

**VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN COLOMBIA:
CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y MOLECULARES LO PROPONEN
COMO AGENTE ZONÓTICO**



ADRIANA PATRICIA CORREDOR FIGUEROA

**Tesis para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADOS
BOGOTÁ D.C, 2018**

**VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN COLOMBIA:
CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y MOLECULARES LO PROPONEN
COMO AGENTE ZONÓTICO**

ADRIANA PATRICIA CORREDOR FIGUEROA

APROBADO



Alba Alicia Trespalacios, Ph.D.
Directora de Posgrado
Facultad de Ciencias




Concepción J. Puerta Bula, Ph.D.
Decana
Facultad de Ciencias

Bogotá., D.C enero de 2019

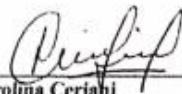
**VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN COLOMBIA:
CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y MOLECULARES LO PROPONEN
COMO AGENTE ZONÓTICO**

ADRIANA PATRICIA CORREDOR FIGUEROA

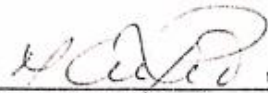
APROBADO



María Fernanda Gutiérrez
DIRECTORA DE TRABAJO DE GRADO



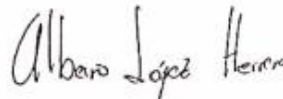
Carolina Ceriani
Jurado



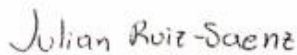
María Antonia Rincón
Jurado



Jairo Jaime Correa
Jurado



Albeiro López Herrera
Jurado



Julián Ruiz
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
<u>1.</u> CARACTERÍSTICAS VIRALES	5
1.1 Virus de la Leucosis Bovina: Historia.....	6
1.2 Estructura, genoma viral y clasificación	6

1.3 Patogénesis, transmisión y epidemiología.....	10
1.4 Diagnóstico, prevención, control y vacunas.....	11
1.5 Tropismo Viral	13
1.6 Respuesta inmune.....	15
1.7 VLB en Humanos.....	17
<u>2.</u> CARACTERISTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DEL VLB EN COLOMBIA.....	18
2.1 INTRODUCCIÓN	19
2.2 ARTÍCULO.....	24
2.3 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	48
<u>3.</u> ANÁLISIS DEL POTENCIAL ZONÓTICO DEL VLB.....	54
3.1 INTRODUCCIÓN	55
3.2 ARTÍCULOS	60
3.3 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	96
<u>4.</u> REFERENCIAS	104

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema del genoma del VLB. Autoría propia	7
Figura 2. Esquema del virus de la Leucosis bovina. Autoría propia.....	9
Figura 3. Esquema distribución de genotipos de VLB a nivel mundial. Autoría propia.	23

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales en el ganado bovino constituyen una causa importante de problemas sanitarios asociados con pérdidas económicas en la industria ganadera bovina. La infección por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) tiene un comportamiento endémico a nivel mundial. La enfermedad cursa como asintomática en la mayoría de los animales infectados, a lo largo de su vida disminuyen considerablemente su capacidad productiva y la ganancia de peso en pie se ve comprometida, la producción de leche disminuye y se generan costos adicionales a causa de infecciones concomitantes (Acaite, Tamosiunas, Lukauskas, Milius, & Pieskus, 2007; Barez et al., 2015).

El ganado bovino es considerado el hospedero natural del VLB, sin embargo su presencia también se ha visto en ovejas y búfalos, (De Oliveira et al., 2016; Nekoei, Hafshejani, Doosti, & Khamesipour, 2015) recientemente se ha reportado la presencia de ADN y de proteínas virales en tejido humano de mujeres con cáncer y sin cáncer de seno (G. C. Buehring et al., 2014; G. C. Buehring et al., 2015; N. A. Gillet & Willems, 2016; Mesa, Ulloa, & Gutiérrez, 2013; Ochoa-Cruz, Uribe, & Gutierrez, 2006; Zhang et al., 2016) . Con este antecedente nace el proyecto titulado "Búsqueda y relación filogenética del virus de la Leucosis bovina (VLB) en tejido mamario humano con y sin neoplasia y en linfocitos de bovinos seropositivos", financiado por Colciencias bajo el Contrato 637 de 2014. Dicho proyecto tiene dos componentes importantes, el humano y el bovino. En el proyecto humano se busca detectar y analizar el VLB obtenido de tejido mamario humano con y sin neoplasia y en el proyecto bovino se busca realizar una caracterización epidemiológica y

molecular del VLB en ganado colombiano tratando de demostrar potencial zoonótico viral. Los dos trabajos tienen un componente común que es tratar de determinar la vía de transmisión del virus del ganado al humano y con los resultados de los dos trabajos se espera dar respuesta a la pregunta principal del macroproyecto que es: ¿cuál es la relación que existe entre el cáncer de seno humano y el VLB?

El proyecto que se describe a continuación aborda el problema del VLB apoyándose en la hipótesis de que es un virus zoonótico. Para tal fin se utilizaron las definiciones de la Organización mundial de la Salud (OMS), el Centro para el control y la prevención de las enfermedades (CDC) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), las cuales se complementaron hasta proponer 9 características que deben ser tenidas en cuenta cuando una infección es considerada como zoonótica.

En Colombia se tiene poca información sobre los aspectos epidemiológicos y moleculares del VLB. Recientemente se reportó una seroprevalencia por animal del 42%, pero no se han reportado los genotipos virales ni las secuencias génicas del ganado colombiano; poco se sabe a nivel molecular del receptor en la célula B y se tienen solo algunos reportes de la presencia viral en células distintas a los linfocitos.

Por este motivo se realizó este estudio epidemiológico y molecular del VLB en Colombia, que si bien buscó determinar su capacidad zoonótica, también dio información adicional sobre la presencia del virus y sus genotipos circulantes en la población bovina analizada, sobre los segmentos de genes *tax*, *gag* y *env* obtenidos en linfocitos aislados de bovinos y en sus productos de consumo como lo son carne y leche cruda, finalmente sobre la molécula AP3D1 como posible receptor viral en linfocitos bovinos.

Los resultados obtenidos que se encuentran en este documento, están distribuidos en tres capítulos. El primero titulado “Características virales”, es una revisión teórica de las particularidades del VLB en su hospedero natural que es el ganado bovino, el segundo denominado “Características epidemiológicas del VLB en Colombia”, responde a la prevalencia viral y a los genotipos encontrados según el proceso y uso de herramientas bioinformáticas de las secuencias de los tres genes virales analizados. Estos resultados se encuentran sintetizados en la siguiente publicación:

Adriana Patricia Corredor, Nury Nathalia Olaya Galán, Salas Sandra, Juan Sebastián Quintero, Álvaro Fajardo, Martín Soñora, Pilar Moreno, Juan Cristina, Alfredo Sánchez, Julio Tobón, Diego Ortiz, María Fernanda Gutiérrez. Genotipo 6 oculto y co-circulando con el genotipo 1 del Virus de la Leucosis Bovina en ganado bovino colombiano. Sometido

El tercer capítulo se titula: “Análisis del potencial zoonótico del VLB” y es donde se aborda el tema del potencial zoonótico desde dos puntos de vista. El primero evidenciando la presencia del VLB en leche de ganado bovino y en carne cruda para consumo. Este reporte es muy importante porque muestra la posible ruta de transmisión del virus al humano. El segundo enfoque fue el análisis de la molécula propuesta como receptor viral sobre la célula bovina y su similitud con ésta misma presente en la célula humana. Los resultados se encuentran sintetizados en los artículos que se presentan a continuación:

N. N. Olaya-Galán, A. P. Corredor-Figueroa, T. C. Guzmán-Garzón, K. S. Ríos-Hernandez, S. P. Salas-Cárdenas, M. A. Patarroyo and M. F. Gutierrez. Bovine leukaemia virus DNA

in fresh milk and raw beef for human consumption Epidemiol. Infect. Page 1 of 6. 2017
doi:10.1017/S0950268817002229

Adriana Corredor, Janneth González, Luis A. Baquero, Hernando Curtidor, Nury Olaya, Manuel A. Patarroyo, María F. Gutiérrez In silico and in vitro analysis of boAP3d1 protein interaction with bovine leukaemia virus gp51. Plos One Abril 2018
<https://www.worldcat.org/issn/1932-6203>

Adriana Patricia Corredor-Figueroa, Nury Nathalia Olaya-Galán, Juan Sebastián Quintero, Sandra Patricia Salas-Cárdenas, Nathalia Alarcón, Karina Salvatierra, Manuel Alfonso Patarroyo, María Fernanda Gutiérrez. Bovine leukaemia virus genotype and genomic variations in fresh milk and raw beef for human consumption. Sometido.

Por último y fuera del contexto de este trabajo, pero buscando cumplir los compromisos adquiridos ante Colciencias, los resultados más relevantes este proyecto se reunirán con el trabajo realizado en VLB en el humano. De esta unión deberá publicarse un último artículo en el que se analizará si la relación que tiene el VLB con el cáncer de seno es de presencia, asociación y causalidad o si se trata de una zoonosis que no tiene relación con la patología de seno.

CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS VIRALES

1. CARACTERÍSTICAS VIRALES

1.1 Virus de la Leucosis Bovina: Historia

El virus de la Leucosis bovina (VLB) causa una enfermedad denominada Leucosis bovina enzoótica (LEB), de la cual se tiene registro desde las primeras observaciones de Leisering en 1871, donde identificó una enfermedad en el bovino que causaba esplenomegalia y leucocitosis persistente, no obstante en ese momento no se conocía la causa específica de esa sintomatología (Aida, Murakami, Takahashi, & Takeshima, 2013). Posteriormente se empezaron a notificar casos de LEB en todo el mundo, principalmente en el Reino Unido, Suiza, Estados Unidos, Suecia, Francia, Japón e incluso algunas regiones de América Latina (Burny et al., 1985). Más adelante, en Alemania, se iniciaron los estudios de la enfermedad y del agente etiológico y en el año 1969 Miller y colaboradores visualizaron por microscopía electrónica estructuras similares a agentes virales a partir de linfocitos infectados, pero solo hasta el año 1972 se logró relacionar su presencia con el desarrollo de la enfermedad (Burny et al., 1978; Burny et al., 1985; Miller, Miller, Olson, & Gillette, 1969).

1.2 Estructura, genoma viral y clasificación

El VLB pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia Orthoretrovirinae, la cual se divide en 6 géneros: alfaretrovirus, betaretrovirus, gammaretrovirus, epsilonretrovirus, lentivirus y deltaretrovirus donde se encuentra el VLB junto con el HTLV, virus causante de leucemia

en humanos. Como particularidad de todos los retrovirus, su genoma es de ARN diploide de cadena sencilla y de polaridad positiva, el cual viene acompañado de una retrotranscriptasa para llevar a cabo su ciclo viral. Es un virus envuelto con un tamaño aproximado de 80 a 125 nm (ICTV, 2014) y es considerado un “retrovirus complejo” por tener en su genoma codificación tanto para proteínas estructurales típicas de todos los retrovirus como una región denominada *pX*, la cual codifica para proteínas auxiliares con función regulatoria como las proteínas Tax y Rex. De igual manera en su genoma se encuentran dos LTR o Long Terminal Regions, ubicadas en los extremos 5' y 3' del genoma viral, que están compuestas por las subregiones U3-R-U5 que cumplen funciones específicas para la transcripción. Su genoma tiene un tamaño de 8714 nucleótidos con 8 Marcos Abiertos de Lectura (ORF) (Figura 1) (Boris-Lawrie, Altanerova, Altaner, Kucerova, & Temin, 1997; Cullen, 1991; N. Gillet et al., 2007; Rola-Luszczak et al., 2013).

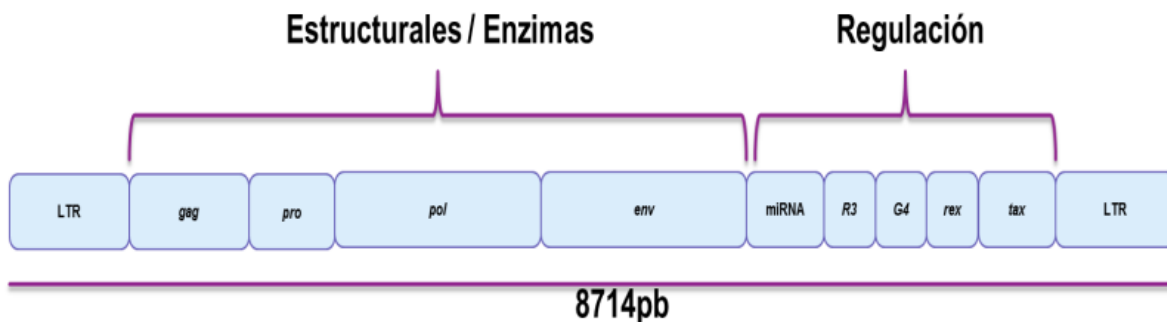


Figura 1 Esquema del genoma del VLB. Autoría propia

El gen *gag* consta de 1183 nucleótidos, codifica para las proteínas de cápside p24 y es frecuentemente utilizado en el laboratorio para determinar la presencia del virus por su nivel de conservación. El gen *pX* de 3304 nucleótidos, codifica para la proteína Tax que cumple funciones regulatorias, activa la transcripción para favorecer la expresión viral e interactúa con factores de transcripción celulares. Algunos mecanismos descritos por los cuales Tax induce transformación en las células es por la inhibición de la reparación del ADN, el bloqueo de la apoptosis, el actuar como transactivador de los LTRs, el alterar la regulación de la transcripción y de la traducción celular. Algunos experimentos en ratones han demostrado que esta proteína coopera con el oncogén Ha-ras para inducir la transformación completa de las células y formar el tumor, así mismo interactúa con el oncogén *myc*, entre otros factores celulares (N. Gillet et al., 2007).

Hasta la fecha no hay evidencia de que existan mutaciones en el gen *tax* que estén relacionadas con la presencia o el desarrollo de la leucemia en el ganado y tampoco que este gen esté relacionado con el genotipo viral.

El segmento que corresponde al gen *env* tiene una longitud de 1547 nucleótidos, codifica para la proteína de la envoltura la cual se encuentra compuesta por la glicoproteína 51 que es la porción extracelular cuya nomenclatura es gp51-SU y la glicoproteína 30 que es la porción transmembranal, conocida como gp30-TM (Johnston, Albritton, & Radke, 2002; Johnston & Radke, 2000). Esta proteína es fundamental para el reconocimiento y entrada del virus a la célula hospedera y es además una de las proteínas más inmunogénicas del virus. Adicionalmente este gen es usado para la genotipificación viral. Hasta el momento se han reportado 10 genotipos del VLB en diferentes regiones del mundo empleando técnicas de RFLP, secuenciación del genoma completo o secuenciación parcial o total de

env, encontrando al genotipo 1 como el más prevalente a nivel mundial (Polat, M. et al., 2017).

La estructura del viri3n est11 dada por las prote3nas de la c11pside p24, p15 y p12, donde la prote3na p24 predomina y empaqueta el ARN en uni3n con la prote3na p12, luego la p15 conforma una matriz que interact11a con las prote3nas transmembranales de la envoltura. La envoltura consta principalmente de 2 glicoprote3nas, la gp30 (TM) y la gp51 (SU) y una regi3n lip3dica obtenida de la membrana celular de su c3lula hospedera. La gp51 cuenta con un dominio globular de superficie (SU) que al final est11 unido a una regi3n transmembranal (TM) conformada por la prote3na gp30 (Figura 2) (Barez et al., 2015).

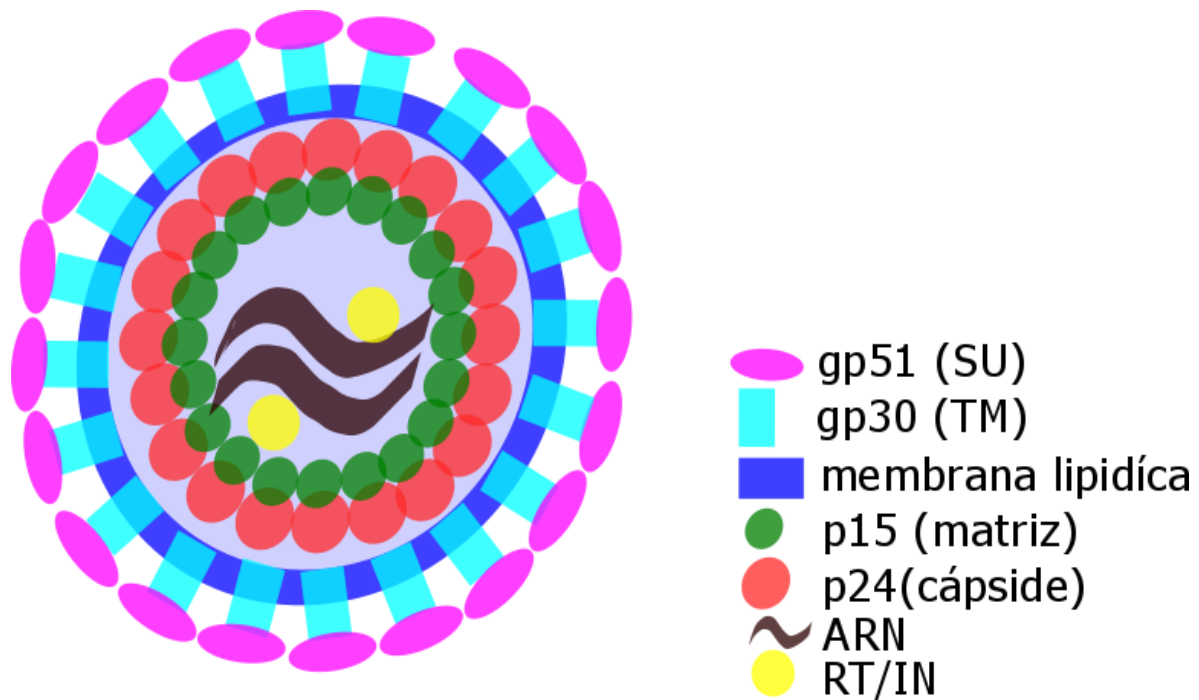


Figura 2 Esquema del virus de la Leucosis bovina. Autor3a propia

1.3 Patogénesis, transmisión y epidemiología

La LEB es una enfermedad infecciosa crónica del ganado bovino, con un bajo porcentaje de individuos con manifestaciones clínicas puesto que de la totalidad de individuos infectados aproximadamente 60 % son aleucémicos (AL), el 30% presentan linfocitosis persistente (LP) y solo el 10% logran llegar a las etapas más avanzadas de la enfermedad con el desarrollo de leucemias o linfomas, lo cual sucede algún tiempo después de que el animal termina su ciclo productivo de leche o su capacidad de tener más terneros, esto conduce a que estos animales sean sacrificados antes de la aparición de los síntomas (OIE, 2012).

La LP se asocia con una condición preneoplásica que no en todos los casos desemboca en linfosarcomas; esta enfermedad se presenta sobre todo en animales adultos después de los dos años de edad y con mayor frecuencia entre los 4 y 8 años. Su desarrollo y las manifestaciones clínicas se asocian con la presencia de una esplenomegalia, formación de nódulos en el bazo con acumulación de células B transformadas y más adelante, el decaimiento y la muerte del animal. En general, las manifestaciones clínicas pueden incluir daños digestivos, inapetencia, pérdida de peso, debilidad general y algunas veces manifestaciones neurológicas (N. Gillet et al., 2007; Hajj et al., 2012; Schwartz & Levy, 1994).

Cualquier líquido o fluido proveniente de una vaca infectada, que contenga linfocitos B portadores del virus, son potencialmente infecciosos para vacas sanas. Para la transmisión horizontal iatrogénica, los individuos sanos son expuestos a linfocitos infectados por lo

general por el contacto con animales portadores o por malas prácticas pecuarias en el hato. En la transmisión vertical, la madre puede pasar el virus a los becerros por medio del calostro, por la leche o por vía transplacentaria, sin embargo, esta vía de transmisión es menos frecuente (Hopkins & DiGiacomo, 1997). Se ha demostrado que los hatos infectados con VLB presentan una menor producción láctea, así como una mayor susceptibilidad a adquirir otras enfermedades de etiología infecciosa, lo que deja como resultado altas pérdidas económicas y serias implicaciones para el sector ganadero de la mayoría de los países, pues la prevalencia a nivel mundial oscila entre el 15 al 80% (M Polat, Takeshima, & Aida, 2017).

1.4 Diagnóstico, prevención, control y vacunas

El diagnóstico del virus se puede realizar con técnicas inmunológicas y moleculares como la seroneutralización, Western Blot, ELISA, inmunodifusión en agar (AGID) y PCR, que en muchos casos son usadas para diagnóstico de muestras “en pool”, lo que disminuye su sensibilidad. La AGID es la técnica serológica más antigua considerada como la prueba de oro, sin embargo, se ha demostrado que es poco sensible en comparación con la ELISA y aún más con la PCR. Las técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación son útiles para el seguimiento de los genotipos circulantes. Actualmente el uso de las técnicas de ELISA y PCR son las más recomendadas por la OIE en el Manual de enfermedades terrestres del año 2018.

Hasta el momento no existe una vacuna ni tampoco un tratamiento para VLB, por lo tanto se hace necesario tomar medidas frente a la prevención y el control de la enfermedad. En la

literatura se reportan algunos factores de riesgo que incrementan la posibilidad de contagio de unos animales con otros tales como la presencia de hatos vecinos infectados, pastos compartidos, alquiler de vacas o toros entre fincas, el tamaño de los hatos, deficiencia en los procesos de desinfección y las malas prácticas pecuarias, entre otros (Bartlett et al., 2014; Della Libera et al., 2015; Kobayashi et al., 2010; Nekouei et al., 2015; Ohno, Takeshima, Matsumoto, & Aida, 2015; Sevik, Avci, & Ince, 2015). En Colombia, recientemente se reportaron factores de riesgo y de protección asociados con la infección por VLB en donde la infección con parásitos sanguíneos y con otros virus tales como el sincitial respiratorio, parainfluenza y diarrea viral bovina se encontraron como unos de los principales factores de riesgo asociados a VLB y el uso de agujas individuales como el principal factor de protección (Ortega et al., 2016). El conocer y evitar exponer a las vacas sanas ante estos factores, contribuye a disminuir los riesgos de infección. Si se tienen animales positivos para VLB dentro del hato, es necesario proceder a su eliminación o segregación con el fin de controlar la fuente de transmisión y evitar su diseminación. Gracias a los programas de control que han acogido los ganaderos, que incluyen prácticas de diagnóstico periódicas de control de anticuerpos, segregación de los animales infectados y buenas prácticas ganaderas entre otras, el VLB ha sido erradicado en 22 países a nivel mundial (Acaite et al., 2007; Bartlett et al., 2014).

Desde hace más de 40 años se han realizado diferentes aproximaciones vacunales. Los virus inactivados generaban respuesta inmune humoral pero no resistían al desafío. Las subunidades vacunales gp51 y de p24 tampoco lograron una protección efectiva. Las vacunas recombinantes con el virus vaccinia al que le incorporaban *env*, *gag* y *pol* fueron efectivas en ensayos en ovejas, pero desafortunadamente no sucedió lo mismo en vacas.

Los péptidos sintéticos de gp51 que se unirían a células B y T resultaron deficientes inmunógenos. Las vacunas de ADN que contenían el gen *env* o *pX* para expresar las proteínas gp51 y Tax, tampoco tuvieron éxito. Los provirus atenuados que contenían solo genes estructurales parecían ser la mejor alternativa del momento, sin embargo el riesgo de que estos se recombinaran con cepas salvajes era esperado (Fukuyama et al., 1993; Miller & Van Der Maaten, 1978; Miller, Van der Maaten, & Schmerr, 1983; Parfanovich et al., 1983; Patrascu et al., 1980; Ristau, Beier, & Wittmann, 1987). En resumen, a pesar de la estabilidad en el genoma del VLB hasta el momento no se cuenta con una estrategia vacunal efectiva.

Por su parte los anticuerpos calostrales transmitidos a los becerros, podrían ser una ventaja para el manejo y control de la infección viral, pero su título disminuye rápidamente dejando expuesto al animal a adquirir la infección. En esta línea, recientemente se desarrolló un anticuerpo quimérico de rata PD-L1 anti-bovino, el cual demostró ser eficiente para reactivar células T *in vitro* e *in vivo*, logrando disminuir la carga proviral, sin embargo, estudios adicionales deberán ser realizados para evaluar su aplicabilidad clínica (Nishimori et al., 2017).

1.5 Tropismo Viral

La célula hospedera reportada para el VLB es el linfocito B, sin embargo, en la literatura también se ha reportado que este virus infecta células distintas al linfocito B e incluso, células de otras especies además del ganado bovino (D'Angelino et al., 2013; Kettmann, Mammerickx, Portetelle, Gregoire, & Burny, 1984; Slavikova, Zajac, Reinerova,

Kettmann, & Burny, 1986; Willems et al., 1993). También se ha informado recientemente que el VLB está presente en las células epiteliales de las glándulas mamarias de las mujeres con cáncer de mama, sugiriendo una asociación con este tipo de patologías (G. C. Buehring et al., 2014; G. C. Buehring et al., 2015; Mesa et al., 2013; Ochoa-Cruz et al., 2006). Adicionalmente se cuenta con reportes donde se han logrado infecciones exitosas por el VLB en modelos *in vivo* como cabras, ovejas, pollos y conejos, generando daño en algunos de ellos, tal como ocurre en la vaca. Los primeros estudios donde se consideraron otras especies y otras células fueron los realizados por Kettman y colaboradores entre 1986 y 1990 donde, de manera experimental, fueron infectadas cabras y ovejas con el virus y fue posible reproducir la enfermedad. Así mismo se logró detectar el ADN proviral en linfocitos de estas especies animales (Kettmann et al., 1984; Slavikova et al., 1986; Willems et al., 1993). Altanerova y colaboradores inocularon pollos de un día de nacidos con células linfoides infectadas por el virus logrando reproducir la enfermedad en algunos de los animales infectados (Altanerova, Ban, Kettmann, & Altaner, 1990). Otro aporte importante fue el realizado por Levkut y colaboradores quienes infectaron conejos con VLB obteniendo una manifestación clínica asociada a una encefalitis, planteando que podría ser una encefalitis zoonótica causada por la presencia del virus (Levkut et al., 1997). Otros hallazgos más recientes son los de D'Angelino y colaboradores en el 2013, quienes encontraron el virus en células de Sistema Nervioso Central (SNC) de ganado con síndromes neurológicos, lo que demuestra otras células susceptibles distintas a su blanco reportado, planteando la posibilidad que este virus pueda estar asociado con otras patologías (D'Angelino et al., 2013). Estos estudios muestran perspectivas distintas que

ponen en duda si realmente el bovino es el único hospedero que puede ser afectado o que los linfocitos B sean las únicas células susceptibles de infección por el virus.

Hasta el momento el receptor celular, que permite la adherencia viral para iniciar el proceso infeccioso no se ha descrito, sin embargo, hasta la fecha se han publicado dos estudios que se refieren a este receptor. En el primero se encontraron dos clones relacionados con el receptor (BLVR) (BLVcp1 y BLVcp1 / 5 ') que codifican para una proteína de membrana plasmática cuyo dominio extracelular se une a gp51 (Ban et al., 1993; Ban et al., 1994). Posteriormente se propuso que el BLVR estaba relacionado con el complejo de proteínas 3 relacionado con el adaptador (AP-3) (Suzuki, Matsubara, Kitani, & Ikeda, 2003). Sin embargo, AP-3 no es una molécula específica de los linfocitos B, lo que sugiere que otros tipos de células podrían ser susceptibles a la infección. Por ello se hacen necesarios estudios que permitan profundizar en la capacidad de infección del virus en diferentes tipos de células.

1.6 Respuesta inmune

A pesar de que el VLB está ampliamente distribuido en el mundo, la enfermedad en los animales infectados no se hace muy evidente a menos de que se desarrolle la leucemia o linfoma. Antes de que suceda ese evento hay una afectación global en el sistema inmunológico tanto de la respuesta innata como adaptativa, lo que conlleva a la inmunosupresión del animal, causando infecciones concomitantes que terminan en una baja producción láctea, altos costos en manejos veterinarios y falla en la respuesta a vacunas, lo

cual impacta la economía de la industria ganadera bovina (Erskine, Bartlett, Sabo, & Sordillo, 2011; Trainin, Brenner, Meiron, & Ungar-Waron, 1996).

La célula blanco del VLB es el LB, por lo que ante la presencia viral genera una expansión policlonal dando origen a la linfocitosis persistente (LP) y a la desregulación de la respuesta humoral (Meiron, Brenner, Gluckman, Avraham, & Trainin, 1985). El VLB infecta preferencialmente LB CD5+, por lo que en algún momento se llegó a proponer a este marcador como receptor celular que interactuaba con la gp51 del VLB (Meiron, Moss, & Brenner, 1997). El marcador de diferenciación CD5 es una glicoproteína de membrana expresada en los LT y en un subconjunto de los LB que actúa como un marcador de activación para los LB y es un mediador entre el LT y el LB (Werner-Favre, Vischer, Wohlwend, & Zubler, 1989). El fenotipo de los LB aislados de un grupo de vacas VLB+ con LP versus vacas sin infección y con un conteo normal de linfocitos, demostró que la población de LB CD5 + era del 90,5% en el primer grupo de animales, mientras que en el segundo grupo fue del 31% (Stone, Hof, & Davis, 1995). Ahora bien, la producción de anticuerpos en animales VLB+ disminuye, un estudio demostró que estos animales a los cuales se les administró la vacuna J5 *Escherichia coli* produjeron una cantidad de IgG2 en suero cuatro veces menos con respecto al grupo de animales negativos para VLB (P = .007) (Erskine et al., 2011).

Si bien el VLB infecta al linfocito B, parte del efecto que causa sobre el sistema inmune es desestabilizar al linfocito T. LT aislados de sangre periférica de vacas VLB+ en fase AL y LP tienen un fenotipo distinto. Por ejemplo, LAG3 y TIM3, reguladores negativos de la activación y proliferación de LT implicados en desencadenar muerte celular, se encontraron

aumentados en LT CD4 + y CD8 +. Lo que podría implicar la supresión de la actividad de los LT en vacas VLB+ (Konnai et al., 2013; Shirai et al., 2011).

Se han realizado análisis de citoquinas que participan en la respuesta antiinflamatoria y humoral en bovinos AL y PL. Se encontró que los niveles de producción y circulación sérica de IL-2, IL-4 e IFN-gamma en bovinos PL y IL-4 e IFN-gamma en bovinos AL se expresaron menos comparado con animales sanos (Amills, Ramiya, Norimine, Olmstead, & Lewin, 2002; Bao & Cao, 2014; Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin, & Coffman, 1986), ocasionando así una respuesta efectora deficiente en los animales infectados con VLB, permitiendo procesos tales como infecciones concomitantes, baja respuesta ante administración de vacunas y pobre renovación de tejidos e inflamación.

1.7 VLB en Humanos

De acuerdo con las evidencias experimentales, la capacidad del VLB para infectar células distintas al linfocito B e incluso células de diferentes especies es evidente. En la literatura existen reportes de Buehring y colaboradores en Estados Unidos y de Gutiérrez y colaboradores en Colombia que muestran la presencia de anticuerpos anti VLB, proteínas y genoma viral en el humano, tratando de relacionar el virus con cáncer de mama (G. C. Buehring et al., 2014; G. C. Buehring et al., 2015; Mesa et al., 2013; Ochoa-Cruz et al., 2006). Sin entrar a profundizar en esta relación del virus con el cáncer, lo cierto es que un virus cuyo tropismo principal es el ganado bovino, está logrando infectar al humano, posiblemente por el contacto directo con el animal infectado o por el consumo de alimentos

Características virales

tales como carne y leche provenientes de estos, convirtiéndolo así en un virus potencialmente zoonótico.

CAPÍTULO 2
CARACTERÍSTICAS
EPIDEMIOLÓGICAS DEL VLB EN
COLOMBIA

2. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DEL VLB EN COLOMBIA

2.1 INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define la epidemiología como el estudio de la distribución y los determinantes de enfermedades relacionados con la salud y la aplicación de esos estudios al control las mismas (OMS, 2018). La epidemiología molecular, cuya herramienta son datos genómicos, es muy útil en el campo de los agentes infecciosos para evaluar su origen, los cambios o variaciones génicas relacionadas con patogenicidad, susceptibilidad, distribución, evaluación de riesgos, dinámica y propagación de enfermedades y evaluación de epidemias (McMichael, 1995), entre otros. Ejemplo de ello, en el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), se ha usado para clasificarlo en grupos, subtipos, sub-subtipos y formas recombinantes (CRFs y URFs), adicionalmente ha sido una herramienta útil para saber cuáles son más prevalentes, más patogénicos, prevenir eventos de transmisión, entender la dinámica de las epidemias y monitorear resistencias a los antirretrovirales disponibles (Paraskevis, Nikolopoulos, Magiorkinis, Hodges-Mameletzis, & Hatzakis, 2016).

El VLB es un agente infeccioso con importantes implicaciones económicas en la industria ganadera bovina (Bartlett et al., 2014; Ott, Johnson, & Wells, 2003), que además de infectar a las vacas que son una fuente importante de proteína para consumo humano se ha demostrado su presencia en tejido mamario humano (G. C. Buehring et al., 2014; G. C. Buehring et al., 2015; Mesa et al., 2013; Ochoa-Cruz et al., 2006). De modo que realizar

análisis filogenéticos a las cepas de VLB circulantes en el mundo, se convierte en una necesidad de todos los países que son productores y consumidores del ganado bovino ya que aportan conocimiento en pro de conocer el virus y su distribución, proponer estrategias vacunales, anticipar riesgos epidémicos y zoonóticos, generar herramientas de decisión y evaluar acciones.

El VLB ha sido reportado en múltiples países del mundo bien sea por medio de la presencia de anticuerpos anti VLB, lo cual se conoce como seroprevalencia o por la presencia del virus demostrada con la detección de uno o varios de sus genes o de sus proteínas, lo que corresponde a la prevalencia. El comportamiento del virus en Suramérica es endémico con cifras que oscilan entre el 27 al 77% (M Polat et al., 2017). En Colombia, se han realizado estudios de seroprevalencia que involucran diferentes regiones o específicamente para algún tipo de producción, por ejemplo, para el ganado lechero se reportan cifras que oscilan entre el 35 y 80% (Alfonso, Almansa, & Barrera, 1998) (Betancur et al., 2008; Úsuga-Monroy et al., 2017).

Recientemente se realizó un estudio que involucró 8150 animales distribuidos en 390 predios en 12 zonas de Colombia, todas ellas consideradas como importantes para la ganadería del país. Los resultados de seroprevalencia obtenidos después de realizar pruebas de ELISA para detectar anticuerpos IgG contra el VLB fue del 42% por animal y del 67.7% por predio (Ortega et al., 2016). Por su parte, estudios de prevalencia en Colombia se han restringido en pocas regiones del país, principalmente en el departamento de Antioquia, cuya cifra estuvo alrededor del 50% (Úsuga-Monroy et al., 2017).

Los factores de riesgo son un requisito importante para iniciar los programas de erradicación, los cuales serán distintos en cada caso, pues dependerán de las condiciones propias de cada región. Por ejemplo en Colombia se describieron como factores de riesgo y de protección asociados al VLB la infección con hemoparásitos y el uso de agujas individuales respectivamente (Ortega et al., 2016). En otros países, el tamaño del hato (a mayor tamaño más riesgo de infección a VLB), la presencia de insectos hematófagos, la reutilización de agujas y guantes, los programas intensivos de vacunación y fertilización y la compra de vacas sin conocimiento de su estado sanitario entre otros, se han considerado factores de riesgo (Bartlett et al., 2014; Nekouei et al., 2015).

Teniendo en cuenta que todos los intentos vacunales que se han realizado hasta el momento no han sido efectivos, el control y la erradicación del VLB se ha realizado empleando otras estrategias como son las buenas prácticas pecuarias, la segregación de animales positivos y al uso de pruebas diagnósticas periódicas. Con ellas, el VLB se ha logrado erradicar en 22 países de Europa (Acaite et al., 2007; Bartlett et al., 2014). En algunos países como Italia, Finlandia y Polonia la prevalencia ha sido alrededor del 70%, sin embargo, la voluntad del gobierno en instaurar programas de control y erradicación con pautas claras y con la acogida de los ganaderos ha conllevado a que hoy en día la cifra de prevalencia sea menor al 1%. Los planes de erradicación han sido largos, como fue el caso de Italia que duró 22 años y solo hasta el año 2018 lograron declararse libres del virus (Maresca et al., 2015; Nuotio, Rusanen, Sihvonen, & Neuvonen, 2003).

Como las medidas de control en cada país han sido diferentes, en Finlandia trabajaron en principio bajo la premisa “Probar y sacrificar” (Nuotio et al., 2003), medida que para el caso de países como Colombia no podría ser fácil de implementar dadas las condiciones

socioeconómicas de los ganaderos, en donde el 80% de ellos son pequeños ganaderos que cuentan con menos de 10 vacas. Sin embargo, otras medidas sí podrían acogerse tales como buenas prácticas pecuarias, pruebas de inspección periódicas realizadas en las vacas y en sus productos como carne y leche, segregación de animales positivos o incluir dentro del hato animales resistentes a la infección por VLB. Se ha documentado que el antígeno leucocitario bovino (BoLA) del gen DRB3.2 confiere resistencia al virus. En Colombia un estudio demostró la presencia de estos alelos en razas criollas, por lo que se consideran una buena estrategia para el control del VLB (Terranova et al., 2012).

En VLB, la evaluación de genotipos virales data del año 1985, con el reporte del genotipo 1, el cual además de ser el más antiguo, es el más prevalente en todo el mundo puesto que hasta la fecha ha sido reportado en 17 países. En cuanto a los demás genotipos, se han reportado el 2, 3, 4 y 7 como predominantes y en contraste, los genotipos 5, 6, 8, 9 y 10 han sido reportados con menor prevalencia y en regiones geográficas más limitadas. El genotipo 6 ha sido descrito desde el año 2007 en 5 países americanos y 4 asiáticos (Figura 3) (Ababneh, Al-Rukibat, Hananeh, Nasar, & Al-Zghoul, 2012; Balic et al., 2012; Camargos et al., 2007; Camargos et al., 2002; Coulston et al., 1990; Derse, Caradonna, & Casey, 1985; Dube et al., 2009; Dube et al., 2000; Fechner et al., 1997; Gautam, Mishra, Kalaiyarasu, Jhade, & Sood, 2018; Inoue et al., 2011; Lee et al., 2016; E. Lee et al., 2015; Licursi et al., 2003; Lim, Jeong, Tark, Yang, & Kweon, 2009; Mamoun et al., 1990; Matsumura, Inoue, Osawa, & Okazaki, 2011; Molteni et al., 1996; Monti, Schrijver, & Beier, 2005; Moratorio et al., 2010; Ochirkhuu et al., 2016; M. Polat et al., 2015; M. Polat et al., 2016; Rodriguez, Golemba, Campos, Trono, & Jones, 2009; Rola-Luszczak et al., 2013; Yang, Kelly, Bai, Zhang, & Wang, 2016; Zhao & Buehring, 2007).

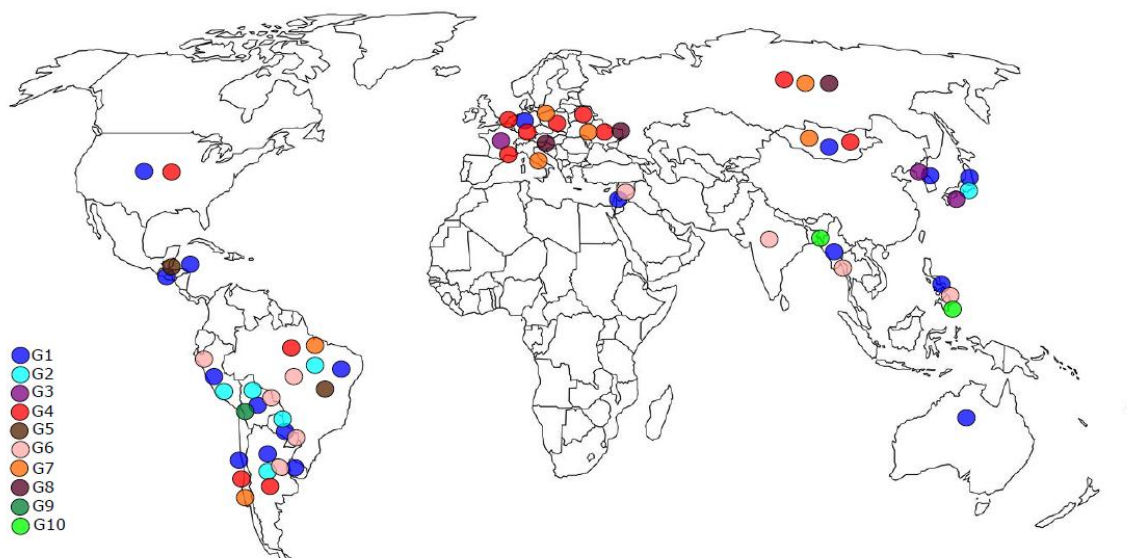


Figura 3. Esquema distribución de genotipos de VLB a nivel mundial. Autoría propia.

En Colombia, estudios reportados por López Herrera en el departamento de Antioquia, describieron la presencia del G1 y G3 (Úsuga-Monroy et al., 2017). Para su hallazgo se genotipificó amplificando una región de 444pb sobre el gen *env* con los primers descritos por Fechner en el año 1997.

Al revisar la bibliografía se evidencia que estudios de la variabilidad genética del VLB circulando en Colombia han sido pocos, por lo tanto en este trabajo se realizó un estudio para conocer la prevalencia del VLB y los genotipos circulantes. Con estos resultados se espera contribuir con la epidemiología global del virus y reforzar el gran impacto de VLB en la ganadería del país. También se espera que aporte herramientas útiles para entidades gubernamentales y productoras de vacunas. Adicionalmente, para los investigadores quienes tendrán la necesidad de comprobar que este es un virus zoonótico, las secuencias

nucleotídicas de las cepas circulantes en vacas serán necesarias para comparar con las secuencias obtenidas de cepas aisladas de tejido mamario de mujeres colombianas.

Los resultados de esta fase del estudio se presentan en el siguiente artículo titulado “Genotipo 6 oculto y co-circulando con el genotipo 1 del Virus de la Leucosis Bovina en ganado bovino colombiano”. Sometido

2.2 ARTÍCULO

GENOTIPO 6 OCULTO Y CO-CIRCULANDO CON EL GENOTIPO 1 DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN GANADO BOVINO COLOMBIANO

Adriana Patricia Corredor¹, Nury Nathalia Olaya Galán^{1,2}, Salas Sandra¹, Juan Sebastián Quintero¹, Álvaro Fajardo³, Martín Soñora³, Pilar Moreno³, Juan Cristina³, Alfredo Sánchez⁴, Julio Tobón⁴, Diego Ortiz⁵, María Fernanda Gutiérrez^{1*}

¹ Grupo de Enfermedades Infecciosas, Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

² PhD Programme in Biomedical and Biological Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

³Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo, Uruguay.

⁴Empresa Colombiana de Productos Veterinarios – VECOL, Bogotá, Colombia.

⁵Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA, Km 14 Vía Mosquera-Bogotá, Mosquera, Colombia.

* Corresponding autor: mfgutierr@javeriana.edu.co

Abstract

Viral diseases in cattle are an important cause of health problems associated to worldwide economic losses in the livestock industry. The BLV belongs to the viral agents whose

prevalence is between 1% and 80% globally, becoming an endemic infection around the world. The etiological agent is the Bovine Leukosis Virus (BLV), 10 viral genotypes have been reported by means of analysis of complete or partial sequences of the envelope gene, genotype 1 being the most prevalent. However, the genetic variability of BLV variants circulating in Colombia remains unexplored. Therefore, in the present study we analyzed blood samples collected from 289 cows distributed in 75 farms around the country. PCR amplification were performed targeting segments of *env*, *gag* and *tax* genes. The amplicons obtained were sequenced and further subjected to phylogenetic analyses. 62% of the cows present at 92% of the farms resulted BLV positive. Genotype I was exclusively detected by *env* and *gag* genes segments when they were analyzed with previously reported primers. However, *tax* gene analyses revealed the circulation of genotype 6 variants, which were further detected in *env* gene with newly designed primers. These results indicate that currently genotyping approaches may bias BLV genetic variability approaches, underestimating the diversity of BLV genotypes detected. This is the first molecular and epidemiological study about BLV conducted in Colombia which contributes to the global epidemiology of the virus; it also reinforces the great impact of BLV in the country's livestock making it a useful tool for farmers and governmental entities.

Palabras clave: Leucosis bovina enzoótica, genotipos virales, BLV por animal, BLV por predio.

Introducción

De acuerdo con el censo bovino nacional del año 2014 en Colombia se reportan cerca de 23 millones de cabezas de ganado. Los virus constituyen una de las principales causas de problemas sanitarios y de ellos el Virus de la Leucosis Bovina (BLV), es uno de los cinco agentes considerados de mayor importancia para el ganado vacuno. Para el año 2016 Colombia reportó una seroprevalencia por animal de 42.7% y por hato del 67.7% (Ortiz et al., 2016) lo que concuerda con la prevalencia reportada a nivel mundial que oscila entre el 4-90% dependiendo la región estudiada (Lee et al., 2016; Morovati et al., 2012; Murakami et al., 2010; Murakamia et al., 2011; Nekouei et al., 2015; Ochirkhuu et al., 2016; Polat et al., 2015; Polat et al., 2016; Rodriguez et al., 2011). La enfermedad se caracteriza por pasar de forma asintomática en el 70% de los animales infectados, puede desarrollar una linfocitosis persistente en el 30% y una leucemia en el 5% de ellos (Barez et al., 2015; Hemmatzadeh et al., 2015).

El BLV pertenece a la familia *Retroviridae*, al género de los Deltaretrovirus, está caracterizado por tener 8714 nucleótidos de longitud, un genoma con RNA de cadena simple y sentido positivo que contiene 8 Open Reading frames (ORFs) dentro de los que se encuentran 3 segmentos génicos, *gag*, *pol* y *env*, que codifican para las proteínas estructurales y enzimas necesarias para la replicación del virus, una región *pX* que codifica para proteínas auxiliares Tax y Rex que realizan funciones regulatorias y dos LTR en los extremos del genoma (Barez et al., 2015; Callebaut et al., 1993; Hamard-Peron and Muriaux, 2011; Inabe et al., 1999; Jewell and Mansky, 2000).

El gen *gag* consta de 1183 nucleótidos, codifica para las proteínas de cápside p24-CA y es frecuentemente utilizado en el laboratorio para determinar la presencia del virus por su nivel de conservación. El *env* tiene una longitud de 1547 nucleótidos, codifican para la proteína de la envoltura la cual se encuentra compuesta por la glicoproteína gp 51 que es la

porción extracelular (gp51-SU) y la gp 30 que es la porción transmembranal (gp30- TM) (Ban et al., 1992). Esta proteína es fundamental para el reconocimiento y entrada del virus a la célula hospedera, y es además una de las proteínas más inmunogénicas del virus.

El gen *pX* de 3304 nucleótidos, codifica para la proteína Tax que cumple funciones regulatorias, ésta activa la transcripción para favorecer la expresión viral y a su vez interactúa con factores de transcripción celulares. Algunos mecanismos descritos por los cuales Tax induce transformación en las células es por la inhibición de reparación del DNA, el bloqueo de la apoptosis, el actuar como transactivador de los LTRs y alterar la regulación de la transcripción y de la traducción celular. Algunos experimentos en ratones han demostrado que esta proteína coopera con el oncogén Ha-ras para inducir la transformación completa de células y formar el tumor. Así mismo interactúa con el oncogén *myc*, entre otros factores celulares, relacionándolo con la presentación del tumor en animales infectados (Gillet et al., 2007). Hasta la fecha no hay evidencia de que existan mutaciones en este gen relacionadas con la presencia o el desarrollo de la leucemia que este virus podría causar en el ganado y tampoco que este gen esté relacionado con el genotipo viral.

Hasta el momento se han reportado 10 genotipos del BLV en diferentes regiones del mundo empleando técnicas de RFLP, secuenciación del genoma completo del virus, secuenciación parcial de *env* o secuenciación del genoma completo. El genotipo 1 es el más prevalente a nivel mundial. Ha sido reportado, a partir del año 1985 hasta la fecha en 17 países de América principalmente, así como en Europa, Australia y Asia. De manera similar se han reportado los genotipos 2, 3, 4 y 7. En contraste, los genotipos 5, 6, 8, 9 y 10 han sido reportados con menor prevalencia y en regiones geográficas más limitadas. El genotipo 6

ha sido descrito desde el año 2007 en 5 países americanos y 4 asiáticos (Ababneh et al., 2012; Balic et al., 2012; Camargos et al., 2007; Camargos et al., 2002; Coulston et al., 1990; Derse et al., 1985; Dube et al., 2009; Dube et al., 2000; Fechner et al., 1997; Gautam et al., 2018; Inoue et al., 2011; Lee et al., 2016; Lee et al., 2015; Licursi et al., 2003; Lim et al., 2009; Mamoun et al., 1990; Matsumura et al., 2011; Molteni et al., 1996; Monti et al., 2005; Moratorio et al., 2010; Ochirkhuu et al., 2016; Polat et al., 2015; Polat et al., 2016; Rodriguez et al., 2009; Rola-Luszczak et al., 2013; Yang et al., 2016; Zhao and Buehring, 2007).

Para la amplificación del gen *env* y la detección del genotipo viral, en 1996 Fechner y colaboradores (Fechner et al., 1997) diseñaron un juego de primers con los cuales reportaron la genotipificación viral basándose en una porción de 444pb, siendo los mismos que han sido recomendados por la OIE para el diagnóstico viral. Esta metodología ha sido utilizada con fines de genotipificación viral en un importante número de reportes, los cuales identifican al genotipo 1 como el más prevalente alrededor del mundo. Sin embargo, al observar que en los árboles filogenéticos las cepas del mismo genotipo forman distintos clusters, surge la pregunta si solo con la amplificación del segmento de 444pb se logran encontrar los 10 genotipos reportados, o si por el contrario se ha subestimado la presencia de otros genotipos circulantes en determinadas regiones.

Teniendo en cuenta el poco conocimiento que se tiene respecto a la prevalencia y los genotipos presentes en Colombia, el objetivo de este trabajo fue realizar la búsqueda y genotipificación de VLB circulantes, haciendo énfasis en la búsqueda de genotipos ocultos, difíciles de encontrar con los primers reportados.

Materiales y métodos

Obtención de muestras y extracción del DNA

El número de muestras a estudiar se determinó mediante la fórmula de muestreo para estimar una proporción usando la herramienta WinEpiscope disponible en línea, teniendo en cuenta los siguientes parámetros: Tamaño de la población 22.574.780, nivel de confianza **95%**, prevalencia esperada 42% de acuerdo a lo reportado por Ortiz y cols en el 2016, error aceptado 5.7%. Lo que indicó que el número adecuado para realizar este trabajo era de 289 realizado de manera aleatoria. Se procedió a realizar la extracción de sangre de 289 animales, las cuales se muestrearon entre el año 2015 y 2016. A partir de las muestras de sangre, se les realizó la separación de células mononucleares mediante la utilización de un gradiente de densidad con Lymphocyte (MP®) y se realizó extracción de DNA total con el fin de buscar el DNA proviral con el estuche comercial High Pure PCR Template Preparation kit (Roche ®).

Prueba de sensibilidad a partir de DNA plasmídicos

La purificación de los productos de 381pb y 396pb para *gag* y *tax* respectivamente se realizó con el kit PCR Wizard (Promega®) insertándolos en el vector pELMO (Ramos et al., 2017), y transformando la *E. coli* TOP10 (Invitrogen®). El DNA plasmídico se usó como plantilla de amplificación en los ensayos de sensibilidad, para lo cual se realizaron diluciones seriadas de cada plásmido iniciando con una concentración de 230ng/μl y 411ng/μl de *gag* y *tax* respectivamente. Posteriormente se realizaron las respectivas PCRs a cada dilución con el fin de determinar el límite de detección de la técnica correspondiente a

la máxima dilución amplificada. Para el caso de *env*, los fragmentos de 801pb se amplificaron de igual manera que el caso anterior pero la clonación fue en el vector pEXP5-CT/TOPO (Invitrogen) con una concentración inicial de 159 ng/ μ l.

Amplificación de los segmentos génicos *gag*, *tax*, *env* de BLV

Para todas las PCR que se describen a continuación se empleó la PCR master mix (Roche ®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los primers y temperaturas de anillaje se describen en la tabla 1. Como control positivo se empleó ADN plasmídico, el cual contenía cada segmento génico en particular (*gag*, *tax*, *env*).

La presencia de BLV se evaluó con una PCR múltiple dirigida a amplificar como control interno el gen constitutivo GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) y un segmento de 385pb del gen *gag*.

Una vez identificadas las muestras positivas para VLB mediante la amplificación del gen *gag*, se procedió a realizar la PCR para detectar un segmento de 373pb del gen *tax* y con el fin de determinar el genotipo, se realizó una PCR dirigida a amplificar un fragmento de 530pb del gen *env*.

Tabla 1. Primers empleados para la amplificación*, secuenciación* y construcción de DNA plasmídico[†] de segmentos génicos de *gag*, *tax* y *env* de VLB. NA (no aplica)

Región	Secuencia de primer 5' - 3' (Forward y reverse)	Producto obtenido (pb)	Temperatura de anillaje (°C)	Concentración mínima detectable (ng/ μ l)	Referencia

Características epidemiológicas del VLB en Colombia

<i>gag</i> *†	AACACTACGACTTGCAATCC	385	59.3	2.3	[8]
	GGTTCCTTAGGACTCCGTCG				
<i>tax</i> *†	CTTCGGGATCCATTACCTGA	373	56.5	0.042	
	GCTCGAAGGGGGAAAGTGAA				
<i>env</i> *	CCCACAAGGGCGGCCTGGTTT	509	62.8	159x10 ⁻⁹	[4]
	AACAACAACCTCTGGGAAGGGT				
<i>env</i> *	TGTCCCTAGGAAAYCAAC	750	56	159x10 ⁻⁴	De este estudio
	AGATTAACCAGGGAGATAGG				
<i>env</i> †	ATGAGATGCTCCCTGTCCCTAG	801	57.6	NA	Corredor et al 2018
	ACGTCTGACCCGGGTAGG				

Los productos de amplificación de todas las regiones estudiadas fueron purificados con el High Pure PCR Product Purification kit (Roche®) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente se realizó la secuenciación por el método de Sanger en el servicio de secuenciación de Macrogen Korea. Las secuencias obtenidas en este estudio fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los números de acceso MH041897 a MH042017, MH057402 a MH057465 y MH057466 a MH057532, para *env*, *gag* y *tax* respectivamente.

Estudios filogenéticos

Con el fin de realizar la genotipificación de los virus circulantes se procedió a comparar las secuencias obtenidas en este estudio con secuencias de genoma completo del BLV

provenientes del Genbank (Tabla 2). 64 amplificadores de *gag* y 67 amplificadores de *tax* provenientes de este estudio fueron comparadas con 16 secuencias de diferentes genotipos provenientes del Genbank. Para el caso del gen *env*, 121 secuencias provenientes de cepas colombianas fueron comparadas con 46 secuencias parciales, que incluían los 10 genotipos de BLV descritos al momento.

Tabla 2. Secuencias de referencia empleadas en la construcción de las filogenias para *env*, *gag* y *tax*. Se relaciona el ID, país de procedencia, porción del genoma, genotipo y referencia.

Genbank ID	País de origen	Genoma	Genotipo	Referencia
AF399703	Brazil	gen <i>env</i>	1	Camargos, 2002
AP018026.1	Japan	Genoma completo	1	Murakami,H. unpublsh
AP018027.1	Japan	Genoma completo	1	Murakami,H.unpublsh
AP018028.1	Japan	Genoma completo	1	Murakami,H. unpublsh
AP018030.1	Japan	Genoma completo	1	Murakami,H. unpublsh
AP018031.1	Japan	Genoma completo	1	Murakami,H. unpublsh
AP018032.1	Japan	Genoma completo	1	Murakami,H. unpublsh
EF065637	Costa Rica	gen <i>env</i>	1	Zhao, 2007
EF600696.1	FLK	Genoma completo	1	Mitchell,M.S, unpublsh
FM209469	Uruguay	gen <i>env</i>	1	Moratorio, 2010
KP201468	Korea	gen <i>env</i>	1	GBGS-2,2014
LC007988	Japan	gen <i>env</i>	1	Mekataunpub
AF399704	Brazil	gen <i>env</i>	2	Camargos, 2002
FJ914764	Argentina	gen <i>env</i>	2	Dube, 2009
LC080654	Perú	gen <i>env</i>	2	Polat, 2016
LC080654.1	Perú	Genoma completo	2	polat 2016
LC080655	Paraguay	Genoma completo	2	Polat, 2016
EF65649	USA	gen <i>env</i>	3	Zhao, 2007
EF65650	Japan	gen <i>env</i>	3	Zhao, 2007

Características epidemiológicas del VLB en Colombia

KP201464	Korea	gen <i>env</i>	3	GBGS-11,2014
LC164084.1	Japan	Genoma completo	3	Murakami
AF067081	Polonia	gen <i>env</i>	4	Mikiewicz, 1998
EF065638	Bélgica	gen <i>env</i>	4	Zhao, 2007
JQ686093	Rusia	gen <i>env</i>	4	Lomakina, 2012
M35238	Francia	gen <i>env</i>	4	Mamoun, 1990
AF399702	Brazil	gen <i>env</i>	5	Polat, 2016
EF065639	Costa Rica	gen <i>env</i>	5	Zhao, 2007
EF065645	Costa Rica	gen <i>env</i>	5	Zhao, 2007
KU233562	Tailandia	gen <i>env</i>	6	Lee, 2016
LC080656	Paraguay	Genoma completo	6	Polat, 2016
LC080657.1	Paraguay	Genoma completo	6	Polat, 2016
LC080658.1	Paraguay	Genoma completo	6	Polat, 2016
AY515274	Chile	gen <i>env</i>	7	Felmer, 2005
HM563758	Ucrania	gen <i>env</i>	7	Rola-Luszczak, 2013
JN695880	Rusia	gen <i>env</i>	7	Lomakina, 2011
GU724606	Croacia	gen <i>env</i>	8	Lojkic, 2010
LC080660.1	Bolivia	Genoma completo	9	Polat, 2016
LC080663	Bolivia	gen <i>env</i>	9	Polat, 2016
LC080668.1	Bolivia	Genoma completo	9	Polat, 2016
LC080670	Bolivia	gen <i>env</i>	9	Polat, 2016
LC080671.1	Bolivia	Genoma completo	9	Polat, 2016
KU233541	Tailandia	gen <i>env</i>	10	Lee, 2016
KU233547	Tailandia	gen <i>env</i>	10	Lee, 2016

El alineamiento múltiple combinado de todas las secuencias colombianas fue realizado mediante la utilización del programa Mega 7(Kumar et al., 2016).

El modelo evolutivo que mejor se adaptaba a los datos fue seleccionado utilizando la interfaz “Find Model” como se encuentra implementado en el paquete Mega7 con base al criterio informativo de Akaike (AIC). Mediante la utilización de este modelo se procedió a

construir arboles de máxima verosimilitud, utilizándose como medida de robustez para cada nodo el método bootstrap con 100 pseudoréplicas. Los árboles filogenéticos obtenidos fueron editados utilizando el programa FigTree v1.4.1 disponible en línea <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Para las secuencias de *env*, se realizó además inferencia filogenética mediante análisis de máxima verosimilitud utilizando el programa RAxML, Phylogenetic tree inference using maximum likelihood/rapid bootstrapping run on XSEDE (RAxML - HPC2 on XSEDE (8.2.10) (Stamatakis, 2014), GTR + G y bootstrap de 100 y con el programa Mrbayes (Huelsenbeck and Ronquist, 2015), se realizó la inferencia filogenética en un marco bayesiano, con GTR +G, dos corridas, tres cadenas.

Resultados

Prevalencia de BLV por detección del segmento génico *gag*

La prevalencia de BLV fue obtenida mediante el hallazgo del segmento génico *gag* y fue de 62% por animal y 92% por granja, distribuida por departamentos así: Cundinamarca 69 y 90%, Boyacá 71 y 94%, Antioquia 73 y 100%, Meta 85 y 100%, Nariño 14 y 75% y Cesar 17 y 75% por animal y finca respectivamente (Fig. 1).

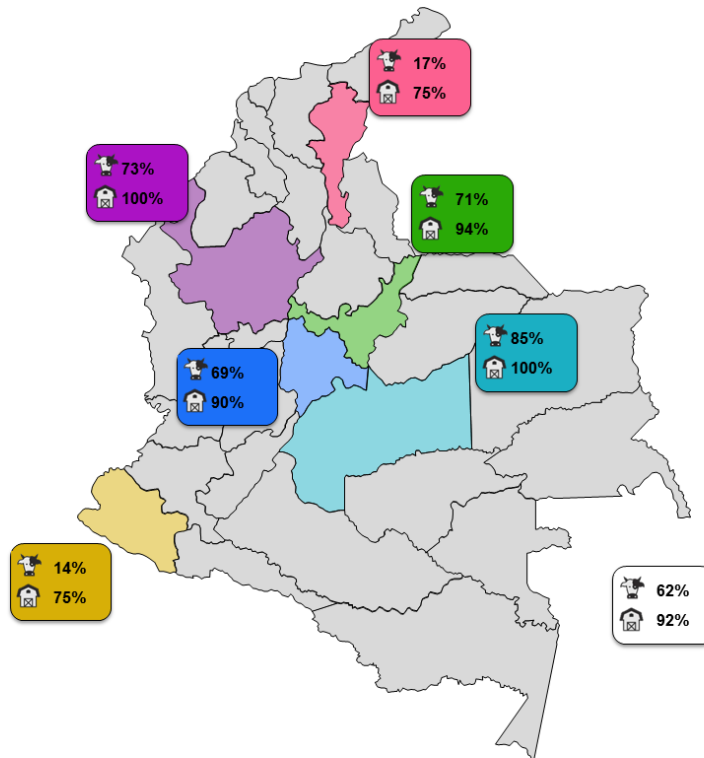


Fig. 1. Prevalencia de VLB por detección del segmento génico *gag* en la población bovina colombiana. Mapa de Colombia, prevalencia por departamento Cundinamarca 69 y 90% (azul oscuro), Boyacá 71 y 94% (verde), Antioquia 73 y 100% (morado), Meta 85 y 100% (turquesa), Nariño 14 y 75% (amarillo) y Cesar 17 y 75% (rosado) por animal y finca respectivamente. Para un total de 62% por animal y 92% por finca de prevalencia de VLB en Colombia.

Determinación del genotipo viral

Con el fin de determinar el genotipo circulante en Colombia, se procedió a la amplificación de la región *env* del genoma de BLV de las muestras recolectadas, obteniendo señal positiva en 179 de ellas, de las cuales solo 100 obtuvo la secuencia correspondiente. Como

se puede observar en el árbol filogenético de la figura 2, todas las muestras colombianas incluidas en este estudio agrupan con el genotipo 1, dato avalado por un alto valor de bootstrap correspondiente al 97%.

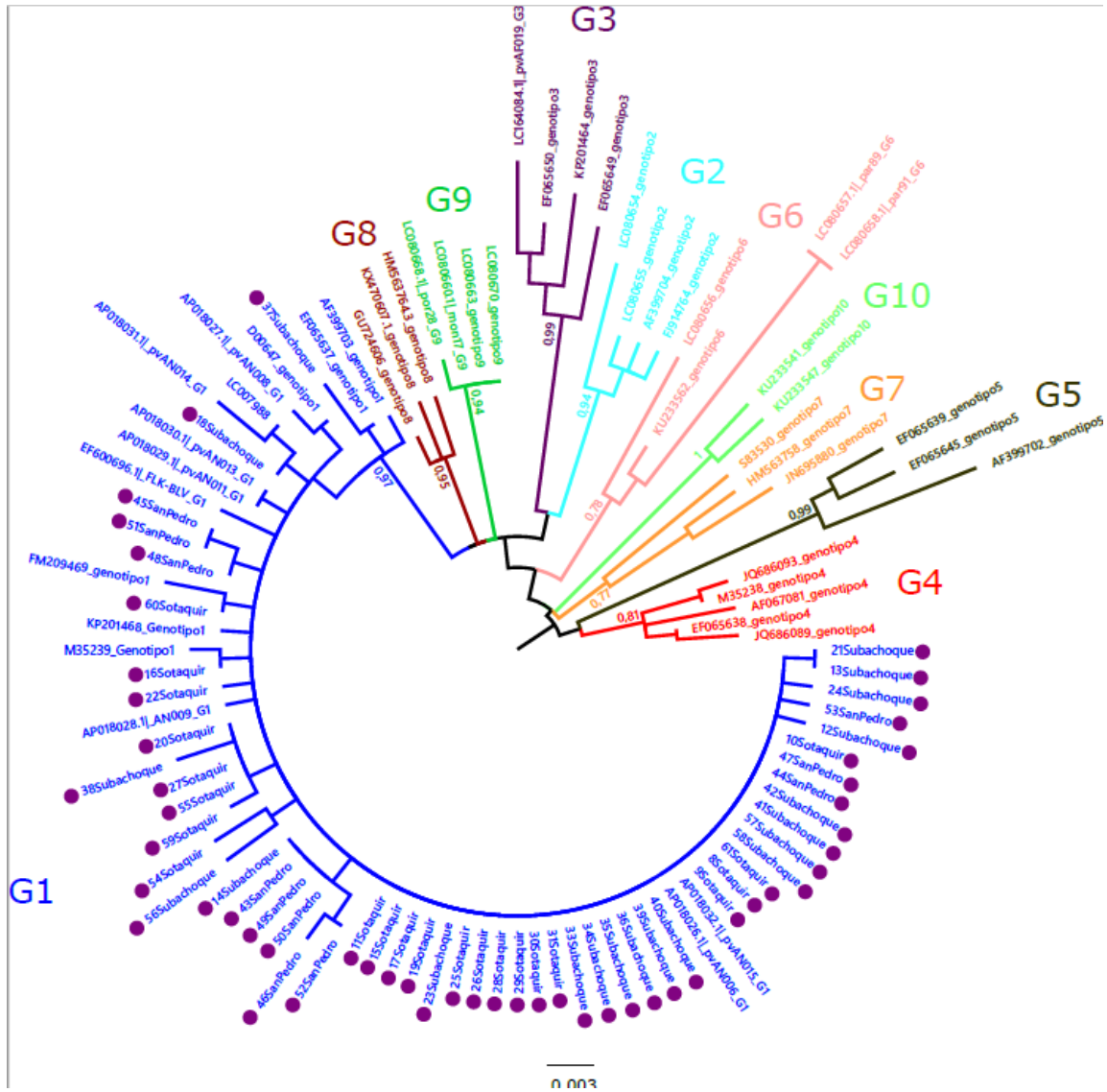


Fig. 2. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method for *env* segment. Using the ML method based on the General Time Reversible model. Likelihood (ML) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A

discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.3005)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 39.13% sites). The analysis involved 100 nucleotide sequences. There were a total of 506 positions in the final dataset.

Así como se le realizó un análisis filogenético al segmento del gen *env*, las secuencias de *gag* y *tax* fueron analizadas encontrando que para *gag*, la totalidad de las muestras colombianas se agrupaban en un mismo clado, el cual correspondía al genotipo 1 (Fig. 3A) pero para *tax*, cuatro de las muestras se separaban del clado de genotipo 1 y se localizaron en genotipo 6 (Fig. 3B). Considerando que esas cuatro secuencias parecían tener una discordancia filogenética entre *tax* y *env* se diseñaron otros primers de mayor longitud, que incluyeran los distintos genotipos descritos buscando detectar variantes que pudieran haber permanecido indetectables con los primers inicialmente utilizados. Con este nuevo juego de primers se amplificó una región de 750 pb del gen *env*, 244nt más largo que el primer juego de primers descrito por Fechner.

Características epidemiológicas del VLB en Colombia

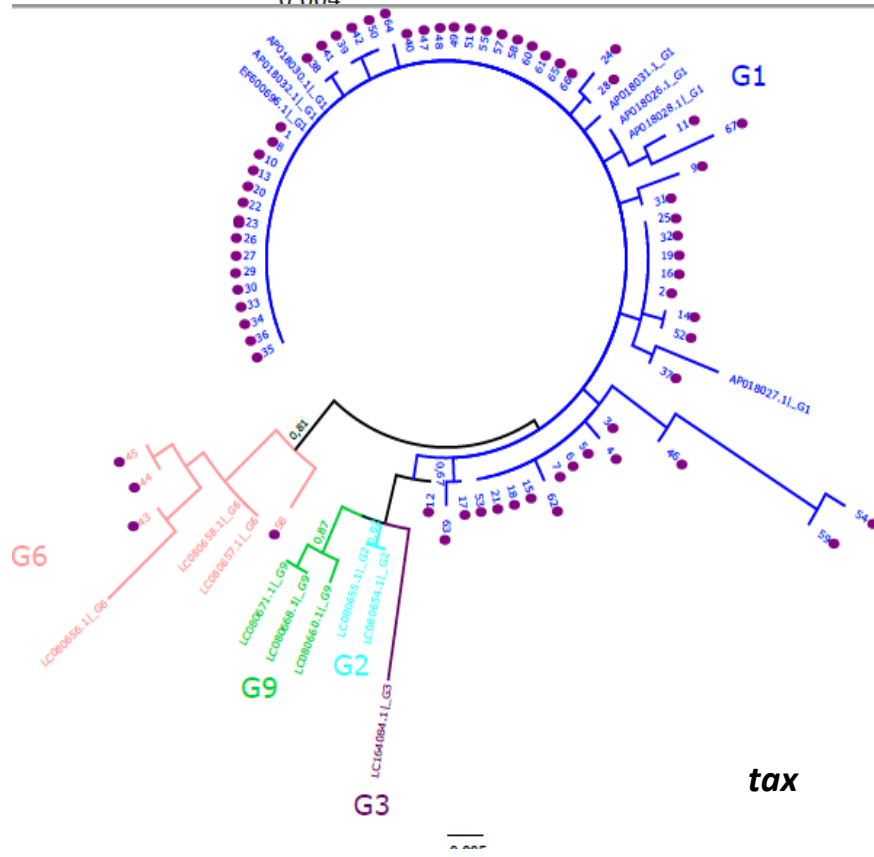
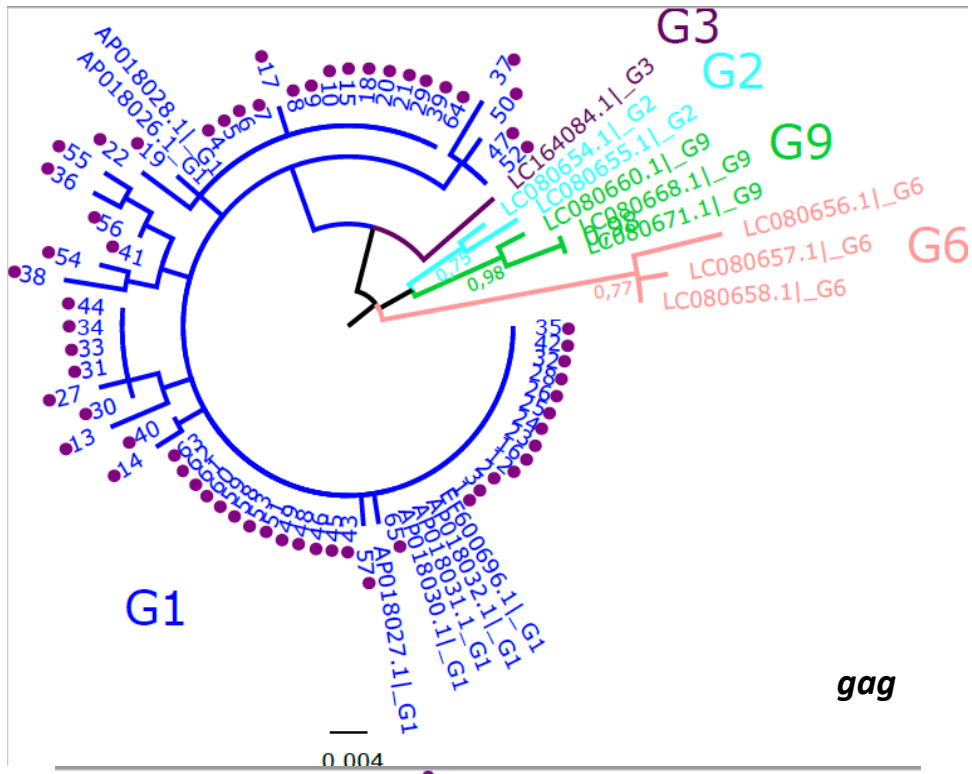


Fig 3. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method with *gag* gene and *tax* gene. The evolutionary history was inferred by using the ML method based on the General Time Reversible model. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.1621) for *gag* and (+G, parameter = 0.1749) for *tax*). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 43.30% sites) for *gag* and ([+I], 42.83% sites) for *tax*. The analysis involved 80 and 83 nucleotide sequences for *gag* and *tax*. There were a total of 306 and 314 positions in the final dataset for *gag* and *tax*. Fig 2 A, Árbol filogenético del segmento del gen *gag*. Nótese que todas las muestras colombianas están agrupadas en el genotipo 1. Fig 2 B árbol filogenético construido con un segmento del gen *tax*. Nótese que cuatro muestras colombianas se encuentran incluidas en el cluster del genotipo 6.

Evidencia de genotipo 6

Para aclarar si existía una posible discordancia filogenética entre *env* y *tax*, las 131 muestras que habían sido positivas para *gag* al principio del estudio fueron amplificadas con el nuevo juego de primers para *env*. Los resultados mostraron que las cuatro muestras que por *tax* se habían agrupado dentro del genotipo 6, se mantuvieron como genotipo 6 en el gen *env*. Con esto se comprobó que de las 131 muestras genotipificadas, los genotipos circulantes en Colombia fueron el 1 y el 6: 127 muestras pertenecían al genotipo 1 y 4 al genotipo 6 (Fig. 4).

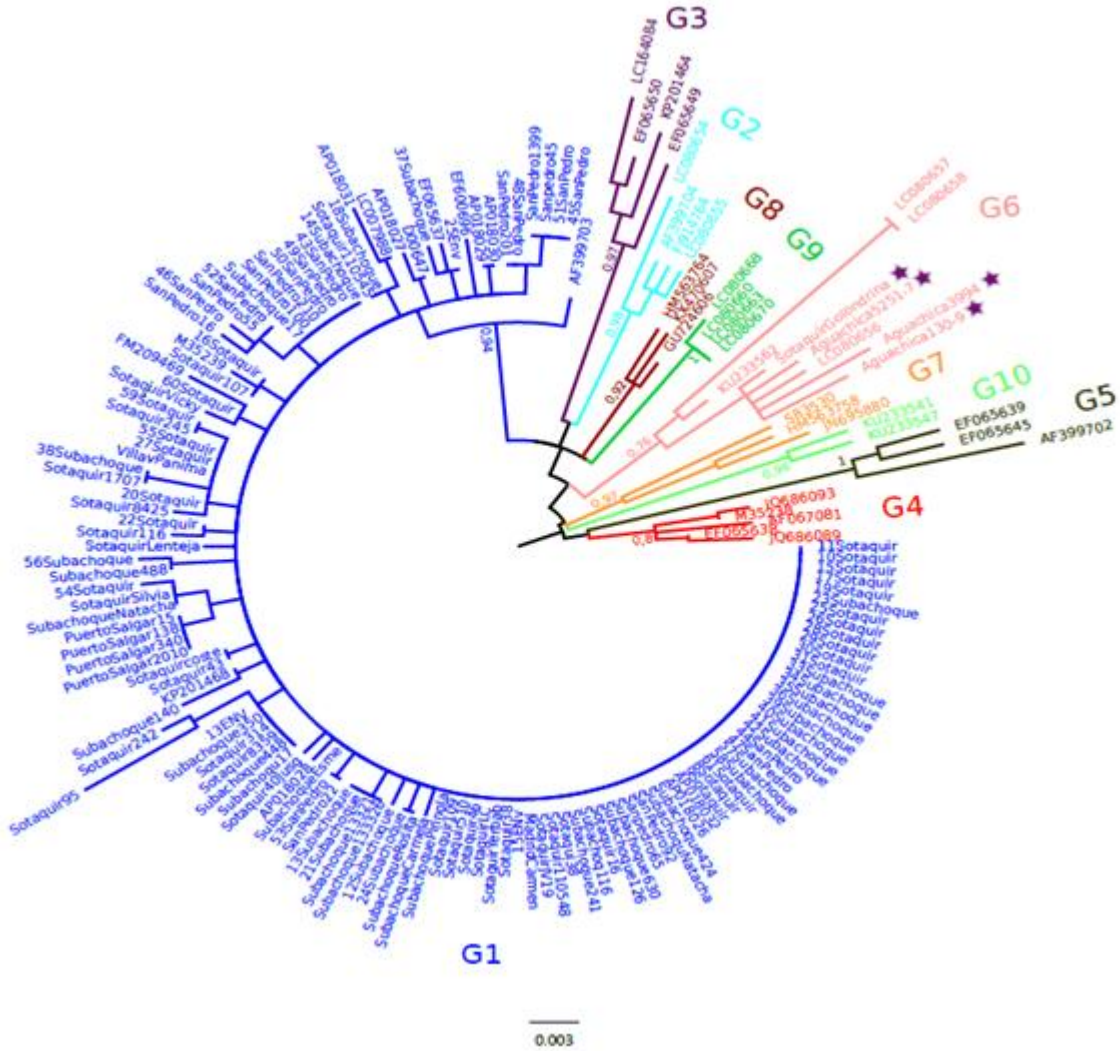


Fig. 4. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method with *env*. The evolutionary history was inferred by using the ML method based on the Tamura-Nei model. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.3588)). The analysis involved 168 nucleotide sequences.

Discusión

El virus de la Leucosis bovina (BLV) ha demostrado tener implicaciones importantes a nivel de salud pecuaria en el mundo entero, dadas las altas cifras que dan cuenta de su circulación viral, que oscilan entre 1 al 80% (Lee et al., 2016; Morovati et al., 2012; Murakamia et al., 2011; Nekouei et al., 2015; Ochirkhuu et al., 2016; Polat et al., 2015; Polat et al., 2016; Rodriguez et al., 2011; Tsutsui et al., 2016). En este estudio se tomaron un total de 289 animales distribuidos en 6 departamentos de Colombia en un total de 75 predios muestreados entre el año 2015 y 2016. Para su detección y prevalencia se amplificó un segmento del gen *gag*, para determinar su genotipo se estudió un segmento del gen *env* y para iniciar una caracterización del virus antes de presentarse la leucemia se amplificó un segmento génico del gen *tax*. La prevalencia encontrada fue de 62% por animal y 92% por predio, más alta a la reportada por Ortiz y colaboradores en el 2016 la cual fue del 42.7% por animal y 67.7% por predio (Ortiz et al., 2016), aumento que para este caso y teniendo en cuenta que solo ha pasado un año desde el reporte de Ortiz y colaboradores, ha de ser atribuido a que en ese estudio la presencia viral se determinó mediante serología mientras que en este estudio fue por detección del genoma viral por PCR. Si bien en infecciones por retrovirus la presencia de anticuerpos puede ser interpretada como la presencia de antígeno, la sensibilidad de una prueba de ELISA es mucho menor a la de una prueba de PCR que determina presencia viral mediante la determinación de un segmento de su genoma (Villalobos, 2017). El otro factor que explicaría el aumento de la propagación viral estaría soportado en la ausencia de la vacuna y al hecho que en Colombia el VLB no está incluido dentro de las enfermedades de control oficial, por lo que no hay medidas de control instauradas por los entes gubernamentales que permitan prevenir la infección viral.

Los análisis filogenéticos que se han realizado desde 1997 para establecer el genotipo circulante del VLB, han empleado RFLP, secuenciación del gen parcial y completo de *env* y el genoma completo de VLB, describiendo hasta la fecha 10 genotipos (Polat et al., 2017). Debido a que los resultados iniciales obtenidos en este trabajo con los primers reportados por Fechner en el año 1996 mostraron un problema de especificidad al no lograr diferenciar el genotipo 6 del genotipo 1 en cuatro muestras, se tomó la decisión de diseñar un nuevo juego de primers que incluyeran un segmento más largo del gen *env*. Al realizar el análisis bioinformático de los primers empleados teniendo en cuenta las 69 secuencias del genoma completo reportadas hasta ese momento en el GenBank representantes de los 10 genotipos, se observó que dichos primers tendrían problemas para amplificar cepas de genotipos 3 y 6 (datos no mostrados), por lo que se diseñó una nueva pareja de primers dirigidos a amplificar un segmento de 750pb del gen *env*, teniendo en cuenta características propias tales como TM (temperatura melting) y formación de estructuras secundarias. Como resultado de este proceso se evidenció la cocirculación del G6 con el G1 en Colombia (Fig. 3).

Es importante resaltar que la presencia del genotipo 6 en los aislados colombianos también fue demostrada por la filogenia realizada con el segmento del gen *tax* (Fig. 2B), gen que no es usado habitualmente para resolver el genotipo en VLB, pero si es uno de los más polimórficos, que incluso presenta mutaciones específicas para otros genotipos del BLV (Polat et al., 2016), y por ejemplo en HTLV, se logra incluso genotipificar con *gag* (Rodgers et al., 2017). Debido a la limitada disponibilidad de secuencias del gen *tax*, no podemos confirmar su utilidad con fines de genotipificación. Sin embargo, los análisis filogenéticos realizados en este estudio permitieron la correcta categorización de los

diferentes genotipos con base en esta región, lo que deberá ser evaluado a futuro cuando se cuenten con más variantes de todos los genotipos.

Estudiar los genotipos virales de una población en particular, es una estrategia importante para avanzar en propuestas preventivas, relacionar las cepas con las regiones geográficas, dar cuenta de la estabilidad del genoma y en algunos casos relacionar el virus con distintos niveles de virulencia (Zhao and Buehring, 2007). En BLV, se han reportado 10 genotipos, el genotipo 1 es el de mayor distribución en el mundo, estudios realizados en América, Australia, Europa y Asia dan cuenta de ello (Ababneh et al., 2012; Derse et al., 1985; Fechner et al., 1997; Lee et al., 2016; Licursi et al., 2003; Lim et al., 2009; Mamoun et al., 1990; Ochirkhoo et al., 2016; Polat et al., 2015; Polat et al., 2017; Polat et al., 2016; Yang et al., 2016; Zhao and Buehring, 2007). En contraste, el genotipo 6 se ha reportado en 4 países asiáticos (Filipinas, Tailandia, Jordania, e India) y 5 suramericanos (Argentina, Brasil, Bolivia, Perú y Paraguay) (Gautam et al., 2018; Polat et al., 2017) y ahora en Colombia (Fig. 2). La distribución de los diferentes genotipos en el mundo, posiblemente se deba a la importación y comercio de ganado (Camargos et al., 2007; Polat et al., 2015), de manera que los estudios de la presencia y diversidad genética de BLV revelan información sobre la prevalencia viral en la región estudiada y proporcionan así datos importantes para construir e instaurar políticas públicas lo cual contribuye con el control y la erradicación del BLV. Adicionalmente, la variabilidad de los genotipos encontrados constituye información útil para los productores de vacunas, que para el caso de Colombia sería deseable dirigirlas a epítopes conservados de las cepas del genotipo 1 y 6.

Conclusiones

Los datos epidemiológicos aquí relacionados de una prevalencia de BLV en Colombia del 62% por animal y 92% por predio y de circulación del genotipo 1 y 6, aportan una herramienta útil para la epidemiología, gremio ganadero, entes gubernamentales y productores de vacunas. Finalmente, si bien se sabe que *tax* no está relacionado con la genotipificación, los análisis filogenéticos muestran que este gen si tiene algo que ver con ella y que eventualmente puede ser usado para la genotipificación del BLV.

Declarations

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions: Conceived and designed the experiments: APC MFG. Analyzed the data: APC JSQ. Contributed reagents/materials/analysis tools: MFG. Wrote the paper: APC MFG. Contributed sampling: AS, JT, DO. Performed the laboratory experiments: APC JSQ SS NO. Reviewed manuscript draft and provided editorial comments: APC MFG. Supervised the study: MFG. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was partly supported by Colciencias PUJ grants, as part of call 657/2014 for 447 projects granted to María Fernanda Gutiérrez, Vecol veterinaries in special to Nestor Andres Fonseca that contributed sampling, Andrea Ramos to Fidic- Colombia for plasmid elaboration and as well Virology Molecular group to Universidad de la Republica- Uruguay that contributed phylogenetics analysis.

Ethics approval and consent to participate This paper is part of the results of the project called “Evaluación epidemiológica y molecular del Virus de la Leucosis Bovina y de los virus asociados al complejo respiratorio y reproductivo bovino, ovino y bufalino en Colombia” registered at Acta N° 8 of 2018. Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

Referencias

- Ababneh, M.M., Al-Rukibat, R.K., Hananeh, W.M., Nasar, A.T., Al-Zghoul, M.B., 2012. Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan. *Archives of virology* 157, 2343-2348.
- Balic, D., Lojkic, I., Periskic, M., Bedekovic, T., Jungic, A., Lemo, N., Roic, B., Cac, Z., Barbic, L., Madic, J., 2012. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. *Archives of virology* 157, 1281-1290.
- Ban, J., Czene, S., Altaner, C., Callebaut, I., Krchnak, V., Merza, M., Burny, A., Kettmann, R., Portetelle, D., 1992. Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukaemia virus external glycoproteins expressed in *Escherichia coli* by means of anti-peptide antibodies. *The Journal of general virology* 73 (Pt 9), 2457-2461.

- Barez, P.Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutierrez, G., Hamaidia, M., Jacques, J.R., Perike, S., Neelature Sriramareddy, S., Renotte, N., Staumont, B., Reichert, M., Trono, K., Willems, L., 2015. Recent Advances in BLV Research. *Viruses* 7, 6080-6088.
- Callebaut, I., Voneche, V., Mager, A., Fumiere, O., Krchnak, V., Merza, M., Zavada, J., Mammerickx, M., Burny, A., Portetelle, D., 1993. Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol* 67, 5321-5327.
- Camargos, M.F., Pereda, A., Stancek, D., Rocha, M.A., dos Reis, J.K., Greiser-Wilke, I., Leite, R.C., 2007. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine leukemia virus. *Virus genes* 34, 343-350.
- Camargos, M.F., Stancek, D., Rocha, M.A., Lessa, L.M., Reis, J.K., Leite, R.C., 2002. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49, 325-331.
- Coulston, J., Naif, H., Brandon, R., Kumar, S., Khan, S., Daniel, R.C., Lavin, M.F., 1990. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *The Journal of general virology* 71 (Pt 8), 1737-1746.
- Derse, D., Caradonna, S.J., Casey, J.W., 1985. Bovine leukemia virus long terminal repeat: a cell type-specific promoter. *Science (New York, N.Y.)* 227, 317-320.
- Dube, S., Abbott, L., Dube, D.K., Dolcini, G., Gutierrez, S., Ceriani, C., Juliarena, M., Ferrer, J., Perzova, R., Poiesz, B.J., 2009. The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain. *Virology* 6, 120.
- Dube, S., Dolcini, G., Abbott, L., Mehta, S., Dube, D., Gutierrez, S., Ceriani, C., Esteban, E., Ferrer, J., Poiesz, B., 2000. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology* 277, 379-386.
- Fechner, H., Blankenstein, P., Looman, A.C., Elwert, J., Geue, L., Albrecht, C., Kurg, A., Beier, D., Marquardt, O., Ebner, D., 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237, 261-269.
- Gautam, S., Mishra, N., Kalaiyarasu, S., Jhade, S.K., Sood, R., 2018. Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus (BLV) Strains Reveals Existence of Genotype 6 in Cattle in India with evidence of a new subgenotype. *Transboundary and emerging diseases*.
- Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R., Willems, L., 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4, 1-32.
- Hamard-Peron, E., Muriaux, D., 2011. Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. *Retrovirology* 8, 15.
- Hemmatzadeh, F., Keyvanfar, H., Hasan, N.H., Niap, F., Bani Hassan, E., Hemmatzade, A., Ebrahimie, E., McWhorter, A., Ignjatovic, J., 2015. Interaction between Bovine leukemia virus (BLV) infection and age on telomerase misregulation. *Veterinary research communications* 39, 97-103.
- Huelsenbeck, Ronquist, A., 2015. MrBayes3.2.6 "Bayesian Inference of Phylogenetic Trees". *Bioinformatics Applications*. Oxford University Press 17, 754-755.
- Inabe, K., Nishizawa, M., Tajima, S., Ikuta, K., Aida, Y., 1999. The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J Virol* 73, 1293-1301.
- Inoue, E., Matsumura, K., Maekawa, K., Nagatsuka, K., Nobuta, M., Hirata, M., Minagawa, A., Osawa, Y., Okazaki, K., 2011. Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. *Archives of virology* 156, 1137-1141.
- Jewell, N.A., Mansky, L.M., 2000. In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *The Journal of general virology* 81, 1889-1899.

- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874.
- Lee, E., Kim, E., Ratthanophart, J., Vitoonpong, R., Kim, B., Cho, I., Song, J., Lee, K., Shin, Y., 2016. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infection, Genetics and Evolution* 41, 245–254.
- Lee, E., Kim, E.J., Joung, H.K., Kim, B.H., Song, J.Y., Cho, I.S., Lee, K.K., Shin, Y.K., 2015. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates. *Virology* 12, 64.
- Licursi, M., Inoshima, Y., Wu, D., Yokoyama, T., González, E.T., Sentsui, H., 2003. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Veterinary Microbiology* 96, 17-23.
- Lim, S.I., Jeong, W., Tark, D.S., Yang, D.K., Kweon, C.H., 2009. Agar gel immunodiffusion analysis using baculovirus-expressed recombinant bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51/gp30(T-)). *Journal of veterinary science* 10, 331-336.
- Mamoun, R.Z., Morisson, M., Rebeyrotte, N., Busetta, B., Couez, D., Kettmann, R., Hospital, M., Guillemain, B., 1990. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J Virol* 64, 4180-4188.
- Matsumura, K., Inoue, E., Osawa, Y., Okazaki, K., 2011. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. *Virus Res* 155, 343-348.
- Molteni, E., Agresti, A., Meneveri, R., Marozzi, A., Malcovati, M., Bonizzi, L., Poli, G., Ginelli, E., 1996. Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* 43, 201-211.
- Monti, G., Schrijver, R., Beier, D., 2005. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Archives of virology* 150, 443-458.
- Moratorio, G., Obal, G., Dubra, A., Correa, A., Bianchi, S., Buschiazzo, A., Cristina, J., Pritsch, O., 2010. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Archives of virology* 155, 481-489.
- Morovati, H., Shirvani, E., Noaman, V., Lotfi, M., Kamalzadeh, M., Hatami, A., Bahreyari, M., Shahramyar, Z., Morovati, M.H., Azimi, M., Sakhaei, D., 2012. Seroprevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Isfahan Province, Iran. *Tropical animal health and production* 44, 1127-1129.
- Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K.-i., Yamamoto, T., Tsutsui, T., 2010. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Veterinary Microbiology* In Press, Corrected Proof.
- Murakami, H., Yamada, T., Suzuki, M., Nakahara, Y., Suzuki, K., Sentsui, H., 2011. Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. *Virus Research* 156, 107-112.
- Nekouei, O., VanLeeuwen, J., Sanchez, J., Kelton, D., Tiwari, A., Keefe, G., 2015. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev Vet Med* 119, 105-113.
- Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Nishimori, A., Okagawa, T., Murata, S., Ohashi, K., 2016. Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. *Archives of virology* 161, 985-991.
- Ortiz, D., Sanchez, A., Tobón, J., Chaparro, y., Gutierrez, M., 2016. Leucosis Bovina Enzootica, Enzootic bovine leukosis, epidemiological indicators for establishing control and prevention measures. Vol., pp. , May *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 8, 35-43.

- Polat, M., Ohno, A., Takeshima, S.N., Kim, J., Kikuya, M., Matsumoto, Y., Mingala, C.N., Onuma, M., Aida, Y., 2015. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Archives of virology* 160, 285-296.
- Polat, M., Takeshima, S., Aida, Y., 2017. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology Journal* 14, 209.
- Polat, M., Takeshima, S.N., Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., Arainga, M., Murakami, T., Matsumoto, Y., de la Barra Diaz, V., Panei, C.J., Gonzalez, E.T., Kanemaki, M., Onuma, M., Giovambattista, G., Aida, Y., 2016. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology* 13, 4.
- Ramos, A.E., Munoz, M., Moreno-Perez, D.A., Patarroyo, M.A., 2017. pELMO, an optimised in-house cloning vector. *AMB Express* 7, 26.
- Rodgers, M.A., Vallari, A.S., Harris, B., Yamaguchi, J., Holzmayer, V., Forberg, K., Berg, M.G., Kenmunge, J., Ngansop, C., Awazi, B., Mbanya, D., Kaptue, L., Brennan, C., Cloherty, G., Ndembu, N., 2017. Identification of rare HIV-1 Group N, HBV AE, and HTLV-3 strains in rural South Cameroon. *Virology* 504, 141-151.
- Rodriguez, S.M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sanchez-Alcaraz, M.T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutierrez, G., Trono, K., Alvarez, I., Vagnoni, L., Willems, L., 2011. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3, 1210-1248.
- Rodriguez, S.M., Golemba, M.D., Campos, R.H., Trono, K., Jones, L.R., 2009. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *The Journal of general virology* 90, 2788-2797.
- Rola-Luszczak, M., Pluta, A., Olech, M., Donnik, I., Petropavlovskiy, M., Gerilovych, A., Vinogradova, I., Choudhury, B., Kuzmak, J., 2013. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny. *PLoS One* 8, e58705.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312-1313.
- Tsutsui, T., Kobayashi, S., Hayama, Y., Yamamoto, T., 2016. Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis. *Preventive Veterinary Medicine* 124, 96-101.
- Villalobos, A., 2017. Enzootic bovine leucosis and the risk to human health. *African Journal of Biotechnology* 16, 763-770.
- Yang, Y., Kelly, P.J., Bai, J., Zhang, R., Wang, C., 2016. First Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus Infections in the Caribbean. *PLoS One* 11, e0168379.
- Zhao, X., Buehring, G.C., 2007. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology* 366, 150-165.

2.3 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Para la discusión de este capítulo se describe a continuación un análisis de los hallazgos presentados en el artículo anterior a la luz de su importancia filogenética, las metodologías empleadas y el uso actual y futuro de los resultados encontrados. Para concluir, los datos epidemiológicos reportados se abordarán desde el enfoque de la posibilidad que el VLB sea un virus zoonótico.

La prevalencia del VLB reportada con este estudio fue de 62% por animal y 92% por predio, y los genotipos circulantes fueron el 1 y el 6, siendo el G1 el más prevalente de las regiones analizadas, el G6 fue encontrado en dos municipios, Sotaquirá y Aguachica, de los departamentos de Boyacá y Cesar respectivamente. Estudios realizados por Usuga y cols en el departamento de Antioquia reportaron una prevalencia no mayor al 50% determinada por PCR y empleando los primers descritos por Fechner en el año 1997. Los genotipos encontrados en esa población fueron G1 y G3, este último en Belmira (Usuga-Monroy et al., 2018), municipio que no fue analizado en la presente investigación. A diferencia de lo usado por Usuga, en el presente trabajo se usaron inicialmente ese mismo juego de primers, pero más tarde se pasó a otros cebadores diseñados "in house" que amplifica una región de 750pb, aumentando la posibilidad de detección de genotipos distintos al 1.

Este trabajo demostró que el juego de primers propuestos por Fechner en el año 1997, usados en alrededor de 13 reportes para genotipificación del VLB en el mundo (Asfaw et al., 2005; Balic et al., 2012; Fechner et al., 1997; Felmer, Munoz, Zuniga, & Recabal, 2005; Gautam et al., 2018; Lee et al., 2016; E. Lee et al., 2015; Licursi et al., 2003; Monti et al., 2005; Ochirkhue et al., 2016; M. Polat et al., 2015; M. Polat et al., 2016; Rola-Luszczak et

al., 2013), fueron insuficientes para detectar el G6 en las cepas aisladas de vacas colombianas. Por tanto, es posible que otros estudios en los que los hayan usado, se subestime la presencia del G6 particularmente o algún otro genotipo.

Hasta el momento la mayoría, si no todos los reportes de genotipificación de VLB que existen, están dirigidos a la amplificación del gen *env* o de un segmento del mismo y algunos mediante la secuenciación del genoma completo del virus (M Polat et al., 2017). Recientemente se reportó el uso de los fragmentos LTR del VLB para genotipificar (Pluta, Rola-Luszczak, Douville, & Kuzmak, 2018). Sin embargo, ningún estudio ha reportado el genotipo de VLB basados en el gen *tax*.

En este estudio, usando una secuencia amplificada de *tax* de un tamaño de 373pb y localizada entre los nucleótidos 7197 y 7551, se demostró que en 4 de las muestras analizadas tenían cuatro cambios a nivel nucleotídico. Estos cambios fueron T7318A, G7358A, A7373G y G7408A, los cuales también están presentes en las cepas de referencia correspondientes al G6 usadas en este estudio, lo que sugirió que el genotipo de estas cepas no era G1 sino G6 y al construir el árbol estas cepas se organizaban en el clado del G6. Esta sugerencia fue comprobada con los primers “in house” para *env*, demostrando de esta manera que sobre el segmento del gen *tax* analizado, es posible genotipificar el VLB. Ahora bien, la pregunta es ¿porque en VLB no se usa otros genes para genotipificar?, la respuesta a esto básicamente estaría dada porque la mayoría de los estudios de genotipo de VLB se han realizado sobre *env*, unos pocos con el genoma completo y solo uno con LTR, lo cual claramente restringe la posibilidad de comparación con otras cepas reportadas en el GenBank que en su mayoría están dadas sobre el gen *env*. Prueba de ello, es que a la fecha en el GenBank, se encuentran 82 secuencias de genoma completo y 873 del gen *env*. Con

respecto a los otros genes, aunque hay secuencias reportadas, 115 de *tax*, 197 de *gag* y 102 de LTR, para estas no se cuenta con el dato de a que genotipo corresponden.

Las secuencias nucleotídicas además de genotipificar también tienen otros usos potenciales tales como:

-Diseño de vacunas, estudios *in silico* para la identificación de epitopes conservados con potencial inmunogénico es una de las estrategias usadas recientemente para el diseño racional de inmunógenos (Oyarzun & Kobe, 2016).

-Identificación de nuevos reservorios virales, como es el caso del virus del Zika en el que la filogenia mostró que los monos son reservorios potenciales del virus y estos podrían transmitirlo a los humanos (Weber, Alroy, & Scheiner, 2017). Para VLB, este trabajo aportó datos a nivel genómico de las cepas circulantes en vacas colombianas, ahora bien, es importante caracterizar potenciales hospederos naturales como las ovejas y los búfalos (De Oliveira et al., 2016; Nekoei et al., 2015), especies donde han sido muy limitados los estudios, pero que podrían estar jugando un papel importante en la epidemiología del VLB.

- Identificación de brotes: Las secuencias anotadas de las cepas circulantes en Colombia de VLB, también pueden ser una herramienta útil ante eventuales brotes del virus en el país. Un ejemplo de esto, fue el estudio realizado de VIH en Quebec Canadá, en brotes ocurridos en la población de hombres que tienen sexo con hombres, revelando que las políticas de diagnóstico y control de esa población merecían una atención especial por parte de los entes encargados, a fin de evitar futuras propagaciones que resultaran en epidemias (Brenner et al., 2017).

-Como último punto, se ha mencionado en la introducción la posibilidad de que el VLB sea zoonótico. Con los resultados expuestos en este capítulo se cuenta con secuencias nucleotídicas de las cepas de VLB circulantes en vacas de Colombia, información que deberá ser confrontada con las secuencias que se reporten en un futuro provenientes de tejido mamario humano, de tal forma que, de confirmarse filogenéticamente su origen esto constituya una herramienta directa que compruebe la zoonosis.

CAPÍTULO 3
ANÁLISIS DEL POTENCIAL
ZOONÓTICO DEL VLB

3.1 ANÁLISIS DEL POTENCIAL ZONÓTICO DEL VLB

3.1 INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las zoonosis como una infección o enfermedad transmitida de animales a humanos de forma directa o indirecta o por los productos derivados del mismo, tales como carne, leche o huevos. El Centro para el Control y la Prevención de las Enfermedades (CDC), la describe como enfermedades que son causadas por infecciones que se comparten entre animales y hombres, que pueden darse por contacto directo o indirecto, por vectores o por alimentos y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como patógenos que son transmisibles del animal al hombre y viceversa (OIE, 2018; CDC, 2018; OMS, 2018).

La zoonosis es un problema que involucra condiciones sociales, económicas y sanitarias, por lo tanto, para profundizar en su definición se debe construir una visión multidisciplinaria que las integre. Este enfoque multidisciplinario fue con el que Calvin Schwabe entregó, hace más de 50 años, la propuesta “Una Salud” donde plantea que la medicina humana y veterinaria debería unirse para combatir las zoonosis, bajo el lema “La salud del ganado es la salud del pueblo” (CDC, 2014).

En la actualidad se desconocen la cantidad de patógenos que potencialmente pueden causar infecciones zoonóticas (Anthony et al., 2013), sin embargo, se ha documentado que de las enfermedades infecciosas emergentes, alrededor del 60% son causadas por un agente zoonótico (Taylor, Latham, & Woolhouse, 2001) (Woolhouse & Gowtage-Sequeria, 2005).

Dos de los ejemplos clásicos de zoonosis son el virus de la Rabia y la Hepatitis E (HEV). Un accidente rábico sucede cuando el virus que se encuentra en la saliva del animal mordedor (la mayoría de los casos es un perro), es inoculado al humano por la herida que causa la mordedura y migra por transporte axonal retrogrado a las células neuronales del Sistema Nervioso Central (SNC) ocasionando una encefalitis letal (Jackson et al., 1999; Plotkin, 2000) (OMS, 2018). En cuanto al HEV, este es capaz de infectar diferentes especies de mamíferos, entre ellos el cerdo y el humano. Anteriormente se pensaba que este virus era exclusivo de humanos y que causaba una hepatitis autolimitada. En el año 1997, se identificó el genotipo 3 de HEV porcino (HEV3) en un caso de hepatitis humana, cuya transmisión se habría dado por consumo de carne cruda proveniente de este animal. Más adelante, con análisis filogenéticos se confirmó que eran el mismo virus, demostrando que el HEV no era exclusivo de humanos como se pensaba (Kwo et al., 1997; Meng et al., 1997; Schlauder et al., 1998). En el año 2003 se definió otro genotipo conocido como HEV4, que también cuenta con la capacidad de ser zoonótico (Yazaki et al., 2003) y hasta la fecha, se han confirmado tres genotipos zoonóticos de HEV, el 3, 4 y 7, este último proveniente de camello (G. H. Lee et al., 2016; Nan & Zhang, 2016).

Con relación al VLB, Buehring en Estados Unidos, Willems en Bélgica, Wang en China y Gutiérrez en Colombia (G. C. Buehring et al., 2014; G. C. Buehring et al., 2015; N. A. Gillet & Willems, 2016; Mesa et al., 2013; Ochoa-Cruz et al., 2006; Zhang et al., 2016) han realizado estudios para demostrar su presencia en tejidos humanos de seno con y sin procesos neoplásicos. Algunos de estos autores han sugerido una asociación de VLB con cáncer de seno lo que ha generado la pregunta de cómo el VLB logra llegar a ese tejido y si los productos de consumo provenientes del ganado y dirigidos al humano podrían ser la

fuelle de infección a través de su ingesta, lo cual haría suponer que el VLB es otro agente zoonótico.

Con las definiciones dadas por la OMS, el CDC y la OIE es claro que para que una infección se declare como zoonótica debe transmitirse del animal al humano. No obstante, para incluirse como tal debería cumplir con la mayoría de las siguientes características y con evidencias apoyadas por diferentes investigadores en distintos lugares del mundo.

1. Conocer la prevalencia del patógeno: Si bien esto no implica que sea una zoonosis este dato forma parte del “paquete” de conocimientos que se deben tener a la hora de definirla. Se debe conocer la prevalencia tanto del patógeno en su hospedero natural como del patógeno en el hombre y se debe esperar que su prevalencia en el animal sea mayor a su prevalencia en el humano. Un ejemplo de ello, es el HEV. Un estudio realizado en trabajadores de fincas porcícolas en una región de Antioquia –Colombia, demostró una seropositividad del 11.22%, mientras que otro estudio realizado en el mismo departamento demostró que la seropositividad en cerdos fue del 100%. Teniendo en cuenta que las condiciones de temporalidad y de muestreo no fueron las mismas se puede resaltar que la seroprevalencia en los animales fue mucho más alta que en los humanos (Gutierrez et al., 2014).
2. Liberación: Para que sea zoonótico, un agente viral debe ser eliminado de su hospedero después de hacer en él una infección lítica. Una situación distinta sucede en infecciones donde el virus se mantiene latente, como le sucede al virus del Herpes durante su estadio de provirus, que, mientras se mantiene latente en células del SNC, no es liberado y, por ende, no es contagioso (Tsurumi, Fujita, & Kudoh, 2005). Si el virus que se está tratando de clasificar como zoonótico tiene estas

características, es poco probable que se logre su liberación. Contrario a lo que sucede con Rabia y con HEV, donde el virus está realizando ciclos líticos y está siendo liberado en buenas cantidades por la célula, permitiendo así mayor posibilidad de infección a hospederos susceptibles (Cao & Meng, 2012).

3. Transmisión: Conocer la ruta de transmisión es importante para apoyar la propuesta de la zoonosis. Si un virus se transmite por transfusión sanguínea y el hombre no puede recibir sangre de dicho animal, sería poco probable que se considerara una infección zoonótica, en contraste con eventos cuya posibilidad de contacto con el animal y/o sus productos sea viable. Ejemplo de ello es lo que se observa en un estudio realizado en Francia donde el consumo de salchicha de hígado de cerdo, estaba relacionado con la transmisión de HEV en los consumidores de dicho alimento (Colson et al., 2010).
4. Tener definidos el reservorio, el vector y el hospedero: Para considerar que exista una zoonosis se debe tener certeza de que el virus produce la patología en un hospedero distinto al humano y que para su transmisión utiliza cierto vector. Con el virus de la Rabia se conocen a los humanos y los perros como hospederos naturales, a la saliva del perro como vector y a los murciélagos como los reservorios principales. En esta zoonosis se puede evidenciar la presencia del virus en los tejidos de cerebro tanto del perro como de humanos, la saliva como la ruta de transmisión a través de la mordida y la presencia del virus en cierto tipo de murciélago, donde el virus puede permanecer por mucho tiempo sin producir enfermedad, característica propia del concepto de un reservorio (Beranova & Zendulkova, 2016).

5. Conocer el ambiente que favorezca la transmisión del patógeno: Siguiendo con el ejemplo de Rabia, la mordedura implica que el virus se inocule en el humano, lo que permite que llegue a células de SNC y migre a cerebro produciendo la sintomatología (Plotkin, 2000). Es claro que la saliva en el perro infectado, sin la herida en el humano no genera un ambiente propicio para la infección.
6. Carga microbiana necesaria para una infección exitosa: En Rabia, un estudio reciente demostró que la infección en modelos animales no depende solo de la virulencia de la cepa sino también la carga viral. Brevemente, inocularon dos grupos de ratones, el primer grupo con títulos bajos de virus y el segundo grupo con títulos altos, encontrando que la mortalidad de ratones infectados del grupo 1 fueron significativamente más bajas ($p < 0,001$) en comparación con las del grupo 2 (Fuoco et al., 2018). Es posible que una baja carga viral sea suficiente para infectar al hospedero natural, pero si este es el hombre que no es su hospedero natural, es probable que requiera de una mayor carga viral para producir la enfermedad.
7. Presencia de receptores celulares compartidos lo cual está relacionado con la susceptibilidad a la infección: La presencia de receptores celulares comunes entre el animal y el hombre definen el tropismo viral y la susceptibilidad a ser infectados. En el caso de Rabia, se han propuesto diferentes moléculas celulares que actuarían como receptores, los no proteicos como los gangliósidos y los de tipo proteico como el receptor nicotínico de acetilcolina, el receptor de baja afinidad de neurotrofinas y la molécula de adhesión celular neural (Lentz, Burrage, Smith, Crick, & Tignor, 1982; Tsiang, Koulakoff, Bizzini, & Berwald-Netter, 1983; Tuffereau, Benejean, Blondel, Kieffer, & Flamand, 1998; Lafom, 2000), los cuales están presentes en la mayoría de los mamíferos, de tal forma que son usados por el virus para iniciar la

infección. Esta puede ser la razón por la cual este virus puede causar problemas en muchos de los mamíferos que conocemos.

8. Filogenia viral: Gracias a esta herramienta, casos de zoonosis han sido resueltos, un ejemplo es el HEV donde se comprobó que el virus circulante en el humano provenía de carne cruda de un ciervo infectado y de carne y leche de camellos (G. H. Lee et al., 2016; Tei, Kitajima, Takahashi, & Mishiro, 2003).
9. Presencia de una enfermedad definida: Una discusión importante es si la presencia del patógeno pero la no producción de sintomatología puede considerarse zoonosis. Ejemplo de esto fue reportado con HEV3, cuya sintomatología fue evidenciada en el humano infectado, pero no en los cerdos donde solamente se encontró evidencia microscópica y serológica de la infección (Meng et al., 1997). De manera que la presencia de la enfermedad con sintomatología clara en el hospedero, no es un criterio que necesariamente confirme o descarte la posibilidad de un agente zoonótico.

A continuación se adjuntan los tres artículos: dos publicados y uno sometido que apoyan la propuesta que el VLB es una zoonosis.

3.2 ARTÍCULOS



Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption

N. N. OLAYA-GALÁN^{1,2*†}, A. P. CORREDOR-FIGUEROA^{2†}, T. C. GUZMÁN-GARZÓN²,
K. S. RÍOSHERNÁNDEZ², S. P. SALAS-CÁRDENAS², M. A. PATARROYO^{3,4} AND
M. F. GUTIERREZ²

¹PhD Programme in Biomedical and Biological Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

²Grupo de Enfermedades Infecciosas, Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

³Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia

⁴Basic Sciences Department, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

Received 27 February 2017; Final revision 16 August 2017; Accepted 6 September 2017

SUMMARY

Bovine leukaemia virus (BLV) is the causative agent of enzootic bovine leucosis, which has been reported worldwide. BLV has been found recently in human tissue and it could have a significant impact on human health. A possible hypothesis regarding viral entry to humans is through the consumption of infected foodstuffs. This study was aimed at detecting the presence of BLV DNA in raw beef and fresh milk for human consumption. Nested PCR directed at the BLV gag gene (272 bp) was used as a diagnostic test. PCR products were confirmed by Sanger sequencing. Forty-nine per cent of the samples proved positive for the presence of proviral DNA. This is the first study highlighting the presence of the BLV gag gene in meat products for human consumption and confirms the presence of the viral DNA in raw milk, as in previous reports. The presence of viral DNA in food products could suggest that viral particles may also be found. Further studies are needed to confirm the presence of infected viral particles, even though the present findings could represent a first approach to BLV transmission to humans through foodstuff consumption.

Key words: Bovine leukaemia virus, foodborne infection, fresh milk, raw meat, zoonosis.

INTRODUCTION

Bovine leukaemia virus (BLV) belongs to the genus Deltaretrovirus, family Retroviridae, subfamily Oncovirinae. This is an oncogenic virus that was first

isolated in 1969 and is the aetiological agent of enzootic bovine leucosis (EBL), one of the most frequently occurring neoplastic diseases in cattle [1]; about a third of BLV-infected cows develop persistent lymphocytosis, 1–5% of them developing the late stage of the disease that is associated with B-cell neoplasm [2]. This retrovirus is closely related to the types of human lymphotropic T-cell leukaemia virus (HTLV-1 and -2) [3]. BLV integrates its genome in target bovine cells, so that all infected animals are persistently infected and become carriers of the virus during the course of

* Author for correspondence: N. N. Olaya-Galán, Grupo de Enfermedades Infecciosas, Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 40–62, Building 50 Lab. 123, Bogotá, Colombia.
(E-mail: nunyolaya@gmail.com)

† These authors contributed equally to this work.

their lives, thereby having a negative impact on the animals' immune system and, consequently, induces losses in milk production, poorer yield regarding weight and induced abortions in the animals [1, 4, 5].

A few studies have revealed the presence of DNA and proteins of BLV in human breast tissue samples, proposing that these findings could be considered as a hazardous factor for breast cancer development [6–9]; albeit some different investigations have not found evidence of the virus in people [10, 11], there is proof that a bovine virus is found in human beings, perhaps related to a zoonosis infection. However, it is still not known how BLV is transmitted to humans. Transmission in cattle could be mediated by horizontal or vertical transmission. Vertical transmission includes perinatal transmission through blood or transplacental passage and post-natal infection routes through colostrum and milk consumption [12, 13]. Horizontal transmission could occur by direct contact between infected and non-infected animals, as well as veterinary practices due to using contaminated instruments on many animals without sterilising them between procedures and animals, including tattooing cattle, vaccination and rectal palpations [14]. Conversely, it has been suggested that humans might become infected by consuming foodstuffs from infected animals, through the direct contact involved in livestock practices or vaccines produced with contaminated cattle sera [7, 15]. Although the transmission route has not yet been established, it could be implicated in as-yet-unknown human health issues such as the emergence of new diseases, taking into account that BLV is described as an oncogenic virus.

Food for human consumption has been proposed as a potential source of pathogen transmission. Several viral infections are related to foodborne diseases; enteric viruses, such as rotaviruses and noroviruses, are amongst the viral agents most frequently transmitted by foodstuffs; these agents are transmitted as free viral particles through faecal contamination of foodstuffs for direct consumption, such as fruit and vegetables and (in some exceptions) meat products [16, 17]. Some other viral infections require the presence of infected cells to transmit the agent to other hosts; this is the case of hepatitis A virus and hepatitis E virus (HEV) that have been found in meat products, such as sausages, liver and pork [18–21].

There are other diseases that are, in principle, associated with foodstuff consumption but where the causative agent remains unknown [22]; in spite of most of them being associated with gastrointestinal diseases,

there could be other types of pathogens in foodstuffs that are still unknown. This could thus be happening with BLV, involving potential risk for human health. Studies focused on food safety for improving the quality of products prepared for human consumption are needed as foodstuffs could transmit unknown pathogens. This study was thus aimed at evaluating the BLV DNA detection in raw meat and fresh milk (i.e. fresh from milking) for human consumption as a first step in estimating the potential of foodstuffs regarding BLV transmission to humans.

METHODS

Sample collection

Convenience sampling was used for obtaining both milk and meat samples, 100 samples were obtained. Fifty beef samples weighing around 15 g each were obtained from butchers in Bogotá whilst the 50 samples of milk were obtained from farms specialising in dairy production located in different parts of Colombia. The milk was collected directly from milking (i.e. before being sent for industrial treatment). The samples were transported to the Virology Laboratory at the Javeriana University in Bogotá where meat samples were stored at -20°C until being processed, whilst milk samples were processed immediately.

Sample preparation and nucleic acid extraction

Roche High Pure PCR Template Preparation Kit was used for extracting total nucleic acids from milk and meat, following the manufacturer's indications; some modifications were made for solid tissue and liquid samples. Regarding meat, an initial 10–20 mg of rump cut (muscle) was lysed with proteinase K and the tissue lysis buffer supplied in the DNA extraction kit. Extraction from milk samples first involved cell concentration from an initial 5 ml milk volume through sequential centrifugations at 16 000 g for 20 min for each cycle (four cycles in total); the pellet so obtained was used for DNA extraction, following the manufacturer's instructions. NanoDrop (Thermo) was used for quantifying the extracted DNA to verify its concentration and purity. The DNA was then frozen (-20°C) and stored until further use.

PCR amplification: multiplex and nested PCR

The bovine GAPDH constitutive gene was used as PCR internal control, which was amplified in a

multiplex PCR together with the virus' *gag* gene encoding its capsid proteins. PCR tests were done using Roche PCR master mix with specific primers (0.8 pmol/μl) for the aforementioned genes. Both bovine GAPDH and *gag* primers were previously reported by Buehring *et al.* [6]. An 857 bp fragment was amplified for the bovine GAPDH gene and a 385 bp fragment for *gag*. Multiplex PCR conditions included an initial denaturing step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 30 s, an annealing step at 59.3 °C for 60 s and a 90 s extension at 72 °C. A final extension step was performed at 72 °C for 10 min.

PCR sensitivity was increased by nested PCR for samples where the viral gene was not amplified in multiplex PCR. The first PCR's products were used as templates for the nested PCR. The amplification target was an internal *gag* fragment (nt 1097–1369), resulting in a 272 bp fragment (also reported by Buehring *et al.*) [6]. Reaction conditions were the same as those described for multiplex PCR. Annealing temperature was 56 °C with 30 s extension time.

The results for both multiplex and nested PCR were visualised on 1.5% agarose gels prepared in 1× TAE (Biorad) dyed with 1× HydraGreen fluorescent intercalating dye (ACTGene). DNA extracted from a blood sample of an infected animal was used as positive control for BLV and RNase- and DNase-free water as negative amplification control.

Sequencing

Virus-positive PCR products were purified with PCR product purification kit (Roche High Pure), following the manufacturer's instructions, and then sent to Macrogen Inc. (Seoul, Korea), for Sanger sequencing. The primers (both sense and anti-sense) used for sequencing were the same as those for the nested PCR. BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.5) was used for editing and analysing the sequences. Consensus sequences were obtained for each positive sample; the online BLASTn tool was used for verifying the identity of the sequences so obtained.

RESULTS AND DISCUSSION

BLV has been known and studied as an infectious agent in cattle; however, there are reports of this virus in humans [6, 7, 9] even though the mechanism by which the virus has reached such host has still not been clarified. Buehring *et al.* [15, 23] highlighted

three main hypotheses for the viral entry to humans. The first considers direct contact with infected animals; however, such hypothesis would necessarily involve viral presence in limited populations (i.e. veterinarians, livestock handlers and/or farmers). Nevertheless, available evidence has revealed that the virus has been found in people who do not necessarily come into direct contact with animals [6, 7, 9]. The second hypothesis concerns possible BLV transmission through vaccine production processes involving the use of BLV-contaminated foetal bovine sera, even though no experimental evidence has been published regarding this issue. The third hypothesis proposes that the virus might infect humans through the consumption of bovine-derived products from BLV-infected cattle [10, 23], leading to the idea of evaluating meat and milk products for human consumption as a possible pathway for viral entry.

Nucleic acids were obtained from fresh milk and raw beef samples (muscle tissues) in the present study in the search for BLV proviral DNA. Internal control (bovine GAPDH) was observed in the multiplex PCR (Fig. 1a). A proviral *gag* segment was found in 24 out of the 50 milk samples and in 25 of the meat samples. These results represent 49% of all samples analysed. Most of them were detected by nested PCR, suggesting that the viral load in the samples was considerably low. Figure one shows a representative agarose gel of the results obtained by multiplex PCR (a) where an 857 bp fragment from bovine GAPDH was observed, as well as the external *gag* fragment in positive control (385 bp); nested PCR (b) from the products obtained in the first PCR with a 272 bp fragment was observed in positive control and the samples analysed here (Figs. 1a and b).

After sequencing PCR products, *gag* gene identity was verified using BLAST (NCBI) with previously reported BLV sequences. The results gave 97–99% identity compared to reference sequences. Such results confirmed that the amplified products obtained from meat and milk samples came from the BLV *gag* segment.

BLV prevalence in Colombia has been recorded as 67.7% on livestock farms throughout the country and in 43% of the bovine population, thereby affecting (health-wise and economically) livestock breeding for milk production and meat for human consumption [24]. Understanding the evolution of the disease in cattle (most infected animals going unnoticed due to low symptomatology) [25] and considering its high prevalence in Colombia highlights the fact that infected

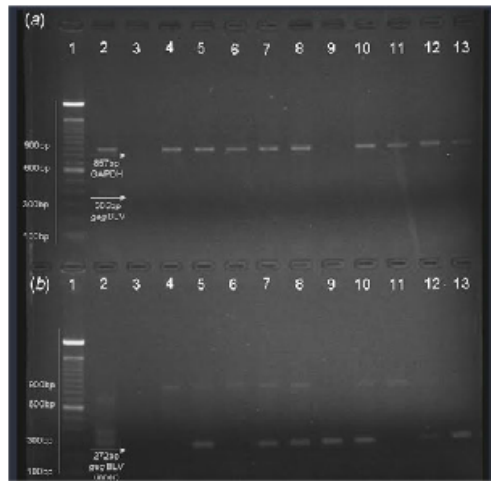


Fig. 1. Representative agarose gel (1.5%) of field samples. (a) Multiplex PCR. (b) Nested PCR. Lane 1 – 100 bp ladder (Invitrogen); lane 2 – positive control; lane 3 – negative control; lane 4–8: beef samples; lane 9–13: milk samples.

animals that have never been detected could be sold for commercialisation, and thus cattle-derived infected products could be distributed in different industries without any government control regarding the presence of the virus. This would favour the disease's dissemination in spite of the fact that EBL was recently established and was considered a disease requiring mandatory notification by the Colombian Agricultural and Livestock Institute [26].

Detection of BLV DNA in cattle-derived foodstuffs (as shown by this study's findings) could serve as a marker, which could suggest a zoonosis (i.e. indicating viral particle transmission by these products). It is worth stressing that cases of zoonosis are considered one of the most important problems regarding infectious disease epidemiology and public health worldwide [27]. Taking the WHO's definition of zoonosis, 'Any disease or infection that is naturally transmissible from vertebrate animals to humans, including all types of pathogenic agents', [28] as well as viral transmission mechanisms, action directed towards avoiding viral dissemination in cattle might prevent the introduction of the pathogen into the human population, even though BLV has not yet been conclusively proven to be a cause of human disease [6, 11, 29].

Foodborne diseases are related with ingesting contaminated foodstuffs with microorganisms, which sometimes could come from an animal origin [30].

Two vehicles have been proposed for viral transmission through foodstuff consumption. Free viral particles in foodstuffs has been related to an exogenous contamination source (i.e. faecal contamination), involving direct consumption of fresh products, such as fruit and vegetables [16]. The other possibility concerns the transmission of viruses through animal-derived products infected with the virus. In this case, animal cells would become carriers of pathogenic agents, introducing them into human beings through consumption of meat from infected animals, trespassing even free viral particles, infected cells or proviral DNA [31]. Reports regarding HEV entry to humans have increased due to products from pigs infected by the virus being consumed, i.e. sausages, liver and poorly cooked pork [18, 19, 21, 32]. This situation has led to acute hepatitis outbreaks where a hitherto disregarded zoonosis has been clearly defined. This study's findings have suggested that a similar situation could be occurring with BLV, giving rise to possible explanations for diseases whose causes have previously been undefined.

The pertinent literature has reported viral particles and viral DNA in cows' milk or colostrum that could be considered a risk factor for transmission to calves [33–36]. Viral DNA was also detected in fresh milk in the present study, thereby agreeing with previous reports, despite not having been described as a risk factor for humans. Bearing this in mind, some other retroviruses could be transmitted by their respective hosts consuming milk, i.e. HTLV, MMTV (mammary murine tumor virus) and also HIV in particular situations [37–39].

Consuming raw milk could be a viable transmission pathway, mostly in developing countries having high raw milk consumption in rural populations. Previous studies have established that industrialisation of milk and pasteurisation processes leads to inactivating viral particles [40–42]; avoiding raw milk consumption would thus be an essential prevention strategy, even if it remains unknown whether BLV can also reach humans by this means.

It is worth highlighting that even though the study's objective was not to determine the presence of complete and infectious viral particles in the samples analysed, the gene fragments found here suggested the virus could be found, since comparing the sequences obtained here with previously reported ones gave 97–99% identity (i.e. dealing with BLV). Further studies should be aimed at establishing whether consuming the aforementioned foodstuffs transmits infective viral particles, which can then complete their biological cycle in humans. It could be of great interest to

evaluate viral presence after cooking meat as this could inactivate viral particles and to ascertain whether other mechanisms could be participating in viral transmission [40].

Moreover, this is the first experimental approach reporting the BLV gag gene segment being detected in beef products for human consumption. Questions concerning viral transmission through consuming infected meat have been raised since the reports by Buehring et al. [15]. However, only empirical approaches and inferences about this transmission pathway have been proposed, regarding slaughterhouse practices involving carcinogenic cattle tissue where not only these tissues are distributed to humans, but have been disposed of for dog and cat food products [43]. The data reported here are important for foodborne infections and public health. Prevention policy, which proposes the early detection of pathogenic agents with a possibility to reach humans, depends on the risks for the target population, by controlling the main sources of dissemination [44].

The presence of the BLV DNA in bovine-derived products could be interpreted as a step forward in identifying previously unknown foodborne diseases. Our results suggested that BLV could be considered a potential zoonotic agent, even though non-infectious particles were reported in this study. Evidence of an oncogenic virus' DNA in milk and meat products highlights such foodstuffs as being a potential source of viral transmission to humans and could be the outcome of currently unknown diseases. Such viruses' alternative transmission routes should be studied (i.e. human-to-human transmission). Prevention and control strategies should be enforced to decrease viral prevalence and transmission in cattle and ensure that infected foodstuffs do not become distributed to markets; such alternatives aimed at eradicating the disease have been achieved in some European countries, New Zealand and Australia [5, 45].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Jason Garry for translating this manuscript and the Vocol Institute for helping with sampling. This research was performed as part of a current project financed by Colciencias, Colombia, as part of call 657/2014 for projects.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Barez P-Y, et al. Recent advances in BLV research. *Viruses* 2015; 7: 6080–6088. doi:10.3390/v7112929.
2. Hemmatzadeh F, et al. Interaction between bovine leukemia virus (BLV) infection and age on telomerase regulation. *Veterinary Research Communications* 2015; 39: 97–103.
3. Yuan Y, et al. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: comparison with blood samples from the same cattle. *Virus Research* 2015; 210: 248–254.
4. Úsuga-Monroy C, Echeverri J, López-Herrera H. Diagnóstico molecular del virus de leucosis bovina en una población de vacas Holstein, Colombia. *Archivos de Zootecnia* 2015; 64: 383–388.
5. Acaite J, et al. The eradication experience of enzootic bovine leukaemia from Lithuania. *Preventive Veterinary Medicine* 2007; 82: 83–89.
6. Buehring GC, et al. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerging Infectious Diseases* 2014; 20: 772–782.
7. Buehring GC, et al. Exposure to bovine leukemia virus associated with breast cancer: a case-control study. *PLoS ONE* 2015; 10: e0134304.
8. Ochoa Cruz A, Uribe A, Gutiérrez M. Estudio del potencial zoonótico del Virus de la Leucosis Bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. *Universitas Scientiarum*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, 2006, pp. 31–40.
9. Mesa G, et al. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. *Open Journal of Medical Microbiology* 2013; 3: 84–90.
10. Zhang R, et al. Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Research* 2016; 18: 101.
11. Gillet NA, Willems L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology* 2016; 13: 75.
12. Lassauzet ML, et al. Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1991; 55: 264–268.
13. Mekata H, et al. Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2015; 77: 1115–1120.
14. Kobayashi S, et al. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: a nationwide survey. *Research in Veterinary Science* 2014; 96: 47–53.
15. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY. Humans have antibodies reactive with bovine leukemia virus. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2003; 19: 1105–1113.
16. Aw TG, Wengert S, Rose JB. Metagenomic analysis of viruses associated with field-grown and retail lettuce identifies human and animal viruses. *International Journal of Food Microbiology* 2016; 223: 50–56.
17. Rodríguez-Lázaro D, et al. Presence of pathogenic enteric viruses in illegally imported meat and meat

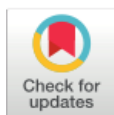
RESEARCH ARTICLE

In silico and *in vitro* analysis of boAP3d1 protein interaction with bovine leukaemia virus gp51

Adriana Patricia Corredor¹, Janneth González^{2*}, Luis Alfredo Baquero³, Hernando Curtidor^{3,4}, Nury Nathalia Olaya-Galán^{1,5}, Manuel Alfonso Patarroyo^{3,4}, María Fernanda Gutiérrez^{1*}

1 Virology Laboratory, Universidad Javeriana, Bogotá DC, Colombia, **2** Nutrition and Biochemistry Department, Science Faculty, Universidad Javeriana, Bogotá DC, Colombia, **3** Molecular Biology and Immunology Department, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá DC, Colombia, **4** Basic Sciences Department, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá DC, Colombia, **5** PhD Programme in Biomedical and Biological Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá DC, Colombia

*mfgutier@javeriana.edu.co (MFG); janneth.gonzalez@javeriana.edu.co (JG)



OPEN ACCESS

Citation: Corredor AP, González J, Baquero LA, Curtidor H, Olaya-Galán NN, Patarroyo MA, et al. (2018) *In silico* and *in vitro* analysis of boAP3d1 protein interaction with bovine leukaemia virus gp51. PLoS ONE 13(6): e0199397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397>

Editor: Leonardo Mariño-Ramírez, National Institutes of Health, UNITED STATES

Received: March 27, 2018

Accepted: June 6, 2018

Published: June 21, 2018

Copyright: ©2018 Corredor et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was partly supported by Colciencias PUJ grants, as part of call 657/2014 for projects granted to María Fernanda Gutiérrez, as well as the Molecular Biology and Immunology Department and the Receptor-Ligand Department from the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

The envelope glycoprotein 51 (gp51) is essential for bovine leukaemia virus (BLV) entry to bovine B-lymphocytes. Although the bovine adaptor protein 3 complex subunit delta-1 (boAP3D1) has been proposed as the potential receptor, the specific ligand-receptor interaction has not yet been completely defined and boAP3D1 receptor and gp51 3D structures have not been determined. This study was thus aimed at a functional annotation of boAP3D1 cellular adaptor protein and BLV gp51 and, proposing a reliable model for gp51-AP3D1 interaction using bioinformatics tools. The boAP3D1 receptor interaction patterns were calculated based on models of boAP3D1 receptor and gp51 complexes' 3D structures, which were constructed using homology techniques and data-driven docking strategy. The results showed that the participation of 6 key amino acids (aa) on gp51 (Asn170, Trp127, His115, Ala97, Ser98 and Glu128) and 4 aa on AP3D1 (Lys925, Asp807, Asp695 and Arg800) was highly probable in the interaction between gp51 and BLV domains. Three gp51 recombinant peptides were expressed and purified to validate these results: the complete domain (rNgp51), the N-terminal portion (rNgp51) and the C-terminal fragment (rCgp51); and binding assays to Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells were then carried out with each recombinant. It was found that rNgp51 preferentially bound to MDBK cells, suggesting this domain's functional role during invasion. The rNgp51-MDBK cell interaction was sensitive to trypsin (98% reduction) and chymotrypsin treatment (80% reduction). These results highlighted that the N-terminal portion of gp51 interacted *in vitro* with the AP3D1 receptor and provides a plausible *in silico* interaction model.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The bovine leukaemia virus (BLV) is a retrovirus from the same genus as the human T-cell leukaemia-lymphoma virus (HTLV) [1], displaying tropism mainly to cattle B-lymphocytes [2], where it has been associated with a slow infection similar to human acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), known as enzootic bovine leukosis. This disease is characterised by having no evident symptomatology in 65% of infected animals, causing persistent lymphocytosis in 30% of them and leukaemia or lymphoma in 5% to 10% [3–5].

The pertinent literature has reported that this virus infects cells other than B-lymphocytes and even cells from species other than cattle [6–10]; it has also been reported recently that it is present in women's mammary gland cells, suggesting the virus' association with breast cancer [11,12]. The cellular protein candidate for viral receptor, allowing virus entry to these cells, must be studied to advance understanding of how BLV can infect cells other than B-lymphocytes, such as human epithelial cells and sheep T-lymphocytes.

The BLV envelope (Env) protein, comprising a 51 kDa molecular weight surface (SU) domain (called gp51), a transmembrane (TM) domain (known as gp30) and a cytoplasmatic (CP) domain, has been involved in virus binding to and penetration of cells [13,14].

Two studies have been published to date referring to the BLV cell receptor. Two receptor (BLVR)-related clones (BLVcp1 and BLVcp1/5') were found in the first experimental approach, encoding a plasma membrane protein whose extracellular domain binds BLV gp51 and increased the susceptibility of cells to recombinant BLV infection [15,16]. A later study proposed that BLVR was related to the adaptor-related protein complex-3 (AP-3) which participates in intracellular protein transport [17]; the MDBK cell line was used for the experiments in both studies. There are currently 75 complete BLV genome sequences in GenBank; only two proteins, a capsid (CA) [18] and a transmembrane protein [19] have been resolved by crystallography. Using computational tools to understand the function of the proteins involved in binding is therefore an important step in resolving concerns about BLV biology.

Generally speaking, *in silico* approaches have been of key importance in assessing protein-protein interactions [20,21]; such methods were used here for identifying functionally important protein regions. Some *in vitro* approaches have been used regarding BLV to identify the cellular receptor [15–17]. The present study describes the functional annotation of BLV gp51 and boAP3D1 proteins and predicts their interaction (GenBank Accession No M35242.1 and No NP_776423). BLV Env and boAP3D1 protein tertiary structures were here modelled and analysed for identifying domains and binding sites and identify and functionally characterise infection pathway components which could lead to a better understanding of BLV pathogenesis and provide pharmacological targets.

Three gp51 recombinant proteins were constructed for determining their Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell binding capability, under the premise that AP3D1 is a cell membrane molecule present in these cells. This was done as a first validation of their *in silico* results which showed an interaction between gp51 and boAP3D1; these results were quite promising according to *in vitro* tests, opening the way forward for further studies aimed at clarifying the receptor involved in BLV infection and also solving gaps in tropism, pathogenesis and maybe identifying future vaccine targets.

Materials and methods

Computational analysis of primary structure

The BLV Env and AP3D1 proteins primary sequences were retrieved from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) accession numbers M35242.1 (FLK-BLV isolate used as BLV

reference strain), NP_776423.3 (AP3D1 bovine boAp3F1). ProtParam [22] was used for calculating protein physical-chemical properties, such as molecular weight, theoretical pI, aa composition, atomic composition, extinction coefficient, estimated half-life, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY).

The ProtScale tool in the ExPASy server was used for boAP3D1 and Env protein aa scale representation (Kyte & Doolittle hydrophobicity scale) [23], having an aa scale defined by a numerical value assigned to each type of aa. The most frequently used scales are hydrophobicity or hydrophilicity scales and secondary structure conformational parameter scales; there are many other scales based on aa chemical and physical properties. The ProtScale tool provides 57 predefined scales entered from the literature [22].

Functional annotation

BLV Env and AP3D1 conserved domains were analysed by sequence similarity search with close orthologous family members available in various protein databases using the web-tools CDD-BLAST [24], INTERPROSCAN [25,26] and COGS [27,28] for this purpose. PROSITE [29] was used for identifying patterns and profiles.

Secondary structure prediction

The PDBSum [30] and CDD-BLAST servers [24] were used for computing and analysing protein sequence secondary structural features. The NSP server (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_secons.html) gave average results from the consensus of 5 algorithms using two basic methods: probability parameters determined by relative frequencies and Bayesian probabilities. GlobPlot tools [31] were used for identifying boAPd1 and gp51 intrinsically disordered proteins (IDPs).

3D structure prediction

The Env and boAP3D1 proteins' 3D structure was predicted by using measures for each type of aa in local structural environments and defined in terms of solvent accessibility and protein secondary structure. Coat protein complex I (COPI) was used for Env; COPI is involved in traffic between the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum [32]. Several criteria were taken into account when selecting the template for modelling, such as crystal resolution, sequence similarity (% identity), conserved regions/domains and sequence coverage. Despite the 3D structure of the BLV Env transmembrane region being available, the main goal of the present study was to characterise the surface (SU) domain (gp51), since this is directly involved in the interaction with the cell receptor and thus, following the above-mentioned criteria, COPI turned out to be the best template choice.

The clathrin-associated AP2 adaptor complex was used for boAP3D1 as it plays roles in many vesicle trafficking pathways within cells [33]. COPI (PDB ID 5A1U) and AP2 adaptor complex (PDB ID 2VGL) crystal structures were the templates selected for obtaining the 3D structures of Env and boAP3D1, respectively. GROMOS96 force field (<http://www.gromacs.org>) [34] was used for quality and reliability assessment once the 3D model had been obtained and energy minimisation performed. Structural evaluation and stereochemical quality was evaluated.

Molecular docking simulations

Scripps Research Institute (<http://www.scripps.edu/mb/dson/doc/autodock/>) Autodock software (v4.2) (Autodock, Autogrid, Autotors, Copyright- 1991e2000) was used for Env protein

and AP3D1 docking analysis. A searching grid extended over the selected target protein to delimitate the docking area was used to run Autodock. Polar hydrogens were added to ligand moieties, Kollman charges assigned and atomic solvation parameters added. Gasteiger polar hydrogen charges were assigned and nonpolar hydrogens were merged with the carbons; internal degrees of freedom and torsions were set. AP3D1 was docked with target protein, being this molecule considered a rigid body. Affinity maps for all atom types and an electrostatic map were computed (0.375 E grid spacing). The Lamarckian genetic algorithm selected in Autodock was used for the search.

Refinement and complex validation

MacroModel (software <https://www.schrodinger.com/macromodel>) was used for screening docking solutions for energy minimisation to avoid steric overlaps and clashes. A 0.05 kJ/A[°]-mol was set as convergence criterion for gradient minimisation for protein-protein complex and docking performance quality test.

Computing binding free energy

Distance-scaled, finite ideal-gas reference (DFIRE) state energy software [35] was used for assessing the complex's (Env and AP3D1) binding free energy and estimating binding affinity. PyMOL (the PyMOL Molecular Graphics System, version 2.0 Schrödinger, LCC) was used for polar contact assessment.

Mapping protein-protein interactions

PyMOL (the PyMOL Molecular Graphics System, version 2.0 Schrödinger, LCC) was used for visualising and mapping interactions between BLV Env and AP3D1 aa.

Obtaining recombinant protein gp51

BLV DNA was extracted from a blood sample collected from a serologically positive bovine. For this purpose, a LymphoSep density gradient (MP Biomedicals) was used for obtaining peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). A High Pure PCR Template Preparation kit (Roche) was then used for extracting total DNA for obtaining proviral DNA, following the manufacturer's indications.

PCR amplification of the *gag* gene was used for confirming BLV presence in the sample, using previously reported primers [11]. The proviral DNA was then used as template in PCR reactions for which specific primers were designed for amplifying gp51 fragments from the FLK reference sequence deposited in the NCBI database (accession number M35242). Such regions were gp51 Nt aa 35–173 (Fwd 5' ATGAGATGCTCCCTGTCCCTAG 3' and Rev 5' TAAAGAAAAGGTGATCAGGGG 3'), gp51 Ct aa 173–301 (Fwd 5' ATGTTACATAAGATCCCTGATCCC and Rev 5' ACGTCTGACCCGGGTAGG 3') and the complete gp51 (aa 35–301), using the gp51 Nt forward and gp51 Ct reverse primers. A Wizard PCR Clean-Up System kit (Promega) was used for purifying PCR products; amplicon quality was then evaluated on 1.5% agarose gels. The purified products were ligated into pEXP5-CT/TOPO expression vector (Invitrogen) and each recombinant construct was used for transforming *E. coli* TOP-10 cells (Invitrogen). Several recombinant clones were grown for plasmid DNA extraction with an UltraClean mini plasmid prep purification kit (MO BIO Laboratories). Insert integrity and correct orientation were confirmed by Sanger sequencing (Macrogen, Seoul, South Korea). ClustalW NPS software [36] was used for determining similarity between FLK reference strain *gp51* gene sequences and that isolated from bovine sera.

Once the *gp51* sequence was confirmed, the EXP5-gp51 (complete, NT and CT) recombinant plasmids were transformed in *E. coli* BL21-DE3 cells (Invitrogen), following the manufacturer's recommendations. Once the cells had reached a 0.5 D O₆₀₀, 1 mM IPTG (Sigma-Aldrich) was added to induce molecule expression for 4h at room temperature with constant shaking at 250 rpm. *E. coli* BL21-DE3 bacteria were recovered by spinning and the cell pellet was used for extracting recombinant proteins in denaturing conditions.

After verifying expression by Western blot, all recombinant proteins were purified from whole cell lysate supernatants by affinity chromatography using Ni²⁺-NTA resin (Qiagen). The mixture was left overnight at 4°C and then passed through a chromatography column; exhaustive dialysis was carried out twice to obtain the three recombinant proteins in a functional conformation. The first was carried out inside the column before elution, using decreasing concentrations of urea buffer (3, 1.5, 0.75, 0.37 M in PBS 1X adding 1mM reduced glutathione, 0.1 mM oxidised glutathione). The fractions obtained after elution were dialysed with PBS 1X pH 7.2 for 72 h at 4°C to eliminate remaining urea and enable proper recombinant refolding. This procedure has been described by Singh, S. *et al.*, as being effective for obtaining a proper conformation and function for proteins expressed in *E. coli* and extracted as denatured protein [37]. We therefore think that the three fragments so obtained had the proper conformation and were functionally active; however, additional assays are required to confirm correct recombinant folding.

All the fractions collected were analysed by 12% SDS-PAGE and Western blot; those presenting just one band were dialysed in 1X PBS at pH 7.2. A BCA protein assay micro kit (Thermo scientific) was used for quantifying the proteins which were ultra-filtered and concentrated with Amicom Ultra-4 centrifugal filters (Merck Millipore).

Verifying protein expression involved separating purified recombinant proteins (rgp51, rNgp51 and rCgp51) (10 µg) by 12% SDS-PAGE and then transferring it to a nitrocellulose membrane and incubating with a peroxidase conjugated (1:4,500) monoclonal anti-histidine antibody (A 7058, Sigma-Aldrich) recognising these recombinant proteins' histidine tail. The membranes were revealed with a peroxidase substrate kit (Vector Laboratories), according to the manufacturer's recommendations. The proteins' molecular masses were determined by linear regression using the XL-Opti Protein (New England Biolabs) molecular mass marker as reference.

Evaluating recombinant protein capability to bind to MDBK cells

MDBK (ATCC, #CCL-22 derived from bovine kidney) cells were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, D5523) containing L-glutamine and 1,000 mg/L glucose, supplemented with 3.7 gm/L sodium bicarbonate and 10% foetal calf serum.

The next step involved radiolabelling 15 µg complete (rgp51) or N-terminal (rNgp51) or Carboxy-terminal (rCgp51) recombinant proteins with 4 µL Na¹²⁵I (100 cpm/mL; ARC) and Iodination Beads (Pierce-Thermo Scientific), following the manufacturer's instructions. Following 12 min of incubation, radiolabelled recombinant protein was separated by size-exclusion chromatography on a Sephadex G-25 column (Pharmacia). Each eluted fraction was then analysed by gamma counter (Packard Cobra II).

Binding assays involved 1.2 × 10⁶ MDBK cells being incubated with 150 and 300 nM concentrations of each radiolabelled recombinant protein at room temperature for 90 min in the absence (total binding) or presence (non-specific binding) of 13 µM of the same unlabelled recombinant protein. The cells were spun through a 60:40 dioctyl phthalate-diethyl phthalate cushion (1.015 g/ml density, 10,200 × g for 1.5 min) and a gamma counter (Packard Cobra II) was used for quantifying cell-associated radioactivity.

Each recombinant protein's binding activity was also evaluated in a binding assay with enzyme-treated cells. Briefly, cells were independently treated with 1mg/mL trypsin (Sigma T-1005) or 1 mg/mL chymotrypsin (Sigma C-4129) for 60 min at 37°C. Following incubation, enzyme-treated cells were washed twice with HBs buffer and used in a typical binding assay. Untreated cells were used as positive binding control.

Results

Computational analysis of primary structure

Table 1 gives boAP3D 1, BLV Env and recombinant proteins' physicochemical properties. The Env protein consists of 515 residues, 33 of which form part of the signal peptide, 36 are positively charged and 33 negatively charged. The boAP3D 1 protein has 1,207 residues, 173 of them are positively charged and 179 negatively charged. Grand average of hydropathy (GRAVY) was also calculated, thereby determining that the proteins were hydrophilic as the resulting value was negative, favouring protein solubility in water. Fig 1 shows Kyte & Doolittle hydrophobicity for boAP3D 1 and gp51 proteins. The physicochemical properties of the three recombinant proteins (rgp51, rNgp51 and rCgp51) are also described.

Aligning bovine and human AP3D 1 protein sequences with Clustal Omega software (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/dustalo/>) revealed 15 differences in the BLVR domain whilst no differences between human and bovine peptide were found in the adaptin domain. The red line in Fig 2 represents the BLVR domain.

Functional annotation

The BLV Env protein is 515 aa long; it is located on cell membrane and has three domains. The extracellularly-located initial domain consists of a 33 aa-long signal peptide followed by an extracellular region from aa 34 to 438 (SU or gp51). The intermediate portion is a transmembrane region from aa 439 to 460 (TM or gp30) and the final portion is a cytoplasmic region from aa 461 to 515. Fourteen aa (48, 50, 77, 96, 99, 112, 113, 120, 122, 135, 136, 186, 187, 292 and 296) which can be considered binding sites are found all along the SU. Fig 3A shows the 14-binding aa in yellow and the 9 glycosylation sites (aa 129, 203, 230, 251, 256, 271, 287, 351 and 396).

The 1,207 aa-long boAP3D 1 protein has two domains: the adaptin domain (residues 32–583) and the BLVR domain (residues 661–807) which is a disorganised region, like others all along the protein. Fig 3B shows the scheme for this protein, having 2 binding sites in position

Table 1. boAP3D 1, BLV Env and recombinant proteins physicochemical properties.

Property	Value				
	boAP3D 1	BLV Env	rgp51	rNgp51	rCgp51
Amount of aa	1,207	515	268	140	129
Molecular weight kDa	136	54	30	16	14
Theoretical pI	6.65	8.19	7.74	7.10	8.06
Total amount of negatively charged residues (Asp+Glu)	179	33	19	12	7
Total amount of positively charged residues (Arg+Lys)	173	36	20	12	8
Ext. coefficient M –1 cm–1	75,845	120,735	74,410	39,795	34,615
Instability index (all are unstable protein)	49.79	49.17	51.57	45.22	58.02
Aliphatic index	88.86	95.93	74.57	65.32	86.98
Grand average of hydropathy (GRAVY)	-0.490	-0.092	-0.346	-0.458	-0.194

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.t001>

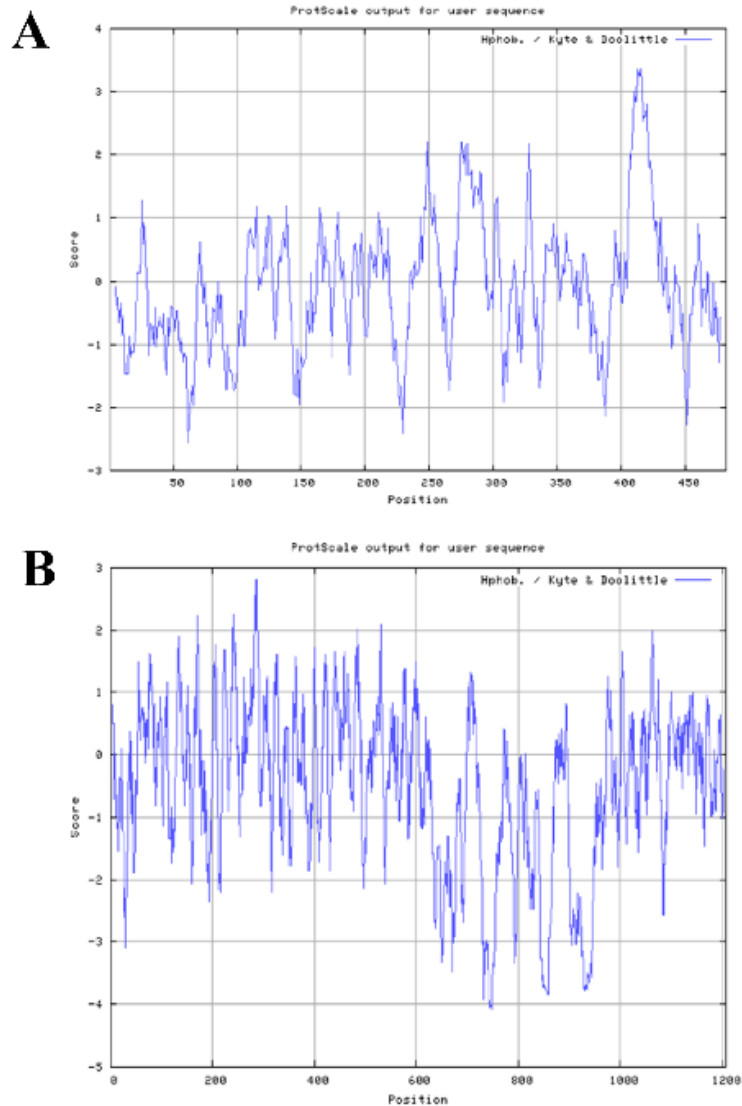


Fig 1. Kyte & Doolittle hydrophobicity for BLV Env (A) and boAP3D1 (B) proteins. Despite differences regarding the amount of asin both proteins, their physicochemical characteristics were comparable.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.g001>

1 and 474 and 16 conserved sites in the BLVR domain (D 661, E662, S686, S688, L726, E728, E729, D 739, D 767, E779, E783, E785, E786, S788, D 797 and A801).

Secondary structure prediction

The BLV envelop protein's secondary structure consists of 37 α -helices, 41 helix-helix interaction regions, 77 β -turns and 22 γ -turns. The boAP3D1 protein has 3 β -sheets, 3 β -hairpins, 2

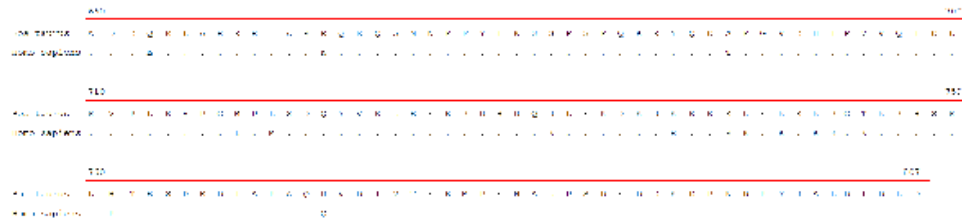


Fig2. Clustal Omega sequence alignment of boAP3D1 and huAP3D1. * represents identical aa, the red line represents the BLVR domain.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.g002>

β -bulges, 7 strands, 4 α -helices, 2 helix-helix interaction regions, 15 β -turns and 2 γ -turns. The boAP3D1 protein has 10 disordered regions in positions 3–8, 39–64, 80–99, 139–157, 181–189, 200–208, 223–228, 255–264, 443–456 and 472–482 and a globular domain between aa 158 to 442.

The AP3D1 intrinsically disordered protein (IDPs) is distributed in 12 regions in positions 120–128, 190–198, 632–637, 680, 695, 714–718, 784–802, 873–878, 943–947, 964–970, 1033–1051 and 1182–1190 and four globular domains between aa 1–679, 696–783, 803–1032 and 1052–1207.

Analysis performed with the PROSITE [29] database predicted that the boAP3D1 gp51 binding domain would be located between aa 660 and 807 (Fig 3B, shown in red).

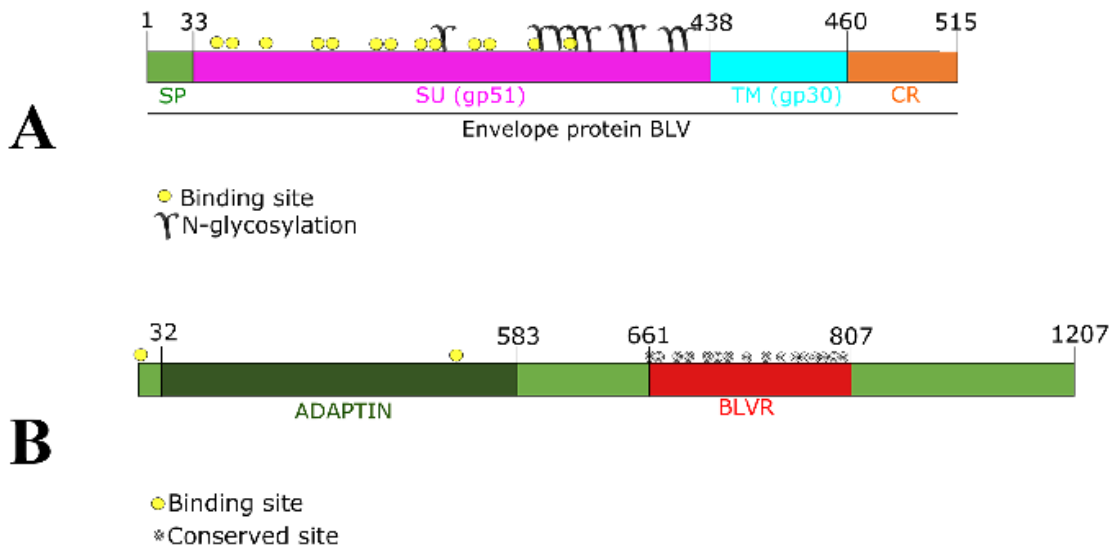


Fig3. Schematic representation of EnvBLV and boAP3D1 proteins. 3A. BLV Env protein. Signal peptide 1 to 34, SU (gp51) 34 to 438, TM (gp30) 439 to 460 and cytoplasmic region 461 to 515. Binding sites are shown by yellow circles (48, 50, 77, 98, 99, 112, 113, 120, 122, 135, 136, 187, 292 and 298), N-glycosylation sites (129, 203, 230, 251, 256, 271, 287, 351 and 398). 3B. boAP3D1 protein has 1,207 aa with two domains: one from aa 32 to 583 for adaptin (dark green) and a second (BLVR) from aa 661 to 807 (red). AP3D1 has 2 binding sites in positions 1 and 474 (yellow dots) and 16 conserved sites in the BLVR domain (D661, E662, S686, S688, K726, E728, E729, K739, D767, E779, E783, A785, L786, S788, D797 and A801).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.g003>

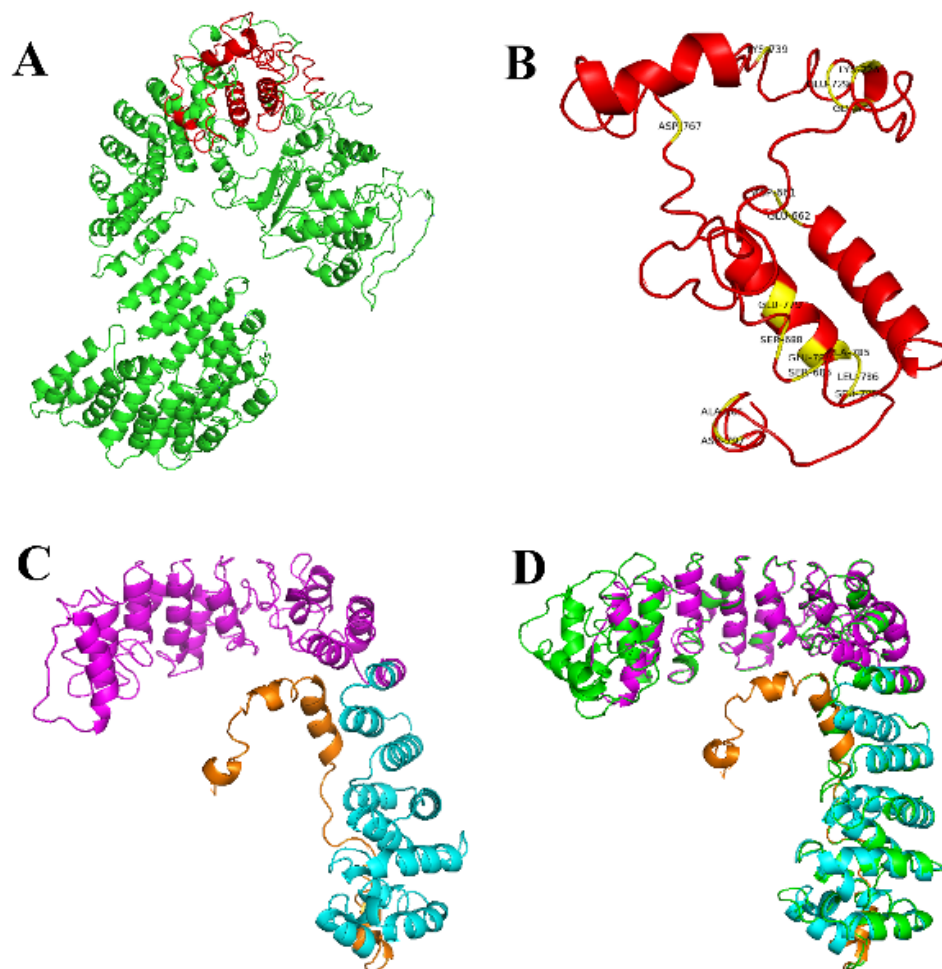


Fig 4. Modelling boAP3D1 and Env proteins. 4A. boAP3D1 structure is coloured green, and in red the BLVR domain. 4B. The BLVR domain (red) with conserved sites highlighted in yellow (D661, E662, S686, S688, K726, E728, E729, K739, D767, E779, E783, A785, L786, S788, D797 and A801). 4C. BLV Env protein structure predicted by I-TASSER, gp51 (SU) is shown in magenta, gp30 (TM) in cyan and cytoplasmic domain in orange. 4D. The COP1 coat triad structure (5A1U) in green overlaps with our BLV Env protein model.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.g004>

3D models predicted for env and boAP3d1

Fig 4 shows the predicted model for both proteins; Fig 4A shows boAP3D1 structure where green represents the binding domain (BLVr) and Fig 4B shows this domain in red and conserved areas in yellow (i.e. aa D661, E662, S686, S688, K726, E728, E729, K739, D767, E779, E783, A785, L786, S788, D797 and A801). Fig 4C shows Env 3D structure; magenta represents the gp51 domain (SU), cyan gp30 (TM), orange the cytoplasmic domain and yellow conserved residues A15, Y17, R44, R65, R66, E78, P79, D87, F89, Q102, G103, Q153, L154, S259 and R265.

The predicted model for the Env protein by Ramachandran plot [38] showed that 68.4% of the residues were located in the most favoured regions, 24.6% residues in additional allowed regions, 2.6% residues in generously allowed regions and 4.3% residues in disallowed regions. DFIRE was -607.58, reflecting the model's quality; lower energy would have indicated that the model was closer to the native conformation. A perfect structure overlap with 5A1U was shown in this study, suggesting the model's high quality (Fig 4D).

Molecular docking simulations, complex refinement and validation and binding free energy computation

PyMOL was used for visualising molecular docking between gp51 and boAP3D1 (Fig 5). The part of the boAP3D1 protein making direct contact with gp51 was the BLVR domain (Fig 5A, red). The BLV-gp51 residues interacted with the proposed receptor (boAP3D1). The interface areas (\AA^2) were 1,495 for boAP3D1 and 1,443 for gp51. This model obtained a score of -131.7, 14 cluster size, 23.6 RMSD for the overall lowest-energy structure, -50.4 Van der Waals energy, -470.4 electrostatic energy, -27.7 solvation energy restraints, 405.2 violation energy, 2,120.2 buried surface area and -1.9 Z-Score.

Protein-protein interaction prediction

Possible interactions in the complex regarding Asn170 and Lys925 (Fig 5B), Trp127 and Asp807 (Fig 5C), His115 and Asp695 (Fig 5D), Ala97, Ser98, Glu128 and Arg800 participation in boAP3D1 (BLVR domain) and Env (gp51 domain) were analysed (Fig 5E). Table 2 gives the values calculated for binding free energy between these aa, i.e. 4 salt bridge interactions, 14 hydrogen bonds and 167 no direct contact points.

An additional *in silico* test showed the effect of mutating the predicted interaction residues in the binding energies between boAP3D1 and gp51. Two experimentally testable predictions were thus made; mutations leading to drastic chemical shifts were made in gp51 amino acids predicted as being crucial in binding to boAP3D1 (His115, Glu128 and Asn170 were replaced by Ala) and ClustalOmega software (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) was used for multiple sequence alignment to assess whether the predicted interaction residues were conserved amongst the 10 BLV gp51 genotypes reported so far.

As a result, binding energies' native spectrum changed (-12.9 to -9.8 ΔG (Kcal mol⁻¹), with a difference of 3.1). This could have led to decreased stability and loss of interaction. On the other hand, key amino acids in the interaction found here were highly conserved amongst different BLV genotypes (highlighted in yellow in Fig 6).

Evaluating recombinant proteins' MDBK cell binding capability

gp51 contains 9 N-glycosylation sites, most of them towards the C-terminus. Although the most appropriate expression system for expressing a glycoprotein would have been a eukaryotic one, previous studies by Rizzo *et al.*, published in 2016 [39] have shown that gp51 interaction with its receptor was mediated by specific domains but sugars did not play any role in such interaction, as syncytia formation with maintenance of BLV particle infectivity remained when N-glycosylation sites of gp51 were mutated. A prokaryotic system was thus used here, taking its advantages into account, in terms of cost and ease of use.

Fig 7 shows gp51 recombinant fragments' purification. Western blot detection is shown with Coomassie blue stained anti-his tag monoclonal antibody, i.e. the expected weight and purity of each recombinant fragment.

Binding assays determined rgp51 protein binding to MDBK cells. It was found that rgp51 had higher MDBK cell binding at low protein concentration (black bars) (Fig 8A); however,

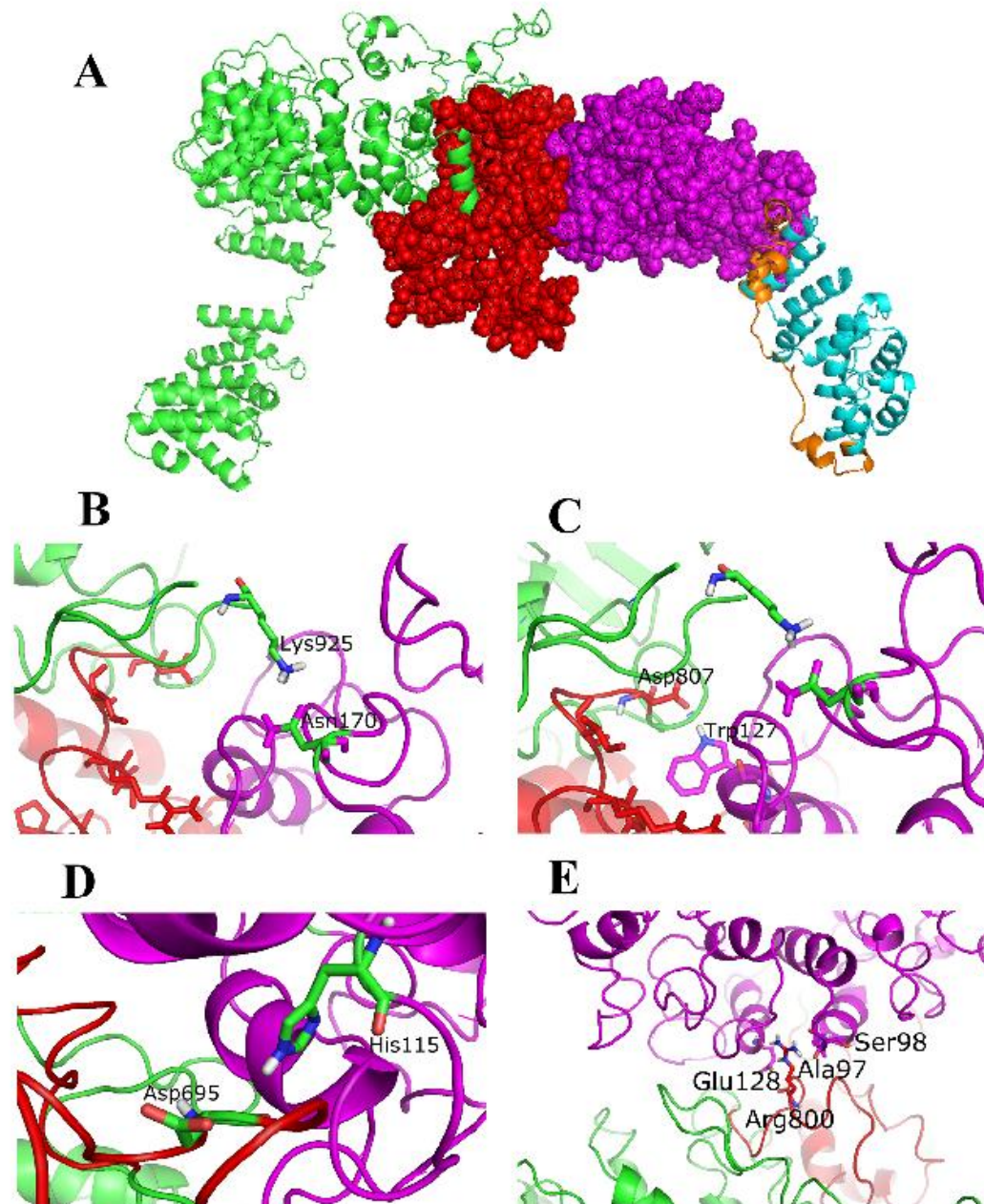


Fig 5. boAP3D1 and gp51 docking. 5A. Overview. 5B. Asn170 (gp51) and Lys925 (boAP3D1). 5C. Trp127 (gp51) and Asp807 (boAP3D1). 5D. His115 (gp51) and Asp695 (boAP3D1), hydrogen bonds, non-bonded contacts. 5E. Ala97, Ser98, Glu128 (gp51) and Arg800 (boAP3D1), hydrogen bonds, non-bonded contacts and salt bridges.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.g005>

Table 2. Binding free energy results for gp51 and boAP3D1 interaction.

gp51	AP3D1	Hydrogen bonded	Non-bonded contacts	Salt bridges
		Distance(A)		
Asn170	Lys925	2.8	3.69	-
Trp127	Asp607	2.89	3.77	-
His115	Asp695	2.90	3.46	-
Ala97	Arg800	2.76	3.30	-
Ser98		3.20	3.20	-
Glu128		2.97	2.97	2.97

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.t002>

when protein concentration was increased (blue bars), a clear preferential binding was observed for rN gp51, whilst rGp51 and rCgp51 interaction remained the same.

Taking into account that binding experiments showed N-terminal fragment (rN gp51) preferential binding to MDBK cells, further experiments only involved this recombinant; furthermore, *in silico* analysis had also shown that the key interacting residues (Ala97, Ser98, His115, Trp127, Glu128 and Asn170) all lay within such fragment (aa 35 to 173). The gp51 N-terminal domain binding to MDBK cells was thus concentration dependent, suggesting this domain's functional role during invasion; rN gp51-MDBK cell interaction was sensitive to trypsin and chymotrypsin treatment, binding becoming reduced by 98% and 80%, respectively (Fig 8B).

Discussion

Bovine enzootic leukosis (LBE) is an infection affecting cattle and seems to have been restricted to such species to date [2]; however, there is evidence of it passing to humans, and some authors have proposed a relationship with breast cancer in women [11,12,40,41]. The possibility of a zoonosis is supported by the virus appearing in milk and meat from cows proving seropositive for BLV which could be acting as vectors of viral transmission to humans [42]. The possibility of being a zoonotic virus and its impact on public health mean that studies are needed in the search for the viral receptor enabling infection in two genetically distinct species (i.e. cattle and humans).

Studies *in silico* (like that described in this article) are necessary as a basis for initiating experimental studies verifying gp51 interaction with AP3D1, complementing existing information about BLV's cellular receptor to achieve infection.

According to Env primary and secondary sequence characterisation, the primary sequence is extremely conserved amongst different BLV strains (0.0 e-value) (data not shown). High sequence identity with human (88%), mouse (88%), sheep (99%) and goat (99%) sequences was found for boAP3D1 (0.0 e-value), suggesting a common ancestor regarding this protein.

PSI-BLAST predicted 88% identity between bovine and human protein for AP3D1 and 99% with sheep and goat protein (data not shown). Aligning bovine and human AP3D1 protein sequences with Clustal Omega software (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/dustalo/>)

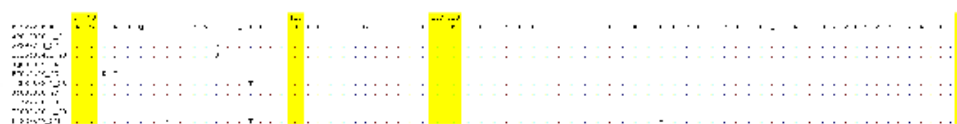


Fig 6. Clustal Omega sequence alignment of different BLV gp51 sequences (genotypes 1 to 10). "-" represents identical aa. The six key amino acids in the interaction are shown in yellow (Ala97, Ser98, His115, Trp127, Glu128 and Asn170).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.g006>

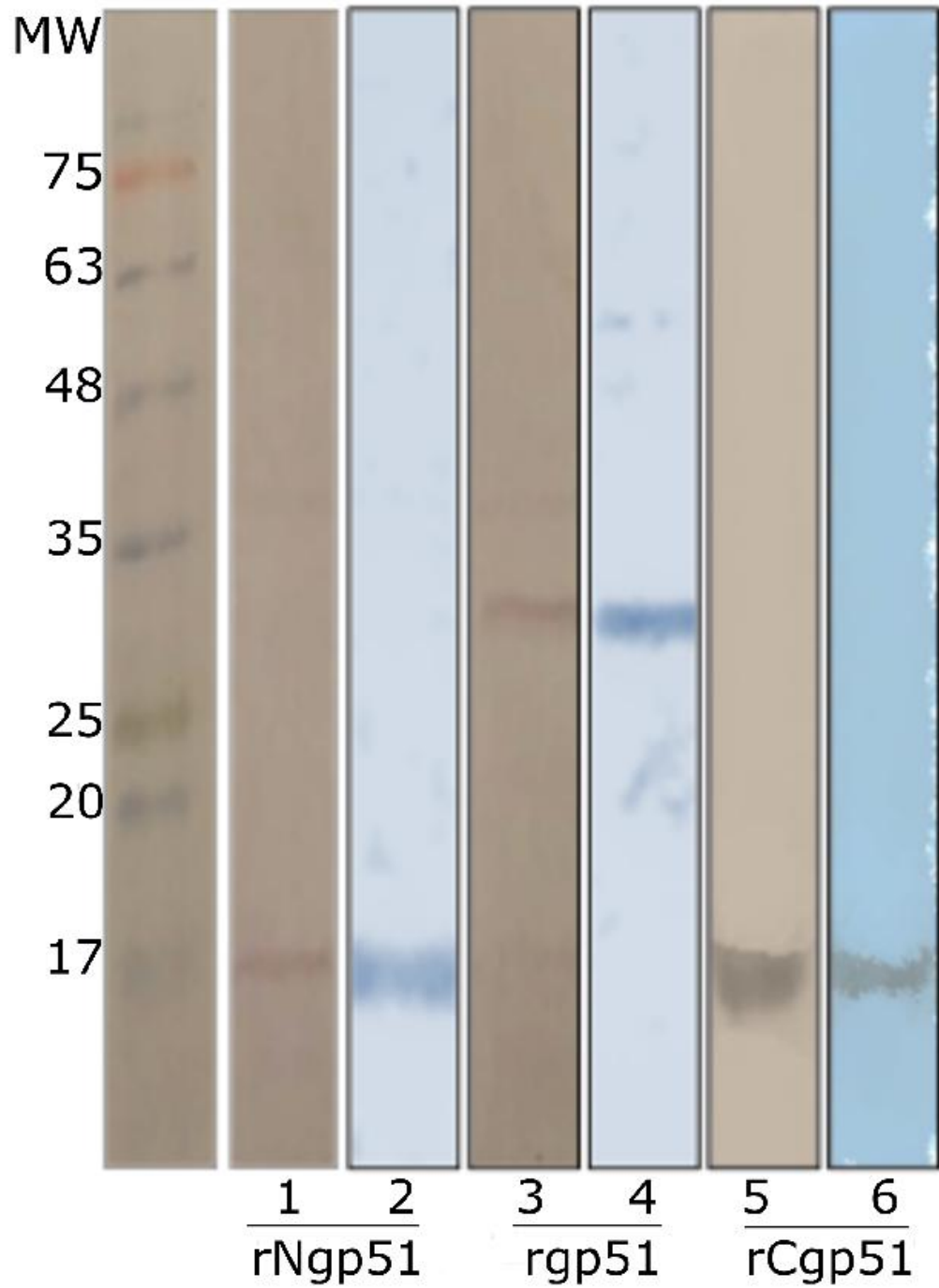


Fig 7. gp51 recombinant fragment purification. Lanes 1, 3 and 5 show Western blot detection with an anti-his monoclonal antibody. Lanes 2, 4 and 6 show Coomassie blue stained purified recombinant proteins. The proteins' molecular weight marker is indicated in the first lane (molecular masses for the three recombinants agreed with expected ones: 30, 16 and 14 kDa for rgp51, rNgp51 and rCgp51, respectively).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.g007>

revealed 15 differences in the BLVR domain whilst no differences between human and bovine peptide were found in the adaptin domain. The red line in Fig 2 represents the BLVR domain (Fig 2); however, docking analysis (Fig 5) showed that they were not involved in the interaction with gp51 (Fig 2, in red). Most substitutions were conservative and just one of them was drastic (between Ala and Thr); such residues have different chemical properties, but such position was not predicted to be relevant for the interaction.

Properties supposed from the proteins' tentative functions (i.e. homology, main domains, structural similarities and physical-chemical characterization inferred by the predictions) provide useful information and should be verified experimentally.

The boAP3D1 envelope protein binding region and BLV entry to target cells requires virus-encoded glycoprotein gp51 to interact with cell receptors to facilitate virus entry. It has been proposed that gp51 plays an important role in virus entry to target cells during the viral cycle [43]. The protein's most exposed aa should interact with specific receptors on target cells. A previous study reported that a protein similar to AP3D1 enabled BLV fusion and entry, but no specific boAP3D1 binding regions were established [15–17]. Regarding BLV and boAP3D1 docking assay results, it was found here that the AP3D1 interacting region with gp51 (located from aa 660–803) was the same region called the BLVR domain in previous studies (Figs 3 and 5).

Furthermore, considering BLV Env proteins, it has been shown that a region mediating interaction with a tentative receptor is located in gp51 or SU domain between aa 83–158. Some receptor binding domains (RBDs), zinc ion linker and binding and glycosylation sites have previously been described in this specific region [13] (Fig 3A). These regions could thus be crucial for a first interaction between host and viral proteins thereby mediating viral attachment. Fig 5 shows the most relevant interactions between both proteins' specific aa as follows: Asn170-Lys925 (5B), Trp127-Asp807 (5C), His115-Asp695 (5D). Some interactions were mediated by hydrogen bonds, non-bonded contacts, as in Ala97, Ser98, Glu128 and Arg900 (5E), and hydrogen bonds, non-bonded contacts and salt bridges. Table 2 gives the distances between interactions. Interestingly, when alanine replacement led to drastic chemical shifts in

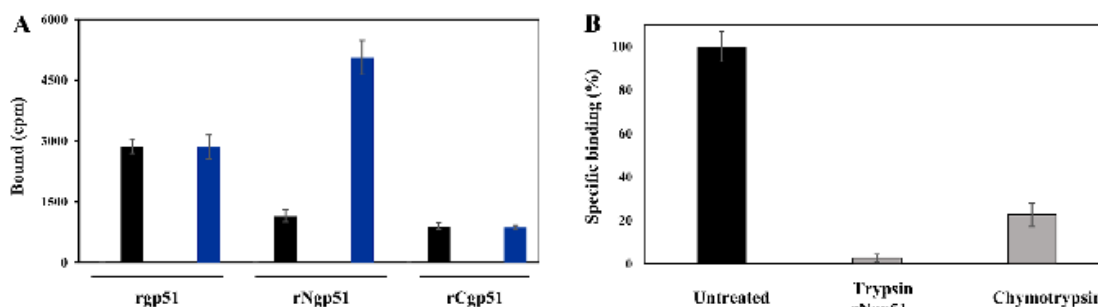


Fig 8. gp51 recombinant protein binding assays. 8A. rgp51 MDBK cell binding. Low rgp51 protein concentration (black bars) gave greater MDBK cell binding; however, rgp51 and rCgp51 binding did not change when protein concentration was duplicated (blue bars), whilst rNgp51 increased. 8B. MDBK cell interaction with rNgp51. The black bars represent enzymatically-treated MDBK and rNgp51 binding to the proposed receptor (AP3D1), followed by trypsin and chymotrypsin treatment, resulting in reduced rNgp51 (98%) and MDBK binding (80%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199397.g008>

some gp51 amino acids predicted as crucial in binding to boAP3D1 (His115, Glu128 and Asn170), the binding energy became drastically changed, thereby supporting the importance of such residues in the interaction.

The present study has suggested a possible hypothesis for viral entry to cells being AP3D1 protein-mediated as there is relevant similarity between this protein in different species and it could thus be said that this virus may have a binding pattern which is not species-specific at all and is using a ubiquitous receptor for achieving viral entry [8,44].

As other studies have proposed that the virus could enter other cells, it leads to a novel possibility involving a co-receptor being involved in cell infection [45,46] as AP3D1 can be found in a wider range of cells, so an additional molecule would seem to be required for BLV to acquire target cell and/or host specificity.

More recent studies have found the virus in other cell systems, particularly in the brains of cattle suffering neurological syndromes, suggesting different target cells being ultimately susceptible to viral infection and suggesting that this virus might be associated with other conditions than classically studied pathology [7]. These studies have presented a different perspective in which cattle are not really the only host which might be affected, as well as only lymphocyte cells being susceptible to infection by the virus.

However, it is clear that AP3D1 is not B-lymphocyte-specific, as shown by the BioGPS search (<http://biogps.org>) fed with experimental data accounting for this protein's presence in different cell types (including human kidney cells), and the *in vitro* experiments in this work showing recombinant gp51 binding (NT fraction and complete protein) to MDBK cells (Fig 8A), whose binding was inhibited by enzymatic treatment (Fig 8B). The above is supported by these cells containing AP3D1 as, according to the present work, this protein's similarity seems to locate it on the membrane (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2238969/>); the Locate (<http://locate.imb.uq.edu.au/>) and QuickGO databases (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) predicted the same.

This study adopted an in-depth bioinformatics and *in vitro* approach, searching for an explanation for gp51 interaction and its receptor. This is the first *in silico* approach to understanding BLV interaction with its host, further confirmed experimentally.

Conclusions

Knowledge concerning the boAP3D1 cellular adaptor protein and BLV gp51 has been expanded through these results. Molecular modelling and protein docking methods were useful for obtaining boAP3D1-receptor and gp51 complex 3D structures, showing these proteins' interaction in detail. These models suggested the receptor-ligand interactions which could be occurring in BLV infection, leading to viral binding and fusion regarding viral entry. Further *in vitro* analyses confirmed that both the N-terminal region and the whole gp51 bound to MDBK cells, being the binding of the former region the strongest. Future studies aimed at assessing the potential use of the interactions here described for developing drugs or vaccines are thus recommended.

Acknowledgments

This work was partly supported by Colciencias PUJ grants, as part of call 657/2014 for projects granted to María Fernanda Gutiérrez, as well as the Molecular Biology and Immunology Department and the Receptor-Ligand Department from the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Adriana Patricia Corredor, Janneth González, Manuel Alfonso Patarroyo, María Fernanda Gutiérrez.

Formal analysis: Adriana Patricia Corredor, Janneth González, Hernando Curtidor, Manuel Alfonso Patarroyo.

Funding acquisition: Manuel Alfonso Patarroyo, María Fernanda Gutiérrez.

Investigation: Adriana Patricia Corredor, Luis Alfredo Baquero, Nury Nathalia Olaya-Galán.

Methodology: Adriana Patricia Corredor.

Project administration: Adriana Patricia Corredor, Janneth González.

Resources: María Fernanda Gutiérrez.

Supervision: Janneth González, Manuel Alfonso Patarroyo, María Fernanda Gutiérrez.

Validation: Adriana Patricia Corredor, Janneth González, María Fernanda Gutiérrez.

Visualization: Adriana Patricia Corredor, Janneth González, María Fernanda Gutiérrez.

Writing—original draft: Adriana Patricia Corredor, Janneth González, Hernando Curtidor, Manuel Alfonso Patarroyo, María Fernanda Gutiérrez.

Writing—review & editing: Adriana Patricia Corredor, Janneth González, Manuel Alfonso Patarroyo, María Fernanda Gutiérrez.

References

1. ICTV (2017) International Committee on Taxonomy of Viruses.
2. Meiron R, Moss S, Brenner J (1997) Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 113–119. PMID: 9437829
3. Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutiérrez G, et al. (2015) Recent Advances in BLV Research. *Viruses* 7: 6080–6088. <https://doi.org/10.3390/v7112929> PMID: 26610551
4. Hemmatzadeh F, Keyvanfar H, Hasan NH, Niap F, Bani Hassan E, Hemmatzade A, et al. (2015) Interaction between Bovine leukemia virus (BLV) infection and age on telomerase misregulation. *Vet Res Commun* 39: 97–103. <https://doi.org/10.1007/s11259-015-9629-2> PMID: 25665900
5. MSD (2014) Overview of bovine leukosis. MSD Manual: Veterinary manual.
6. Burny A, Mammerickx M (1987) *Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus*. Boston, Norwell, Mass.: M. Nijhoff, Distributors for North America, Kluwer Academic Publishers. xvi, 283 p. p.
7. D'Angelino RH, Pituco EM, Villalobos EM, Harakava R, Gregori F, Del Fava C (2013) Detection of bovine leukemia virus in brains of cattle with a neurological syndrome: pathological and molecular studies. *Biomed Res Int* 2013: 425646. <https://doi.org/10.1155/2013/425646> PMID: 23710448
8. Kettmann R, Mammerickx M, Portetelle D, Gregoire D, Burny A (1984) Experimental infection of sheep and goat with bovine leukemia virus: localization of proviral information on the target cells. *Leuk Res* 8: 937–944. PMID: 6096636
9. Slavikova K, Zajac V, Reinerova M, Kettmann R, Burny A (1986) Bovine leukemia provirus in the DNA of different infected host cells. *Neoplasma* 33: 671–678. PMID: 3027595
10. Willems L, Kettmann R, Dequiedt F, Portetelle D, Voneche V, Cornil I, et al. (1993) In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants. *J Virol* 67: 4078–4085. PMID: 8389918
11. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Choi KY, Sun D, Nuovo G, et al. (2014) Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis* 20: 772–782. <https://doi.org/10.3201/eid2005.131298> PMID: 24750974
12. Mesa G, Ulloa JC, Uribe AM, Gutierrez MF (2013) Bovine leukemia virus gene segments detected in human breast tissues. *Open journal of medical microbiology* 3: 84–90.
13. Johnston ER, Albritton LM, Radlke K (2002) Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of bovine leukemia virus surface protein. *J Virol* 76: 10861–10872. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.10861-10872.2002> PMID: 12368329

14. Johnston ER, Radke K (2000) The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemia virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions. *J Virol* 74: 2930–2935. PMID: 10684314
15. Ban J, Portetelle D, Altaner C, Horion B, Milan D, Krchnak V, et al. (1993) Isolation and characterization of a 2.3-kilobase-pair cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus cell receptor. *J Virol* 67: 1050–1057. PMID: 8380453
16. Ban J, Truong AT, Horion B, Altaner C, Burny A, Portetelle D, et al. (1994) Isolation of the missing 5'-end of the encoding region of the bovine leukemia virus cell receptor gene. *Arch Virol* 138: 379–383. PMID: 7998843
17. Suzuki T, Matsubara Y, Kitani H, Ikeda H (2003) Evaluation of the delta subunit of bovine adaptor protein complex 3 as a receptor for bovine leukaemia virus. *J Gen Virol* 84: 1309–1316. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18763-0> PMID: 12692298
18. Obal G, Trajtenberg F, Carrion F, Tome L, Larrieux N, Zhang X, et al. (2015) STRUCTURAL VIROLOGY. Conformational plasticity of a native retroviral capsid revealed by x-ray crystallography. *Science* 349: 95–98. <https://doi.org/10.1126/science.1260442> PMID: 26044299
19. Lamb D, Schuttelkopf AW, van Aalten DM, Brighty DW (2011) Charge-surrounded pockets and electrostatic interactions with small ions modulate the activity of retroviral fusion proteins. *PLoS Pathog* 7: e1001268. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001268> PMID: 21304939
20. Srinivasa Rao V, Srinivas K (2011) Modern drug discovery process: an in silico approach. *Journal of bioinformatics and sequence analysis* 2: 89–94.
21. Wadood A, Ahmed N, Shah L, Ahmad A, Hassan H, Shams S (2013) In-silico drug design: an approach which revolutionised the drug discovery process. *O A drug design & delivery* 1: 3.
22. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel R D., et al. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, editor. *The proteomics protocols handbook*. Humana press. pp. 571–607.
23. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105–132. PMID: 7108955
24. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43: D222–226. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1221> PMID: 25414356
25. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, et al. (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30: 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031> PMID: 24451626
26. Lubec G, Afjehi-Sadat L, Yang JW, John JP (2005) Searching for hypothetical proteins: theory and practice based upon original data and literature. *Prog Neurobiol* 77: 90–127. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.10.001> PMID: 16271823
27. Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28: 33–36. PMID: 10592175
28. Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, et al. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 29: 22–28. PMID: 11125040
29. Sigrist CJ, de Castro E, Cerutti L, Cuče BA, Hulo N, Bridge A, et al. (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* 41: D344–347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067> PMID: 23161676
30. de Beer TA, Berka K, Thornton JM, Laskowski RA (2014) PDBsum additions. *Nucleic Acids Res* 42: D292–296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt940> PMID: 24153109
31. Linding R, Russell RB, Neduva V, Gibson TJ (2003) GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res* 31: 3701–3708. PMID: 12824398
32. Dodonova SO, Diestelkoetter-Bachert P, von Appen A, Hagen VJ, Beck R, Beck M, et al. (2015) VESICULAR TRANSPORT. A structure of the COPI coat and the role of coat proteins in membrane vesicle assembly. *Science* 349: 195–198. <https://doi.org/10.1126/science.1261121> PMID: 26160949
33. Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ (2002) Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109: 523–535. PMID: 12086608
34. van Gasteren WF, Berendsen HJC (1987) Groningen molecular simulation (GROMOS) library manual. Groningen, The Netherlands: Biomos.
35. Zhou H, Zhou Y (2002) Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure selection and stability prediction. *Protein Sci* 11: 2714–2726. <https://doi.org/10.1110/ps.0217002> PMID: 12381853

36. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680. PMID: 7984417
37. Singh S, Pandey K, Chattopadhyay R, Yazdani SS, Lynn A, Bharadwaj A, et al. (2001) Biochemical, biophysical, and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* duffy-binding protein. *J Biol Chem* 276: 17111–17116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101531200> PMID: 11279211
38. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, et al. (2003) Structure validation by Calpha geometry, phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* 50: 437–450. <https://doi.org/10.1002/prot.10286> PMID: 12557186
39. Rizzo G, Forti K, Serroni A, Cagiola M, Baglivo S, Scoccia E, et al. (2016) Single N-glycosylation site of bovine leukemia virus SU is involved in conformation and viral escape. *Vet Microbiol* 197: 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.024> PMID: 27938679
40. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY (2003) Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19: 1105–1113. <https://doi.org/10.1089/088922203771881202> PMID: 14709247
41. Olaya N, Corredor A, Gutierrez MF (2016) Bovine leukemia: zoonosis associated with breast cancer in humans? *Journal of medical and surgical pathology* 1: 2–4.
42. Olaya-Galan NN, Corredor-Figueroa AP, Guzman-Garzon TC, Rios-Hernandez KS, Salas-Cardenas SP, Patarroyo MA, et al. (2017) Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and rawbeef for human consumption. *Epidemiol Infect* 145: 3125–3130. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002229> PMID: 28956522
43. de Brogniez A, Mast J, Willem sL (2016) Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis. *Viruses* 8: 88. <https://doi.org/10.3390/v8040088> PMID: 27023592
44. Buehring GC, Kramme PM, Schultz RD (1994) Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Lab Invest* 71: 359–365. PMID: 7933986
45. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR (1997) The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1925–1930. PMID: 9050881
46. Manel N, Battini JL, Taylor N, Sitbon M (2005) HTLV-1 tropism and envelope receptor. *Oncogene* 24: 6016–6025. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208972> PMID: 16155608

Interpretive Summary: Bovine leukaemia virus genotype in fresh milk and raw beef for human consumption, Corredor-Figueroa. Bovine Leukaemia Virus (BLV) is part of the five most important infectious agents in cattle. BLV worldwide prevalence was reported to be between 0-90%. Recently, in Colombia was reported a seroprevalence of 42.7% in which most of the animals remain asymptomatic and could be a source of dissemination of the virus through cattle-derived food products, with a risk of reaching humans as a zoonotic infection.

Abbreviated title: SHORT COMMUNICATION: Phylogenetic analysis of BLV in food products derived from cattle

Short communication: Bovine leukaemia virus genotype in fresh milk and raw beef for human consumption

Adriana Patricia Corredor-Figueroa *, Nury Nathalia Olaya-Galán*†, Juan Sebastián Quintero*, Sandra Patricia Salas-Cárdenas*, Nathalia Alarcón*, Karina Salvatierra‡, María Fernanda Gutiérrez*¹

* Microbiology Department, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 40 – 62, Ed 50. Bogotá D.C., Bogotá, Colombia

† PhD Programme in Biomedical and Biological Sciences, Universidad del Rosario, Carrera 24 #63C-69 Bogotá, Colombia

‡ Faculty of Exact Chemical and Natural Sciences, Universidad Nacional de Misiones, Felix de Azara 1552, N3300LQH, Posadas, Argentina

Both authors made an equal contribution

¹Corresponding author: mfgutierr@javeriana.edu.co, +573102707567. Microbiology Department. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No. 40 – 62, Ed 50. Bogotá D.C., Colombia.

Abstract

Bovine Leukaemia Virus (BLV) is the causative agent of enzootic bovine leucosis (EBL), a slow, progressive and asymptomatic disease affecting cattle. Evidence of BLV in humans has also been reported, and was recently associated as a potential risk factor for breast cancer development. Previous work in our research group found BLV in raw meat and fresh milk with the hypothesis that BLV could be transmitted to humans by the consumption of these food products. However, there is no evidence if the virus that could be found in the food products is the same as the isolates obtained from bloodstream in cattle. In the current study, proviral DNA was extracted from 50 milk and 50 meat samples, in which segments of three viral genes were detected (*gag*, *env* and *tax*). At all, 24 samples of meat as well as milk were positive to BLV by the diagnosis test directed to *gag* region. Afterwards, five positive milk and three positive meat samples were randomly selected for sequence analysis and phylogenetic reconstruction with the other two genes. Considering *env* region for genotyping, it was found that all of the samples were grouped into genotype 1; being one of the most frequent genotypes all around the world. This is the first study directed to the molecular characterization of the virus in food products.

Key words: Zoonosis; bovine leukaemia virus genotype; milk; beef.

Short communication

Viral diseases in cattle represent a major cause of health-related problems associated with global economic losses in the livestock industry (Gutiérrez et al., 2014; Tsutsui et al., 2016). Bovine Leukaemia Virus (BLV) is one of the five most important viral agents in livestock, causing asymptomatic disease in 70% of infected animals, persistent lymphocytosis in 30% of them and leukaemia in another 5% (Gutiérrez et al., 2014; Lee et al., 2016). The BLV belongs to the *Retroviridae* family, genus Deltaretrovirus, along with the Human T-cell Lymphotropic Virus (HTLV) and Simian T-lymphotropic Virus (STLV) (Licursi et al., 2003). BLV genome is composed of 8,714 nucleotides, distributed into 8 ORFs, including the *gag*, *env* and *pol* regions which code for both structural and non-structural proteins; and a *pX* region which encodes for auxiliary proteins involved in the regulation of the viral cycle and in the induction of leukaemia (Panei et al., 2013; Barez et

al., 2015). Nowadays, ten circulating genotypes have been described worldwide, which have been determined by variations in the sequence of the *env* gene which encodes the gp51 protein, thereby showing the virus' worldwide diversity. Even if there is not a direct relationship between viral genotypes, pathogenicity and geographical distribution, genotypes 1 and 4 have been reported all around the world while other genotypes such as 5, 6 and 9 seem to more localised. In addition, some specific mutations have been found in cattle isolates in other genomic regions different than *env*, through complete genome sequencing. They are reported particularly in South America (Lee et al., 2015; Lee et al., 2016).

BLV prevalence in cattle worldwide ranges from 1% to 80% (Lee et al., 2016; Polat et al., 2017; Tsutsui et al., 2016). In some regions as North Europe, BLV has been eradicated with efficient prevention and control strategies (Acaite et al., 2007; Lee et al., 2016; Maresca et al., 2015; Nuotio et al., 2003; Tsutsui et al., 2016). However, in other regions as South America high prevalence rates are still reported (Polat et al., 2016). A recent study in Colombia reported 42.7% seroprevalence (Ortiz et al., 2016), meaning that the same amount of animals might be allowing the virus to become dispersed through meat or dairy products.

In a previous study, it was shown the presence of proviral DNA of the BLV in meat and milk products with a 50% of BLV positive samples, what is similar with the prevalence in Colombia, suggesting that through these products, the virus could be circulating both in the animals and end-point products as a possible pathway of transmission to humans (Olaya-Galán et al., 2017). In spite of such findings, it is not clear whether the proviral DNA found as a biomarker of the viral presence in these samples, could be associated with infectious viral particles present on meat and milk products. In addition, there is no evidence about the viral divergence happening in milk neither beef, thus, this study was aimed to seek for specific mutations that could be occurring in these types of samples compared with bloodstream isolates, and to identify the BLV genotype circulating in ready-to-consume fresh milk as well as in raw meat products.

In order to develop the objective of this study, convenience sampling was done to obtain 50 samples of milk and 50 samples of beef obtained from nursing cows on farms nearby Bogotá and from grocery stores respectively. Samples were transported in a refrigerated container to the Virology Lab at the Javeriana University and nucleic acids extraction was done with High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) following the instructions of the manufacturer. PCRs for this study were done with PCR Master from Roche ® following the manufacturer's instructions and adjusting the conditions of annealing of the primers per each gene. A initial PCR directed to the bovine GAPDH was used as an indicator of DNA quality for the assays. Subsequent proviral DNA was detected by nested PCR targeting a region of the *gag* of the virus as a diagnosis test, for being one of the most highly conserved regions of the virus.

Positive samples obtained for the *gag* region, were selected for amplifying the other viral genes (*tax* and *env*), in order to find the genotype in the food products as well as mutations in the *tax* region that might have an impact on the progression of the viral cycle. Primers used in the current study were previously published by Buehring *et. al.* (Buehring et al., 2014). Conditions for the nested PCRs were slightly adjusted and could be seen in table 1. PCR products were visualised on 1.5% agarose gels stained with HydraGreen, and using a 100 bp DNA ladder (BioLine) to compare the obtained products. Proviral DNA obtained from a blood sample of a BLV seropositive cow was used as positive control. For the negative controls, it was used DNA obtained from a blood sample of a seropositive cow, and as an internal control of the PCR showing non cross-contamination of the reagents, RNase- and DNase-free water was used. Some of the PCR products of the positive samples (randomly selected) were purified with a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) and sent for sequencing to Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

Table1. Primers used for amplifying the gene segments of the BLV

Análisis del potencial zoonótico del VLB

Region		Primer sequence 5'- 3' (forward and reverse)	Product obtained (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>gag</i>	Outer	AACACTACGACTTGCAATCC	385	59.3
		GGTTCCTTAGGACTCCGTCG		
	Inner	ACCCTACTCCGGCTGACCTA	272	57.3
		CTTGGACGATGGTGGACCAA		
<i>tax</i>	Outer	CTTCGGGATCCATTACCTGA	373	56.5
		GCTCGAAGGGGGAAAGTGAA		
	Inner	GGCCCCACTCTCTACATGC	206	57
		AGACATGCAGTCGAGGGAAC		
<i>env</i>	Outer	TGATTGCGAGCCCCGATG	264	56
		TCTGACAGAGGGAACCCAGT		
	Inner	TGATTGCGAGCCCCGATG	230	60
		GGAAAGTCGGGTTGAGGG		

The Staden computer software package (<http://staden.sourceforge.net/>) was used for editing the sequences; the ClustalW algorithm was used for nucleotide alignment and the Mega 7 integrated tool was used for multiple alignments. The foregoing work was performed with 10 reference sequences which were representative of known BLV genotypes which were obtained from 29 sequences from the GenBank. Accession numbers of the reference sequences are found in both figures. BLV genotype of the food products was determined using the *env* region and through the distribution within phylogenetic clusters when analysed with reported sequences of BLV. Sequences for genotypes 1-10 were chosen to represent BLV diversity.

Maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees were reconstructed using the partial *env* gene sequence with the online PhyML (3.0) platform (<http://www.atcg-montpellier.fr/phyml>). The best-fitting nucleotide substitution model (general time-reversible + gamma distribution amongst the sites) was estimated using Model Test integrated in MEGA 7.

Branch reliability was evaluated by an approximate likelihood-ratio test (Chi-squared statistic-based) with a 0.9 interior branch cut-off value (Tamura et al., 2011 ; Posada, 1998).

BLV complete genome reference sequences were selected from the GenBank (NCBI) for *gag* and *tax* phylogenetic analysis. The data set for *gag* region was constructed using sequences obtained in this study compared with previously reported sequences, considering a segment of 273 bp within the p24 coding region; and for the *tax* region a segment of 207 bp was included. The Mega7 tool was used for selecting the best nucleotide evolutionary model for this data set, resulting in a general time reversible (GTR) model with gamma (G) and proportion of invariant sites (I) distribution for *tax* and GTR with G distribution for *gag*, based on Akaike information criterion (AIC) as an indicator of statistical model quality.

Phylogenetic trees were also reconstructed with ML approach, considering gaps in the analysis and with a bootstrap of 100 pseudo-replicates method for each node as a measure of robustness. Once the phylogenetic trees were obtained, they were edited using FigTree v1.4.1 software available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Forty-eight out of the 100 samples including both milk and meat were positive to BLV by the diagnosis test of the *gag* region. For the *env* region, eight sequences (5 isolated from milk samples and 3 from meat) were aligned with sequences available in the GenBank and was found that the food-products BLV isolates were all grouped within the cluster of genotype 1, with a bootstrap value of 84% defining the genotypes (Figure 1).

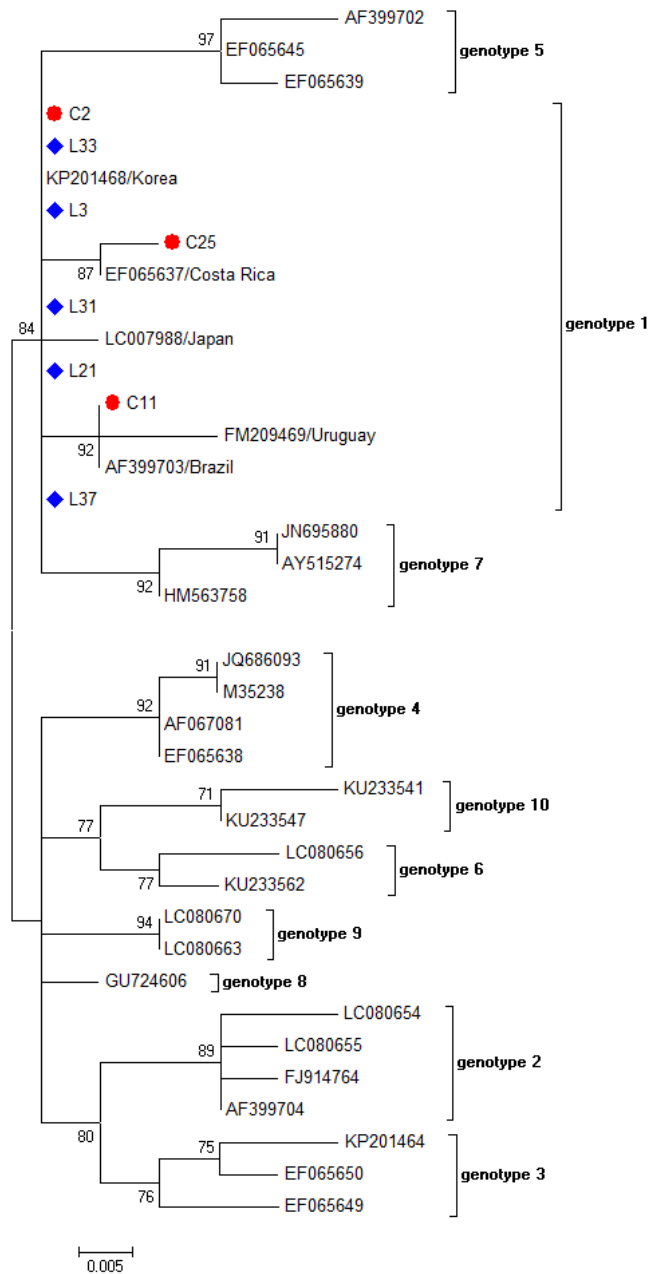


Figure 1. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree constructed based on BLV *env* gene fragment sequences. Previously reported nucleotide sequences for the 10 genotypes were included (labelled with GenBank code). Eight Colombian sequences obtained from milk and beef products were included (labelled L and C). Blue labelling represents milk samples; red labelling represents beef samples. Low bar indicates evolutionary distance.

Análisis del potencial zoonótico del VLB

Some samples were selected for *gag* and *tax* regions for genomic variation analysis. Specific substitutions were found in both genes compared with the FLK reference sequence (Accession number EF600696). For the *gag* region, a substitution in the position 561 of an adenine (A) for a thymine (T) was detected and in the *tax* region, a substitution in the position 2499 of a guanine (G) for an adenine (A) was found in almost all of the analysed samples (12/16) (data not shown). In figure 2 is shown the phylogenetic trees obtained for *gag* and *tax* regions.

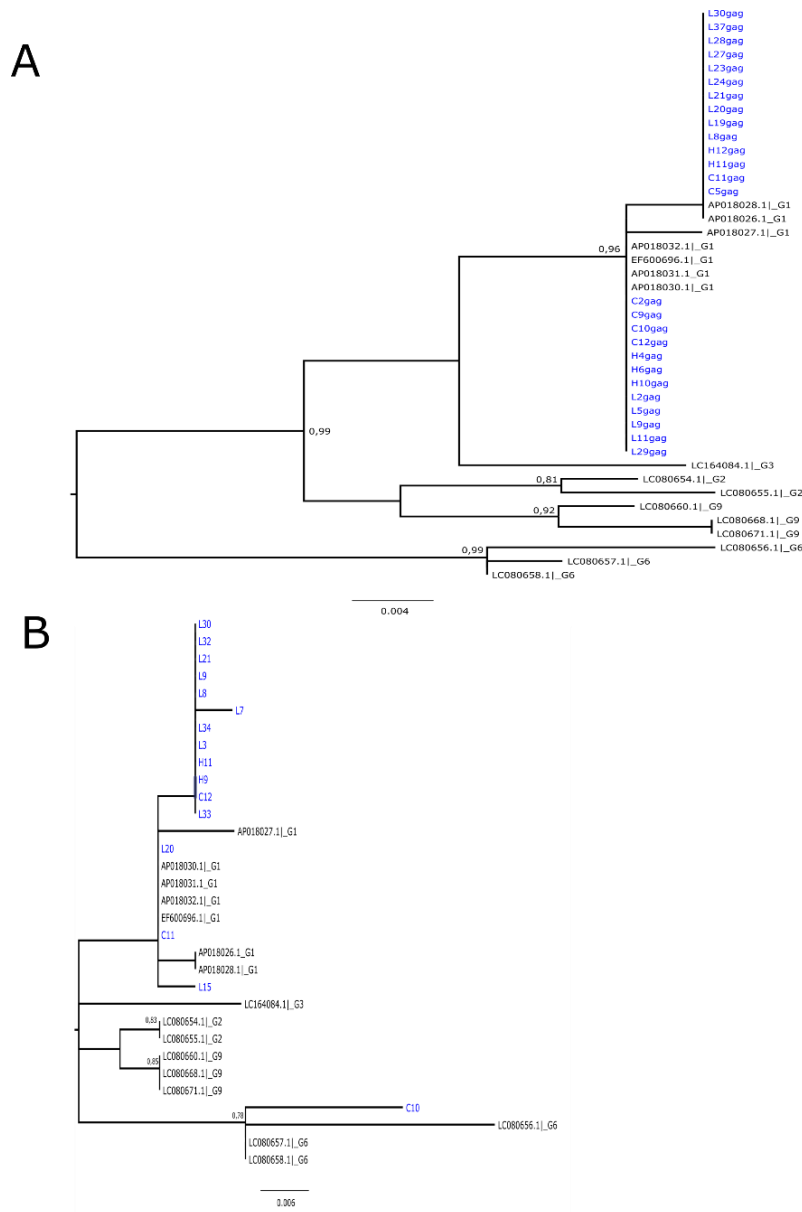


Figure 2: Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees based on partial BLV *gag* (A) and *tax* (B) genes. Evolutionary history was inferred by using the ML method based on the GTR model. For *gag* gene, analysis involved 42 nucleotide sequences whilst for *tax* gene analysis involved 32 nucleotide sequences. 273 positions in the final dataset for *gag* gene and 207 positions for the *tax* gene. The Colombian sequences obtained from milk and beef products were included, shown in the trees as L for milk and C for beef, labelled in blue colour. Low bar indicates evolutionary distance.

BLV has been widely reported in cattle's B-lymphocytes as well as in milk and colostrum of cows since its transmission to calves by nursing has been already reported (Ferrer, Kenyon, & Gupta, 1981). Recently, it was reported the presence of the *gag* gene in ready-to-eat cuts of meat sold in grocery stores as well as in milk selected for human consumption suggesting a possible pathway of transmission of BLV to humans (Olaya-Galán et al., 2017). The importance of seeking for BLV within the human interface has arisen after the proposal of being linked with breast cancer (Buehring et al., 2017; Buehring et al., 2015; Gillet and Willems, 2016; Martinez Cuesta et al., 2018), identifying the circulating genotype and specific mutations in the food products deepens the knowledge of the current status of BLV in Colombia and will be useful in future prevention and control strategies such as vaccines design or eradication programs. Even if the current evidence of BLV linked with breast cancer is not conclusive, a good question to be solved is which is the role of a retrovirus with oncogenic potential, that besides might come from cattle, is found on breast tissues of humans (Barez et al., 2015; Buehring et al., 2017; Buehring et al., 2015; Mesa et al., 2013; Olaya-Galán et al., 2017); it could not be discarded the possibility of having an impact in the transformation process due to the mechanisms of the viral particle itself such as the effect of Tax protein in the inhibition of DNA repair and accumulation of mutations in the host genome.

Furthermore, some other questions remain unsolved about the BLV dissemination process. One of them, is if it is possible to find infective viral particles in the cattle more than in the bloodstream. Given the high phylogenetic similarity between milk and meat samples found in this study compared with previously reported sequences obtained from blood isolates, it

could be said that the proviral DNA could also be co-circulating in other tissues/fluids more than the blood. Thus, considering that milk usually contains 70% of mammary epithelial cells, 22% polymorphonuclear cells and 8% lymphocytes (Bradley and Green, 2004), both the mammary epithelial cells (Buehring et al., 2014) and the lymphocytes could be a source of proviral BLV in the milk. Also, evidence of BLV in exosomes released to the milk having infectious particles has been reported (Yamada et al., 2013). Likewise, beef samples have large amount of blood cells, including lymphocytes, what could explain the viral presence in these samples.

In this study, the *gag* gene was selected as a diagnostic test, *env* was used for genotype identification and *tax* (together with *gag* and *env*) for providing information about genome variability and the changes these gene segments might have in the milk and meat samples. Only one non-synonymous mutation was found when sequencing the *gag* 273 bp fragment, representing a high nucleotide identity regarding the FLK reference strain (data not shown). The *tax* gene was included in this study because it encodes the Tax protein which acts as transactivator and modulator protein for other genes' expression (Gutiérrez et al., 2014; Barez et al., 2015). It also cooperates with the Ha-ras oncogene to induce transformation in rat embryonic cells and has been found in cell transformation since its expression generates instability in the genome by reducing the ability to repair damage occurring in the DNA, inducing long term mutations. Variations in this gene's nucleotides or segment may thus provide evidence of virulence and a relationship with cancer (Inoue et al., 2013; Panei et al., 2013). An amplified 207 bp *tax* sequence was used in this work, which gave similar results to the *gag* region, where only a single nucleotide variation was observed. These transversions found in *gag* and *tax* segments could be considered as synonymous mutations which would not have affected the resulting proteins.

Studying the viral genotypes of a virus found in a particular population of interest is an important strategy for advancing in the preventative proposals directed to the identification of circulating strains in a specific geographical regions and genome stability of the virus, showing the level of adaptation to the environment and trying to find a relationship with viral virulence (Zhao and Buehring, 2007). Ten genotypes have been reported to date for

BLV (Polat et al., 2017); even the first seven are the commonest worldwide, genotype 1 has been seen as the predominant genotype. In this study, only genotype 1 was found on the food products in concordance with previous reports found in cattle bloodstream all around the world (Lee et al., 2016).

The analysis made in this paper supports the on-going hypothesis of the zoonotic potential of BLV by the evidence of molecular biomarkers as a presence of the DNA viral in these products, however, further studies are needed focused in the identification of circulating strains in humans in order to tell if the same viral agents could be co-circulating in the animals, food products and humans, what all of them makes the human/animal interface for exposure to a zoonotic agent (Wang and Crameri, 2014). Two questions must be answered regarding why this virus could be found in epithelial cells: 1) which receptor is shared by cattle lymphocytes and human epithelial cells so that the virus can enter both types of cell?, recently it has been suggested that AP3D1 protein could be involved in the viral cycle penetration of both (Corredor et al., 2018) 2) which is the pathway of entrance into humans? If the virus is in milk and beef and then in the human breast, then it could have been ingested. However, there is no clarity regarding how it resists changes in pH during its passage through the stomach and intestine and neither how it finally reaches the breast (Zhao and Buehring, 2007; Buehring et al., 2014; Buehring GC et al., 2015). It thus remains to be demonstrated phylogenetically that the same virus in cows is the one reaching humans, probably having (undergone) some genomic variations, thereby providing it with greater adaptability.

Acknowledgements

This research was performed as part of a current project financed by Colciencias, Colombia, as part of call 657/2014 for projects. Special acknowledgment to Vecol Institute and FIDIC for partially funding the sequencing process of the paper.

References

Acaite, J., Tamosiunas, V., Lukauskas, K., Milius, J., Pieskus, J., 2007. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Preventive veterinary medicine* 82, 83-89.

- Barez, P.Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutierrez, G., Hamaidia, M., Jacques, J.R., Perike, S., Neelature Sriramareddy, S., Renotte, N., Staumont, B., Reichert, M., Trono, K., Willems, L., 2015. Recent Advances in BLV Research. *Viruses* 7, 6080-6088.
- Buehring, G.C., Shen, H., Schwartz, D.A., Lawson, J.S., 2017. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PloS one* 12, e0179367.
- Buehring, G.C., Shen, H.M., Jensen, H.M., Choi, K.Y., Sun, D., Nuovo, G., 2014. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerging infectious diseases* 20, 772-782.
- Buehring, G.C., Shen, H.M., Jensen, H.M., Jin, D.L., Hudes, M., Block, G., 2015. Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. *PloS one* 10, e0134304.
- Gillet, N.A., Willems, L., 2016. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology* 13, 75.
- Lee, E., Kim, E.J., Joung, H.K., Kim, B.H., Song, J.Y., Cho, I.S., Lee, K.K., Shin, Y.K., 2015. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates. *Virology journal* 12, 64.
- Lee, G.H., Tan, B.H., Teo, E.C., Lim, S.G., Dan, Y.Y., Wee, A., Aw, P.P., Zhu, Y., Hibberd, M.L., Tan, C.K., Purdy, M.A., Teo, C.G., 2016. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* 150, 355-357.e353.
- Maresca, C., Costarelli, S., Dettori, A., Felici, A., Iscaro, C., Feliziani, F., 2015. Enzootic bovine leukosis: report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005-2012). *Preventive veterinary medicine* 119, 222-226.
- Martinez Cuesta, L., Lendez, P.A., Nieto Farias, M.V., Dolcini, G.L., Ceriani, M.C., 2018. Can Bovine Leukemia Virus Be Related to Human Breast Cancer? A Review of the Evidence. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 23, 101-107.
- Mesa, G., Ulloa, J., Uribe, A., Gutierrez, M., 2013. Bovine Leukemia Virus (blv) gene segment detected in human breast tissue. *Open Journal of Medical Microbiology* 3, 84-90
- Nuotio, L., Rusanen, H., Sihvonon, L., Neuvonen, E., 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Preventive veterinary medicine* 59, 43-49.
- Olaya-Galán, N., Corredor-Figueroa, A., Guzmán-Garzón, T., Ríos-Hernandez, K., Salas-Cárdenas, S., Patarroyo, M., Gutierrez, M., 2017 Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. *Epidemiol. Infect.* 1-6.
- Polat, M., Takeshima, S., Aida, Y., 2017. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology Journal* 14, 209.
- Polat, M., Takeshima, S.N., Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., Arainga, M., Murakami, T., Matsumoto, Y., de la Barra Diaz, V., Panei, C.J., Gonzalez, E.T., Kanemaki, M., Onuma, M., Giovambattista, G., Aida, Y., 2016. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology* 13, 4.
- Tsutsui, T., Kobayashi, S., Hayama, Y., Yamamoto, T., 2016. Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis. *Preventive veterinary medicine* 124, 96-101.
- Wang, L.F., Crameri, G., 2014. Emerging zoonotic viral diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 33, 569-581.

3.3 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Identificar infecciones zoonóticas nuevas constituye un reto permanente dada la cantidad de agentes infecciosos que existen, la cantidad de evidencia que debe ser entregada y los aportes de investigadores que participan para que sus conclusiones apoyen la hipótesis. Desde el inicio de este proyecto se tenía clara la presencia del VLB en tejido mamario humano y fue esa la motivación para estudiar al bovino y tratar de determinar qué papel cumplía en la enfermedad, suponiendo además una zoonosis que era interesante caracterizar. Con los resultados obtenidos a través de este proyecto se logra abordar con hallazgos científicos el potencial zoonótico del VLB, desde 4 de las 9 características con las cuales definimos a la zoonosis: 1. La prevalencia del VLB en la vaca, 3. Las posibles vías de transmisión, 7. La susceptibilidad relacionada con la presencia de receptores compartidos, 8. La evaluación filogenética para demostrar que es el mismo virus en la vaca y el del humano.

Para algunas de las otras características descritas, si bien no hay evidencia científica, si hay una discusión con evidencias indirectas que permite apoyar la hipótesis. Por esto, con la discusión que se presenta a continuación refuerza las cuatro características de las que se tiene evidencia de que el VLB es un virus zoonótico y se entregan evidencias indirectas de las otras cinco características.

Característica 1: Prevalencia del virus en la población: En el segundo capítulo de este trabajo, se reportó la prevalencia de VLB en vacas colombianas del 62% por animal. Ahora bien, ya se ha mencionado que esta característica no implica una zoonosis, sin embargo hay que resaltar que esta es una de las más altas prevalencias de VLB en Suramérica (M Polat

et al., 2017), lo que implica que este mismo número de animales con escasas medidas de control, podría estar diseminando el virus a vacas sanas o al humano consumidor de sus productos, como carne y leche, de manera que el riesgo de transmisión al humano estaría dado en la misma medida. Por otra parte, se esperaría que la prevalencia en VLB en vacas sea más alta que la prevalencia en el humano. En el año 2003 la Dra Buerhing reportó un estudio de seroprevalencia de 74% en 257 humanos (G. Buehring, Philpott, & Yeon Choi, 2003). Lo cual es mayor a lo reportado por nuestro grupo en ganado, sin embargo, en un corto tiempo se tendrá el dato exacto de prevalencia en tejido de seno humano, pudiendo con este dato demostrar que las vacas como hospederos naturales tienen mayor prevalencia de VLB que las mujeres colombianas. Situación similar fue reportada para HEV en cerdos y personas en una región colombiana, cuya seroprevalencia encontrada en los animales fue drásticamente más alta que en los humanos (Bentancur et al., 2008; Gutierrez et al., 2014).

Con respecto a los genotipos, en este trabajo se reportó la presencia del G1 y el G6, que sumado al aporte de López de G3 se esperaría que en el humano se encuentren los mismos genotipos y en las mismas proporciones.

Característica 3, ruta de transmisión: En este trabajo se encontró la presencia de 3 segmentos génicos del VLB en productos de consumo. Previamente se ha reportado que el VLB puede ser transmitido de la vaca infectada a sus becerros a través de calostro o leche (Ferrer, Kenyon, & Gupta, 1981), de modo que dicho evento también podría darse a los humanos consumidores de estos alimentos. Sumado a los antecedentes de lo que ocurre con VIH o HTLV, otros retrovirus en los que se conoce que las madres pueden transmitir a sus bebés el virus a través de la leche (Ikeda et al., 1989; Orloff, Wallingford, & McDougal, 1993). El origen del HTLV y del HIV son los primates no humanos, de tal forma que vale

la pena la atención en el estudio de otros retrovirus como el VLB por el riesgo zoonótico que estos representan (Gao et al., 1999; Van Dooren, Salemi, & Vandamme, 2001).

Por este motivo, considerando que la demanda de alimentos para humanos incrementa, y que en su mayoría estos son de origen animal como fuente de proteína, es pertinente mencionar la iniciativa de la OPS en el año 2003 “Contribuir al bienestar de los humanos a través de la producción y el suministro de proteínas de origen animal en cantidades suficientes y garantizar la inocuidad y calidad de los alimentos; evitar el impacto nocivo de las enfermedades comunes al hombre y los animales; preservar el ambiente del efecto de la tenencia de animales y de la industrialización de la producción animal; y contribuir a la solución de problemas de salud a través del desarrollo de modelos animales que faciliten las investigaciones biomédicas, así como la conservación de especies de animales domésticos y de vida libre para su uso sostenido” (OPS, 2003). De modo que todos los entes involucrados como lo son la academia, el gobierno y la industria, están obligados a velar por la salud y la integridad de los animales y de los humanos ante la posibilidad de una zoonosis, que hasta este punto estaría respaldada por el virus que aparece en la leche y carne cruda de vacas que resultan ser positivas para VLB, productos de consumo que pueden estar actuando como vía de transmisión viral a humanos.

Característica 7, presencia de receptores comunes entre el ganado bovino y el humano: Con este trabajo se aportaron evidencias *in silico* e *in vitro*, que el receptor celular involucrado en la adherencia viral es AP3D1 en vacas, así mismo la posibilidad plausible de que la misma proteína del humano este cumpliendo la misma función y permitiendo que el VLB pueda infectar esta especie. Un ejemplo de esto, fue reportado en el virus MERS-CoV, un coronavirus zoonótico emergente, que necesita dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4) para su

adhesión, cuyos análisis revelaron similitud entre la dipeptidilpeptidasa-4 humana y equina, lo que indica la posible susceptibilidad de los caballos a este nuevo virus (Barlan et al., 2014; Bosch, Raj, & Haagmans, 2013; Mohd, Al-Tawfiq, & Memish, 2016).

Estudios adicionales deberán enfocarse a evaluar la promoción de la infección y la replicación en cada sistema, el bovino y el humano, incluso analizar si hay participación de otros receptores tal como se propuso con el virus de la Rabia (Lentz et al., 1982; Tsiang et al., 1983; Tuffereau et al., 1998), los adenovirus (Nemerow, 2000) o en VIH que requiere la participación de correceptores como las moléculas CCR4 y CCR5 entre otros (Berger, Murphy, & Farber, 1999) (Lafom, 2000; Thoullouse, 2000).

Característica 8: Análisis filogenético de las cepas: Clasificar genéticamente los aislados y compararlos con cepas de otros lugares del mundo es uno de los primeros requisitos para responder ante la hipótesis de que un virus es zoonótico. En este trabajo se realizó un análisis filogenético con las secuencias provenientes del virus circulante en la vaca y del virus en los productos de consumo como los son leche y carne cruda. Un ejemplo reciente de esta situación es la del HEV, donde uno de los casos de infección zoonótica se confirmó por análisis filogenéticos del virus aislado de humanos que habían consumido carne de ciervo cruda. Así mismo miembros de una familia que habían consumido dicho alimento tuvieron diagnóstico de Hepatitis, ellos habían sido negativos para anticuerpos contra hepatitis A, B y C, pero más adelante se verificó que eran positivos para anticuerpos anti HEV. Posteriormente la historia clínica reveló que los miembros de esa familia habían consumido carne cruda de ciervos cazados en Japón en repetidas ocasiones. La carne sobrante había sido congelada y se logró recuperar el ARN viral, del que posteriormente se amplificó un segmento de 326 pb del ORF1 y se demostró una identidad del 99.7 y 100%

con el virus circulante en los miembros de dicha familia. Al compararlo con otras secuencias nucleotídicas de HEV reportadas en las bases de datos, se pudo concluir que pertenecían al genotipo 3, proporcionando así una evidencia directa de una zoonosis. Desde entonces existe diversidad de reportes que dan cuenta de la relación filogenética del virus aislado del producto de consumo y del virus circulante en el humano (Li et al., 2005; Renou, Roque-Afonso, & Pavio, 2014; Takahashi, Kitajima, Abe, & Mishiro, 2004; Tei et al., 2003)

Ahora bien, para el caso de las secuencias nucleotídicas de VLB provenientes de humanos, hasta este momento no están disponibles, por lo cual no hay evidencia que confirme la existencia de un virus zoonótico. Situación contraria ocurrió con HEVs, donde solo hasta los años 90 hubo disponibilidad de secuencias provenientes de animales, lo que no implicaba que la zoonosis no hubiera ocurrido antes.

Las cinco características de las cuales se tienen evidencias indirectas son:

2. Liberación: Como los demás retrovirus, el VLB realiza ciclos líticos y lisogénicos confirmando la infección lenta. La presencia de virus en leches y en carnes cruda de consumo muestra una gran excreción viral lo cual no descarta la permanencia del virus en ganglios linfáticos como se ha reportado respecto al ciclo del VLB. Esto demuestra que el virus se está liberando en buena cantidad para pasar a otra célula que tenga receptores para continuar su ciclo.

4. Identificación de hospederos y vectores: Para VLB se sabe que el hospedero natural es el ganado bovino (Burny et al., 1985). También se ha informado recientemente que el VLB está presente en las células epiteliales de las glándulas mamarias de las mujeres con cáncer

de mama, sugiriendo una relación. En general, en este trabajo se ha estudiado el VLB desde tres de sus genes, el hospedero que es la vaca y el medio de transmisión que podría involucrar la leche o la carne cruda, donde también se encuentra el virus presente. Por último, está el hombre que actuaría como hospedero accidental y para el que falta presentar las pruebas de su presencia allí, ya hay evidencias bibliográficas que lo muestran con este tipo de patologías (G. C. Buehring et al., 2014; G. C. Buehring et al., 2015; Mesa et al., 2013; Ochoa-Cruz et al., 2006).

5. Conocer el ambiente que favorezca la transmisión del patógeno: Previamente se ha discutido que la carne y la leche cruda podrían ser la vía de transmisión del VLB al humano. Sin embargo, no está claro como el VLB que entraría por ingesta no es degradado por proteínas salivares, tal como si ocurre en VIH-1 o en Influenza A, donde la proteína conocida como aglutinina salival (gp340) (Wu, Golub, Abrams, & Malamud, 2004) tiene una actividad antiviral sobre estos agentes, inhibiendo a gp120 en VIH1 o a la hemaglutinina en Influenza A (White et al., 2005; Wu et al., 2003). Por lo que no es descartable que lo mismo suceda con VLB sobre gp51. También queda sin resolver cómo llega el VLB a tejido mamario humano, cómo logra pasar el pH del estómago e intestino y cómo atraviesa la pared intestinal para llegar a tejido mamario.

6. Carga viral necesaria para lograr una infección: Un estudio de Marcela A. Juliarena y cols, demostró que vacas VLB+ con bajas cargas virales no lograron infectar vacas sanas (Juliarena, Barrios, Ceriani, & Esteban, 2016), por lo que, si esta situación ocurre en el hospedero natural que es la vaca, es posible que para que el humano la infección requiera una concentración viral importante. Una situación similar fue evidenciada en un caso de

zoonosis de HEV, cuyas personas infectadas fueron las que habían consumido mayor cantidad y en repetidas ocasiones carne infectada con el virus (Tei et al., 2003).

9. Presencia de una enfermedad definida: El VLB se caracteriza por ser de infección lenta, por tener baja tasa de replicación, lo cual le permite no producir una sintomatología clínica aparente y escapar de la respuesta inmune. Evidencia de esta situación es que solo del 5 al 10% de las vacas infectadas con VLB, llegan a desarrollar leucemias o linfosarcomas (Aida et al., 2013). Ahora bien, en el humano no se sabe ni en qué momento ingresó el virus ni la enfermedad que este causando, a pesar de que algunos autores lo han asociado con cáncer de seno (G. C. Buehring et al., 2014; G. C. Buehring et al., 2015; N. A. Gillet & Willems, 2016; Mesa et al., 2013; Ochoa-Cruz et al., 2006; Zhang et al., 2016).

Si bien existen varias definiciones para la palabra zoonosis, incluir para su definición 9 características permite tener evidencia suficiente para confirmar que en realidad el agente cumple con las condiciones necesarias. Para el caso del VLB hay evidencia casi completa para afirmarlo sin embargo aún faltan por analizar los datos correspondientes a la parte humana de este proyecto y con ellos ya se podrán completar las condiciones que hacen falta. Los datos que se entregaron en este documento atraviesan el estado del arte y aportan nuevo conocimiento de gran importancia para la sanidad animal.

4 REFERENCIAS

- Ababneh, M. M., Al-Rukibat, R. K., Hananeh, W. M., Nasar, A. T., & Al-Zghoul, M. B. (2012). Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan. *Arch Virol*, *157*(12), 2343-2348. doi:10.1007/s00705-012-1447-z
- Acaite, J., Tamosiunas, V., Lukauskas, K., Milius, J., & Pieskus, J. (2007). The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev Vet Med*, *82*(1-2), 83-89. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.05.010
- Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M., & Takeshima, S. N. (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol*, *4*, 328. doi:10.3389/fmicb.2013.00328
- Alfonso, R., Almansa, J. E., & Barrera, J. C. (1998). [Serological prevalence and evaluation of the risk factors of bovine enzootic leukosis in the Bogotá savannah and the Ubaté and Chiquinquirá Valleys, Colombia]. *Rev Sci Tech*, *17*(3), 723-732.
- Altanerova, V., Ban, J., Kettmann, R., & Altaner, C. (1990). Induction of leukemia in chicken by bovine leukemia virus due to insertional mutagenesis. *Arch Geschwulstforsch*, *60*(2), 89-96.
- Amills, M., Ramiya, V., Norimine, J., Olmstead, C. A., & Lewin, H. A. (2002). Reduced IL-2 and IL-4 mRNA expression in CD4+ T cells from bovine leukemia virus-infected cows with persistent lymphocytosis. *Virology*, *304*(1), 1-9.
- Anthony, S. J., Epstein, J. H., Murray, K. A., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, C. M., Solovyov, A., . . . Lipkin, W. I. (2013). A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *MBio*, *4*(5), e00598-00513. doi:10.1128/mBio.00598-13
- Asfaw, Y., Tsuduku, S., Konishi, M., Murakami, K., Tsuboi, T., Wu, D., & Sentsui, H. (2005). Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch Virol*, *150*(3), 493-505. doi:10.1007/s00705-004-0433-5
- Balic, D., Lojkic, I., Periskic, M., Bedekovic, T., Jungic, A., Lemo, N., . . . Madic, J. (2012). Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. *Arch Virol*, *157*(7), 1281-1290. doi:10.1007/s00705-012-1300-4
- Ban, J., Portetelle, D., Altaner, C., Horion, B., Milan, D., Krchnak, V., . . . Kettmann, R. (1993). Isolation and characterization of a 2.3-kilobase-pair cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus cell receptor. *J Virol*, *67*(2), 1050-1057.
- Ban, J., Truong, A. T., Horion, B., Altaner, C., Burny, A., Portetelle, D., & Kettmann, R. (1994). Isolation of the missing 5'-end of the encoding region of the bovine leukemia virus cell receptor gene. *Arch Virol*, *138*(3-4), 379-383.
- Bao, Y., & Cao, X. (2014). The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. *J Autoimmun*, *55*, 10-23. doi:10.1016/j.jaut.2014.04.001
- Barez, P. Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutierrez, G., . . . Willems, L. (2015). Recent Advances in BLV Research. *Viruses*, *7*(11), 6080-6088. doi:10.3390/v7112929
- Barlan, A., Zhao, J., Sarkar, M. K., Li, K., McCray, P. B., Jr., Perlman, S., & Gallagher, T. (2014). Receptor variation and susceptibility to Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol*, *88*(9), 4953-4961. doi:10.1128/jvi.00161-14

- Bartlett, P. C., Sordillo, L. M., Byrem, T. M., Norby, B., Grooms, D. L., Swenson, C. L., . Erskine, R. J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, *244*(8), 914-922. doi:10.2460/javma.244.8.914
- Beranová, K., & Zendulková, D. (2016). [Rabies in bats]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*, *22*(2), 68-74.
- Berger, E. A., Murphy, P. M., & Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, *17*, 657-700. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.657
- Betancur, C., & Rodas, J. (2008). Seroprevalencia del virus de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos en Montería. *Revista MVZ Córdoba*, *13*(1), 1197-1204.
- Boris-Lawrie, K., Altanerová, V., Altaner, C., Kucerová, L., & Temin, H. M. (1997). In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex. *J Virol*, *71*(2), 1514-1520.
- Bosch, B. J., Raj, V. S., & Haagmans, B. L. (2013). Spiking the MERS-coronavirus receptor. *Cell Res*, *23*(9), 1069-1070. doi:10.1038/cr.2013.108
- Brenner, B. G., Ibanescu, R. I., Hardy, I., Stephens, D., Otis, J., Moodie, E., . . . Wainberg, M. A. (2017). Large cluster outbreaks sustain the HIV epidemic among MSM in Quebec. *Aids*, *31*(5), 707-717. doi:10.1097/qad.0000000000001383
- Buehring, G., Philpott, S., & Yeon Choi, K. (2003). Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia Virus. *AIDS research and human retrovirus*, *19*(12), 1105-1113.
- Buehring, G. C., Shen, H. M., Jensen, H. M., Choi, K. Y., Sun, D., & Nuovo, G. (2014). Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis*, *20*(5), 772-782. doi:10.3201/eid2005.131298
- Buehring, G. C., Shen, H. M., Jensen, H. M., Jin, D. L., Hudes, M., & Block, G. (2015). Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. *PLoS One*, *10*(9), e0134304. doi:10.1371/journal.pone.0134304
- Burny, A., Bex, F., Chantrenne, H., Cleuter, Y., Dekegel, D., Ghysdael, J., . . . Portatelle, D. (1978). Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv Cancer Res*, *28*, 251-311.
- Burny, A., Bruck, C., Cleuter, Y., Couez, D., Deschamps, J., Gregoire, D., . . . et al. (1985). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Onderstepoort J Vet Res*, *52*(3), 133-144.
- Camargos, M. F., Pereda, A., Stancek, D., Rocha, M. A., dos Reis, J. K., Greiser-Wilke, I., & Leite, R. C. (2007). Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine leukemia virus. *Virus Genes*, *34*(3), 343-350. doi:10.1007/s11262-006-0011-x
- Camargos, M. F., Stancek, D., Rocha, M. A., Lessa, L. M., Reis, J. K., & Leite, R. C. (2002). Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, *49*(7), 325-331.
- Cao, D., & Meng, X. J. (2012). Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg Microbes Infect*, *1*(8), e17. doi:10.1038/emi.2012.7
- CDC, 2014.
- CDC, 2018.
- Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., . . . Gerolami, R. (2010). Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*, *202*(6), 825-834. doi:10.1086/655898
- Coulston, J., Naif, H., Brandon, R., Kumar, S., Khan, S., Daniel, R. C., & Lavin, M. F. (1990). Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J Gen Virol*, *71* (Pt 8), 1737-1746. doi:10.1099/0022-1317-71-8-1737

- Cullen, B. R. (1991). Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *J Virol*, 65(3), 1053-1056.
- D'Angelino, R. H., Pituco, E. M., Villalobos, E. M., Harakava, R., Gregori, F., & Del Fava, C. (2013). Detection of bovine leukemia virus in brains of cattle with a neurological syndrome: pathological and molecular studies. *Biomed Res Int*, 2013, 425646. doi:10.1155/2013/425646
- De Oliveira, C. H., Resende, C. F., Oliveira, C. M., Barbosa, J. D., Fonseca, A. A. J., Leite, R. C., & Reis, J. K. (2016). Absence of Bovine leukemia virus (BLV) infection in buffaloes from Amazon and southeast region in Brazil. *Prev Vet Med*, 129, 9-12. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.05.002
- Della Libera, A. M., de Souza, F. N., Batista, C. F., Santos, B. P., de Azevedo, L. F., Sanchez, E. M., . . . Blagitz, M. G. (2015). Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Vet Res*, 46, 2. doi:10.1186/s13567-014-0125-4
- Derse, D., Caradonna, S. J., & Casey, J. W. (1985). Bovine leukemia virus long terminal repeat: a cell type-specific promoter. *Science*, 227(4684), 317-320.
- Dube, S., Abbott, L., Dube, D. K., Dolcini, G., Gutierrez, S., Ceriani, C., . . . Poesz, B. J. (2009). The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain. *Virology*, 6, 120. doi:10.1186/1743-422x-6-120
- Dube, S., Dolcini, G., Abbott, L., Mehta, S., Dube, D., Gutierrez, S., . . . Poesz, B. (2000). The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology*, 277(2), 379-386. doi:10.1006/viro.2000.0622
- Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Sabo, K. M., & Sordillo, L. M. (2011). Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Vet Med Int*, 2011, 915747. doi:10.4061/2011/915747
- Fechner, H., Blankenstein, P., Looman, A. C., Elwert, J., Geue, L., Albrecht, C., . . . Ebner, D. (1997). Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, 237(2), 261-269. doi:10.1006/viro.1997.8784
- Felmer, R., Munoz, G., Zuniga, J., & Recabal, M. (2005). Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microbiol*, 108(1-2), 39-47. doi:10.1016/j.vetmic.2005.04.005
- Ferrer, J. F., Kenyon, S. J., & Gupta, P. (1981). Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. *Science*, 213(4511), 1014-1016.
- Fukuyama, S., Kodama, K., Hirahara, T., Nakajima, N., Takamura, K., Sasaki, O., & Imanishi, J. (1993). Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J Vet Med Sci*, 55(1), 99-106.
- Fuoco, N. L., Dos Ramos Silva, S., Fernandes, E. R., Luiz, F. G., Ribeiro, O. G., & Katz, I. S. S. (2018). Infection of neuroblastoma cells by rabies virus is modulated by the virus titer. *Antiviral Res*, 149, 89-94. doi:10.1016/j.antiviral.2017.11.003
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., . . . Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature*, 397(6718), 436-441. doi:10.1038/17130
- Gautam, S., Mishra, N., Kalaiyarasu, S., Jhade, S. K., & Sood, R. (2018). Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus (BLV) Strains Reveals Existence of Genotype 6 in Cattle in India with evidence of a new subgenotype. *Transbound Emerg Dis*. doi:10.1111/tbed.12979
- Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., . . . Willems, L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4(18), 1-32.

- Gillet, N. A., & Willems, L. (2016). Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology*, *13*(1), 75. doi:10.1186/s12977-016-0308-3
- Hajj, H. E., Nasr, R., Kfoury, Y., Dassouki, Z., Nasser, R., Kchour, G., . . . Bazarbachi, A. (2012). Animal models on HTLV-1 and related viruses: what did we learn? *Front Microbiol*, *3*, 333. doi:10.3389/fmicb.2012.00333
- Hopkins, S. G., & DiGiacomo, R. F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, *13*(1), 107-128. ICTV, 2014.
- Ikeda, S., Kinoshita, K., Amagasaki, T., Momita, S., Soda, H., Ito, M., et al. (1989). [Mother to child transmission of human T cell leukemia virus type-1]. *Rinsho Ketsueki*, *30*(10), 1732-1737.
- Inoue, E., Matsumura, K., Maekawa, K., Nagatsuka, K., Nobuta, M., Hirata, M., . . . Okazaki, K. (2011). Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. *Arch Virol*, *156*(7), 1137-1141. doi:10.1007/s00705-011-0955-6
- Jackson, A. C., Ye, H., Phelan, C. C., Ridaura-Sanz, C., Zheng, Q., Li, Z., . . . Lopez-Corella, E. (1999). Extraneural organ involvement in human rabies. *Lab Invest*, *79*(8), 945-951.
- Johnston, E. R., Albritton, L. M., & Radke, K. (2002). Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of bovine leukemia virus surface protein. *J Virol*, *76*(21), 10861-10872.
- Johnston, E. R., & Radke, K. (2000). The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemia virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions. *J Virol*, *74*(6), 2930-2935.
- Juliarena, M. A., Barrios, C. N., Ceriani, M. C., & Esteban, E. N. (2016). Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J Dairy Sci*, *99*(6), 4586-4589. doi:10.3168/jds.2015-10480
- Kelly, E. J., Jackson, M. K., Marsolais, G., Morrey, J. D., & Callan, R. J. (1993). Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res*, *54*(2), 205-209.
- Kettmann, R., Mammerickx, M., Portetelle, D., Gregoire, D., & Burny, A. (1984). Experimental infection of sheep and goat with bovine leukemia virus: localization of proviral information on the target cells. *Leuk Res*, *8*(6), 937-944.
- Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K., Konishi, M., & Murakami, K. (2010). Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Veterinary Research*, *6*, 1.
- Konnai, S., Suzuki, S., Shirai, T., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Sunden, Y., . . . Ohashi, K. (2013). Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, *36*(1), 63-69. doi:10.1016/j.cimid.2012.09.005
- Kwo, P. Y., Schlauder, G. G., Carpenter, H. A., Murphy, P. J., Rosenblatt, J. E., Dawson, G. J., . . . Balan, V. (1997). Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc*, *72*(12), 1133-1136. doi:10.1016/s0025-6196(11)63675-6
- Lafon, M., Thoulouze, M. I., Astoul, E., & Lafage, M. (2000). Rabies virus and immunopotentiality. *Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong Sydney, Tokyo*, 631-642.
- Lee, E., Kim, E., Ratthanophart, J., Vitoonpong, R., Kim, B., Cho, I., . . . Shin, Y. (2016). Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infection, Genetics and Evolution* *41*, 245-254.

- Lee, E., Kim, E. J., Joung, H. K., Kim, B. H., Song, J. Y., Cho, I. S., . . . Shin, Y. K. (2015). Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates. *Virology*, *12*, 64. doi:10.1186/s12985-015-0286-4
- Lee, G. H., Tan, B. H., Teo, E. C., Lim, S. G., Dan, Y. Y., Wee, A., . . . Teo, C. G. (2016). Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, *150*(2), 355-357.e353. doi:10.1053/j.gastro.2015.10.048
- Lentz, T. L., Burrage, T. G., Smith, A. L., Crick, J., & Tignor, G. H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science*, *215*(4529), 182-184.
- Levkut, M., Lesnik, F., Balent, P., Zajac, V., Korim, P., & Slavikova, K. (1997). Bovine leukemia virus-induced clinical signs and morphological changes of encephalitozoonosis in rabbits. *Folia Parasitologica (Praha)*, *44*(4), 249-254.
- Li, T. C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., . . . Miyamura, T. (2005). Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(12), 1958-1960. doi:10.3201/eid1112.051041
- Licursi, M., Inoshima, Y., Wu, D., Yokoyama, T., González, E. T., & Sentsui, H. (2003). Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Veterinary Microbiology*, *96*(1), 17-23.
- Lim, S. I., Jeong, W., Tark, D. S., Yang, D. K., & Kweon, C. H. (2009). Agar gel immunodiffusion analysis using baculovirus-expressed recombinant bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51/gp30(T-)). *Journal of Veterinary Science*, *10*(4), 331-336.
- Mamoun, R. Z., Morisson, M., Rebeyrotte, N., Busetta, B., Couez, D., Kettmann, R., . . . Guillemain, B. (1990). Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *Journal of Virology*, *64*(9), 4180-4188.
- Maresca, C., Costarelli, S., Dettori, A., Felici, A., Iscaro, C., & Feliziani, F. (2015). Enzootic bovine leukosis: report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005-2012). *Preventive Veterinary Medicine*, *119*(3-4), 222-226. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.02.024
- Martin, D., Arjona, A., Soto, I., Barquero, N., Viana, M., & Gomez-Lucia, E. (2001). Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *Journal of Veterinary Medical and Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *48*(2), 97-106.
- Matsumura, K., Inoue, E., Osawa, Y., & Okazaki, K. (2011). Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. *Virus Research*, *155*(1), 343-348. doi:10.1016/j.virusres.2010.11.005
- McMichael, A. J. (1995). La " epidemiología molecular": nueva ruta de investigación o compañero de viaje?.
- Meirom, R., Moss, S., & Brenner, J. (1997). Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *59*(1-2), 113-119.
- Meiron, R., Brenner, J., Gluckman, A., Avraham, R., & Trainin, Z. (1985). Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with bovine leukemia virus (BLV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *9*(2), 105-114.
- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., . . . Emerson, S. U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *94*(18), 9860-9865.
- Mesa, G., Ulloa, J., & Gutiérrez, M. (2013). Técnica no convencional de extracción de DNA a partir de tejido embebido en parafina para uso en la reacción en cadena de la polimerasa. *REVISTA U.D.C.A ACTUALIDAD & DIVULGACIÓN CIENTÍFICA*.

- Miller, J. M., Miller, L. D., Olson, C., & Gillette, K. G. (1969). Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst*, *43*(6), 1297-1305.
- Miller, J. M., & Van Der Maaten, M. J. (1978). Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Ann Rech Vet*, *9*(4), 871-877.
- Miller, J. M., Van der Maaten, M. J., & Schmerr, M. J. (1983). Vaccination of cattle with binary ethylenimine-treated bovine leukemia virus. *Am J Vet Res*, *44*(1), 64-67.
- Mohd, H. A., Al-Tawfiq, J. A., & Memish, Z. A. (2016). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virology*, *13*, 87. doi:10.1186/s12985-016-0544-0
- Molteni, E., Agresti, A., Meneveri, R., Marozzi, A., Malcovati, M., Bonizzi, L., . . . Ginelli, E. (1996). Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). *Zentralbl Veterinarmed B*, *43*(4), 201-211.
- Monti, G., Schrijver, R., & Beier, D. (2005). Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Arch Virol*, *150*(3), 443-458. doi:10.1007/s00705-004-0437-1
- Moratorio, G., Obal, G., Dubra, A., Correa, A., Bianchi, S., Buschiazzo, A., . . . Pritsch, O. (2010). Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch Virol*, *155*(4), 481-489. doi:10.1007/s00705-010-0606-3
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, *136*(7), 2348-2357.
- Nan, Y., & Zhang, Y. J. (2016). Molecular Biology and Infection of Hepatitis E Virus. *Front Microbiol*, *7*, 1419. doi:10.3389/fmicb.2016.01419
- Nekoei, S., Hafshejani, T. T., Doosti, A., & Khamesipour, F. (2015). Molecular detection of bovine leukemia virus in peripheral blood of Iranian cattle, camel and sheep. *Pol J Vet Sci*, *18*(4), 703-707. doi:10.1515/pjvs-2015-0091
- Nekoei, O., VanLeeuwen, J., Sanchez, J., Kelton, D., Tiwari, A., & Keefe, G. (2015). Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev Vet Med*, *119*(3-4), 105-113. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.02.025
- Nemerow, G. R. (2000). Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology*, *274*(1), 1-4. doi:10.1006/viro.2000.0468
- Nishimori, A., Konnai, S., Okagawa, T., Maekawa, N., Ikebuchi, R., Goto, S., . . . Ohashi, K. (2017). In vitro and in vivo antiviral activity of an anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) rat-bovine chimeric antibody against bovine leukemia virus infection. *PLoS One*, *12*(4), e0174916. doi:10.1371/journal.pone.0174916
- Nuotio, L., Rusanen, H., Sihvonen, L., & Neuvonen, E. (2003). Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med*, *59*(1-2), 43-49.
- Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Nishimori, A., Okagawa, T., Murata, S., & Ohashi, K. (2016). Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. *Arch Virol*, *161*(4), 985-991. doi:10.1007/s00705-015-2676-8
- Ochoa-Cruz, A., Uribe, A., & Gutierrez, M. (2006). Estudio del potencial zoonótico del virus de la leucosis bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. *Universitas Scientiarum*, *11*(2), 31-40.
- Ohno, A., Takeshima, S. N., Matsumoto, Y., & Aida, Y. (2015). Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Res*, *210*, 283-290. doi:10.1016/j.virusres.2015.08.020

- OIE, www.oie.int/es/
- OMS, www.who.int/es
- OPS, www.paho.org/hq/?lang=es
- Orloff, S. L., Wallingford, J. C., & McDougal, J. S. (1993). Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *J Hum Lact*, *9*(1), 13-17. doi:10.1177/089033449300900125
- Ortega, D. O., Sánchez, A., Tobón, J., Chaparro, Y., Cortés, S., & Gutiérrez, M. I. F. (2016). Seroprevalence and risk factors associated with bovine leukemia virus in Colombia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, *8*(5), 35-43.
- Ott, S. L., Johnson, R., & Wells, S. J. (2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med*, *61*(4), 249-262.
- Oyarzun, P., & Kobe, B. (2016). Recombinant and epitope-based vaccines on the road to the market and implications for vaccine design and production. *Hum Vaccin Immunother*, *12*(3), 763-767. doi:10.1080/21645515.2015.1094595
- Paraskevis, D., Nikolopoulos, G. K., Magiorkinis, G., Hodges-Mameletzis, I., & Hatzakis, A. (2016). The application of HIV molecular epidemiology to public health. *Infect Genet Evol*, *46*, 159-168. doi:10.1016/j.meegid.2016.06.021
- Parfanovich, M. I., Zhdanov, V. M., Lazarenko, A. A., Nomm, E. M., Simovart Yu, A., Parakin, V. K., & Lemesh, V. M. (1983). The possibility of specific protection against bovine leukaemia virus infection and bovine leukaemia with inactivated BLV. *Br Vet J*, *139*(2), 137-146.
- Patrascu, I. V., Coman, S., Sandu, I., Stiube, P., Munteanu, I., Coman, T., . . . Mihailescu, D. (1980). Specific protection against bovine leukemia virus infection conferred on cattle by the Romanian inactivated vaccine BL-VACC-RO. *Virologie*, *31*(2), 95-102.
- Plotkin, S. A. (2000). Rabies. *Clin Infect Dis*, *30*(1), 4-12. doi:10.1086/313632
- Pluta, A., Rola-Luszczak, M., Douville, R. N., & Kuzmak, J. (2018). Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. *Virology*, *15*(1), 165. doi:10.1186/s12985-018-1062-z
- Polat, M., Ohno, A., Takeshima, S. N., Kim, J., Kikuya, M., Matsumoto, Y., . . . Aida, Y. (2015). Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Arch Virol*, *160*(1), 285-296. doi:10.1007/s00705-014-2280-3
- Polat, M., Takeshima, S., & Aida, Y. (2017). Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology Journal*, *14*(1), 209.
- Polat, M., Takeshima, S. N., Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., . . . Aida, Y. (2016). A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*, *13*, 4. doi:10.1186/s12977-016-0239-z
- Renou, C., Roque-Afonso, A. M., & Pavio, N. (2014). Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis*, *20*(11), 1945-1947. doi:10.3201/eid2011.140791
- Ristau, E., Beier, D., & Wittmann, W. (1987). [The course of infection with bovine leukosis virus (BLV) in calves after the administration of cell extract from lymph node tumors of BLV-infected cattle]. *Arch Exp Veterinarmed*, *41*(3), 323-331.
- Rodriguez, S. M., Golemba, M. D., Campos, R. H., Trono, K., & Jones, L. R. (2009). Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *J Gen Virol*, *90*(Pt 11), 2788-2797. doi:10.1099/vir.0.011791-0
- Rola-Luszczak, M., Pluta, A., Olech, M., Donnik, I., Petropavlovskiy, M., Gerilovych, A., . . . Kuzmak, J. (2013). The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern

- Europe and Siberia and its impact on phylogeny. *PLoS One*, 8(3), e58705. doi:10.1371/journal.pone.0058705
- Schlauder, G. G., Dawson, G. J., Erker, J. C., Kwo, P. Y., Knigge, M. F., Smalley, D. L., . . . Mushahwar, I. K. (1998). The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol*, 79 (Pt 3), 447-456. doi:10.1099/0022-1317-79-3-447
- Schwartz, I., & Levy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet Res*, 25(6), 521-536.
- Sevik, M., Avci, O., & Ince, O. B. (2015). An 8-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity. *Trop Anim Health Prod*, 47(4), 715-720. doi:10.1007/s11250-015-0783-x
- Shirai, T., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Suzuki, S., Sunden, Y., . . . Ohashi, K. (2011). Molecular cloning of bovine lymphocyte activation gene-3 and its expression characteristics in bovine leukemia virus-infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 144(3-4), 462-467. doi:10.1016/j.vetimm.2011.08.018
- Slavikova, K., Zajac, V., Reinerova, M., Kettmann, R., & Burny, A. (1986). Bovine leukemia provirus in the DNA of different infected host cells. *Neoplasma*, 33(6), 671-678.
- Stone, D. M., Hof, A. J., & Davis, W. C. (1995). Up-regulation of IL-2 receptor alpha and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. *Vet Immunol Immunopathol*, 48(1-2), 65-76.
- Suzuki, T., Matsubara, Y., Kitani, H., & Ikeda, H. (2003). Evaluation of the delta subunit of bovine adaptor protein complex 3 as a receptor for bovine leukaemia virus. *J Gen Virol*, 84(Pt 5), 1309-1316. doi:10.1099/vir.0.18763-0
- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N., & Mishiro, S. (2004). Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology*, 330(2), 501-505. doi:10.1016/j.virol.2004.10.006
- Taylor, L. H., Latham, S. M., & Woolhouse, M. E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1411), 983-989. doi:10.1098/rstb.2001.0888
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., & Mishiro, S. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 362(9381), 371-373. doi:10.1016/s0140-6736(03)14025-1
- Terranova, A. M. P., Florez, J. E. M., Giovambattista, G., & Franco, L. A. A. (2012). Asociación del gen BoLA-DRB3. 2 con el virus de la leucosis bovina (VLB) en ganado criollo hartón del Valle. *Acta Agronómica*, 61(5), 22-23.
- Trainin, Z., Brenner, J., Meirum, R., & Ungar-Waron, H. (1996). Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 54(1-4), 293-302.
- Tsiang, H., Koulakoff, A., Bizzini, B., & Berwald-Netter, Y. (1983). Neurotropism of rabies virus. An in vitro study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 42(4), 439-452.
- Tsurumi, T., Fujita, M., & Kudoh, A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol*, 15(1), 3-15. doi:10.1002/rmv.441
- Tuffereau, C., Benejean, J., Blondel, D., Kieffer, B., & Flamand, A. (1998). Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *Embo j*, 17(24), 7250-7259. doi:10.1093/emboj/17.24.7250
- Úsuga-Monroy, C., Echeverri-Zuluaga, J. J., & López-Herrera, A. (2018). Detección molecular y serológica del virus de la leucosis bovina en una población de vacas Holstein, de Colombia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(2), 387-399.

- Van Dooren, S., Salemi, M., & Vandamme, A. M. (2001). Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-i (HTLV-I) subtypes. *Mol Biol Evol*, *18*(4), 661-671. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003846
- Weber, D. S., Alroy, K. A., & Scheiner, S. M. (2017). Phylogenetic Insight into Zika and Emerging Viruses for a Perspective on Potential Hosts. *Ecohealth*, *14*(2), 214-218. doi:10.1007/s10393-017-1237-x
- Werner-Favre, C., Vischer, T. L., Wohlwend, D., & Zubler, R. H. (1989). Cell surface antigen CD5 is a marker for activated human B cells. *Eur J Immunol*, *19*(7), 1209-1213. doi:10.1002/eji.1830190709
- White, M. R., Crouch, E., Vesona, J., Tacken, P. J., Batenburg, J. J., Leth-Larsen, R., . . . Hartshorn, K. L. (2005). Respiratory innate immune proteins differentially modulate the neutrophil respiratory burst response to influenza A virus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *289*(4), L606-616. doi:10.1152/ajplung.00130.2005
- Willems, L., Kettmann, R., Dequiedt, F., Portetelle, D., Voneche, V., Cornil, I., . . . Mammerickx, M. (1993). In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants. *J Virol*, *67*(7), 4078-4085.
- Woolhouse, M. E., & Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis*, *11*(12), 1842-1847. doi:10.3201/eid1112.050997
- Wu, Z., Golub, E., Abrams, W. R., & Malamud, D. (2004). gp340 (SAG) binds to the V3 sequence of gp120 important for chemokine receptor interaction. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *20*(6), 600-607. doi:10.1089/0889222041217400
- Wu, Z., Van Ryk, D., Davis, C., Abrams, W. R., Chaiken, I., Magnani, J., & Malamud, D. (2003). Salivary agglutinin inhibits HIV type 1 infectivity through interaction with viral glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *19*(3), 201-209. doi:10.1089/088922203763315704
- Yang, Y., Kelly, P. J., Bai, J., Zhang, R., & Wang, C. (2016). First Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus Infections in the Caribbean. *PLoS One*, *11*(12), e0168379. doi:10.1371/journal.pone.0168379
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., & Okamoto, H. (2003). Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*, *84*(Pt 9), 2351-2357. doi:10.1099/vir.0.19242-0
- Zhang, R., Jiang, J., Sun, W., Zhang, J., Huang, K., Gu, X., . . . Wang, C. (2016). Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Res*, *18*(1), 101. doi:10.1186/s13058-016-0763-8
- Zhao, X., & Buehring, G. C. (2007). Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology*, *366*(1), 150-165. doi:10.1016/j.virol.2007.03.058