



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“Detección de Lentivirus de pequeños rumiantes  
en rebaños mixtos de ovinos y caprinos por  
serología y PCR”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

**Cecilia Rodríguez Murillo**

ASESOR:

Dr. Hugo Ramírez Álvarez

COASESORA:

M. en C. María Martha García Flores

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2017.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Agradecimientos

Supongo que a la primera persona que debo agradecer es a la que siempre me ha dado el vivo ejemplo de lucha constante, podría llenar otra tesis con todo lo que tengo que decirte. Mil gracias Fabiola Murillo, sin ti no hubiera llegado hasta éste punto, sabes lo fundamental que eres en mi vida, gracias por dejarme ser y por enseñarme a defender lo que quiero en la vida. TE AMO nunca lo olvides. De paso agradecerte por los tres motores de vida que tenemos:

Miguel Murillo: mi compañerito, cómplice, cainal, valedor y muchas cosas más. Gracias por compartir raíces y vida conmigo. Por ser Luz y Compañía.

Moisés Murillo: gracias por hacerme ver la vida de forma relajada, por enseñarme a poner buena cara en los tiempos más difíciles, por ser el primero en ponerse la camiseta cuando tenemos un problema. Espero ser un buen ejemplo para ti y que podamos seguir caminando juntos mucho tiempo más.

Abigail Murillo: “Que lindos ojos tiene mi chata, como relumbran cuando me ven, son negros negros como la noche y tan serenos como mi fe. Esos ojitos son mi esperanza, no me los quites nunca Señor, no me los quites Diosito santo porque sin ellos muero de amor... y cuando no estoy me esperas, porque sabes bien que tengo que regresar contigo porque me gusta estar contigo”  
Círculo de amor, El Gran Silencio.

Gracias a los Murillo's & Friends por compartir y apoyar este proyecto de vida, los amo; (familia Medina Murillo por creer en mí y por darme mi primer fuente de empleo dónde crecí como persona) (familia Zamudio Murillo por apapacharme y especialmente a Mario Murillo porque en una de las mil pláticas que hemos tenido me ayudó de decidir lo más padre que me ha pasado: pertenecer a la máxima casa de estudios) (a la familia Murillo Pérez porque cuidaron de la pequeña Ceci; Mama Mace, gracias por enseñarme la importancia de la familia La AMO).

Mayra: gracias por ser mi tía y mi amiga: por apoyarme y darme seguridad para caminar, gracias por formar parte de éste logro y porque desde que ingrese a nuestra amada Universidad me enseñaste a quererla, tal como lo hizo Jhonna, los quiero.

He tenido la gran fortuna de pertenecer a la UNAM, a la que también quiero dar las gracias por los tres años más relajados de mi vida, mi adorado CCH Vallejo en donde conocí a grandes amigas; Aline y Jenni, para toda la vida. Y por supuesto a la FES Cuautitlán de la que soy orgullosamente egresada y en dónde he conocido a mí otra familia; mis amigos:

Eduardo: amigooooo, gracias infinitas por recorrer camino conmigo, por ser inseparables, por compartir vivencias, experiencias, enseñanzas. Gracias por las miles de charlas infinitas, comidas, paseos, por mis hijas (Pimienta y mi Pequeña plantita) a las que adoro, por hacerme reír, por ser el primero que leyó mi escrito, por apoyarme en todo lo referente a la escuela (sobre todo las sesiones de estudio), por animarme, por soportarme, por quedarte. Eres lo máximo!!! Te quiero mucho, mucho mucho!!!

Bere, Mari, Cinthia y Paulina el cuenta chiste que tengo dentro salía inmediatamente con ustedes, gracias por apoyarme, reír y llorar. En especial a Berenice por ser mi compañerita de vida por

algún tiempo, que gusto haber vivido la aventura de salir de casa por primera vez juntas y asumir las consecuencias de querer ser adultas “responsables” fue todo un placer.

Nancy querida: gracias por ser mi gurú, guía, maestra pero sobre todo amiga. Gracias por enseñarme a entender la vida.

Gerardo: mi hermanito mayor. Mil gracias por leer mi mente y darle forma a las miles de ideas que siempre revolotean en mi cabeza. Por sostenerme y ayudarme a entender todo lo que me pasa.

Fabián, Pili, Emma, Rutencia, Arturo: gracias por hacer cada día inolvidable en la casa MVZ, por aguantarme, por hacerme reír, por consolarme, por echarme porras, por estar para mí, un gusto haber formado parte de su vida.

Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular: gracias por cambiarme la vida. Gracias al Dr. Alejandro, Dra. Lulu, Dr. Fito, Dr. Gerardo, Dra. Alma, Dra. Martha (por haber accedido a formar parte de éste escrito, gracias por su tiempo y valiosas opiniones) a Yessi, Marce, Carmen, Melisa, Hiram, Carlitos, Areli, Lizethe, Juanito, Nayely, Ricardo, gracias por darme un consejo, por enseñarme, por hacer mi estancia en el laboratorio inolvidable. Al proyecto CONACyT 221285 por enseñarme tanto en tan solo tres años, por conocer gente, lugares, experiencias, por ayudarme de alguna forma a decidir el rumbo que quiero tomar en los siguientes años. A la bandita M. en C. Ne-li, Marcos, Pa-vel, Fernando, Sandra, Anita y Biktor (la banda del bacho 6) por hacerme sentir parte de su manada, me llevo grandes experiencias con ustedes, gracias. A mi sinodales por su tiempo y opiniones.

Dr. Hugo Ramírez (mi crayoli favorito): Gracias por ser mi papá! No sólo académico, sino de vida. Gracias por apoyarme, por creer en mí, por su confianza, por sus enseñanzas, consejos, risas, por su tiempo. Créame cuando le digo que de grande quiero ser como usted. Eternamente agradecida.

María Ednita Guadalupe Trinidad: sin ti y tu bella mami definitivamente esto no hubiera sido posible, gracias por unirme a mi causa, por ser la primera en ayudarme a no flaquear. Te amito mucho nena, que nuestra amistad sea para siempre. Niña Monchis Turrall gracias por tu apoyo, tus consejos, por abrirme las puertas de tu casa y hacerme sentir parte de tu familia, por enseñarme algo que no se aprende en la escuela; el amor a tu profesión. Gracias por instruirme en el mundo de las pequeñas especies te amo.

A la plaza Mesones por haber sido mi válvula de escape durante 6 años: Martina, Temo, Alan, Alejandro, Rodo, Vale, Hugo, Efrén, Isa; gracias por su apoyo, por sus enseñanzas, consejos y en muchos de los casos por hacer de sus mascotas mis primeros pacientes. Los quiero.

A todas y cada una de las personas que han hecho de mi existencia la mejor, son muchas. Por siempre... Gracias.

Todo lo que el Padre me da, vendrá a mí; y el que a mi viene, no le echo fuera. Porque he descendido del cielo, no para hacer mi voluntad, sino la voluntad del que me envió. Jn 6. 37,38.

“Cuando se nace pobre, estudiar es el mayor acto de rebeldía contra el sistema. El saber rompe las cadenas de la esclavitud”. Tomás Bulat.

Para ti mamá... Gracias

## ÍNDICE

Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Impacto económico	10
Manifestaciones clínicas	13
Lentivirus: características generales	14
Ciclo de infección	15
Tropismo celular de los LVPR	18
Vías de transmisión	19
Transmisión entre especies	20
Diagnóstico	21
Control	23
Situación de la enfermedad en México	24
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
Metodología	29
Resultados	33
Discusión	38

Conclusión	42
Bibliografía	43
Apéndices	51

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Distribución de animales por rebaño.	29
Tabla 2. Características de los iniciadores diseñados que hibrida en una región del gen <i>LTR</i> .	32
Tabla 3. Reactividad de plasmas de ovinos a las técnicas de ELISA´s comerciales.	33
Tabla 4. Reactividad de plasmas de caprinos a las técnicas de ELISA´s comerciales.	33
Tabla 5. Distribución de ovinos seropositivos por genotipos de LVPR.	34
Tabla 6. Distribución de caprinos seropositivos por genotipos de LVPR.	34
Tabla 7. Reactividad de plasmas de ovinos a las técnicas de ELISA´s caseras.	35
Tabla 8. Reactividad de plasmas de caprinos a las técnicas de ELISA´s caseras.	35
Figura 1. Comparación de resultados obtenidos en los ELISAS comerciales y caseros que detectan anticuerpos contra LVPR.	36
Figura 2. Visualización de un gel de agarosa con productos obtenidos en la PCR de LTR de diferentes muestras.	37
Figura 3. Visualización de productos de PCR en un gel de agarosa de un fragmento del gen constitutivo (SDHA).	37
Tabla 9. Total de ovinos y caprinos positivos a diferentes pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra LVPR.	51

## RESUMEN

A los Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) y del Maedi Visna (VMV), se les ha agrupado como Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR). Estudios previos han demostrado evidencia clara de que algunos de los genotipos virales como el A y B pueden recombinarse, principalmente en la región que involucra al gen *env* y por lo tanto, favorecer la posible infección de las cabras y/o borregos. Evidencia epidemiológica y molecular muestran claramente que los LVPR son capaces de transmitirse entre borregos y cabras en condiciones naturales favorables. El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes en rebaños mixtos de ovinos y caprinos que se encuentran en convivencia en el estado de Sinaloa, identificando la presencia de anticuerpos y/o ADN proviral en los pequeños rumiantes. Para ello se realizó un muestreo de 4 rebaños mixtos de ovinos y caprinos en diferentes puntos del estado de Sinaloa, a la sangre colectada mediante venopunción se le separó el plasma para pruebas de serología comercial y de péptidos sintéticos, y a los leucocitos de sangre periférica se les realizó la extracción de ADN, el cual se utilizó para detectar el ADN proviral con la técnica de PCR. De un total de 142 animales evaluados con los kits comerciales de ELISA (VMRD y Eradikit) y los ELISAs caseros basados en péptidos sintéticos, 35 resultaron positivos (12 ovinos y 23 caprinos). El ELISA Eradikit permite determinar si el genotipo viral es de tipo A o B, con lo cual se determinó que en ambas especies se identificaron genotipos A y B, en el rebaño 2 además de presentar ambos genotipos 3 cabras presentaron co-infección. Con el uso de la PCR no se identificó ADN proviral. Aunque de manera regular se identifica el genotipo A más relacionado con la infección en ovinos y del genotipo B en cabras, ambas especies indistintamente presentaron un genotipo u otro, e incluso ambos. Sería de gran utilidad no solo genotipificar por serología sino obtener amplificadores por PCR para secuenciar y asegurar que la estirpe genética está relacionada con lo obtenido por serología. Se demostró la infección por LVPR del genotipo A y B en rebaños mixtos de ovinos y caprinos del estado de Sinaloa.

## ABSTRACT

Caprine Encephalitis Arthritis Virus (CAEV) and Maedi Visna Virus (VMV) have been grouped as Small Ruminants Lentiviruses (SRLV). Previous studies have demonstrated clear evidence that some viral genotypes, such as A and B, may recombine, mainly in the region involving *env* gene, thus favoring the possible infection of goats and/or sheep. Epidemiologic and molecular evidence clearly show that SRLVs are capable of being transmitted between sheep and goats, in favorable natural conditions. The objective of the present work was to determine the frequency of infection by SRLVs in mixed herds of sheep and goats, which share spaces in the municipality of Culiacán, Sinaloa, Mexico, identifying the presence of antibodies and/or proviral DNA in small ruminants. For this purpose, a sampling of 4 mixed herds of sheep and goats was performed in different places in the State of Sinaloa. The collected blood, by venipuncture, was separated from plasma for serological commercial tests and synthetic peptides, and DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, which was used to detect proviral DNA by PCR technique. From a total of 142 animals that were evaluated with commercial ELISA kits (VMRD and Eradikit) and peptide ELISAs based in synthetic peptides, 35 were positive (12 sheep and 23 goats). Eradikit ELISA allows determining if the viral genotype is A or B. It was determined that genotypes A and B were identified in both species; additionally, 3 goats presented co-infection in herd 2. No proviral DNA was identified by PCR. Although genotype A is regularly more related with sheep infection and genotype B with goats, both species presented one or the other genotype indistinctly, and even both. It would be very useful not only to genotype by serology, but to obtain amplifies by PCR to sequence and verify that the genetic line is related with the results obtained by serology. Infection by SRLV, genotypes A and B, was demonstrated in mixed herds of sheep and goats in the State of Sinaloa.

## INTRODUCCIÓN

El género Lentivirus pertenece a la familia Retroviridae, el cual infecta a un amplio número de especies incluyendo al humano, animales domésticos y especies de vida libre, causando infecciones de curso lento y que pueden conducir a enfermedades degenerativas progresivas. El virus Maedi Visna (VMV) y el virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) infectan borregos y cabras (1). Actualmente, ambas enfermedades se agrupan como Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) debido a su proximidad filogenética y a la transmisión natural entre las especies (2, 28).

El descubrimiento del VMV podría considerarse una hazaña científica debido a que fue el primer caso de un virus de replicación lenta y causante de una enfermedad con un periodo de incubación aparentemente largo. Éste virus fue aislado por primera vez por Sigurdsson y colaboradores en 1960 durante la epidemia de enfermedades que afectaron Islandia en la década de 1940, después de la importación de 20 carneros de raza Karakul provenientes del Departamento de Reproducción Animal de la Universidad de Halle (Alemania), los cuales fueron distribuidos a lo largo de la isla con la finalidad de mejorar la producción ovina de aquel país. Aunque los animales provenían de una institución científica donde ninguna enfermedad había sido observada y los animales habían pasado por una larga cuarentena, eran reservorio de tres enfermedades crónicas: paratuberculosis, adenocarcinoma pulmonar ovino y Maedi Visna. Las dos primeras eran conocidas clínicamente y había literatura científica existente en ese tiempo, pero el tercero tenía características totalmente desconocidas para los científicos por lo que los nombres fueron dados por los pastores locales, “visna” (emaciación) y “maedi” (disnea) convirtiéndose en el nombre universal para referirse a la enfermedad en ovinos causada por LVPR. Desde entonces, la infección ha sido identificada primordialmente en todos los pequeños rumiantes en diversos países, con algunas excepciones acorde a las especies y los sistemas de producción. Más allá de las pérdidas substanciales asociadas a la presentación clínica causada por LVPR, los efectos de infecciones subclínicas han sido sujetos a controversia, debido al curso lento de la infección que crea todo un espectro de progresión de la enfermedad que no puede ser diferenciada siguiendo los criterios diagnósticos actuales *in vitro*. Esto ha obstaculizado la justificación económica de programas de control a gran escala fuera de los implementados en rebaños de alto valor genético (2, 24).

La enfermedad en caprinos es de reciente descubrimiento, la Artritis Encefalitis Caprina (AEC) de etiología retroviral, fue descrita por primera vez por Cork y colaboradores en Estados Unidos en 1974, y el virus (VAEC) fue aislado en 1980. La artritis caprina y la encefalitis fueron rápidamente reportadas en otros países donde sus efectos parecían ser más negativos que en las ovejas por lo que los programas de control fueron implementados inmediatamente (2).

### **Impacto económico.**

La importancia económica de esta infección ha sido ampliamente discutida, ya que cabe diferenciar entre la enfermedad clínica con pérdidas directas relacionadas por la infección y la infección subclínica. Quizá el problema de ésta infección es que no causa pérdidas rápidamente detectables por el ganadero, y en consecuencia, se ha creado la idea de que no merece la pena su control. En México, la mayoría de los borregos se destinan a la producción cárnica (menores de un año de edad) por lo que los animales no desarrollan signos de enfermedad, sólo en animales que son de desecho (sementales y hembras pie de cría) podrían manifestarse lesiones sugerentes de la infección. Mientras que en el caso de las cabras la producción de leche ha ido aumentando con el paso de los años y es más frecuente encontrar a animales adultos con las articulaciones inflamadas como un signo de enfermedad (3).

Con respecto a las pérdidas directas, hay pocas dudas acerca de su importancia. Ésta ha sido demostrada en multitud de ocasiones desde el reconocimiento de la infección en Islandia hasta nuestros días. Las pérdidas pueden cuantificarse si se suman los conceptos de los animales muertos por la enfermedad o en estado avanzado de emaciación, los eliminados por los sistemas de control, los derivados del incremento de la tasa de reposición, las pérdidas derivadas de la mastitis indurativa y por la consecuente pérdida por pobre crecimiento del cordero, pérdida que no se recupera entre el periodo de destete y sacrificio (4).

Por lo que respecta a la infección subclínica se ha debatido mucho y se han expuesto opiniones muy encontradas. Así, mientras algunos autores describían pérdidas por la afectación de diferentes parámetros productivos tales como la fertilidad y el peso al nacimiento, otros no las encontraron en sus estudios (3). Sin embargo, muchos de estos trabajos se realizaron con un número insuficiente de observaciones y en muestras no adecuadas en términos estadísticos. Se

realizó un estudio productivo en un rebaño comercial, en el que se incluían animales seronegativos y seropositivos (sin signología), contando con un número de 1,466 madres (de las que parieron 1,242) y sus 2,452 corderos. Los resultados dejan poco margen de duda. Las hembras seronegativas a LVPR tuvieron una tasa de fertilidad mayor que las seropositivas, tuvieron más corderos por parto, el peso de sus corderos al nacer fue mayor, destetaron más corderos por parto y sus corderos ganaron más peso diario, produciendo corderos más pesados al destete que las ovejas seropositivas. Además, la mortalidad predestete fue menor en las crías de las madres seronegativas. Estos datos indican que el control de la infección por el LVPR se justifica económicamente y que resulta en una mejora general de la economía de la explotación (5). Algunos factores que influyen en las pérdidas económicas son las siguientes: a) La enfermedad clínica causada por la infección de LVPR se desarrolla de forma lenta, b) Solo cerca del 30% de los animales infectados desarrollan signos clínicos; c) Factores genéticos influyen en el grado de la enfermedad. En ovejas, la susceptibilidad a la enfermedad puede ser influenciada por la raza, mientras que en cabras esto se asocia con ciertos haplotipos principales de histocompatibilidad presentes en todas las razas investigadas; d) Ciertas prácticas de manejo como la producción de leche, alojamiento y condiciones de hacinamiento aumentan la tasa de transmisión viral, y por lo tanto, la seroprevalencia; f) Los signos clínicos pueden estar influenciados por infecciones concurrentes que pueden variar de acuerdo con la zona geográfica y las prácticas de manejo (4, 18). Algunos de los parámetros de producción que se ven afectados se mencionan a continuación.

### **Producción de leche.**

Se estima que la producción de leche puede disminuir hasta un 10%, debido a la mastitis indurativa, que a menudo es una característica de la infección por LVPR. Los datos precisos no están disponibles porque los procedimientos estandarizados para evaluar la producción de leche son menos comunes en los pequeños rumiantes que en el ganado lechero. Cabe mencionar que la disminución en la producción de leche está fuertemente influenciada por el manejo zootécnico. La falta en la ganancia de peso de los corderos o cabritos de madres infectadas por LVPR ha sido demostrada en diversos estudios, indicando que tiene un impacto en la productividad de las siguientes generaciones (4, 26).

### **Peso al nacimiento.**

Existen trabajos que evidencian otros que niegan que la infección por LVPR afecte el peso al nacimiento. Se sabe que el bajo peso al nacer afecta negativamente el desarrollo de corderos y cabritos, lo que disminuye la productividad, especialmente en rebaños muy infectados (4).

### **Ganancia de peso.**

La infección con LVPR merma la ganancia de peso en corderos. Las pérdidas pueden tener rangos de 0.3 a 3.0 Kg por cordero al destete (4).

### **Rango de mortalidad.**

La mortalidad debida a la infección por LVPR es baja en zonas enzoóticas, pero está fuertemente influenciada por enfermedades concurrentes, manejo, nutrición y factores ambientales. Las observaciones realizadas durante la epizootia del VMV en Islandia indican que la mortalidad puede alcanzar el 20-30% en los animales recién infectados. La infección disminuye el promedio de vida de los animales debido a la disminución de la productividad. Se estima que los animales son desechados aproximadamente un año antes en comparación con animales que no están infectados. También afecta indirectamente a la productividad al disminuir el número promedio de descendientes nacidos en cada generación. La disminución de la producción de leche genera un aumento en la mortalidad de los corderos. Un elemento que no ha recibido mucha atención en el pasado es el impacto de la infección por LVPR en la calidad de la producción de leche. La infección puede afectar negativamente la calidad mediante el aumento de los recuentos de células somáticas en la leche. Dado que los consumidores demandan cada vez más productos de animales con el mejor estado de salud posible, los animales persistentemente infectados con LVPR no pueden cumplir con este requisito (4).

## **Manifestaciones clínicas.**

La mayoría de los animales infectados no muestran cuadros clínicos y son asintomáticos, pero una minoría desarrolla signos clínicos (30-40%) (21). La encefalomiелitis (paresia progresiva) ocurre sobre todo en cabritos de 2-6 meses de edad. Además, se puede observar cojera, ataxia, debilidad de los miembros con hipertonia e hipersensibilidad total. Es importante resaltar que no se presenta fiebre. El principal síndrome en cabras adultas es la poliartritis crónica, dolorosa y acompañada por sinovitis y bursitis. Los signos clínicos tempranos incluyen la distensión de la cápsula y un grado variable de cojera. Los carpos son los más afectados y aunque el curso de la enfermedad es lento, siempre es progresivo. En las últimas etapas, las cabras pueden caminar con sus miembros anteriores doblados o llegar a permanecer hincadas, pero siguen teniendo buenos reflejos. Los animales infectados también pierden condición física y tienden a tener capas gruesas con pelo hirsuto. En casos severos hay agalactia en el parto, consecuencia de que la glándula mamaria presente una mastitis intersticial, para luego provocar una induración de la glándula (ubre de madera) y la producción de leche puede disminuir (56).

En el caso de borregos la forma pulmonar se presenta en animales adultos, siempre después de los dos años de edad. La signología clínica suele empezar de manera insidiosa, es decir, de manera lenta, progresiva y no evidente, de tal manera que los primeros signos clínicos suelen escaparse del control clínico. La forma mamaria en ovejas pasó desapercibida hasta que fue descrita a mediados de los años setenta y posteriormente cobró la importancia que merecía en estudios realizados en los años ochenta y noventa. Dicha presentación clínica se observa normalmente en animales de 3-5 años, pero puede aparecer en animales de tan sólo un año de edad, presentándose como una mastitis de tipo indurativa crónica. La forma nerviosa de la enfermedad es esporádica y ocurre en animales mayores de dos años de edad. Los signos clínicos más destacados son la incoordinación de movimientos, que llega a causar ataxia del tercio posterior, progresando hacia el tercio anterior para terminar finalmente con los animales en decúbito, postración e incapacidad para levantarse del suelo (5).

### **Lentivirus: características generales.**

El género Lentivirus no oncogénico pertenece a la familia Retroviridae, sub-familia Orthoretrovirinae. Los retrovirus se caracterizan por la capacidad de transcribir inversamente el ARN viral a ADN de doble cadena (dsDNA) a través de la acción de la transcriptasa reversa (TR) (2).

El género Lentivirus incluye al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS), el Virus de la Inmunodeficiencia Bovina (VIB), el Virus de la Inmunodeficiencia Felina (FIV), Anemia Infecciosa Equina (VAIE) y los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) (2).

Los Lentivirus se componen aproximadamente de 60% de proteína, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN. Los viriones tienen un diámetro de 80 a 100 nanómetros (nm). En el interior de la nucleocápside (NC) se encuentra el genoma, así como cerca de 30 moléculas de TR con simetría helicoidal, la proteasa (PR) y la integrasa (IN). Rodeando a la NC se encuentra la cápside (CA) de morfología icosaédrica y con cerca de 60 nm de diámetro. Ésta se haya rodeada por una capa de proteína de matriz (MA). Finalmente, el virión presenta una envoltura externa compuesta por una bicapa de lípidos que contiene la proteína de transmembrana (TM) y la proteína de superficie (SU), desde la cual se proyectan hacia el exterior protuberancias (peplómeros) de glicoproteínas. Los Lentivirus presentan 72 peplómeros, cada uno con 10 nm de longitud de forma ovoide en la parte distal (3).

Todos los Lentivirus tienen la misma organización genética base, el genoma de los provirus presentan una zona no codificante (*LTR*), en ambos extremos finales. Entre las *LTRs* se encuentran tres genes estructurales: *gag* (codifica proteínas como la nucleocápside, cápside y matriz), *pol* (codifica proteínas de transcriptasa, proteasas e integrasas) y el gen *env* (genera proteínas como la de transmembrana y la glicoproteína de superficie de la envoltura). Además, los Lentivirus codifican genes accesorios, los cuales varían según la especie, de acuerdo a sus características, la presencia o ausencia (e.g.: *vif*, *rev*, *vpr-like*, están presentes en los lentivirus de pequeños rumiantes; adicionalmente el VIH incluye los genes *vpu*, *vpr-like*, *nef* *yvpx* (2, 20).

A diferencia de otros retrovirus, el ADN proviral es transcrito en el núcleo de la célula, en donde se producen los genomas virales. Las células infectadas contienen pocas (o al menos una) copias del provirus integradas en el ADN celular del huésped. El resto de las moléculas virales de dsDNA lineal (100-200 copias) que se encuentran en el citoplasma de la célula infectada podría estar vinculado a los efectos citolíticos que algunos Lentivirus presentan, los cuales no son observados en células que son infectadas con oncovirus (2).

En términos generales, los LVPR han sido divididos en 5 grupos genéticos distintos A, B, C, D y E, y a su vez, estos han sido divididos en numerosos subtipos. Los grupos A y B son los predominantes e incluyen a las cepas originales del VMV y VAEC respectivamente. Hasta la fecha el genotipo A incluye al menos 15 subtipos (A1-A15), mientras que el genotipo B contiene sólo 3 subtipos (B1-B3). Esta alta diversidad genética está asociada con cambios en el fenotipo citopático, el tropismo celular y la patogenicidad de cepas de LVPR (9). Con excepción de los genotipos C, D y E que parecen ser restringidos geográficamente a áreas limitadas, los genotipos A y B han sido descritos en todo el mundo (10, 24).

### **Ciclo de infección.**

Entrada a la célula: al entrar en contacto con una célula permisible, las partículas víricas se fusionan con la membrana celular a través del anclaje de los ligandos presentes en los peplómeros con los receptores celulares, que aunque desconocidos en el caso de este virus, parecen ser de tipo proteoglicano. A continuación, la nucleocápside es liberada al citoplasma en donde comienza el proceso de retrotranscripción (5).

Transcripción: la replicación de los retrovirus es un fenómeno biológico singular que suele recibir una atención especial en los tratados de biología molecular, ya que, además de su singularidad biológica, proporciona una herramienta poderosa de introducción de genes en los organismos animales (5).

La retrotranscripción que tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas resulta extremadamente compleja y sólo es posible gracias a la capacidad de dar saltos a lo largo de la molécula matriz de ARN de la retrotranscriptasa inversa. Esta capacidad parece depender en buena parte del papel catalítico que juegan las proteínas de la nucleocápside. La simple copia de extremo a extremo que se puede reproducir *in vitro* mediante RT-PCR no tiene nada que

ver con la transcripción inversa natural. Para comprenderla, es necesario conocer la estructura del genoma vírico (5).

El genoma de los retrovirus en la partícula vírica es una cadena de ARN con dos subunidades idénticas que se encuentra rematada en ambos extremos por terminaciones que son parte de la LTR 5'U3-R y U5-R3'. El proceso comienza con el cebado por parte de un oligonucleótido de tARN presente en la partícula vírica en el extremo U5. A partir de aquí, y todavía en el citoplasma de la célula infectada, la retrotranscriptasa comienza a transcribir el ARN en ADN hasta formar una copia. En cada extremo se encuentra una llamada repetición terminal larga (LTR) formada por la secuencia U5-R-U3. Dado que el paso final de la copia de ARN a ADN conlleva a una pseudocircularización, parece ser bastante común la formación de subproductos en forma de genomas circulares con una o dos LTR's, que, aunque sin capacidad funcional tienen un gran interés para aplicaciones diagnósticas por PCR al incrementar el número de sustratos iniciales de la reacción (5).

Integración: las moléculas de ADN recién formadas, aparentemente con la ayuda de nucleoproteínas de la cápside, son capaces de atravesar la membrana nuclear y de penetrar en el núcleo, en dónde, consigue intercalarse en el ADN genómico celular gracias a la acción de la integrasa del virus. La integración parece ser un fenómeno esencialmente aleatorio en cuanto a la localización regional del punto de integración en el genoma celular. Esto no quiere decir que la integración sea un fenómeno inespecífico, más bien, que existen señales de integración distribuidas por todo el genoma, ya que las secuencias adyacentes al provirus son siempre muy similares. Por otro lado, parece constante el hecho de que en cada célula se integra sólo una única copia del genoma vírico, ya que no sólo se observa que cada virus produce solamente una doble cadena de ADN para integrarse en el genoma, sino que se produce un fenómeno de interferencia que impide que una célula ya infectada vuelva a reinfectarse con sus propios productos víricos, algo que acabaría rápidamente con la viabilidad de aquella. Finalmente, hay que señalar que la integración da lugar a un provirus completamente estable en el cromosoma y que se transmite a toda la descendencia de la célula infectada, como un carácter genómico más sin interferir de otra forma en la actividad del propio ADN celular (5).

Expresión: una vez integrado en el ADN nuclear, el provirus se comporta inicialmente como cualquier otra región del cromosoma y pasa a depender completamente de la maquinaria celular, de manera que sus productos se expresan solamente cuando lo hacen los de la región en la que se ha integrado. Precisamente, la principal función de las LTR del provirus es la de proporcionar las señales para la maquinaria de transcripción celular, que está basada en la actividad de la polimerasa de ARN II, la misma que se encarga de la síntesis del ARNm celular, la cual reconoce una serie de señales o familias de señales (TATA, SP1, NF, NRF, AP-1, etc.) como las correspondientes a genes celulares normales (5).

El uso de estos mecanismos significa que la producción vírica es relativamente baja en los primeros momentos de la infección. Para incrementar su eficiencia algunos retrovirus cuentan con unas proteínas llamadas transactivadoras, que son capaces de incrementar extraordinariamente los niveles de expresión del provirus. En el caso de los lentivirus, esta proteína es llamada TAR y está codificada por el gen *vpr-like*, la cual actúa en la zona normal de señales, esto es, en la porción R de la LTR (5).

Estos mecanismos moleculares que regulan la expresión del virus dependen a su vez de factores ambientales. Un factor que se reconoce de primera importancia es la maduración de las células, especialmente de la línea monocítica, en las que el virus se integra en el momento de la infección, pero en las que no se expresa hasta su maduración a macrófagos (5, 21).

Síntesis, ensamblaje y maduración: las proteínas víricas se sintetizan en dos localizaciones distintas y a partir de dos unidades distintas de ARNm. La mayor parte de las proteínas codificadas por los genes *gag* y *pol* se sintetizan en los polirribosomas libres en el citoplasma celular a partir de una molécula completa de ARN y comprenden las proteínas de la cápside y las enzimas víricas que quedan constituidas como un precursor proteico de *gag*. El resto, las proteínas de la envoltura (gen *env*) se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso, de manera que quedan unidas a la estructura bicapa de la membrana de éste. El mecanismo de ensamblaje no se conoce en detalle, pero se asume que el precursor *gag* se une por su extremo terminal C (futura proteína de NC) con el ARN genómico, por su región media (futura proteína de CA) con otras proteínas y por extremo terminal N (futura proteína de MA) con la membrana celular en la que comenzaría a desarrollarse el fenómeno de gemación característico de los Lentivirus. Al mismo tiempo, las proteínas de los pepllos ya integradas en la estructura de la membrana

celular del retículo endoplásmico rugoso se irían incorporando a este conjunto hasta que finalmente queda completa la estructura vírica inmadura. Sólo a partir de este momento, y por acción de la proteasa, se produce la maduración final de los precursores proteicos que confiere la capacidad de infectar a las partículas virales. Cualquier alteración de esta secuencia o de sus componentes puede dar lugar a partículas víricas más o menos completas, pero que carecen de poder infectante (5).

### **Tropismo celular de los LVPR.**

El mayor tropismo celular de los LVPR es hacia células de la línea monocito/macrófago y células dendríticas. Sin embargo, se ha demostrado que otros tipos de tejidos pueden infectarse y actuar como reservorio del virus. Estas fuentes adicionales incluyen células epiteliales de glándula mamaria que es una importante fuente de células y virus libre para la transmisión de LVPR de madres a sus crías. Otras células importantes en la patogenidad susceptibles a infectarse pueden incluir células epiteliales, células de la microglía, células del aparato reproductor en hembras y machos, aunque es difícil establecer si la detección del antígeno viral o ácido nucleico indica infección o la aceptación (permisibilidad) de productos virales por estas células (59). Se han propuesto diferentes moléculas candidatas que funcionarían como receptores en la célula, que incluyen: un proteoglicano asociado a membrana 30 kDa sustituido con una cadena de glicosaminoglicano de condroitín sulfato; moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II), dado que la preincubación con antígenos del CMH II inhiben la infección por VMV y ésta no es inhibida por antiuerpos específicos frente antígenos del CMH II; las moléculas CD4 y CXCR4 que han sido propuestas como componentes auxiliares del receptor para el VMV pues facilita los eventos de fusión de membrana; y un complejo formado por tres proteínas de membrana de 15, 30 y 45 kDa identificadas como proteínas de unión al VMV. Sin embargo ninguna de estas moléculas se ha establecido como el receptor principal. Al parecer los LVPR utilizan diferentes receptores celulares (3).

El tropismo de LVPR depende de la interacción hospedero-virus en los diferentes niveles en que ocurre: celular (en las fases de receptor/entrada, pre-integración, integración, post-integración del genoma viral en el ADN del hospedero), órgano/tejido u hospedero (individuo/raza/especie) (7).

*In vivo*, la infección permanece latente hasta que el monocito, la principal célula diana del LVPR, actúa como un “caballo de Troya” para propagar el virus en el cuerpo diferenciándose en macrófago desencadenando la transcripción viral. *In vitro*, una diferencia clara en la replicación viral ha sido encontrado acorde con el origen del tejido. Los virus aislados a partir de células de cerebro se replican rápidamente en comparación con aislados a partir de células de pulmón; esta diferencia está relacionada con las diferencias en las regiones *env* y *LTR* del virus (23).

El uso del receptor de la célula explica, al menos en parte, diferentes patrones de restricción por el hospedero a los LVPR. La alta variabilidad de la proteína *env* puede ser debida a su interacción con el sistema inmune y a la generación de virus mutados que evaden dicha interacción y escapan. Por lo tanto, los cambios en este gen pueden afectar la capacidad del virus para unirse al receptor de la célula (s) diana y co-receptor(es). Diferencias en la permisividad han sido encontradas *in vitro*, en particular en líneas celulares heterólogas de diversas especies (pollo, hámster, humano, mono y codorniz), las cuales son permisivas a la infección por LVPR. En el caso de las células de ovario de hámster chino resultaron ser permisivas a dicha infección. Los lentivirus de pequeños rumiantes son fenotípicamente muy variables en las células de origen homólogo (de pequeños rumiantes) con respecto a la capacidad de replicación *in vitro* y la generación de efectos citopáticos. Con frecuencia, los aislados a partir de borregos son clasificados fenotípicamente como rápido/alto, ya que se replican rápidamente, además inducen a la formación de sincitios y/o lisis celular y cuando se titulan los sobrenadantes tienen títulos muy altos. En contraste, aislados a partir de cabras son de replicación bajos/lentos y con generación de títulos bajos (2).

### **Vías de transmisión.**

Los LVPR son transmitidos tanto por calostro y leche como por aerosoles, aunque los mecanismos involucrados no se conocen por completo. También se ha reportado que las secreciones de órganos diana que contienen macrófagos infectados representan una fuente potencial de infección. Además del calostro y de la leche, el LVPR ha sido detectado en secreciones nasales, saliva, orina y semen (11,15, 16).

### **Transmisión entre especies.**

Originalmente, el VMV y el VAEC se clasificaban en distintas especies virales, restringidas a sus respectivos hospederos. Los lentivirus de pequeños rumiantes formaron dos clases o grupos distintos genéticamente. Los virus aislados a partir de borregos han sido relacionados al VMV y los aislados a partir de cabras refieren ser, en su mayoría, al VAEC. Sin embargo, conforme se han caracterizado más secuencias, ha sido más evidente la variabilidad genética de estos virus, lo que hace más compleja y extensa su evolución filogenética de lo que originalmente se pensaba. La clasificación de los LVPR basada en el origen de especie puede no ser muy útil desde un punto de vista genómico y filogenético, ya que la construcción de árboles filogenéticos demuestra la transmisión entre especies (8).

La recombinación es un mecanismo complementario de la variación genética, el cual puede armar combinaciones genéticas que resultan beneficiosas más que la mutación por sí sola. Las inserciones o deleciones en el genoma de los lentivirus son muy frecuentes debido a las altas tasas de replicación de los mismos. Juntos, estos mecanismos crean una rápida generación de poblaciones virales genéticamente diversas que a su vez están sometidas a las presiones de selección de los factores de restricción del hospedero y de la respuesta inmune (29).

La identificación de nuevos genotipos y subtipos de LVPR amplían significativamente su genética y la heterogeneidad antigénica, es probable que esto favorezca la infección de un amplio espectro de células huésped (13). Por otro lado, las infecciones dobles (co-infecciones o súper infecciones) son situaciones esenciales para eventos de recombinación. Las infecciones entre especies pueden ocurrir en animales que viven bajo condiciones naturales. Estudios previos han demostrado clara evidencia de la recombinación entre los genotipos A/B en el gen *env* en una cabra infectada. Cuando una célula del hospedero es co-infectada con dos o más diferentes genotipos de LVPR, dichos genomas pueden co-empaquetarse dentro de la progenie viral. Un evento de recombinación puede tener lugar como resultado del co-empaquetado de dos copias del genoma de ARN en cada virión replicado. La influencia de esta evolución genética sobre las propiedades biológicas de los LVPR puede dar lugar a importantes cambios de adaptación en el contexto de la patogénesis y la transmisión de dicho virus (9). Aunado a lo anterior, es importante resaltar que no sólo se ha demostrado la

presencia de LVPR en rumiantes domésticos, sino también en especies de vida libre (por ejemplo cérvidos) los cuales pueden actuar como potenciales reservorios del virus (13).

### **Diagnóstico.**

Un diagnóstico basado en la signología clínica que pudiera presentar un animal infectado por LVPR resulta complicado debido a que los cuadros clínicos pueden ser asociados a otros agentes etiológicos, Además, el curso de la enfermedad es de tipo crónico por lo que se esperaría que la aparición de la signología ocurriera después de meses o incluso años (11).

Otras consideraciones importantes en el diagnóstico de la enfermedad son la heterogeneidad del virus, la baja carga viral en muchas ocasiones y la lentitud de seroconversión de los animales que limitan la sensibilidad de las pruebas, por lo que una combinación de técnicas, mejoraría la detección de animales infectados (19).

Basado en ello los métodos diagnósticos más certeros son los realizados ya sea por pruebas serológicas o de biología molecular. Éstas podrían dividirse en dos categorías: las utilizadas como pruebas tamiz (IDGA y ELISA) y pruebas complementarias (RIA, WB y PCR) (12).

#### **Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA).**

Es una técnica que se utilizó en los 80s de manera rutinaria; de acuerdo a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) se utiliza como prueba de referencia. La IDGA utiliza como antígeno el virus completo concentrado de sobrenadantes de cultivos celulares infectados, los cuales son lisados con detergentes y otros tratamientos para posteriormente semipurificarlos. Las proteínas utilizadas como antígenos son proteínas de cápside y de superficie (12). Una de las ventajas que ofrece la realización de esta prueba es su alta especificidad, cercana al 100%, pero se ha demostrado que aunque su correlación con los resultados de algunas pruebas de ELISA es buena, tiene una sensibilidad inferior a la que presentan otros métodos diagnósticos más recientes, como las pruebas de ELISA, WB o la técnica de PCR (5).

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).

Actualmente hay más de 30 publicaciones que describen técnicas de ELISA para detectar la infección por LVPR. Estas pueden ser ampliamente categorizados en ensayos que utilizan virus completos o proteínas recombinantes (o péptidos sintéticos) como antígenos, también existen ELISAS de tipo competitivo basadas en el uso de anticuerpos monoclonales antivirales. La sensibilidad y especificidad de las pruebas de ELISA han sido publicadas junto con algunos otros datos de calidad de las pruebas (12). Hoy día son las más utilizadas para el diagnóstico de la infección por LVPR, ya que resultan ser más sensibles y con valores de especificidad aceptables en comparación con otras pruebas como IDGA, así como por el bajo costo por animal y en comparación con técnicas como PCR o WB son más sencillas de realizar (22).

Pruebas suplementarias.

Técnicas diagnósticas como el Western Blot (WB) o Radioinmunoensayo (RIA) no son utilizadas como pruebas tamiz pues consumen mucho tiempo en su realización y son laboriosas. A pesar de esto, son comúnmente utilizadas como “pruebas de oro” para la valoración de técnicas de diagnóstico. En el caso del WB resulta más confiable al apreciar diversas bandas que coincidan con los pesos moleculares de las proteínas que conforman el virus que una reacción colorimétrica como sucede en el caso de un ELISA.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir de los años noventa, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha utilizado como una prueba para identificar la infección de LVPR tanto en células de la sangre como en diferentes tejidos. El hecho de que el genoma de los LVPR sea de ARN supone un problema para la realización de una PCR convencional, por lo tanto, la aplicación de la PCR a la detección de virus libre de LVPR exige la realización de una reacción previa de transcripción inversa que produzca el sustrato sobre el que pueda iniciarse la reacción propiamente dicha. A esta variante se le denomina RT-PCR. Este sistema se utiliza de manera convencional en la detección de VIH en medicina humana, debido a la abundancia del virión en forma libre en las fases de viremia, no así en el caso de los lentivirus de pequeños rumiantes, debido a la baja cantidad de partículas víricas libres en los tejidos y fluidos corporales. Por lo tanto, el interés

se centra en la propiedad que tiene los lentivirus, que es su integración (provirus) en el genoma de las células huésped. Así es como se han desarrollado técnicas de PCR orientadas a la amplificación de diversas regiones del genoma que resultan de gran ayuda para el posterior análisis de secuencias generadas gracias a esta técnica. Una región ampliamente utilizada para mejorar la sensibilidad de la técnica es el segmento LTR ya que se encuentra repetido en todo el genoma vírico. Una ventaja del uso de esta técnica es que detecta animales infectados y los diferencia de los que presentan anticuerpos calostrales, que darán un resultado positivo a pruebas serológicas.

### **Control.**

En la actualidad existen diversas formas de control de la enfermedad, encaminadas en un inicio, a disminuir la prevalencia de la enfermedad hasta declarar el rebaño libre de LVPR. Algunas de las ventajas que se obtienen al declarar libre el rebaño son: evitar pérdidas económicas debido a la infección, añadir un valor extra a la venta de pie de cría y evitar la diseminación de dicha enfermedad a nivel nacional e internacional (3,60).

Todas estas medidas se fundamentan en las vías más comunes de transmisión de la enfermedad. La más común es por la ingesta de calostro y leche contaminada. Algunas medidas que se sugieren son separar a las crías de las madres al momento del parto y alimentar a dichas crías con calostro pasteurizado o sustituto (calostro de vaca). También se ha implementado la eliminación de animales viejos seropositivos, reemplazándolos por animales libres de la enfermedad. Algunos estudios sugieren como fuente de infección la vía horizontal, principalmente aerosoles; esto es más común en explotaciones intensivas. En los últimos años se ha demostrado la presencia del virus en células, plasma y tejidos del tracto genital en sementales ovinos y caprinos, lo que sugiere la posibilidad de transmisión venérea, ya sea de forma natural o por inseminación artificial. Recientemente se ha sugerido el uso de semen PCR-negativo para evitar el riesgo de infección por esta vía. El riesgo de transmisión de LVPR por transferencia de embriones se considera poco relevante y por vía intrauterina se estima que es muy limitada (57).

.Siempre debe tenerse en cuenta la aplicación de cualquiera de las medidas antes mencionadas en ambas especies, considerando la transmisión entre ellas. Muchos de los programas de erradicación han fracasado debido a la falta de inclusión de cualquiera de las dos especies (3).

En la actualidad, no se ha logrado una vacuna eficaz frente a los LVPR por varias razones: a) los mecanismos de patogenia/inmunidad frente al virus no están bien definidos, b) la elección e identificación de los antígenos protectores se encuentran aún en estudio y c) la variación genética y antigénica del virus es elevada (3).

Dado que la enfermedad no tiene cura el tratamiento se enfoca en disminuir el cuadro clínico que pudiera presentar cualquiera de las dos especies.

### **Situación de la enfermedad en México.**

En el caso de la infección de cabras en México, se reconoce desde los años 80s; conforme se han adquirido diversas pruebas comerciales de diagnóstico se han realizado más estudios en diferentes Estados de la República para determinar la infección demostrando que la infección va en aumento. Los primeros datos de evidencia serológica a la infección por Lentivirus caprinos fueron descritos en 1983. En 1984 en un estudio que involucró a varios países incluyendo México; menos del 10% de infección se identificó en un grupo de 3729 sueros caprinos con la prueba de IDGA. Por el contrario, en el mismo año se evaluaron 800 sueros de animales provenientes de los estados de Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Querétaro y Sonora con la prueba de IDGA, encontrando un 28% de seropositividad. Los últimos estudios que han involucrado poblaciones grandes de caprinos y el uso de técnicas de ELISA competitiva son, en primer lugar, el realizado con más de 1211 caprinos residentes en el altiplano central identificando una seroprevalencia de 39.55% en los caprinos de raza pura o de animales que tuvieron convivencia con cabras importadas y, en segundo lugar, el descrito en 2011 con un total de 488 sueros de machos caprinos de 7 estados de país, encontrado seropositividad en los estados de Querétaro con un 55.55%, Coahuila con un 17.86%, Estado de México con un 16.6%, Guanajuato con un 10.50%, Hidalgo con un 8.8%, Puebla con un 4.3% y Oaxaca con cero por ciento (53).

En el caso de los ovinos, la enfermedad ha sido reconocida oficialmente en el 2016 en el acuerdo mediante el cual se dan a conocer las enfermedades, plagas exóticas y endémicas de

notificación obligatoria. Sin embargo, existe una serie de trabajos desde 1983 en los cuales se demostró una seroprevalencia del 23% en un estudio que se realizó en el Estado de México y la Ciudad de México con 200 ovinos; en 2003 en distintos estados del país (Estado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Zacatecas) se demostró en 70 ovinos una seropositividad del 17% y en 2011 se identificaron ovinos seropositivos en el Estado de México, Jalisco y Chiapas. La importancia de estudiar la presencia de la infección en ganado ovino tomó mayor fuerza debido a que en 2007, 265 ovinos de distintas razas (Kathadin, Damara, Blackbelly, Pelibuey, Dorset, Hampshire, Dorper y Mestizos) exportados a Colombia fueron objeto de sacrificio por la detección de 17 animales seropositivos, lo que significó una pérdida de aproximadamente 3 millones de pesos. Con los estudios serológicos realizados hasta ahora en México se ha demostrado que las seroprevalencias han sido variables, lo cual depende principalmente de la población de estudio, de la densidad poblacional de la región, de la pureza, origen racial y de la técnica empleada (52).

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que es frecuente la crianza de borregos y cabras en rebaños mixtos en distintas regiones de México, además de que la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) ha sido reconocida recientemente en ambas especies en el país, es de relevancia la identificación y la frecuencia de transmisión de LVPR entre estas especies en sistemas de crianza conjunta, ya que en otros países se ha demostrado la transmisión de la infección entre ellas. Esto permitirá remarcar la importancia de establecer y generar estrategias de prevención que puedan reducir la transmisión en este tipo de rebaños.

## **HIPÓTESIS.**

Con el uso de ELISA´s comerciales y basadas en péptidos sintéticos como pruebas serológicas y PCR se podrá identificar la infección por LVPR en ovinos y caprinos que conviven en sistemas de producción.

## **OBJETIVO GENERAL.**

- Determinar la frecuencia de infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes en ovinos y caprinos que conviven en sistemas de producción ubicados en el estado de Sinaloa, mediante la presencia de anticuerpos y/o ADN proviral.

## **Objetivos específicos.**

- Identificar ovinos y caprinos infectados por LVPR mediante el uso de pruebas serológicas en rebaños donde conviven ambas especies.
- Detectar la presencia de ADN proviral en ovinos y caprinos utilizando la técnica de PCR.
- Comparar la frecuencia de detección de animales positivos y negativos entre las pruebas de detección utilizadas.

## METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán ubicada en la carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

### **Población de estudio.**

La población de estudio consistió de 142 animales (73 ovinos y 69 caprinos) provenientes de 4 rebaños ubicados en el municipio de Culiacán, Sinaloa. Los rebaños se distribuyeron de la siguiente manera tabla 1.

**Tabla 1.** Distribución de ovinos y caprinos por rebaño.

<b>Rebaño</b>	Ovinos	Caprinos	Total
<b>Rebaño 1</b>	15	15	30
<b>Rebaño 2</b>	30	21	51
<b>Rebaño 3</b>	17	14	31
<b>Rebaño 4</b>	11	19	31

Se realizó un muestreo por conveniencia con productores cooperantes, observando en el rebaño 2 signos clínicos sugestivos de la enfermedad (artritis a nivel de carpos), mientras que en los otros tres no existía historial de signos clínicos relacionados con la infección por LVPR (54), en dichos rebaños ambas especies se encuentran en convivencia. El muestreo de los animales fue sin distinción de sexo y raza, pero mayores de 6 meses de edad.

### **Colección de muestras.**

Se obtuvo muestra de sangre completa (10 ml) por punción de la vena yugular utilizando tubos estériles con heparina como anticoagulante (Vacutainer®). Una vez tomada la muestra se conservó en refrigeración y así fue enviada por medio de mensajería al laboratorio de virología para su posterior procesamiento. La sangre fue centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos para separar los leucocitos de sangre periférica y el plasma, los cuales fueron almacenados en microtubos de 2.0 ml a una temperatura de -70 °C hasta su uso.

## **Detección de anticuerpos contra LVPR.**

Se utilizaron tres tipos de ELISA, los cuales se agruparon de la siguiente manera:

ELISAS comerciales.

### **VMRD**

Descripción general:

Este ELISA de tipo competitivo detecta anticuerpos contra el Virus de la Artritis Encefalitis Caprina en suero de cabra o el virus de Maedi Visna en suero de oveja. Los anticuerpos contra el VAEC/VMV presentes en la muestra inhiben la unión del anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno viral (proteína de superficie: gp135) del VAEC marcado con peroxidasa de rábano (HRP) que recubre los pozos de la placa. La unión del anticuerpo monoclonal marcado con HRP se detecta y cuantifica debido a la adición del sustrato y el subsecuente desarrollo de un producto colorido. El desarrollo de un color fuerte indica poca o nula inhibición del anticuerpo monoclonal marcado con HRP y, por lo tanto, la ausencia de anticuerpos contra el VMV/VAEC en la muestra de suero. La ausencia de color, debido a la inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal con el antígeno, indica la presencia de anticuerpos contra el VAEC/VMV en la muestra. La longitud de onda a la que se mide es de 650 nm.

### **ERADIKIT**

Tamizaje:

De manufactura italiana, la placa está recubierta con una mezcla de tres antígenos recombinantes derivados de diferentes genotipos, los cuales pertenecen a proteínas de la cápside y matriz del virus. Este ELISA es de tipo indirecto y se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (ver apéndice).

## Genotipado:

Una vez realizada la fase de tamizaje, las muestras de suero positivas se probaron en una placa de genotipado, que tiene como opción la identificación del genotipo A o B. La placa está recubierta con tres subunidades recombinantes de regiones inmunodominantes que derivan de la proteína de cápside.

ELISA´s basadas en péptidos sintéticos (caseras).

Basadas en péptidos sintéticos derivados de la proteína de superficie para la detección del genotipo A (126 M2) y B (126 M1). Dichas ELISAS son de tipo indirectas, es decir el antígeno (en este caso el péptido) se encuentra pegado a la placa, la presencia del anticuerpo en el suero problema es detectado por la proteína G, la cual está acoplada a peroxidasa, cuando se agrega el sustrato (ABTS), la enzima produce un color proporcional a la cantidad de anticuerpo unido la que es medida a una longitud de onda de 405 nm espectrofotómetro (50).

## **Extracción de ácido nucleico.**

Una vez detectada la presencia de la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes por serología, se extrajo el ADN total de los leucocitos de sangre periférica de animales seropositivos usando el kit comercial FavorPrep™ TissueGenomic DNA Extracción Mini Kit (Favorgen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue cuantificado y almacenado a -20°C hasta su uso.

## **Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

Para el diseño de los iniciadores se tomó en cuenta la región *LTR* (Long Terminal Repeat). Para ello se seleccionaron secuencias reportadas en el GenBank, y se analizaron con programas bioinformáticos como BioEdit y Primer3 Input, en el diseño de los iniciadores fue considerado el uso de posiciones degeneradas para detectar más de un genotipo (A y B) o varios subtipos (A1-A7 y B1-B3) (Tabla 2). Una vez diseñados se mandaron a sintetizar a Eurofins®.

**Tabla 2.** Características de los iniciadores diseñados que hibridan en una región del gen LTR.

Nombre	Secuencia	Tamaño del producto
CesLTR Fw	TCASKGTGACAAAATGTAA	291 pb.
CesLTR Rv	TGTTGCACAGAWTWAGGRACG	

La mezcla de los componentes para la reacción de PCR fue: Buffer 1x (KAPA BIOSYSTEMS), MgCl<sub>2</sub>: 3.0 Mm (KAPA BIOSYSTEMS), dNTPs 230 μM (KAPA BIOSYSTEMS), iniciadores 600 nm de cada uno, Taq Polimerasa 5 U/μl (KAPA BIOSYSTEMS), ADN 100 ng. por reacción en un volumen final de 30 μl. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron: Desnaturalización inicial de 95°C por 5 min. (1 ciclo); seguido de 45 ciclos a 95°C por 30 seg.; hibridación de 53°C por 30 seg. y extensión de 72°C por 40 seg., por ultimo una extensión final de 72°C por 7 min. (1 ciclo).

Una vez obtenidos los productos de PCR fueron cargados y separados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (85 volts por 50 min) y posteriormente visualizados en un transiluminador con luz UV. para su posterior análisis.

Como control positivo se utilizó cDNA obtenido a partir de sobrenadantes de cultivos celulares infectados con LVPR previamente obtenidos en el laboratorio.

Para asegurar la calidad del ADN, algunas muestras fueron sometidas a una PCR para amplificar un fragmento de un gen constitutivo, los iniciadores fueron diseñados en el laboratorio y se eligió el gen más estable y frecuentemente detectado SDHA (Succinato deshidrogenasa) (58).

### **Análisis de resultados.**

Una vez obtenidos los datos de positividad en cada una de las técnicas se analizaron y compararon los resultados, así como la frecuencia de infección por LVPR en ambas especies (ovinos y caprinos).

## RESULTADOS.

Serología comercial.

De los 142 animales evaluados mediante esta prueba se obtuvieron los siguientes resultados, detallados por especie y técnica de ELISA en las tablas 3 y 4:

**Tabla 3.** Reactividad de plasmas de ovinos a las técnicas de ELISAs comerciales.

Rebaño	Positivos		Negativos		Total
	VMRD	ERADIKIT	VMRD	ERRADIKIT	
1	0	1	15	14	15
2	0	0	30	30	30
3	0	2	17	15	17
4	0	1	11	11	11

**Tabla 4.** Reactividad de plasmas de caprinos a las técnicas de ELISAs comerciales.

Rebaño	Positivos		Negativos		Total
	VMRD	ERADIKIT	VMRD	ERADIKIT	
1	0	0	15	15	15
2	17	17	4	4	21
3	1	1	13	13	14
4	1	1	18	18	19

Los resultados obtenidos en ERADIKIT en la fase de genotipado por especie se muestran en la tabla 5 y 6:

**Tabla 5.** Distribución de ovinos seropositivos por genotipo de LVPR.

Rebaño	Genotipo A	Genotipo B	Co-infección	Indeterminado
1	0	0	0	1
2	0	0	0	0
3	0	1	0	1
4	0	1	0	0

**Tabla 6.** Distribución de caprinos seropositivos por genotipo de LVPR.

Rebaño	Genotipo A	Genotipo B	Co-infección	Indeterminado
1	0	0	0	0
2	6	1	3	6
3	0	0	1	0
4	0	1	0	0

Se identificó la misma cantidad de caprinos seropositivos al genotipo A e indeterminados, mientras que en los ovinos los que resultaron seropositivos fueron al genotipo B (Tabla 5 y 6).

ELISAs basados en péptidos sintéticos (caseras)

Ovinos

**Tabla 7.** Reactividad de plasmas de ovinos a las técnicas de ELISAs caseras.

Rebaño	Positivos		Negativos		Total
	126 M1	126 M2	126 M1	126 M2	
<b>1</b>	0	2	15	13	15
<b>2</b>	0	1	30	29	30
<b>3</b>	1	1	16	16	17
<b>4</b>	1	5	10	6	11

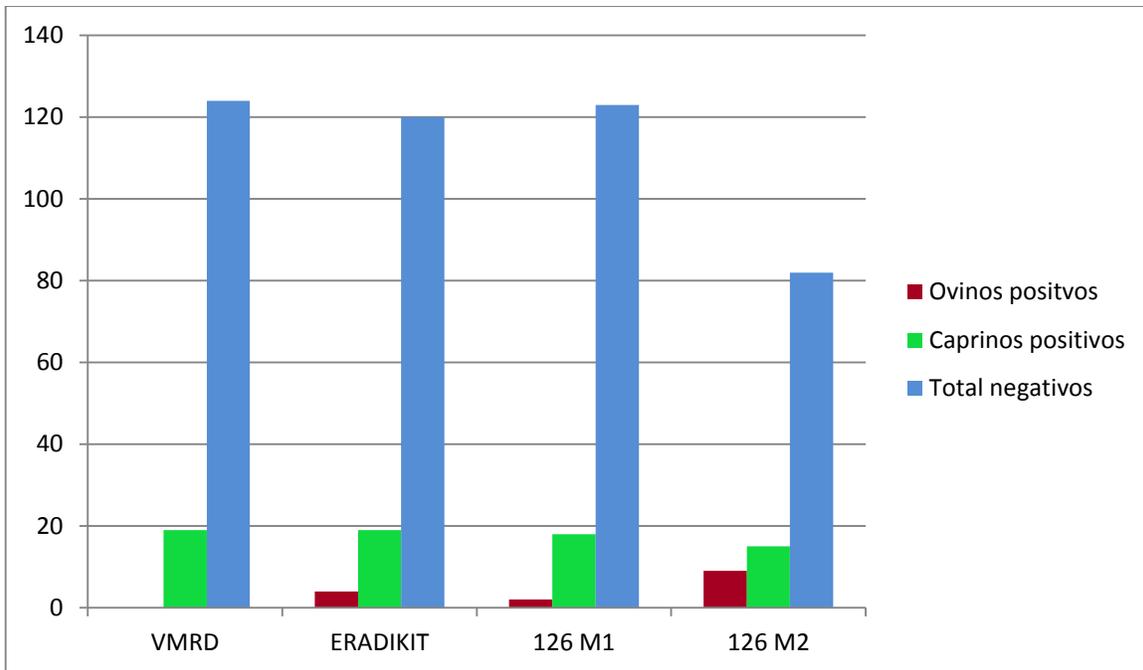
Caprinos

**Tabla 8.** Reactividad de plasmas de caprinos a las técnicas de ELISAs caseras.

Rebaño	Positivos		Negativos		Total
	126 M1	126 M2	126 M1	126 M2	
<b>1</b>	0	2	15	13	15
<b>2</b>	16	11	5	10	21
<b>3</b>	1	0	13	14	14
<b>4</b>	1	2	18	17	19

El ELISA 126 M2 fue el que detectó más animales positivos y detectó los mismos animales que resultaron positivos al genotipo A en ERADIKIT. En el caso de ovinos se detectaron la mayor población de positivos de ésta especie en el último rebaño, como se muestra en las tablas 7 y 8.

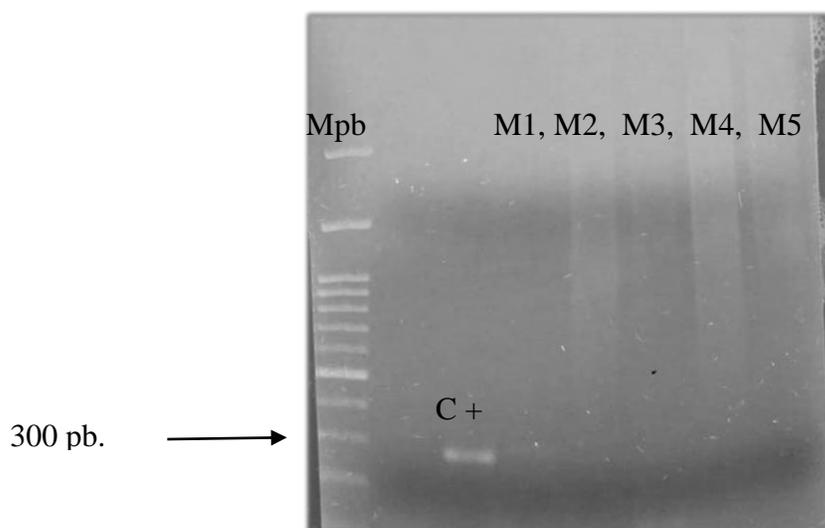
Como resultado final tenemos que la técnica que resultó ser más sensible fue la ELISA 126 M 2 como se muestra en la siguiente gráfica (Figura 1).



**Figura 1.** Comparación de resultados obtenidos en los ELISAS comerciales y caseros que detectan anticuerpos contra LVPR.

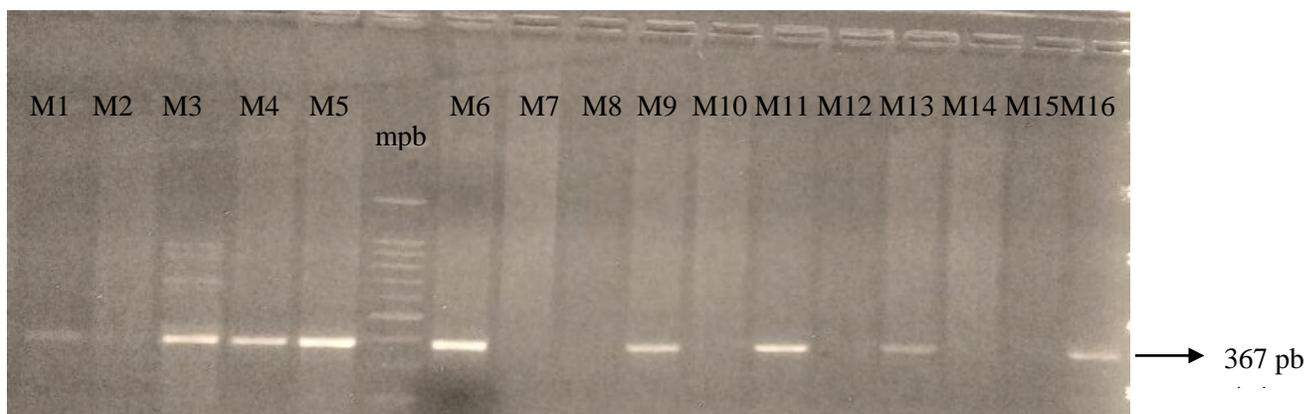
## PCR

Ninguna de las muestras evaluadas fue positiva a la PCR (ver figura 2). Para descartar un problema de integridad del ADN extraído se realizó la PCR del gen constitutivo (ver figura 3).



**Mpb= Marcador de pares de bases; M= Muestras**

**Figura 2.** Visualización de un gel de agarosa con productos obtenidos en la PCR de LTR de diferentes muestras.



**Mpb= Marcador de pares de bases; M=Muestras**

**Figura 3.** Visualización de productos de PCR en un gel de agarosa de un fragmento del gen constitutivo (SDHA).

## DISCUSIÓN.

Al paso del tiempo y con los diversos estudios que se han realizado, las estrategias para el diseño de ELISAS se han ido modificando con la finalidad de hacer más eficiente la detección de la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes en ovinos y caprinos. Al ser un virus altamente variable, se ha optado por utilizar más de una combinación de antígenos (ya sea más de dos péptidos, virus completos, proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales), obtenidos a partir de aislados de cepas tipo VAEC o VMV que involucran algunos subtipos virales conocidos. Esta puede ser la razón por la que los resultados obtenidos entre un kit de ELISA y otro pueden variar, no sólo por el antígeno/genotipo prevalente en la población de estudio, sino además por la especie (ovinos y caprinos) (18, 27, 37, 41), como se encontró en el presente estudio.

En el caso del ELISA de VMRD, el antígeno utilizado en la prueba es una proteína de superficie codificada por el gen *env*, aislado de una cepa tipo VAEC, lo que podría explicar que 19 cabras resultaran positivas a la prueba (27, 37) y que estos animales estuvieran infectados con un LVPR del genotipo B. Esto es apoyado con la identificación previa del genotipo B1 en caprinos de México (51). No sólo el antígeno juega un papel relevante en el diagnóstico, la composición genética también se tiene que considerar debido a que en ésta radica la variabilidad del virus en ciertas regiones (Gen *env*) y, por lo tanto, la composición antigénica (35, 42). Esta puede ser la razón por la cual difieren los resultados del presente estudio y los obtenidos en trabajos anteriores en los cuales se ha utilizado el ELISA de VMRD (38). Aunque este kit menciona que está diseñada para detectar la infección por LVPR en ambas especies (ovinos y caprinos) ningún ovino resulto positivo a dicha prueba. En trabajos como el de Sánchez et al., (2016) donde compararon más de un ELISA comercial incluyendo el VMRD para detectar la infección de LVPR en ovinos de 3 estados del país, obtuvieron resultados negativos con este kit comercial, mientras que en otras pruebas comerciales (ELITEST y CHEKIT) 7 ovinos fueron positivos en ambas técnicas (49, 39, 40).

Por otro lado, la prueba comercial de ERADIKIT se identificaron 4 ovinos positivos. La composición antigénica de este kit es diferente a VMRD ya que contiene péptidos antigénicos de las proteínas de cápside y matriz (Gen *gag*), lo que según los fabricantes podría asegurar la detección de un núcleo mayor de muestras. En contraste, los caprinos que resultaron

seropositivos con la prueba de ELISA de VMRD fueron los mismos que los identificados con ERADIKIT, lo que refuerza aún más la presencia del genotipo B presente en caprinos en el estado de Sinaloa (32, 33, 34, 61).

Las ELISAS basadas en péptidos sintéticos han cobrado relevancia debido a la facilidad con que se obtiene el antígeno (por medio de síntesis química), lo que representa una ventaja al obtenerse puro (en comparación de lisados de virus, en los cuales, proteínas ajenas al antígeno podrían interferir con el resultado). Además, se pueden evaluar varias secuencias peptídicas de regiones diversas del virus y a la larga resulta más barato el diseño de la técnica en comparación con montar sistemas en donde se obtengan proteínas recombinantes o cultivo de virus, etc. (31). En trabajos previos, los péptidos utilizados en el presente estudio han sido evaluados con buenos resultados, no sólo utilizando como muestra para la detección de anticuerpos el plasma, sino también en leche; además se ha demostrado la afinidad que cada péptido tiene para identificar animales infectados con el genotipo B (péptido 126 M1) o genotipo A (péptido 126 M2) (31,50). Los resultados obtenidos con estos péptidos mostraron reactividades diferentes por especie, identificando una mayor reactividad en caprinos para el péptido del genotipo B (rancho 2) y en el caso de los ovinos se encontró mayor reactividad con el péptido del genotipo A (rancho 4). Estudios relacionados al uso de antígenos que permiten identificar genotipos han demostrado que los antígenos derivados de virus del genotipo B presentan mayores reacciones cruzadas en comparación con los derivados del genotipo A (61). Esto explicaría la alta reactividad encontrada en los caprinos del rancho dos en ambas ELISAs de péptidos. Es importante mencionar que en dicho rebaño los caprinos presentaban cuadro clínico artrítico vinculado a la infección por lentivirus.

Los resultados de genotipificación obtenidos con el ELISA ERADIKIT identificaron en los animales de estudio los genotipos A y B. Para lograr esto la prueba se basa en el uso de un par de péptidos que derivan de la cápside. Uno de ellos deriva de una cepa viral aislada de ovinos en Islandia (tipo A), cuya secuencia es GNRAQKELIQGKLNEEAERWVRQNPPGPN, mientras que el segundo péptido se generó de una cepa italiana aislada de ovinos (tipo B), teniendo la secuencia GNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPPPA (35). En el extremo C terminal (subrayado) del péptido radica la diferencia de aminoácidos que identifican de forma específica cada genotipo (30). Del total de animales seropositivos identificados en este

estudio, fue posible establecer en 22 de ellos el genotipo por serología con al menos una de las pruebas serológicas utilizada; no obstante, no fue posible determinar el genotipo en 9 animales (7 caprinos y 2 ovinos). Esto podría indicar que el genotipo viral infectante no está relacionado con los genotipos presentes en la prueba (A y B), ya que es sabido que los lentivirus son altamente variables, lo cual está reflejado en los 23 subtipos genéticos descritos hasta el momento (43). También es posible considerar que estas variaciones podrían inducir un cambio en la secuencia de aminoácidos de los epítomos representados en las pruebas, lo que derivó en la incapacidad de generar reactividad para cualquiera de los dos genotipos. Otra explicación puede estar relacionada con la producción de anticuerpos en infecciones tempranas, los cuales son principalmente dirigidos contra proteínas expresadas por el gen *gag* (utilizadas en las placas de genotipificación de ERADIKIT), mientras que en infecciones tardías los anticuerpos presentes reconocen principalmente antígenos relacionados con el gen *env* (61). Esto se pudo demostrar dado que 8 de los 9 animales indeterminados fueron reactivos en al menos un ELISA de péptidos, los cuales son derivados de la proteína de transmembrana expresada por el gen *env* (31). Aunque fue posible identificar reactividades tanto para el genotipo A en caprinos y B en ovinos y caprinos, el de mayor frecuencia infectando a los caprinos fue el A, genotipo que por primera vez es descrito en el país, sin embargo es necesario realizar más estudios al respecto. También es importante resaltar caprinos identificados como coinfectados, es decir, el animal presentó reactividad a ambos genotipos, lo cual no es extraño y ha sido descrito en varios trabajos (45, 59, 63).

Contrario a las pruebas serológicas, la PCR no logró detectar ADN proviral en ninguna muestra. A diferencia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (también un Lentivirus con el cual el humano presenta fases de viremia en sangre, los LVPR no desarrollan una fase de este tipo, pero pueden permanecer integrados al genoma de la célula huésped (principalmente en monocitos) y en dónde la PCR resulta una herramienta de utilidad diagnóstica; en animales con infección reciente, es difícil detectar cantidades de provirus suficientes para que se identifiquen positivos cuando de sangre se trata, en el caso de tejidos donde haya algún tipo de cuadro clínico (mastitis indurativa, neumonía intersticial o inflamación de las articulaciones) y por tanto existen infiltrados de monocitos, las probabilidades de amplificar ADN proviral son altas. Algunos estudios en los cuales se utiliza la sangre como muestra separan los monocitos del resto del paquete leucocitario con FICOLL HYPaque, lo que asegura tener mayormente

representadas las células diana en estos animales. En el presente estudio no se realizó de esta manera por lo que probablemente podría ser un factor a considerar si los animales tuvieran cantidades bajas de provirus. Por otro lado, algunas de estas muestras no amplificaron al gen constitutivo, lo que indica que el ADN genómico no era de buena calidad y podría influir de manera negativa en el resultado. Hubiera sido de suma importancia haber obtenido animales positivos a PCR para posteriormente secuenciar y hacer un análisis filogenético de las estirpes virales presentes en los animales y correlacionar esta información con la obtenida en la genotipificación serológica.

En los últimos años los programas de erradicación de la enfermedad, principalmente en Europa, han tomado fuerza ya que las prevalencias son altas y los cuadros clínicos más evidentes, tanto en borregos como en cabras (25). Un problema que detectaron conforme se fueron implementado dichos programas es que rebaños que habían sido declarados libres de VAEC en el caso de las cabras, resultaron seropositivos cuando se evaluaba el status serológico de la enfermedad, estas granjas no sólo contaban con cabras, sino también con borregas lecheras, o bien se habían introducido cabras sin hacer una prueba previa (44). Con ayuda de herramientas de biología molecular y filogenia se ha demostrado cómo genotipos A y B circulan entre estas especies. Primero la infección se demostró de manera experimental infectando borregos con cepas VAEC o viceversa; hoy día los estudios se enfocan en rebaños en los cuales los animales conviven o bien comparten encierro en sus respectivos corrales (45, 48). No sólo el contacto directo (aerosoles, agua o alimento) puede favorecer este tipo de infecciones, sino también fómites o maquinas ordeñadoras, en el caso de rebaños lecheros de cabras y borregas (44 46). Algunos subtipos que se han identificado como circulantes en ambas especies son B1, B2, A3, A4 y A6 (17, 43). No sólo un subtipo puede involucrarse en la infección por LVPR, también infecciones duales donde se involucran subtipos distintos (14, 45,47). Por lo anterior, es de importancia que en programas de control y erradicación de esta enfermedad se incluyan ambas especies ya que cualquiera de ellas puede ser foco de infección para la otra, y particularmente en el país donde recientemente se ha reconocido Maedi Visna como una enfermedad endémica. A pesar de que pareciera que la infección no tiene gran impacto en los borregos, en cabras los cuadros clínicos comienzan a ser más frecuentes y probablemente en unos años podría pasar lo mismo con los borregos.

## **CONCLUSIÓN**

Se identificó por serología (comercial y casera) la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes en rebaños donde conviven ovinos y caprinos en el estado de Sinaloa.

Se detectó por serología los genotipos A y B en ambas especies, encontrando reactividad al genotipo A de LVPR en caprinos. Identificando por primera vez la posible presencia del genotipo A.

No se pudo identificar la presencia de ADN proviral por PCR.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Larruskain A. M., Jugo B. (2013). Retroviral infections in sheep and goats: Small Ruminant Lentiviruses and host interaction, *Viruses*, 2043-2061.
2. Minguijón E., Reina R., Pérez M., Polledo L., Villoria M., Ramírez H., Leginagoikoa I., Badiola J. J., García-Marín J. F., De Andres D., Luján L., Amorena B., Juste R. A. (2015). Small Ruminant Lentivirus infections and diseases, *Veterinary Microbiology* 181, 75-89.
3. Ramírez A. H. (2010). Contribución al diagnóstico y a la filogenia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes, Tesis Doctoral, Universidad Pública de Navarra, Instituto de Agrobiotecnología.
4. Peterhans E., Greenland T., Badiola J., Harkiss G., Bertoni G., Amorena B., Eliaszewicz M., Juste R., Kraßnig R., Lafont J.P., Lenihan P., Petursson G., Pritchard G., Thorley J., Vitu C., Mornex J. F., Pépin M. (2004). Routes of transmission and consequences of Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes, *Veterinary Research*, 35, 257–274.
5. Juste R. A., De la Concha A. (2001). “Maedi-Visna”, *Ovis*, 72, 9-26.
6. Blacklaws A. B. (2012). Small Ruminant Lentivirus: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35, 259– 269.
7. Ramírez H., Reina R., Amorena B., de Andrés D., Martínez H. A. (2013). Small Ruminant Lentiviruses: genetic variability, tropism, and diagnosis, *Viruses*, 5, 1175-1207.
8. Frasn M., Leboeuf A., Labrie F.-M., Laurin M.-A., Sohal S. J., L’Homme Y. (2013). Phylogenetic analysis of Small Ruminant Lentiviruses in mixed flocks: Multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats, *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 97–104.
9. Rachid A., Croise B., Russo P., Vignoni M., Lacerenza D., Rosati S., Kuzmak J., Valas S. (2013). Diverse host-virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats, *Journal of General Virology*, 94, 634–642.
10. Bertolotti L., Mazzei M., Puggioni G., Carrozza M. L., Dei Giudici S., Muz D., Juganaru M., Patta C., Tolari F., Rosati S. (2011). Characterization of new small

- ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin, *Journal of General Virology*, 92, 1923–1929.
11. De Andrés D., Klein D., Watt N. J., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Blacklaws B.A., Harkiss G. D. (2005). Diagnostic tests for Small Ruminant Lentiviruses, *Veterinary Microbiology*, 107, 49–62.
  12. Sanjosé L., Crespo H., Blatti-Cardinaux L., Glaria I., Martínez-Carrasco C., Berriatua E., Amorena B., De Andrés D., Bertoni G., Reina R. (2016). Post-entry blockade of Small Ruminant Lentiviruses by wild ruminants., *Veterinary Research*, 47.
  13. Gjerset B., Rimstand E., Teige J., Soetaert K., Monceyron J C. (2009). Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of Small Ruminant Lentivirus group C infections., *Veterinary Microbiology*, 135, 231–238.
  14. Rachid A., Croisé B., Russo P., Vignoni M., Lacerenza D., Rosati S., Kuzmak J., Valas S. (2013). Diverse host-virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats, *Journal of General Virology*, 94, 634–642.
  15. Villoria M., Leginagoikoa I., Luján L., Pérez M., Salazar E., Berriatua E., Juste R. A., Minguijón E. (2013). Detection of Small Ruminant Lentivirus in environmental samples of air and water, *Small Ruminant Research*, 110, 155–160.
  16. Leginagoikoa I., Minguijón E., Juste R. A., Barandika J., Amorena B., de Andrés D., Badiola J. J., Luján L., Berriatua E. (2010). Effects of housing on the incidence of visna/maedi virus infection in sheep flocks, *Research in Veterinary Science* 88, 415–421.
  17. Reina R., Mora M. I., Glaria I., García I., Solano C., Luján L., Badiola J. J., Contreras A., Berriatua E., Juste R., Marmoun R. Z., Rolland M., Amorena B., de Andrés D. (2006). Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain, *Virus Research*, 121, 189–198.
  18. Muz D., C, Ciğdem O. T., Rosati S., Reina R., Bertolotti L., Burgu I. (2013). First molecular characterization of visna/maedi viruses from naturally infected sheep in Turkey, *Archive of Virology*, 158, 559–570.
  19. Leginagoikoa I., Daltabiu-Test M., Álvarez V., Arranz J., Juste R. A., Amorena B., de Andrés D., Luján L. L., Badiola J. J., Berriatua E. (2006). Horizontal Maedi-Visna

- virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR, *Research in Veterinary Science*, 80, 235–241.
20. Stonos N., Wootton K. S., Karrow. (2014). Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral infections, *Viruses*, 6, 3311-3333.
  21. Gjerset B., Rimstand E., Teige J., Soetaert K., Monceyron J. C. (2009). Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of Small Ruminant Lentivirus group C infections, *Veterinary Microbiology*, 135, 231–238.
  22. Khumar U., Barlic-Mangania D., Zadnik T., Grom J. (2013). Molecular and genetic characteristics of Small Ruminant Lentiviruses in Slovenia, *Acta Veterinaria Hungarica*, 61, 135–146.
  23. Gjerset B., Monceyron J. C., Rimstad E. (2007). Natural transmission and comparative analysis of Small Ruminant Lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations, *Virus Research*, 125, 153–161.
  24. Kuhar U., Barlic-Maganja D., Grom J. (2013). Phylogenetic analysis of Small Ruminant Lentiviruses detected in Slovenia, *Veterinary Microbiology*, 162, 201–206.
  25. Reina R., Berriatua E., Luján L., Juste R., Sánchez A., de Andrés D., Amorena B. (2009). Prevention strategies against Small Ruminant Lentiviruses: an update, *The Veterinary Journal*, 182, 31–37.
  26. Martinez-Navalón B., Peris C., Gómez A., E., Peris B., Roche M. L., Caballero C., Goyena E., Berriatua E. (2013). Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats, *The Veterinary Journal*, 197, 311–317.
  27. Cardinaux L., Zahno M. L., Deubelbeiss M., Zanoni R., Vogt H. R., Bertoni G. (2013). Virological and phylogenetic characterization of attenuated Small Ruminant Lentiviruses isolates eluding efficient serological detection, *Veterinary Microbiology*, 162, 572–581.
  28. Cortez-Romero C., Pellerin J. L., Ali-Al-Ahmad M. Z., Chebloune Y., Gallegos-Sánchez J., Lamara A., Pépin M., Fieni F. (2013). The risk of Small Ruminant Lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: State-of-the-art review, *Theriogenology*, 79, 1–9.

29. Minardi da Cruz J. C., Kumar S. D., Lamara A., Chebloune Y. (2013). Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range, *Viruses*, 5, 1867-1884.
30. Rosati S., Mannelli A., Merlo T., Ponti N. (1999). Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen, *Virus Research*, 61, 177–183.
31. de Andrés X., Ramírez H., Bertolotti L., San Roman B., Glaria I., Crespo H., Jáurregui P., Minguijón E., Juste R., Leginagoikoa I., Pérez M., Luján L., Badiola J. J., Polledo L., García-Marín J. F., Riezu J. I., Borrás-Cuesta F., de Andres D., Rosati S., Reina R., Amorena B. (2013). An insight into combination of ELISA strategies to diagnose Small Ruminant Lentivirus infections, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152, 277– 288.
32. Rosati S., Profiti M., Lorenzatti R., Bandecchi P., Mannelli A., Ortoffi M., Tolari F., Ciabatti I. M. (2004). Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections, *Journal of Virological Methods*, 121, 73–78.
33. Reina R., Grego E., Profiti M., Glaria I., Robino P., Quasso A., Amorena B., Rosati S. (2009). Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E, *Veterinary Microbiology*, 138, 251–257.
34. Grego E., Bertolotti L., Carrozza M. L., Profiti M., Mazzei., Tolari F., Rosati S. (2005). Genetic and antigenetic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses, *Veterinary Microbiology*, 106, 179–185.
35. Grego E., Profiti M., Giammarioli M., Giannino L., Rutuli D., Woodall C., Rosati S. (2002). Genetic heterogeneity of Small Ruminant Lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10, 828–832.
36. Tolari F., Al-Ramadneh W., Mazzei M., Carrozza M. L., Forzan M., Bandecchi P., Grego E., Rosati S. (2013). Small Ruminant Lentiviruses in Jordan: evaluation of sheep and goat serological response using recombinant and peptide antigens, *Tropical Animal Health and Production*, 45, 1335–1340.

37. Herrmann L. M., Cheevers W. P., Travis C., McGuire M. C., Scott A., D., Hutton M. M., Gavin G. W., Knowles P. D. (2003). Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: Diagnostic tool for successful eradication, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10, 267–271.
38. Gonzales J. C. V., Domingo C. Y. J., Abes N. S., Gutierrez C. A., Villanueva M. A., Mingala C. N. (2013). Concordance of competitive enzyme linked immunosorbent assay and nested-polymerase chain reaction in the detection of caprine arthritis-encephalitis virus, *Small Ruminant Research*, 115, 134– 139.
39. Herrmann L. M., Cheevers W. P., Marshall K. L., McGuire T. C., Hutton M. M., Lewis G. S., Knowles D. P. (2003). Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10, 862–865.
40. Herrmann-Hoesing L. M., Broughton-Neiswanger L. E., Gouine K. C., White S. N., Mousel M. R., Lewis G. S., Marshall K. L., Knowles D. P. (2009). Evaluation of a CAEV/MVV indirect ELISA in the serological diagnosis of ovine progressive pneumonia virus in U. S. sheep: *gag* dissimilarity indicates low sensitivity among U. S. sheep, *Clinical and Vaccine Immunology*, 17, 307–310.
41. Özyörük F., Cheevers W., Hullinger G. A., McMguire T. C., Hutton M., Knowles D. P. (2001). Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus: potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 44–51.
42. Valas S., Benoit C., Baudry C., Perrin G., Mamoun R. Z. (2000). Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein, *Journal of Virology*, 74, 6178–6185.
43. Shah C., Böni J., Hunder J. B., Vogt H. R., Mühlherr J., Zanoni R., Miserez R., Lutz H., Schüpbach J. (2003). Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat

- transmission and worldwide propagation through livestock trade, *Virology*, 319, 12–26.
44. Pisoni G., Quasso A., Moroni P. (2005). Phylogenetic analysis of Small-Ruminant Lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep, *Virology*, 339, 147 – 152.
  45. Pisoni G., Bertoni G., Puricelli M., Maccalli M., Moroni P. (2007). Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats, *Journal of Virology*, 81, 4948-4955.
  46. Fras M., Leboeuf A., Labrie F. M., Laurin M. A., Sohal J. S., L'Homme Y. (2013). Phylogenetic analysis of Small Ruminant Lentiviruses in mixed flocks: multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats, *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 97–104.
  47. Shah C., Hurder J. B., Böni J., Schönmann M., Mühlherr J., Lutz H., Schüpbach J. (2004). Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa, *Journal of Virology*, 78, 7518-7522.
  48. Souza T. S., Pinheiro R. R., Costa J. N., Lima C. C. V., Andrioli A., Andrioli A., Azevedo D. A. A., Santos V. W. S., Araújo J. F., Sousa A. L. M., Pinheiro D. N. S., Fernandes F. M. C., Neto C. A. O. (2015). Interspecific transmission of Small Ruminant Lentiviruses from goats to sheep, *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 867-874.
  49. Sánchez J. H., Martínez H. A., García M. M., Garrido G., Gómez L., Aguilar J A., De Andrés., Reina R., Ramírez H. (2016). The presence of small ruminant lentiviruses in mexican Pelibuey sheep, *Theriogenology*, 86, 1953–1957.
  50. Aguilar T. M. C. (2015). Uso de péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos específicos contra Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) en leche de rebaños ovinos y caprinos, Tesis maestría, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli.
  51. Ramírez H., Glaria I., de Andrés X., Martínez H. A., Hernández M. M., Reina R., Iráizoz E., Crespo H., Berriatua J., Amorena B., de Andrés D. (2011). Recombinant Small Ruminant Lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico, *The Veterinary Journal*, 190, 169–172.

52. Mendiola B. W. P. S., González M. A. S., Barrera C. S. M., Hernández G. J. A., Rodríguez M.C., Díaz A. E., García F. M. M., Tórtora P. J. L., Martínez R. H. A., Ramírez A. H. (2016). Estudio serológico de lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) en ovinos de seis estados de México, Memorias del XL Congreso nacional e internacional de Buiatría, Zacatecas, 136-140.
53. Rodríguez M. C., González M. A. S., Barrera C. S. M., Hernández G. J. A., Sánchez P. M. J., Mendiola B. W. P. S., Herrera L. E., Díaz A. E., García F. M. M., Martínez R. H. A., Tórtora P. J. L., Ramírez Á. H. (2016). Detección de anticuerpos contra lentivirus caprinos en diferentes rebaños de México utilizando una prueba de ELISA comercial, Memorias del XL Congreso nacional e internacional de Buiatría, Zacatecas, 141-147.
54. Castro F. R. (2015). Detección de Lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) en hatos mixtos de ovinos y caprinos de Culiacán, Sinaloa, Tesis maestría, Culiacán Rosales, Sinaloa, México.
55. Gorodezky C. (1998). Manual de técnicas, XIII Curso teórico-práctico de genética molecular, Depto. de Inmunogenética del INDRE, Sector salud.
56. Díaz A. E., Tórtora P. J. L., Palomares R. E. G., Gutiérrez H. J. L. (2015). Enfermedades de las cabras, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal México, ISBN: 978-607-37-0411-3, 259-274.
57. Blacklaws B., A., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Watt N.J., de Andrés D., Klein D., Harkiss G. D. (2004). Transmission of Small Ruminant Lentiviruses, *Veterinary Microbiology*, 101, 199–208.
58. Peletto S., Bertuzzi S., Campanella C., Modesto P., Maniaci M. G., Bellino C., Ariello D., Quasso A., Caramelli M., Awtis P. L. (2011). Evaluation of internal reference genes for quantitative expression analysis by Real-Time PCR in ovine Whole Blood, *International Journal Molecular Sciences*, 12, 7732-7747.
59. Ramírez H., San Román B., Glaria I., Reina R., Hernández M. M., de Andrés X., Crespo H., Hichou B., Cianca S., Goñi C., Grandas A., García-Pastor L., Vijil L. E., Quintín F., Grilló M. J., de Andrés D., Amorena B. (2009). Antibody-based diagnosis of Small Ruminant Lentivirus infection in seminal fluid, *Theriogenology*, 72, 1085-1096.

60. Luján L., Juste R. A., Berriatua E., Badiola J. J. (2001). Epidemiología y control. El virus Maedi-Visna en España, “Maedi-Visna”, *Ovis*, 72, 81-93.
61. Grego E., Luigi B., Quasso A., Profiti M., Lacerenza D., Muz D., Rosati S. (2007). Genetic characterization of Small Ruminant Lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for novel genotype circulating in a local goat population, *Journal of General Virology*, 88, 3423-3427.
62. Lacerenza D., Giammarioli M., Grego E., Marini C., Profiti M., Rutili D., Rosati S. (2006). Antibody response in sheep experimentally infected with different Small Ruminant Lentivirus genotypes, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112, 264-271.
63. Ramírez H., Reina R., Bertolotti L., Cenoz A., Hernández M.-M., San Román B., Glaria I., de Andrés X., Crespo H., Jáuregui P., Benavides J., Polledo L., Pérez V., García-Marín J. F., Rosati S., Amorena B., de Andrés D. (2012). Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep, *Veterinary Research*, 8, 8.

## APÉNDICES

**Tabla 9.** Total de ovinos y caprinos positivos a diferentes pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra LVPR.

Identificación	Especie	VMRD	ERADIKIT	126 M1	126 M2	Genotipado (ERADIKIT)
<b>Rancho 1</b>						
<b>3</b>	Ovino	-	+	-	+	Indeterminado
<b>13</b>	Ovino	-	-	-	+	-
<b>24</b>	Caprino	-	-	-	+	-
<b>30</b>	Caprino	-	-	-	+	-
<b>Rancho 2</b>						
<b>32</b>	Caprino	+	+	+	-	A
<b>37</b>	Caprino	+	+	+	-	Indeterminado
<b>38</b>	Caprino	+	+	+	-	A
<b>42</b>	Caprino	+	+	+	-	Indeterminado
<b>45</b>	Ovino	-	-	-	+	-
<b>48</b>	Caprino	+	+	+	+	A
<b>49</b>	Caprino	+	+	+	+	Indeterminado
<b>52</b>	Caprino	+	+	+	-	Indeterminado
<b>53</b>	Caprino	+	+	+	+	
<b>55</b>	Caprino	+	+	+	+	A
<b>62</b>	Caprino	+	+	+	+	Indeterminado
<b>69</b>	Caprino	+	+	+	+	A
<b>70</b>	Caprino	+	+	+	+	Indeterminado
<b>71</b>	Caprino	+	+	+	+	Co-infección
<b>72</b>	Caprino	+	+	-	-	B
<b>73</b>	Caprino	+	+	+	-	Co-infección
<b>74</b>	Caprino	+	+	+	+	A
<b>78</b>	Caprino	+	+	+	+	Co-infección

Rancho 3						
<b>82</b>	Ovino	-	-	+	+	-
<b>85</b>	Caprino	+	+	+	-	Co-infección
<b>93</b>	Ovino	-	+	-	-	B
<b>108</b>	Ovino	-	+	-	-	Indeterminado
Rancho 4						
<b>118</b>	Caprino	-	-	-	+	-
<b>119</b>	Caprino	+	+	+	-	B
<b>125</b>	Caprino	-	-	-	+	-
<b>128</b>	Ovino	-	-	+	-	-
<b>137</b>	Ovino	-	-	-	+	-
<b>139</b>	Ovino	-	-	-	+	-
<b>140</b>	Ovino	-	-	-	+	-
<b>141</b>	Ovino	-	+	-	+	B
<b>142</b>	Ovino	-	-	-	+	-

### **Protocolo de extracción de leucocitos de sangre periférica (55).**

1. Centrifugar la muestra de sangre a 3,000 rpm durante 15 minutos para la obtención del plasma o suero.
2. Colectar la parte líquida (suero o plasma) del tubo y almacenar en un microtubo.
3. Transferir cuidadosamente con pipeta Pasteur la capa blanca a otro tubo cónico de 15 ml.
4. Agregar solución de lisis I hasta 10ml y homogenizar.
5. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 minutos y desechar el sobrenadante (decantar).
6. Repetir los pasos 4 y 5 pero con lisis II con la finalidad de que las células blancas (Pellet) queden libres de eritrocitos.
7. En el caso de que existan remanentes importantes de eritrocitos en el paquete celular puede ser tratado con un 1ml. de agua bidestilada y completar con 7 ml de PBS, homogenizar por 1 un minuto.
8. Se homogeniza y se centrifuga.
9. Se decanta y las células se deben resuspender en 300  $\mu$ l con la misma solución de PBS y se colocan en un microtubo, etiquetar y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **ELISA VMRD®**

### **Procedimiento:**

1. Cargar 50 µl de las muestras de suero y los controles en la placa tan rápido como sea posible, asegurando que cubran el fondo de los pozos. Incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ).
2. Después del periodo de incubación, lavar la placa 3 veces. Vaciar el contenido de los pozos, golpeando la placa de manera invertida sobre una toalla de papel. Inmediatamente después, llenar cada pozo con solución de lavado 1X. Vaciar la solución de lavado de la placa como se indica anteriormente, llenando y vaciando la placa hasta completar un total de 3 lavados.
3. Agregar 50 µl del conjugado diluido 1X en cada pozo. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Después del periodo de incubación, lavar la placa 3 veces, como se realizó en el paso 2.
5. Agregar 50 µl de sustrato a cada pozo. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, evitando dejar la placa bajo la luz directa del sol. No vaciar los pozos.
6. Agregar 50 µl de solución de paro a cada pozo. No vaciar los pozos.
7. Inmediatamente después de agregar la solución de paro, leer la placa en el espectrofotómetro, ajustando la longitud de onda a 620, 630 o 650 nm.
8. Almacenar todos los reactivos restantes del kit a  $2 - 7^\circ\text{C}$ .

## **ELISA ERADIKIT®**

### **Tamizaje.**

1. Agregar 95 µl de buffer de dilución de suero en cada pozo.
2. Agregar 5 µl del control negativo en los pozos A1, B1.
3. Agregar 5µl del control positivo en los pozos C1, D1.
4. Agregar 5µl de la muestra de suero en los pozos siguientes.
5. Incubar la placa por 60 minutos a 37°C.
6. Diluir el buffer de lavado 20X (2) 1:20 con agua pura.

*Ejemplo: Para 1 placa, 10 ml del buffer de lavado 20X y 190 ml de agua.*

7. Lavar la placa 3 veces con 300µl/pozo de buffer de lavado.

*Agregar buffer de lavado, enjuagar por 30 segundos, vaciar la placa vigorosamente y secar brevemente en una toalla de papel; repetir dos veces más.*

8. Diluir el conjugado 10X antes de usar, en buffer de dilución de conjugado.

*Ejemplo: Para 1 placa, 1.2 ml de conjugado 10X en 10.8 ml de buffer de dilución de conjugado.*

9. Agregar 100 µl del conjugado diluido en cada pozo.
10. Incubar la placa por 60 minutos a 37° C.
11. Lavar como se hizo previamente (paso 7).
12. Agregar 100 µl del sustrato en cada pozo.
13. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 15 – 20 minutos.
14. Parar la reacción agregando 100µl de solución de paro en cada pozo.
15. Leer la placa a 405 nm.

## **Genotipificación.**

1. Agregar 95 µl de buffer de dilución de suero en cada pozo.
2. Agregar 5 µl del control positivo (Genotipo A) en los pozos A1, A2.
3. Agregar 5µl del control positivo (Genotipo B) en los pozos B1, B2.
4. Agregar 5µl de cada muestra de suero por duplicado en los pozos siguientes (C1, C2).
5. Incubar la placa durante 60 minutos a 37°C.
6. Diluir el buffer de lavado 20X 1:20 con agua pura.

*Ejemplo: Para 1 placa, 10 ml del buffer de lavado 20X y 190 ml de agua.*

7. Lavar la placa 3 veces con 300µl/pozo de buffer de lavado.

*Agregar buffer de lavado, enjuagar por 30 segundos, vaciar la placa vigorosamente y secar brevemente en una toalla de papel; repetir dos veces más.*

8. Diluir el conjugado 10X antes de usar, en buffer de dilución de conjugado.

*Ejemplo: Para 1 placa, 1.2 ml de conjugado 10X en 10.8 ml de buffer de dilución de conjugado.*

9. Agregar 100 µl del conjugado diluido en cada pozo.
10. Incubar la placa durante 60 minutos a 37° C.
11. Lavar como se hizo previamente (Paso 7).
12. Agregar 100 µl del sustrato en cada pozo.
13. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 15 – 20 minutos.
14. Parar la reacción agregando 100µl de solución de paro en cada pozo.
15. Leer la placa a 405 nm.

### **Extracción de ADN de Leucocitos de Sangre Periférica. (Favorprep®).**

Descongelar las muestras de células y verificar que tengan 300 microlitros de volumen si no es así centrifugar hasta formar un Pellet en el fondo del tubo o dividir la muestra en dos microtubos.

1. Añadir 200 microlitros de FATG1 Buffer y homogenizar la muestra de tejido otra vez con el Micropeste o Micromartinete.
2. Añadir 20 microlitros de Proteinasa K que se encuentra a una concentración de (10mg/ml).
3. Mezclar bien por agitación y centrifugar brevemente para bajar los residuos de las paredes.
4. Incubar a 60° C por 15 minutos (homogenizar cada 5 minutos), centrifugar brevemente a 6000 revoluciones por minuto para remover los residuos.
5. Agregar 200 microlitros de FATG2 Buffer a la muestra y mezclar en vortex.
6. Incubar a 70° C durante 10 minutos, centrifugar brevemente a 6000 revoluciones por minuto para remover los residuos.
7. Añadir 200 microlitros de Etanol (96/100), mezclar bien y centrifugar brevemente.
8. Colocar una Minicolumna FATG Mini en un tubo colector de 2ml y transferir la mezcla anterior a la Minicolumna y centrifugar a 6000 revoluciones por minuto durante 2 minutos.
9. Lavar la Minicolumna FATGMini con Buffer W1 (500 microlitros) y centrifugar a 6000 revoluciones por minuto durante 2 minutos.
10. Deseche el residuo del tubocolector.
11. Lavar la Minicolumna FATGMini con Wash Buffer (750 microlitros) y centrifugar a 600 revoluciones por minuto durante 2 minutos.
12. Deseche el residuo del tubo colector.

13. Centrifugar a 6000 revoluciones por minuto durante 5 minutos nuevamente para secar la Minicolumna FATGMini.
14. Colocar la Minicolumna FATGMini en el tubo de elución y añadir 25-30 microlitros del buffer de elución por el centro de la membrana de la columna FATGMini y dejar reposar por 5 o 10 minutos.
15. Centrifugar a 6000 revoluciones por minuto por 2 minutos para eluir el ADN.
16. Se toma el líquido del tubo de elución y se añade a la columna por el centro de la membrana y se deja reposar por 5 o 10 minutos, para posteriormente centrifugarlo a 6000 revoluciones por minuto durante 3 minutos.
17. Almacenar el ADN a 4 ° C o a -20 ° C, y realizar la cuantificación de ADN.