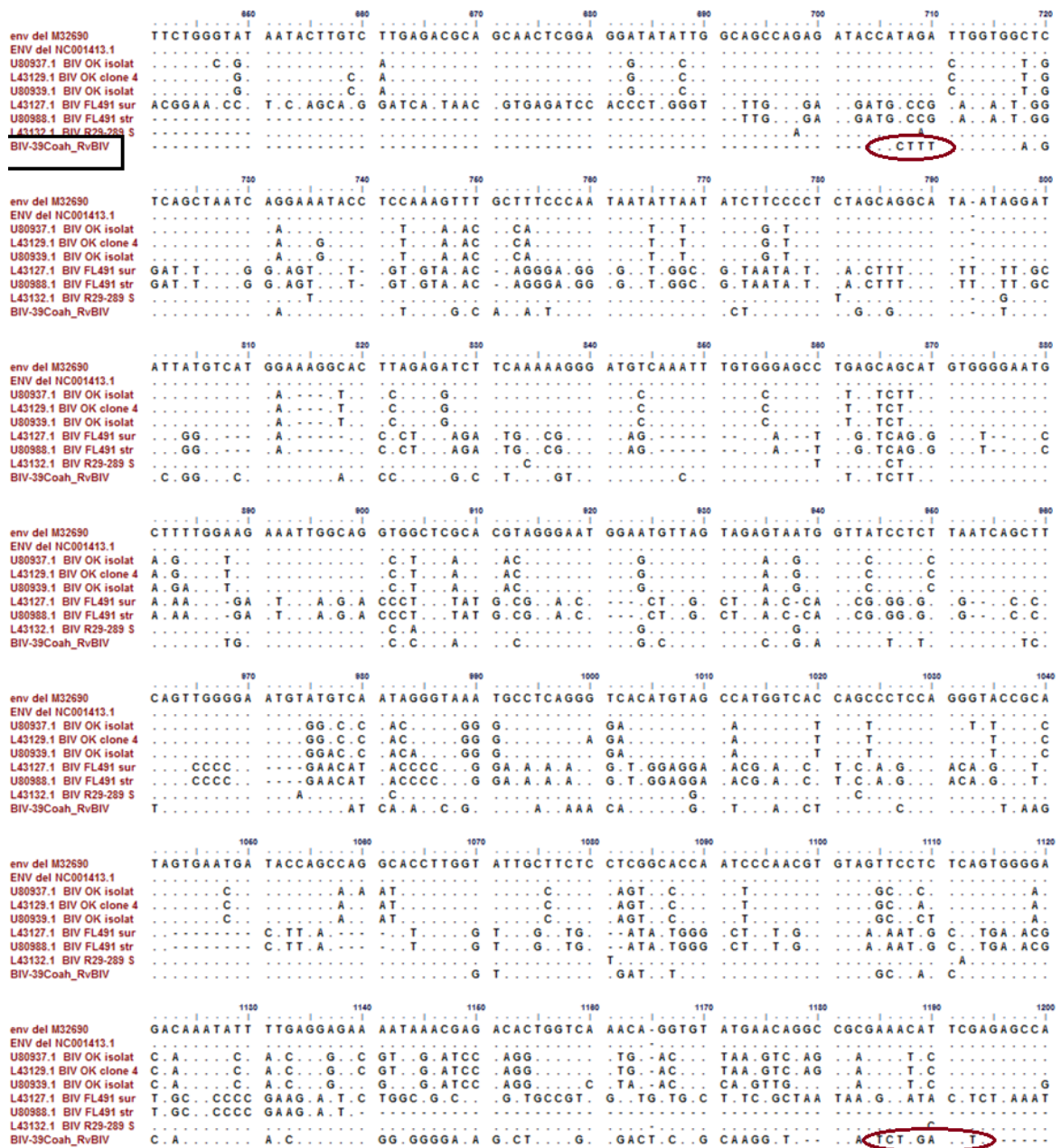


FIGURA 13. Alineamiento de la secuencia 39Coah con la secuencia de referencia y otras secuencias del BIV. Se observa divergencia entre la secuencia obtenida y la secuencia de referencia, característica de los lentivirus. En el recuadro se resalta la secuencia obtenida y en los óvalos se resaltan tanto el inicio como el final de la secuencia.

La secuenciación nucleotídica de productos procedentes de la PCR-SU y el análisis *in silico* de las secuencias confirman la infección por el BIV. La amplificación de seis productos de 519pb, la secuenciación nucleotídica, y el alineamiento en el software BLAST de la secuencia proveniente de la muestra 39-Coah demuestra la identidad del Virus de Inmunodeficiencia Bovina (**FIGURA 13 y FIGURA 14**).

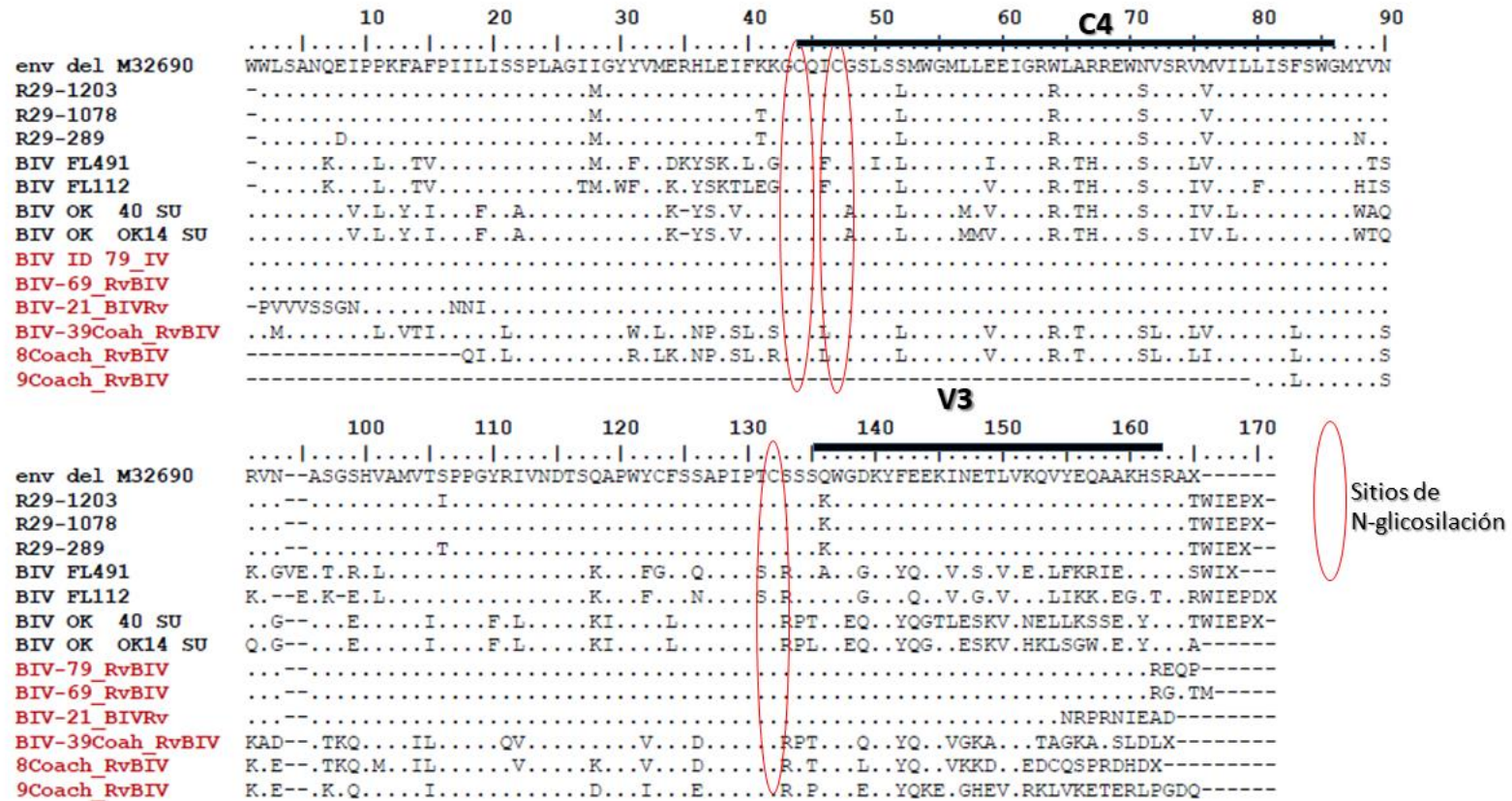


FIGURA 14. Análisis *in silico* de las secuencias aminoácidas de las secuencias obtenidas. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos derivadas a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas permitió identificar regiones específicas de la proteína de superficie descritas previamente¹¹

El alineamiento de las secuencias obtenidas permitió la identificación de regiones genéticas previamente caracterizadas. Se obtuvieron 6 secuencias provenientes de animales de los hatos N (Puebla) y Q (Coahuila). La deducción a aminoácidos de estas secuencias demuestra que, como otros autores lo han descrito, la región V4 presenta mutaciones (**FIGURA 14**).

7. DISCUSIÓN

El papel del BIV en la salud bovina no ha sido estudiado como con otros retrovirus que afectan a especies domésticas, por lo que hay autores^{62,98} que sugieren la urgencia mundial de evaluar diferentes estrategias para detectar las posibles variantes del BIV, lo que a la vez permitiría estudiar:

- La presencia de la infección en lugares donde ésta ha sido estudiada poco o nada.
- La relación del BIV con su entorno.
- La evolución del BIV.
- La respuesta inmune del ganado vacuno hacia la infección.
- Las mejores técnicas de detección del BIV.

En el presente estudio se muestra una estrategia que, si bien sigue una metodología no probabilística de muestreo, permitió por primera vez la detección de la infección por el *Virus de inmunodeficiencia bovina* en animales que se encuentran en unidades de producción dentro de territorio mexicano. De manera similar a otros estudios^{33,38,74,78,81,82,88,98}, aquí se muestran recursos bioinformáticos y sintéticos, así como procedimientos serológicos y moleculares que confirman la infección por el BIV.

A lo largo del estudio de la presencia del BIV en diversos países, han sido desarrollados varios protocolos enfocados en la detección serológica, estos en su mayoría han evaluado variantes en la naturaleza del antígeno utilizado en el ensayo. Así, existe evidencia del uso de antígenos purificados a partir de cultivos celulares⁷³, de antígenos recombinantes^{51,64,70,99} y más recientemente de antígenos sintéticos⁹⁸. En este trabajo se presenta un protocolo de ELISA indirecto usando como antígeno un péptido sintético previamente diseñado mediante un análisis *in silico* de secuencias disponibles en el GenBank.

Los inmunoensayos enzimáticos basados en el uso de péptidos de transmembrana han sido útiles para la detección de individuos infectados con otros lentivirus como HIV¹⁰⁰, FIV^{101,102}, EIAV¹⁰³, y SRLV^{104,105}. Debido a esto, en el presente trabajo se optó por diseñar una estrategia similar para la detección de anticuerpos específicos contra el BIV. Nuestro análisis de la secuencia aminoacídica para la derivación del péptido se basó en el registro #M32690¹⁸ correspondiente a el BIV R29. Hay escasos aislados disponibles actualmente para su estudio: el original BIV_{R29}³, BIV_{FL112} y BIV_{FL491}¹¹.

En este reporte, la glicoproteína TM de la envoltura del BIV se eligió como modelo para el diseño del antígeno sintético, ya que se ha descrito que es un blanco para los anticuerpos debido a sus epítomos inmunodominantes de linfocitos B^{100,104,106}. Ha sido descrito que por su conformación proteica¹⁰⁷, por sus propiedades bioquímicas¹⁰¹ y por la disposición estratégica de aminoácidos que permite la formación de asas¹⁰⁸, la TM-BIV es una proteína con potencial inmunodominante. Además hay estudios que demuestran la conservación de esta región comparada con la región SU¹⁰⁷. El alineamiento con secuencias disponibles en el GenBank correspondiente al sitio del péptido FESCunam_BIV1 evidencia conservación (**FIGURA 6**); esto confirma el valor de este epítomo inmunodominante como reactivo para la detección de anticuerpos específicos. La secuenciación de futuros aislados es necesaria para examinar esta región a mayor detalle y para el posible diseño y evaluación de otros antígenos sintéticos.

La reactividad en este ensayo se restringió a una región inmunodominante predicha de la región TM, definida por el péptido lineal FESCunam_BIV1. Scobie y cols⁹⁸ demostraron en 1999 que no había diferencia significativa entre el uso de un péptido lineal y uno cíclico de la misma región de la TM del BIV. Péptidos derivados de un determinante inmunodominante de las glicoproteínas TM de lentivirus han mostrado actividad inmunológica para otros lentivirus^{100,106,109}.

Si bien la mayoría de los reportes serológicos previos han sido enfocados en la detección de anticuerpos contra proteínas de la cápside (p26), Whetstone y cols (1999) han demostrado que, aunque la seroconversión (dos semanas PI) y el pico de detección (6-8 semanas PI) de estos anticuerpos suceden rápidamente, los títulos suelen disminuir hasta ser indetectables a los 19-38 meses PI⁴⁹. Por otra parte, en un estudio realizado en 1995 por Isaacson y cols⁵⁰, se observó una mayor persistencia de reactividad a la proteína env-BIV comparado con proteínas de Gag. La tendencia evidente por enfocarse en la proteína p26 para ensayos diagnósticos puede derivar en la infravaloración de las tasas de infección y en la tergiversación del papel del BIV en la salud bovina.

El acercamiento serológico nos permitió reducir el umbral para la confirmación de la infección por el BIV. No obstante, en este reporte no se pretende catalogar como “seropositivos” a aquellos animales que tuvieron valores de densidad óptica mayores a 0.3, estos valores solo sugieren la presencia de posibles anticuerpos específicos contra el BIV. La principal ventaja de la utilización de antígenos sintéticos es su pureza y especificidad^{98,103,105}.

Nuestro grupo de investigación se encuentra actualmente trabajando en la validación del ELISA-BIV comparándolo con métodos previos para la detección de este retrovirus y se está estudiando la utilidad de este ensayo en el cálculo de la seroprevalencia de la infección por el BIV en el campo. La sensibilidad de este ensayo no se estableció debido a la falta de una prueba *gold standard* de anticuerpos antivirales específica para el BIV. El protocolo de ELISA indirecto que describimos en este estudio podría ser útil en la detección de ganado infectado naturalmente con el BIV.

La coinfección por el BLV y BIV ha sido descrita previamente^{71,88}; asimismo, existe un estudio⁴⁵ que afirma que la infección por el BIV potencializa la expresión del BLV. En el presente estudio, se realizó como primera instancia un tamizaje serológico contra el BLV (que forma parte de otro estudio¹¹⁰ enfocado al

diagnóstico, filogenia y epidemiología del BLV), de donde se determinó que aquellos animales seropositivos tendrían una mayor probabilidad de presentar a la vez la infección por el BLV.

Algunos ensayos llegan a ser poco rentables y pueden arrojar resultados falsos positivos; además se ha visto⁵⁰ que la respuesta inmune llega a disminuir a niveles indetectables a escasos meses posteriores a la infección, lo que puede derivar en resultados negativos falsos. En la mayoría de los trabajos enfocados al estudio de la presencia del BIV se han detectado anticuerpos específicos utilizando pruebas serológicas; sin embargo, el desarrollo y estandarización de pruebas de detección directa asegura una mayor precisión en la identificación de cualquier retrovirus dado que el ARN o ADN proviral puede ser detectado incluso en animales seronegativos¹¹¹. Es así que los animales falsos negativos de ensayos serológicos pueden ser transmisores potenciales de la infección⁸¹.

Los ensayos moleculares son una opción rápida y sencilla, comparados con el aislamiento en cultivo celular, que resulta más difícil, costoso y tardado¹¹², además de que incluso al realizar un aislamiento se sugiere la confirmación molecular dada la interferencia potencial de otros agentes virales, especialmente el *Virus sincitial bovino*⁷¹.

Han sido desarrollados y comparados diferentes ensayos de PCR para detectar el BIV en cultivo celular infectados y en animales infectados tanto natural como experimentalmente^{32,58,80,81,113-116}. En ensayos de PCR, las regiones genéticas utilizadas más comúnmente para la detección del BIV son los genes *env* y *pol*^{58,75,81,88,111}. En este estudio se documenta el diseño de un ensayo de PCR que detectó un fragmento de la región SU del gen *env* del BIV, a partir de ADN proviral, esto a su vez nos permitió generar información genética debido a que en esta región son más frecuentes los cambios debido a presión selectiva¹¹⁷; además se evaluó también un ensayo de PCR basado en la amplificación de un fragmento del gen *pol*, sin embargo en este caso solo se logró amplificar DNA a partir de una

sola muestra, así mismo al replicar el protocolo de Meas y cols³³ no se lograron resultados positivos, esto podría sugerir la presencia de una variante local con diferencias genéticas específicamente en el gen pol¹¹².

Por otro lado, ha sido demostrado que pueden existir en el mundo variantes del BIV¹¹²: Meas y cols reportaron que las secuencias del gen *env* de virus circulantes en Japón⁷¹, Pakistán⁷⁶ y Camboya⁸² fueron más cortas y con demasiadas sustituciones cuando se compararon con los aislamientos de los EUA (R29, Florida 112 y Oklahoma 40), si bien estas regiones en virus circulantes en México son desconocidas.

De las 338 muestras de ADN evaluadas mediante PCR, 6 (1.8%) amplificaron el fragmento de 519 pb (**FIGURA 11**). Este valor representa una proporción menor comparado con resultados obtenidos por otros autores en Pakistán (10.3%)⁷⁶ y Camboya (16.7%)¹⁶. Sin embargo existen diferencias entre la detección ya que en el caso de Pakistán la población constó de 370 animales y en el estudio en Camboya fueron 544, ambos fueron determinados con Western blot, cabe destacar que en el presente estudio se detectó DNA proviral.

Al comparar la frecuencia de animales infectados por el BIV en la población estudiada, se observó que los hatos N y P (ubicados dentro del territorio de las entidades federativas de Puebla y Coahuila, respectivamente) tuvieron el mayor número de animales infectados (n=3). Esta tendencia se puede asociar a la edad de los animales, ya que en estos hatos las vacas eran viejas y se apreciaban condiciones sanitarias precarias; los resultados también se pueden asociar a prácticas de manejo implementadas en esas unidades de producción como el hacinamiento en las casetas de manejo para vacunación, diagnóstico de gestación, colección de sangre para pruebas de tuberculina o brucelosis, entre otros procedimientos que implican hacinamiento. El contacto entre animales a través del intercambio de fluidos puede favorecer la transmisión del virus. Además,

la transmisión del BIV puede suceder por vía iatrogénica por agujas y otros fómites que se comparten entre los animales⁷⁷.

Este análisis demuestra que la infección por el BIV es menos común que la infección por el BLV en la población estudiada proveniente de diez estados de la República Mexicana; la frecuencia del BIV fue baja comparada con estudios previos realizados en otros países^{71,76,78,81,82,88,112,118}.

Aquí se documenta la primera evidencia de la infección por el BIV en territorio mexicano, por lo que es importante considerar la promoción de medidas de prevención y control. Para confirmar estos hallazgos preliminares, sería interesante el planteamiento de un estudio serológico más grande con un enfoque epidemiológico más detallado y con una profundización en el rol del BIV como agente patógeno. La presencia de esta infección se puede facilitar por la transmisión horizontal mediada por vectores mecánicos como artrópodos hematófagos, por lo que el control de estos puede ser una táctica favorable para evitar a diseminación del BIV en regiones cálidas⁷⁸. Snider y cols¹¹⁹ propusieron en 1996 que el tiempo que comparten los animales hacinados en prácticas de manejo puede incrementar la transmisión de virus en el hato.

8. CONCLUSIÓN

El presente estudio demuestra la primera evidencia de la infección por el *Virus de Inmunodeficiencia bovina* en ganado vacuno dentro de territorio mexicano. Así mismo, plantea y ofrece estrategias teóricas y experimentales que permiten la detección de esta infección.

De manera adicional, en este escrito se plasma la primera revisión actualizada disponible en lengua hispana a lo descubierto hasta principios del año 2018 en materia del *Virus de Inmunodeficiencia bovina* y su papel tanto en la salud bóvida, y en el análisis de este lentivirus como modelo de estudio del HIV. La tendencia a futuro de la investigación en materia del BIV debería considerar la disponibilidad de más aislamientos y de más genomas íntegros.

9. REFERENCIAS

1. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology* 2017;162:2505–2538.
2. Malmquist WA, Van Der Maaten MJ, Boothe AD. Isolation, Immunodiffusion, Immunofluorescence, and Electron Microscopy of a Syncytial Virus of Lymphosarcomatous and Apparently Normal Cattle. *Cancer Research* 1969;29:188–200.
3. Van Der Maaten MJ, Boothe AD, Seger CL. Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. *Journal of the National Cancer Institute* 1972;49:1649–1657.
4. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann E Al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220(4599):868–71.
5. Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, et al. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science (New York, NY)* 1985;227:173–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2981428>.
6. Gonda MA, Braun MJ, Clements JE, et al. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1986;83:4007–4011. Available at: <http://www.pnas.org/content/83/11/4007.abstract><http://www.pnas.org/content/83/11/4007.full.pdf><http://www.pnas.org/content/83/11/4007.short>.
7. Gonda MA, Braun MJ, Carter SG, et al. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature* 1987;330:388–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3683555>.
8. Bhatia S, Patil SS, Sood R. Bovine immunodeficiency virus: A lentiviral infection. *Indian Journal of Virology* 2013;24:332–341.
9. Garvey KJ, Oberste MS, Elser JE, et al. Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* 1990;175:391–409.

10. Braun MJ, Lahn S, Boyd AL, et al. Molecular cloning of biologically active proviruses of bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* 1988;167:515–523.
11. Suarez DL, VanDerMaaten MJ, Wood C, et al. Isolation and characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. *Journal of virology* 1993;67:5051–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=237896&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
12. Oberste MS, Greenwood JD, Gonda MA. Analysis of the transcription pattern and mapping of the putative rev and env splice junctions of bovine immunodeficiency-like virus. *J Virol* 1991;65:3932–7.
13. Oberste MS, Williamson JC, Greenwood JD, et al. Characterization of bovine immunodeficiency virus rev cDNAs and identification and subcellular localization of the Rev protein. *Journal of virology* 1993;67:6395–405. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=238074&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
14. Elder JH, Lin Y-C, Fink E, et al. Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels with HIV. *Current HIV research* 2010;8:73–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2853889&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
15. Battles JK, Hu MY, Rasmussen L, et al. Immunological characterization of the gag gene products of bovine immunodeficiency virus. *J Virol* 1992;66:6868–6877.
16. Berkowitz R, Ilves H, Lin WY, et al. Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *Journal of virology* 2001;75:3371–82.
17. Katzourakis A, Tristem M, Pybus OG, et al. Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104:6261–6265. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0700471104>.
18. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. *Nucleic Acids Research* 2017;45:D37–D42.
19. Matthew A. G, D. Gene L, Steven E. F, et al. Bovine immunodeficiency virus: molecular biology

and virus-host interactions. *Virus Research* 1994;32:155–181.

20. Corredor AG, St-Louis M-C, Archambault D. Molecular and biological aspects of the bovine immunodeficiency virus. *Current HIV Research* 2010;8:2–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210777>.

21. Calabro V, Daugherty MD, Frankel AD. A single intermolecular contact mediates intramolecular stabilization of both RNA and protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:6849–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1100766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

22. Bhatia S, Patil SS, Sood R. Bovine immunodeficiency virus: A lentiviral infection. *Indian Journal of Virology* 2013;24:332–341.

23. Fong SE, Greenwood JD, Williamson JC, et al. Bovine immunodeficiency virus tat gene: Cloning of two distinct cDNAs and identification, characterization, and immunolocalization of the tat gene products. *Virology* 1997;233:339–357.

24. Xuan C, Qiao W, Li J, et al. BTat, a trans-acting regulatory protein, contributes to bovine immunodeficiency virus-induced apoptosis. *Cellular Microbiology* 2008;10:31–40.

25. Deng G, Su Y, Mu J, et al. Molecular basis of the internalization of bovine immunodeficiency virus Tat protein. *Virus Genes* 2008;36:85–94.

26. Wakiyama M, Kaitsu Y, Muramatsu R, et al. Tethering of proteins to RNAs using the bovine immunodeficiency virus-Tat peptide and BIV-TAR RNA. *Analytical Biochemistry* 2012;427:130–132.

27. Guo HY, Ma YG, Gai YM, et al. Bovine HEXIM1 inhibits bovine immunodeficiency virus replication through regulating BTat-mediated transactivation. *Veterinary Research* 2013;44.

28. Athanassiou Z, Patora K, Dias RLA, et al. Structure-guided peptidomimetic design leads to nanomolar ??-hairpin inhibitors of the Tat-TAR interaction of bovine immunodeficiency virus. *Biochemistry* 2007;46:741–751.

29. Burke DS. Recombination in HIV: An Important Viral Evolutionary Strategy. *Emerging Infectious Diseases* 1997;3:253–259.

30. Mansky LM. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *Journal of General Virology* 1998;79:1337–1345.
31. Carpenter S, Vaughn EM, Yang J, et al. Antigenic and genetic stability of bovine immunodeficiency virus during long-term persistence in cattle experimentally infected with the BIV(R29) isolate. *Journal of General Virology* 2000;81:1463–1472.
32. Cooper CR, Hanson L a, Diehl WJ, et al. Natural selection of the Pol gene of bovine immunodeficiency virus. *Virology* 1999;255:294–301.
33. Meas S, Ohashi K, Sugimoto C, et al. Phylogenetic relationships of bovine immunodeficiency virus in cattle and buffaloes based on surface envelope gene sequences: Brief report. *Archives of Virology* 2001;146:1037–1045.
34. Suarez DL, Whetstone CA. Size variation within the second hypervariable region of the surface envelope gene of the bovine lentivirus BIV in experimentally and naturally infected cattle. *Journal of virology* 1997;71:2482–2486. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032387>.
35. Whetstone C a, Suarez DL, Miller JM, et al. Bovine lentivirus induces early transient B-cell proliferation in experimentally inoculated cattle and appears to be pantropic. *Journal of virology* 1997;71:640–644.
36. Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics* 2016;17:422–433.
37. Li Y, Carpenter S. Cis-acting sequences may contribute to size variation in the surface glycoprotein of bovine immunodeficiency virus. *Journal of General Virology* 2001;82:2989–2998.
38. Suarez DL. Viral variation of the bovine immunodeficiency- like virus. 1995.
39. Suarez DL, Whetstone CA. Identification of hypervariable and conserved regions in the surface envelope gene in the bovine lentivirus. *Virology* 1995;212:728–733.
40. Gonda MA, Oberste MS, Garvey KJ, et al. Development of the bovine immunodeficiency-like virus as a model of lentivirus disease. *Developments in Biological Standardization* 1990;72:97–110.
41. Wu D, Murakami K, Morooka A, et al. In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine

immunodeficiency-like virus. *Virus Research* 2003;97:81–87.

42. Snider TG, Hoyt PG, Jenny BF, et al. Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice* 1997;13:151.

43. Carpenter S, Miller LD, Alexandersen S, et al. Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *Journal of virology* 1992;66:1074–1083. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1309889%5Cnpapers3://publication/uuid/7D63A313-97D3-4777-A837-E050B00C49B8.

44. Zhang S, Wood C, Xue W, et al. Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:232–235. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9067663.

45. Rola M, Kozaczynska B, Pluta A, et al. Bovine Immunodeficiency Virus as a potentiating cofactor for the experimental Bovine Leukemia Virus infection in sheep. *Retrovirology* 2011;8:A5. Available at:

www.biomedcentral.com/submit%5Cnhttp://www.retrovirology.com/content/8/S1/A5.

46. De Oliveira CHS, Barbosa JD, Damasceno KA, et al. Multicentric lymphoma in buffaloes in the Amazon region, Brazil. *BMC Veterinary Research* 2016;12:238. Available at:

<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0845-y>.

47. Flaming K, van der Maaten M, Whetstone C, et al. Effect of bovine immunodeficiency-like virus infection on immune function in experimentally infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1993;36:91–105.

48. Martin SJ, O'Neill TP, Bilello JA, et al. Lymphocyte transformation abnormalities in bovine immunodeficiency-like virus infected calves. *Immunology Letters* 1991;27:81–84.

49. Whetstone CA, VanDerMaaten MJ, Black JW. Humoral immune response to the bovine immunodeficiency-like virus in experimentally and naturally infected cattle. *Journal of virology* 1990;64:3557–61. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=249632&tool=pmcentrez&rendertyp>

e=abstract.

50. Isaacson JA, Roth JA, Wood C, et al. Loss of Gag-specific antibody reactivity in cattle experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus. *Viral Immunol* 1995;8:27–36.

51. Abed Y, Archambault D. A viral transmembrane recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine immunodeficiency virus infection. *Journal of Virological Methods* 2000;85:109–116.

52. Abed Y, St-Laurent G, Zhang H, et al. Development of a Western blot assay for detection of bovine immunodeficiency-like virus using capsid and transmembrane envelope proteins expressed from recombinant baculovirus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1999;6:168–72.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95681&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

53. Zheng L, Zhang S, Wood C, et al. Differentiation of two bovine lentiviruses by a monoclonal antibody on the basis of epitope specificity. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2001;8:283–7.

54. Meas S, Usui T, Ohashi K, et al. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Veterinary Microbiology* 2002;84:275–282.

55. Hidalgo G, Flores M, Bonilla JA. Detection and Isolation of Bovine Immunodeficiency-like Virus (BIV) in Dairy Herds of Costa Rica. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 1995;42:155–161.

56. Kashanchi F, Liu ZQ, Atkinson B, et al. Comparative evaluation of bovine immunodeficiency-like virus infection by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 1991;31:197–209.

57. Suarez DL, Van der Maaten MJ, Whetstone CA. Improved early and long-term detection of bovine lentivirus by a nested polymerase chain reaction test in experimentally infected calves. *American Journal of Veterinary Research* 1995;56:579–586.

58. Gradil CM, Watson RE, Renshaw RW, et al. Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls. *Vet Microbiol* 1999;70:21–31.

59. Patil SS, Pattnaik B, Mishra N, et al. Detection of proviral genomic sequence of bovine immunodeficiency virus in Indian cattle. *Current Science* 2003;84:563–566.
60. Bex F, Bruck C, Mammerickx M, et al. Humoral Antibody Response to Bovine Leukemia Virus Infection in Cattle and Sheep Humoral Antibody Response to Bovine Leukemia Virus Infection in Cattle. *American Association for Cancer Research* 1979;39:1118–1123.
61. Cockerell GL, Jensen WA, Rovnak J, et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine leukemia virus in a dairy cattle herd. *Veterinary Microbiology* 1992;31:109–116.
62. Horzinek M, Keldermans L, Stuurman T, et al. Bovine immunodeficiency virus: Immunochemical characterization and serological survey. *Journal of General Virology* 1991;72:2923–2928.
63. Betemps D, Mallet F, Cheynet V, et al. Overexpression and Purification of an Immunologically Reactive His–BIV Capsid Fusion Protein. *Protein Expression and Purification* 1999;15:258–264. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104659289891004X>.
64. Zheng L, Swanson M, Liao J, et al. Cloning of the bovine immunodeficiency virus gag gene and development of a recombinant-protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin DiagnLab Immunol* 2000;7:557–562.
65. Rasmussen L, Battles JK, Ennis WH, et al. Characterization of virus-like particles produced by a recombinant baculovirus containing the gag gene of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* 1990;178:435–451.
66. Bhatia S, Sood R, Bhatia AK, et al. Development of a capsid based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunodeficiency virus antibodies in cattle and buffalo serum. *Journal of Virological Methods* 2008;148:218–225.
67. Choudhury B, Finnegan C, Phillips A, et al. Detection of Bovine Leukaemia Virus Antibodies and Proviral DNA in Colostrum Replacers. *Transboundary and Emerging Diseases* 2015;62:e60–e61.
68. McNab WB, Jacobs RM, Smith HE. A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and associations between test results, production records and management practices. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*

1994;58:36–41.

69. Muluneh A. Seroprevalence of Bovine Immunodeficiency-virus (BIV) Antibodies in the Cattle Population in Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 1994;41:679–684.

70. Polack B, Schwartz I, Berthelemy M, et al. Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France. *Veterinary Microbiology* 1996;48:165–173.

71. Usui T, Meas S, Konnai S, et al. Seroprevalence of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle in Hokkaido. *J Vet Med Sci* 2003;65:287–289.

72. Cavarani S, Donofrio G, Chiocco D, et al. Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 1998;37:147–157. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587798000993>.

73. Burkala EJ, Ellis TM, Voigt V, et al. Serological evidence of an Australian bovine lentivirus. *Veterinary Microbiology* 1999;68:171–177.

74. Albernaz TT, Leite RC, Pimenta Reis JK, et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon region, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 2015;47:1625–1628.

75. Meas S, Nakayama M, Usui T, et al. Evidence for bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Zambia. *Japanese Journal of Veterinary Research* 2004;52:3–8.

76. Meas S, Seto J, Sugimoto C, et al. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J Vet Med Sci* 2000;62:329–331. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770609>.

77. Moody CA, Pharr GT, Murphey J, et al. Confirmation of vertical transmission of bovine immunodeficiency virus in naturally infected dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2002;14:113–119.

78. St.Cyr Coats K, Pruett SB, Nash JW, et al. Bovine immunodeficiency virus: incidence of infection in Mississippi dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 1994;42:181–189.

79. Moore EC, Keil D, St. Cyr Coats K. Thermal inactivation of bovine immunodeficiency virus. *Applied and Environmental Microbiology* 1996;62:4280–4283.
80. González ET, Licursi M, Vila Roza V, et al. Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: Serological survey in Argentina. *Research in Veterinary Science* 2008;85:353–358.
81. Albernaz TT, Leite RC, Pimenta Reis JK, et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon region, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 2015;47:1625–1628. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-015-0884-6>.
82. Meas S, Ohashi K, Tum S, et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 2000;62:779–781.
83. Cho KO, Meas S, Park NY, et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus in dairy and beef cattle herds in Korea. *J Vet Med Sci* 1999;61:549–551.
84. Scobie L. Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. *Veterinary Record* 2001;149.
85. Barboni P, Thompson I, Brownlie J, et al. Evidence for the presence of two bovine lentiviruses in the cattle population of Bali. *Veterinary Microbiology* 2001;80:313–327.
86. Brujeni GN, Poorbazargani TT, Nadin-Davis S, et al. Bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian holstein cattle. *Journal of Infection in Developing Countries* 2010;4:576–579.
87. Horner G. Serologic evidence of bovine immunodeficiencylike virus and bovine syncytial virus in New Zealand. *Surveillance* 1991;18.
88. Meas S, Yilmaz Z, Usui T, et al. Evidence of bovine immunodeficiency virus in cattle in Turkey. *Japanese Journal of Veterinary Research* 2003;51:3–8.
89. Gorodezky C. Manual de técnicas, XIII Curso teórico-práctico de genética molecular. 2009.
90. Fleri W, Paul S, Dhanda SK, et al. The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design. *Frontiers in Immunology* 2017;8.

91. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters* 1990;276:172–174.
92. Parker JMR, Guo D, Hodges RS. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry* 1986;25:5425–5432.
93. Hall T, Biosciences I, Carlsbad C. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences* 2011;2:60–61.
94. Altschul SF. BLAST Algorithm. In: *Encyclopedia of Life Sciences.*; 2005. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0005253>.
95. Chatterjee SS, Sharma A, Choudhury S, et al. Significance of igg optical density ratios (Index value) in single reactive anti-dengue virus IgG capture ELISA. *Iranian Journal of Microbiology* 2016;8:395–400.
96. Anon. Identification of Hypervariable and Conserved regions in the SU env gene in the BIV.pdf.
97. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 2012;40.
98. Scobie L, Venables C, Hughes K, et al. The antibody response of cattle infected with bovine immunodeficiency virus to peptides of the viral transmembrane protein. *Journal of General Virology* 1999;80:237–243.
99. Burkala EJ, Narayani I, Hartaningsih N, et al. Recombinant Jembrana disease virus proteins as antigens for the detection of antibody to bovine lentiviruses. *Journal of Virological Methods* 1998;74:39–46.
100. Gnann JW, Nelson J a, Oldstone MB. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *Journal of virology* 1987;61:2639–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=255715&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
101. Fontenot JD, Hoover EA, Elder JH, et al. Evaluation of feline immunodeficiency virus and feline

leukemia virus transmembrane peptides for serological diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1992;30:1885–1890.

102. Sibille P, Avraméas a, Moraillon a, et al. Comparison of serological tests for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection of cats. *Veterinary microbiology* 1995;45:259–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7571377>.

103. Soutullo a, Verwimp V, Riveros M, et al. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Veterinary microbiology* 2001;79:111–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230933>.

104. Bertoni G, Zahno ML, Zanoni R, et al. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *Journal of virology* 1994;68:7139–7147.

105. de Andrés X, Ramírez H, Bertolotti L, et al. An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2013;152:277–288. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.017>.

106. Pancino G, Camoin L, Sonigo P. Structural analysis of the principal immunodominant domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein. *Journal of virology* 1995;69:2110–2118.

107. Chen P, Liu ZQ, Wood C. Use of TrpE fusion protein to identify antigenic domains within the BIV envelope protein. *Journal of Virological Methods* 1994;47:331–343.

108. GALLAHER WR, BALL JM, GARRY RF, et al. A General Model for the Transmembrane Proteins of HIV and Other Retroviruses. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1989;5:431–440. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/aid.1989.5.431>.

109. Avrameas A, Guillet JG, Chouchane L, et al. Localisation of three epitopes of the ENV protein of feline immunodeficiency virus. *Molecular Immunology* 1992;29:565–572.

110. Heinecke N, Tórtora J, Martínez HA, et al. Detection and genotyping of bovine leukemia virus in Mexican cattle. *Archives of Virology* 2017;162:3191–3196.

111. Tajbakhsh E, Borujeni GN, Momtaz H. Molecular evidence for bovine immunodeficiency virus

- infection in Iranian sheep and cattle population. *Comparative Clinical Pathology* 2011;20:635–638.
112. Meas S, Kabeya H, Yoshihara S, et al. Seroprevalence and field isolation of bovine immunodeficiency virus. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 1998;60:1195–1202.
113. St-Louis M-C, Cojocariu M, Archambault D. The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses. *Animal Health Research Reviews* 2004;5:125–143. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S146625230400009X.
114. Zhang S, Troyer DL, Kapil S, et al. Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR in situ hybridization. *Virology* 1997;236:249–257. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9325232.
115. Lewis J, McNab T, Tenaya M, et al. Comparison of immunoassay and real-time PCR methods for the detection of Jembrana disease virus infection in Bali cattle. *Journal of Virological Methods* 2009;159:81–86.
116. Ammersbach M, Bienzle D. Methods for assessing feline immunodeficiency virus infection, infectivity and purification. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011;143:202–214. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.004>.
117. Hull S, Lim J, Hamil A, et al. Analysis of jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) envelope protein domains in transformation. *Virus Genes* 2012;45:508–517.
118. Meas S, Ruas FJ, Usui T, et al. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. *The Japanese journal of veterinary research* 2002;50:9–16.
119. Snider TG, Luther DG, Jenny BF, et al. Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 1996;19:117–131.