



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Identificación de Lentivirus de Pequeños Rumiantes en ovinos en distintas regiones del país
por ELISA y PCR”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

JUAN ÁNGEL HERNÁNDEZ GARCÍA

ASESOR:

DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

COASESOR:

DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

"Identificación de Lentivirus de Pequeños Rumiantes en ovinos en distintas regiones del país por ELISA y PCR"

Que presenta el pasante: JUAN ÁNGEL HERNÁNDEZ GARCÍA
Con número de cuenta: 30603155-3 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de septiembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés	
VOCAL	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
SECRETARIO	Dra. Cynthia González Ruíz	
1er. SUPLENTE	M. en C. Gerardo Arcila López Tello	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Alma Noemí Montes De Oca Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

Le preguntan qué consejo le daría a la gente:
Daría tres. El primero es: Haz siempre, porque si
no haces, te arrepentirás, y si haces y te
equivocas, al menos habrás aprendido algo. El
segundo: No quieras nada para ti que no sea
también para los otros. El tercero: No seas lo
que otros quieran que seas; sé lo que tú eres

-Alejandro Jodorowsky

A mi esposa Ana Lisset gracias por estar ahí cuando lo necesite, gracias por aguantarme en todo este proyecto, que fue bastante. Gracias por apoyarme en todo, por ayudarme con tareas, exposiciones, etc., durante toda la carrera. Sabes que te amo y que todo esto es por ambos, gracias por todo.

A mi mama Carmen García, gracias por no dejarte rendir y enseñarnos a trabajar y nunca rendirnos por más difícil que parezca, gracias por sacarnos adelante tú solita, eres una mujer maravillosa y te estaré agradecido toda mi vida por enseñarnos que se puede salir adelante. A mi abuelita Leo por siempre apoyarme y darme tanto cariño y afecto, la quiero mucho y siempre estaré agradecido por sacarnos adelante, ya que nos ayudó cuando más lo necesitamos al igual que mi tío Vic, Mary, Martin. Gracias por que sin ustedes no estaríamos aquí y sé que lo hacen incondicionalmente y se los agradezco de corazón.

A mi asesor el Dr. Hugo Ramírez gracias por su apoyo, tiempo y conocimiento que me brindo en el paso por el laboratorio, gracias por aguantarme todo este tiempo y ayudarme a cumplir este gran paso. A mi coasesor el Dr. Humberto, a la Dra. Martha, y todo el equipo de Viro, gracias por dejarme trabajar a su lado y aprender de ustedes. Gracias a todos los compañeros del laboratorio de Viro (Pavel, Ceci, Ana, Nely, Víctor, Fernando, Carlos, y un gran etc.), por hacer más ameno el paso por el laboratorio y por ese consejo, esa ayuda.

A mis amigos Oscar, Areli, José Luis, Iñaki. Gracias por ayudarme, apoyarme, hacerme reír, gracias por estar ahí y muchas veces salvarme de mi loca. Gracias por compartir esta etapa tan bonita de la vida, gracias por todos los buenos momentos y los que nos faltan.

Abreviaturas

LvPR	Lentivirus de Pequeños Rumiantes
VMV	Virus Maedi-Visna
VAEC	Virus Artritis Encefalitis Caprina
ELISA	Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
VIH	Virus Inmunodeficiencia Humana
VIF	Virus Inmunodeficiencia Felina
VIB	Virus Inmunodeficiencia Bovina
VAIE	Virus Anemia Infecciosa Equina
RT	Retro-Transcriptasa
SNC	Sistema Nervioso Central
IDGA	Inmunodifusión en Gel de Agar
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
WB	Western blot
LTR	Región Terminal Larga Repetida
gp	glicoproteína
p	proteína
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
IN	Integrasa
PR	Proteasa
dUTPasa	Enzima dUTPasa
dNTP	di nucleosido trifosfato
VIF	Factor infectividad Viral
RM	Receptor Manosa
Ig	Inmunoglobulina
RIPA	Radio Inmunoprecipitación
RIA	Radio Inmunoanálisis
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
SIAP	Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera
PBMS	Monocitos de sangre periférica
UV	Ultravioleta
nM	nano Molar
mM	micro Molar
ng	nano gramo
cbp	cuanto baste para
pb	pares de bases
Cl ₂ Mg	Cloruro de Magnesio
μl	micro litro
SU	proteína de Superficie
TM	proteína de Transmembrana

Contenido

RESUMEN	- 1 -
ABSTRACT	- 2 -
<u>I.</u> INTRODUCCIÓN	- 3 -
I.I. LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES (LvPR)	- 3 -
I.I.I Historia y agente causal	- 3 -
I.I.II Antecedentes de la infección en México	- 4 -
I.I.III Organización genética	- 6 -
I.I.IV Genotipos	- 10 -
I.I.V Ciclo de replicación viral	- 11 -
I.I.VI Tropismo	- 12 -
I.I.VII Transmisión	- 14 -
I.I.VIII Patogenia	- 16 -
I.I.IX Cuadros clínicos.....	- 18 -
I.I.X Importancia económica.....	- 20 -
I.I.XI Prevención y control	- 20 -
I.I.XII Diagnóstico.....	- 22 -
<u>II.</u> JUSTIFICACIÓN	- 26 -
<u>III.</u> OBJETIVOS	- 27 -
III.I Objetivo general	- 27 -
III.II Objetivos particulares	- 27 -
<u>IV.</u> HIPÓTESIS.	- 28 -
<u>V.</u> METODOLOGÍA.....	- 29 -
V.I Animales de estudio.....	- 29 -
V.II Inmuno Ensayo ligado a Enzimas (ELISA´s)	- 29 -
V.III Extracción de ADN.....	- 29 -
V.IV PCR	- 30 -
V.V Análisis de resultados	- 30 -
<u>VI.</u> RESULTADOS.....	- 31 -
<u>VII.</u> DISCUSIÓN	- 40 -
<u>VIII.</u> CONCLUSIONES	- 46 -
<u>IX.</u> BIBLIOGRAFÍA	- 47 -
<u>X.</u> APÉNDICES.....	- 53 -

Apéndice I.....	- 53 -
Apéndice II.....	- 54 -
Apéndice III.....	- 55 -
Apéndice IV	- 56 -

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1	Estructura y mapa genómico de LvPR	Pag. 9
Figura 2	Procedencia por estado de muestras evaluadas	Pag. 31
Figura 3	Resultados por estado	Pag. 32
Figura 4	Placa ELISA ERADIKIT	Pag. 32
Figura 5	Placa ELISA VMRD	Pag. 33
Figura 6	Gel agarosa 1.5% teñida con bromuro de Etidio	Pag. 35
Figura 7	Resultados por raza	Pag. 37
Figura 8	Resultados por sexo	Pag. 37
Figura 9	Tabla de contingencia VMRD y ERADIKIT	Pag. 38
Figura 10	Tabla de contingencia Serología y PCR	Pag. 39
Tabla 1	Resultados Positivos de dos Kits comerciales de ELISA	Pag. 34
Tabla 2	Resultados de Serología y PCR	Pag. 36

RESUMEN

Los lentivirus son agentes causantes de una gran variedad de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes que amenazan a los animales y los seres humanos. Los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) incluyen a los Virus de Maedi-Visna (VMV) y el Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC). La manera más conveniente de diagnosticar infecciones por LvPR es mediante la detección de anticuerpos utilizando el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Otra opción es utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), esta técnica molecular detecta los ácidos nucleicos y los amplifica en millones de moléculas. En el presente estudio se recolectaron 582 muestras de sangre de ovinos de 18 municipios (4 estados) en tubos estériles con heparina. A la llegada al laboratorio se separó el plasma y la capa flogística por centrifugación. El plasma fue evaluado utilizando dos kits comerciales de ELISA (VMRD y Eradikit). Obteniendo un porcentaje de seropositividad de 13.9 (n=50) y 10.3 (n=31) respectivamente. El Eradikit detecto 1.7% (n=10) de muestras positivas adicionales que fueron negativas a VMRD. Se obtuvo un índice de concordancia kappa de Cohen de 0.670 entre las pruebas de ELISA, lo que indico una concordancia moderada. De las muestras seropositivas, se extrajo el ADN genómico de las células con kits comerciales, y de un grupo de muestras seronegativas (n= 51) elegidas al azar, dando un total de 142 muestras, de las cuales el 48.6 % (n=69) fueron positivas a PCR de la región de terminación larga repetida (LTR). El índice kappa para las muestras seropositivas y PCR positivas fue de 0.02, lo que indico una concordancia pobre. De los 582 animales, 439 fueron hembras y 12 machos. Con el uso combinado de ambas pruebas se detectaron 60 hembras (13.7%) positivas y solo 2 machos fueron positivos (16.7%). El total de animales positivos en general, fue de 113 animales el cual representó el 19.4% del total de animales muestreados. Se identificaron ovinos positivos a la infección por LVPR por técnicas serológicas y de biología molecular, concluyendo que esta última es una técnica complementaria para la detección de la infección por LvPR y aunque los ELISAs fueron más sensibles detectando animales infectados, se encontraron diferencias de detección entre las técnicas utilizadas.

ABSTRACT

Lentivirus are caused agents of a wide variety of emerging and reemerging infectious diseases that threaten animals and humans. The small ruminant lentiviruses (SRLV), include the maedi-visna virus (VMV) and the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). The most convenient way to diagnose infections by SRLV is through the detection of antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Another option is using the Polymerase Chain Reaction (PCR), this molecular technique detects the nucleic acids and the amplified in millions of molecules. In the present study were collected 582 samples of sheep blood from 18 different municipalities (4 STATES) in sterile tubes with heparin. Upon arrival at the laboratory were separated from the plasma and phlogistica layer by centrifugation. The plasma was evaluated using two commercial ELISA kits (Vmrđ and Eradikit). Obtaining a positive percentage of 13.9 (n=50) and 10.3 (n=31) respectively, the Eradikit detected 1.7% (n=10) from positive additional samples that were negative to Vmrđ. A Cohen kappa concordance index of 0.670 indicating a moderate concordance between the ELISA tests. From samples positive, genomic DNA was extracted from the cells with commercial kits, and a group of seronegative samples (n= 51) randomly chosen giving us a total of 142 samples, from wich 48.6% (n=69) were positive to PCR long terminal repeat (LTR). The kappa index from seropositive and PCR positive samples were 0.02 indicating a poor concordance. From the 582 animal samples 439 were females and 12 males, with the combined use of both test were detected 60 females (13.7%) were positive and only 2 males were positive (16.7%). The total number animal positive in general were 113 accounted 19.4% of the grand total from samples. Sheep were identified positive LVPR infection by serological techniques and molecular biology, concluding that the latter is a complementary technique for the infection detection by LVPR and although the ELISAs were more sensitive detecting infected animals, differences detection were found between the techniques used.

I. INTRODUCCIÓN

Los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) comprenden el virus de Maedi-Visna (VMV) de borregos y virus de Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) de cabras. Estos retrovirus causan inflamación crónica en cerebro, pulmón, articulaciones y glándula mamaria. La transmisión se da principalmente vía ingestión de calostro infectado y/o leche, o por transmisión aerógena. Después de la infección los animales producen anticuerpos contra el virus, pero la seroconversión puede ser retrasada desde semanas hasta 2 años post infección (Blacklaws *et al.*, 2004; De Andrés *et al.*, 2005).

La ruta más conveniente para el diagnóstico de la infección por LvPR es por serología. Una variedad de técnicas de laboratorio están disponibles para este propósito, entre las que se incluye el inmunoensayo asociado a enzimas (ELISA) (de Andrés *et al.*, 2005).

I.I. LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES (LvPR)

I.I.I Historia y agente causal

Estos virus pertenecen a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus*. Los retrovirus se han encontrado en todas las clases de animales vertebrados, incluyendo peces, anfibios, aves y mamíferos (ICTV, 2017).

Los lentivirus son agentes causantes de muchas enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes que amenazan a los animales y los seres humanos, estos infectan naturalmente un rango limitado de huéspedes mamíferos; incluyendo seres humanos (Virus de inmunodeficiencia humana, VIH), primates no humanos (Virus de inmunodeficiencia del simio, VIS), felinos (Virus de inmunodeficiencia felina, VIF), ganado bovino (Virus de inmunodeficiencia bovina, VIB), caballos (Virus de la anemia infecciosa equina, VAIE) y pequeños rumiantes (LvPR) que incluye los virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) y Maedi Visna (VMV) (Minardi *et al.*, 2013).

Este género se caracteriza por retrotranscribir el ARN monocatenario a ADN de doble cadena, gracias a la acción de la enzima retrotranscriptasa (RT). La persistencia del virus infeccioso en varios órganos y tejidos a pesar de la fuerte respuesta inmune es una característica de todas las infecciones por Lentivirus. Este género contiene virus unidos

por un tropismo común por los macrófagos y las células dendríticas. Los miembros de este género se distribuyen en dos grupos, atendiendo al tropismo celular y al tipo de enfermedad que provocan. Por un lado se encuentran los lentivirus que se replican tanto en linfocitos como en macrófagos, causando un síndrome de inmunodeficiencia adquirida y una enfermedad que afecta a pulmones, sistema nervioso central (SNC) y tracto gastrointestinal. A este grupo pertenecen los VIH-1 y VIH-2, el VIS y el VIF. Los lentivirus del otro grupo infectan macrófagos pero no linfocitos, causando una enfermedad caracterizada por la afección del sistema retículo endotelial, pulmón, SNC, articulaciones y/o glándula mamaria, sin provocar un síndrome de inmunodeficiencia clásico que conlleve a una severa depleción linfocitaria en sangre. A este segundo grupo pertenecen el VIB, el VAIE y los LvPR (Ravazzolo *et al.*, 2006; Blacklaws, 2012; Galaria, 2015).

Maedi-Visna o neumonía progresiva ovina fue el primer miembro de las infecciones por lentivirus identificado. Sigurdsson fue el primer científico que reconoció que existía una nueva categoría de infecciones, "infecciones lentas". Describió la enfermedad en ovejas con una característica de "largo periodo de latencia" que no es sinónimo de periodo de incubación, ya que el virus se propaga y distribuye por el cuerpo sin ningún signo clínico aparente durante meses y años, seguido de un progreso continuo de signos clínicos después de su primera aparición que conduce finalmente a la enfermedad grave y la muerte de los animales (Straub, 2004).

La primera evidencia de la enfermedad fue en Islandia en 1933 y se dice que la enfermedad había sido introducida por una importación de ovejas Karakul provenientes de Alemania. La importación tenía el objetivo de mejorar la raza autóctona islandesa. Al final resultó que el mismo karakul introdujo varias enfermedades entre ellas MV (Straub, 2004).

I.I.II Antecedentes de la infección en México

En México en 1984 se reporta la primera identificación de la enfermedad por VAEC. Adams y colaboradores realizaron un estudio en varios países incluyendo México, analizando 3729 sueros mediante Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) con resultados de seropositividad menores al 10%. El mismo año, Álvarez utilizó 800 sueros de animales provenientes de varios estados del país y utilizando la misma técnica de IDGA encontró una seropositividad de 28%. Un año después Nazara y Trigo analizaron 138 muestras del Estado de México con IDGA encontrando 47 caprinos seropositivos (34.1 %). En 1991

Nazara evaluó 2484 sueros caprinos con una prevalencia de 27 % (Ramírez *et al.*, 2011; Lazcano, 2013).

En el 2003 Torres-Acosta y colaboradores realizaron un estudio serológico en cabras de Yucatán con IDGA identificando anticuerpos contra las proteínas gp135 y p28 demostrando una seropositividad del 3.6%. En el 2008 se evaluó con un ELISA competitivo a 1211 caprinos del Altiplano central con una seroprevalencia del 39.35% (Torres- Acosta *et al.*, 2003; Vázquez *et al.*, 2008).

El primer aislamiento en México del VAEC fue descrito por Daltabuit *et al.*, (2009) a partir de 2 cabras seropositivas a IDGA, este aislamiento fue logrado en células de membrana sinovial co-cultivadas con células mononucleares de sangre periférica (CMSP), el cual se determinó por la formación de sincitios y se confirmó por PCR amplificando un fragmento del gen *gag* del VAEC (Lazcano, 2013).

Por otro lado, un estudio realizado por Ramírez *et al.*, (2011) en una granja del centro del país con 90 cabras y 80 ovejas obtuvieron una seropositividad a IDGA contra la p28 (12/90 y 0/80), ELISAc (VMRD) (59/90 y 0/80) y ELISAi (72/90 y 0/80), concluyendo que según la especie y prueba diagnóstica utilizada existen diferencias en la detección (Ramírez *et al.*, 2011).

La identificación por su parte de VMV en México data de 1981 cuando se realizó un estudio patológico en vísceras decomisadas en el rastro de la ciudad de México, en este reporte se describieron lesiones macroscópicas y microscópicas muy sugestivas a la infección por el VMV (Eguiluz y Aluja, 1981). En 1986 se realizó un estudio serológico en México para detectar anticuerpos contra el VMV obteniendo como resultado un 8.2% de animales positivos (Molina *et al.*, 1986). Pérez en 2005 realizó un estudio con 70 muestras de machos ovinos obtenidas de rebaños de los estados de Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Estado de México y Zacatecas. Los sueros fueron evaluados con un kit comercial de ELISA indirecto (CHEKIT Bommeli Switzerland) basado en un virus completo de MV que también detecta el VAEC. Los sueros también se evaluaron por Western Blot (WB), utilizando como antígeno viral el obtenido de un cultivo de células de membrana sinovial de feto caprino infectadas con el VAEC. Los resultados con estas pruebas fueron 12 animales positivos, 1 por la prueba de ELISA y 11 por la prueba de WB. De igual forma, en ovinos importados de los Estados Unidos de Norteamérica, se encontraron altos

porcentajes de seroprevalencia (26%) del VMV en el año 2006 (Pérez, 2005; Lazcano, 2013).

Cabe hacer mención de la situación ocurrida en el año 2007, en la que se exportaron desde México a Colombia 265 ovinos y 17 de ellos resultaron positivos mediante IDGA a Maedi Visna, por lo que estos animales fueron sacrificados. Resultando en una pérdida económica de aproximadamente 3 millones de pesos (Urcastegi, 2007).

Actualmente en base al acuerdo emitido por SAGARPA, mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos que entro en vigor el 04 de mayo del 2016. Tanto AEC y MV se encuentra en el grupo 3 el cual está constituido por aquellas enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y son consideradas como endémicas; y que por representar un riesgo menor desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, son consideradas de notificación mensual obligatoria a las dependencias oficiales de salud animal y sanidad acuícola del país. El grupo 1 de este acuerdo está conformado por enfermedades y plagas exóticas o erradicadas del país de notificación inmediata, y el grupo 2 por enfermedades y plagas endémicas en el país con efectos significativos, de notificación inmediata (DOF, 2016).

I.I.III Organización genética

El genoma de los LvPR está constituido por dos subunidades positivas de ARN idénticas de entre 8 a 9.5 Kb. Básicamente todos los lentivirus presentan una organización genómica similar, donde se encuentran tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) y de tres a seis genes accesorios dependiendo de la especie: *vif*, *vpr-like* y *rev* presentes en LvPR; y además *vpu*, *tat*, *nef* y *vpx* en VIH. En la forma proviral, el genoma está flanqueado por una región repetida no codificante, denominada *Long Terminal Repeat* (LTR), cuya funciones es promover la transcripción del ARN mensajero viral, además de servir como señal de poliadenilación y terminación. En la forma del virión el extremo 5' comienza con una región pequeña llamada R, seguida de una secuencia única llamada U5, mientras que en el extremo 3' hay una secuencia única U3, seguida por una región R. La región R contiene la señal y el sitio de unión de una secuencia poliadenilada terminal (Pepin *et al.*, 1998; Arcila, 2010; Glaria, 2015).

El gen *env* genera las proteínas que envuelven al virión, estas proteínas son importantes en el reconocimiento del receptor; siendo estas la glicoproteína de superficie (SU; gp135) y la transmembranal (TM; gp46), ambas sintetizadas como un precursor y cortadas por proteasas virales. La proteína Env expresada en la membrana de células infectadas es capaz de unirse a receptores de células sanas provocando la fusión de ambas y permitiendo la propagación de la infección sin necesidad de producir partículas virales completas. Dicha fusión celular origina *in vitro* el efecto citopático característico de las infecciones por LvPR, es decir, la formación de sincitios o células multinucleadas de entre 5 y 30 núcleos. El reconocimiento del receptor celular por parte de la proteína Env la convierte en un factor determinante del tropismo y la patogénesis de los LVPR (Arcila, 2010; Glaria, 2015).

El gen *gag* genera un precursor llamado Prp55gag, el cual es cortado por la proteasa viral y produce en su maduración: la proteína de matriz (MA; p17) que asegura la unión entre la cápside y la envoltura. La proteína de cápside (CA; p25) es la más abundante proteína del virión, forma el núcleo hidrofóbico del virión y genera una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección, además está relativamente conservada entre los genotipos de LvPR, lo que favorece la detección de anticuerpos por reactividad cruzada. La proteína de nucleocápside (NC; p14) asegura la estabilidad de la nucleocápside y del ARN viral (Pepin *et al.*, 1998; Arcila, 2010; Blacklaws, 2012; Glaria, 2015).

Las proteínas no estructurales son codificadas por el gen *pol* y comprenden las enzimas necesarias para la replicación viral. La transcriptasa reversa o retrotranscriptasa (RT). Es la enzima clave en la replicación viral, se considera una ADN polimerasa dependiente de ARN. Proceso único en la naturaleza. Transcribe una cadena doble de ADN a partir de una cadena de ARN, además de tener actividad de ribonucleasa H, la cual degrada la hebra de ARN del híbrido ARN/ADN y elimina el cebador tRNA Lys-3 (Pepin *et al.*, 1998).

La integrasa (IN). Después de la retrotranscripción, el provirus migra hacia el núcleo, el genoma viral es integrado entonces en el ADN de la célula hospedadora, mediado por esta enzima. Aquí se involucran las secuencias repetidas invertidas presentes en las LTRs, la integrasa cataliza la reacción de transferencia de cadenas por lo que el ADN viral queda ligado covalentemente al ADN cromosómico, forma que se conoce como provirus (Pepin *et al.*, 1998; Arcila, 2010).

La dUTPasa ayuda a mantener una baja proporción de dUTP a TTP, minimizan la incorporación de uracilos dentro del ADN, disminuye la frecuencia de mutaciones de G a A. En algunos genotipos hace más lento la replicación viral en macrófagos. Lentivirus como VIH-1 carecen de dUTPasa y son capaces de originar una infección productiva en macrófagos (Blacklaws, 2012; Glaria, 2015).

La Proteasa (PR). Divide el precursor gag y la poliproteína de gag-pol y reensambla las proteasas de ácido aspártico celular en su estructura tridimensional (Pepín *et al.*, 1998).

Además los genes accesorios producen las proteínas:

1.- *Rev*. Produce una proteína que regula la expresión de proteínas virales vía un mecanismo post-transcripcional. Se trata de una proteína de 18-19 kDa (167 aminoácidos) derivado de un ARNm de 1.4 kb. Se involucra en los empalmes de los transcritos de ARN virales estabilizándolos para su exportación del núcleo al citoplasma. Contiene señales de exportación nuclear, que le permite a la proteína pasar a través de la membrana nuclear y ejercer su regulación a través de la vía el elemento de respuesta de rev (RRE). Éste es capaz de unir el genoma a través de un sitio de unión del ARN (Saltarelli *et al.*, 1994; Pepín *et al.*, 1998).

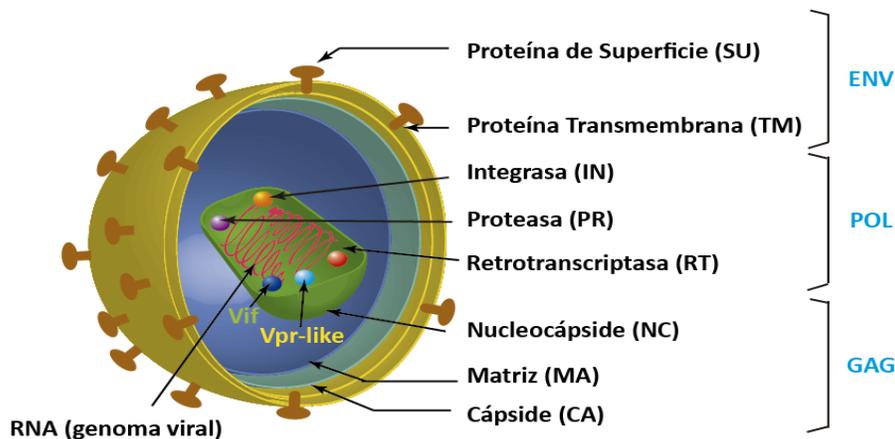
2.- *Vif* (Factor de infectividad viral). Codifica una proteína de 28-29 kDa (230 aminoácidos) que es requerida en algunos pasos de la síntesis y formación de la nucleocápside viral, la cual determina la infectividad y la liberación. Existen reportes de que es esencial para permitir la replicación viral *in vitro* en macrófagos primarios, así como para una eficiente replicación y patogenicidad *in vivo*. En algunos genotipos virales que tienen este gen con alta mutación estos virus no pueden establecer una infección persistente, lo que sugiere que la inhibición de miembros de la familia Apobec3 puede ser una función importante de esta proteína (Blacklaws, 2012; Glaria, 2015).

3.- *VPR-like* codifica una proteína de aproximadamente 10-11 kDa, la cual se considera un potente transactivador que incrementa la eficiencia de transcripción de la ARN polimerasa celular durante la maduración monocito/macrófago, permitiendo la expresión génica viral. Puede contribuir en la producción de trastornos linfoproliferativos en varios órganos por un bloqueo del ciclo celular en fase G2 y apoptosis. Es necesaria para que el

virus se replique en células que no se dividen, como las de la serie monocito-macrófago, una de las principales dianas del virus (Pepin *et al.*, 1998; Arcila, 2010; Glaria, 2015).

La región LTR no codifica proteína alguna; su función es regular la transcripción viral, modulando así las fases latentes y productivas. Por ello, contiene todas las señales requeridas para la expresión génica de eucariotas: *enhancer*, promotor, inicio de la transcripción (*capping*), terminador de la transcripción y señal de poliadenilación. La expresión dirigida por las señales contenidas en la LTR se lleva a cabo por las enzimas de la célula hospedadora. La región U3, situada en el extremo 5' del provirus, contiene la caja TATA, que marca el inicio de la transcripción y los sitios de unión a factores de transcripción necesarios para la regulación. La región R contiene el sitio CAP y la señal de poliadenilación de los mRNA. Por último, la región U5 es la primera que se retro transcribe y constituye el extremo 3' del provirus. LTR es importante desde el punto de vista del diagnóstico molecular, ya que son secuencias duplicadas en el provirus que presentan regiones conservadas para el diseño de cebadores de PCR, lo que podría aumentar la sensibilidad (Pepin *et al.*, 1998; Glaria, 2015).

a) Estructura de los Lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV):



b) Genoma de los SRLV:

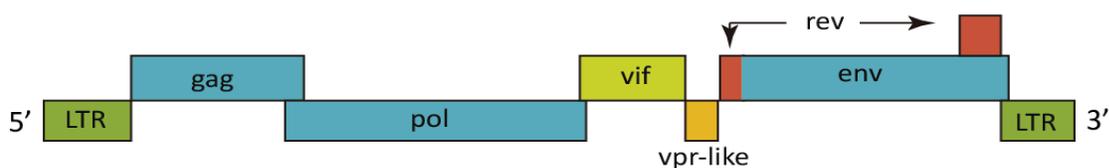


Fig. 1 Estructura y mapa genómico de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (Tomado de Glaria, 2015).

I.I.IV Genotipos

La variabilidad genética de los LvPR es muy alta y se debe a la confluencia de distintos mecanismos. La RT posee una elevada tasa de error y la ausencia de sistemas de corrección contribuye a una alta frecuencia de mutaciones puntuales, incluyendo inserciones y deleciones. Se ha estimado que la tasa de mutaciones oscila entre 0,1 y 2 mutaciones por genoma y por ciclo replicativo. Otro mecanismo de variabilidad es la recombinación, que se da cuando una célula es co-infectada por dos o más virus. En estos casos, durante la retrotranscripción la RT puede saltar de un genoma a otro produciendo virus recombinantes, lo que supone una gran ventaja evolutiva, hecho que se ha demostrado *in vivo*. La diversidad también puede estar causada por la presión selectiva que ejerce el sistema inmune. Así, las proteínas de la familia APOBEC3 se incorporan en las partículas de nueva formación y durante la retrotranscripción desaminan citosinas produciendo hipermutaciones de G a A en la cadena cDNA (+) que aumentan la variabilidad genética. Por último, la propia célula diana de los LvPR puede contribuir en esta variabilidad genética ya que los macrófagos poseen un alto ratio de dUTP:dTTP, lo que proporciona uracilos que pueden ser incorporados mutando el ADN viral (Glaría, 2015).

Los LvPR debido a su alta variabilidad genética y antigenicidad pueden ser observados diferentes fenotipos *in vitro*. Son catalogados en rápidos y lentos. Las primeras se replican rápidamente, inducen la formación de sincitios, lisis celular y alta producción de anticuerpos. Por otro lado las lentas tienen una replicación baja y generan títulos de anticuerpos pobres. Con frecuencia los aislados caprinos muestran un fenotipo lento y a menudo los aislados de ovejas muestran un fenotipo rápido, sin embargo, los fenotipos más extremos se han aislado de ambas especies (Ramírez *et al.*, 2013).

Shah y colaboradores (2004), siguiendo los criterios empleados para el VIH, propusieron una clasificación de tipo filogenético basándose en dos segmentos largos del genoma de los LvPR (el segmento *gag-pol* de 1,8 kb y el segmento *pol* de 1.2 kb). Atendiendo a dicha clasificación, los genotipos virales de LvPR se dividen en cinco grupos (A-E) que difieren entre un 25% y un 37% de su secuencia nucleotídica. Además, los genotipos A, B y E albergan subtipos que difieren entre un 15% y un 27% de su secuencia. Concretamente, los grupos predominantes A (estirpes tipo VMV) y B (estirpes tipo VAEC) se subdividen en quince (A1-A15) y tres (B1-B3) subtipos, respectivamente;

mientras que el genotipo E, aislado de cabras italianas, lo hace en dos subtipos (E1- E2). Los genotipos C y D no presentan subtipos. Este grupo D, en el que se engloban estirpes de ovejas de Suiza y España, fue clasificado sólo mediante el estudio del segmento *pol*, aunque análisis de secuencias del gen *gag* lo agrupan junto al genotipo A, sugiriendo que en realidad son el mismo genotipo A con divergencia en la secuencia del gen *pol* (Minardi *et al.*, 2013; Lazcano, 2013; Glaria, 2015; Sanjosé *et al.*, 2015).

I.I.V Ciclo de replicación viral

Los LvPR se replican mediante la producción de una molécula intermedia de ADN llamada provirus, que se integra en el genoma de la célula huésped. A causa de las altas tasas de mutación y recombinación durante la replicación hay una notable diversidad genética. El virión contiene dos subunidades del genoma viral para permitir la síntesis del provirus. El ciclo comienza con el reconocimiento del receptor situado en la superficie de la célula permisiva por la glicoproteína de la envoltura del virus (SU o gp135). Tras la unión, la envoltura viral se fusiona con la membrana celular liberando en el interior la cápside vírica (la región N-terminal de TM actúa como un péptido de fusión). En el interior de la célula la cápside libera al citoplasma el genoma viral y varias enzimas, incluyendo la RT, IN y PR, que serán transportadas al núcleo. Durante este viaje al núcleo en el complejo de pre-integración (PIC) se completará la retrotranscripción o síntesis de la doble cadena de ADN a partir del ARN viral. La retrotranscripción es impulsada desde el promotor LTR, que se genera durante la síntesis del provirus y permite la expresión de ARNm viral y ARN genómico. Esta comienza en la región U5 de la LTR en donde se encuentra el sitio de unión del cebador (PBS, *primer binding site*) de tRNA Lys-3, marcando el inicio de la síntesis de la cadena complementaria de ADN de sentido negativo (cDNA(-)). El ARN del híbrido ARN-ADN es degradado por la actividad RNAasa H de la RT y finalmente sintetiza la cadena de sentido positivo (cDNA(+)) desde los denominados tracto de polipurinas situados al final del gen *pol* (cPPT) e inmediatamente en dirección 5' (*upstream*) de la 3'-LTR (3'PPT), que no son degradados por la actividad RNAasa H de la RT (Blacklaws, 2012; Glaria, 2015).

Esta doble cadena de ADN es transportada al núcleo donde se integra en el genoma celular mediante la acción de la IN, constituyendo el provirus. La RT posee una alta tasa de error y como los lentivirus carecen de sistemas de corrección de dichos errores, se pueden generar mutaciones en el provirus que pueden ayudar a evadir el sistema inmune

del hospedador. En este punto del ciclo viral es donde ejercen su acción factores de restricción de la inmunidad innata como TRIM5 α o APOBEC3. El provirus integrado en el ADN del hospedador puede permanecer en estado latente durante un período indeterminado. Diferentes factores ambientales, el estrés de la lactancia o la maduración de monocitos a macrófagos, pueden activar la fase productiva de la infección, ya que desencadenan señales para que la ARN polimerasa II celular reconozca y se una a la caja TATA de la región LTR promotora del virus y comience la transcripción (Glaria, 2015).

Los monocitos sanguíneos infectados con LvPR muestran niveles muy bajos de transcripción y no expresan proteínas virales. Tras la maduración de estos monocitos a macrófagos tisulares, el virus induce una infección productiva, probablemente debido al aumento de la expresión de factores de transcripción celulares activando la transcripción (Gendelman *et al.*, 1986 Glaria, 2015).

La proteína ENV viral se inserta en las membranas de la célula huésped, incluyendo la membrana plasmática. La proteína GAG y las proteínas precursoras de Gag/Pol se asocian con la membrana y ENV. La maduración final de los viriones (escisión de GAG y Gag/Pol) se produce después de los brotes de la cápside a través de la membrana. En los macrófagos esto puede ocurrir a través de la membrana plasmática y también en vacuolas que por medio de exocitosis liberan las partículas virales (Blacklaws, 2012; Glaria, 2015).

I.I.VI Tropicismo

Los LvPR que anteriormente se consideraban virus diferentes no es el único ejemplo de virus que infectan más de una especie. Se tienen ejemplos de trasmisión del virus de inmunodeficiencia del simio (VIS) a humanos y del virus de inmunodeficiencia felina (VIF) a otras especies de felinos (Blacklaws, 2012). Los estudios de caracterización genética recientes demuestran la aparición de recombinantes virales capaces de superar la barrera de especies y que resultan en la transmisión cruzada entre los ovinos y caprinos. La primera evidencia de transmisión fue obtenida por la infección experimental de cabras y ovejas con VAEC y VMV, subsecuentemente, más evidencia se ha obtenido por análisis filogenéticos, estudios epidemiológicos han demostrado paso directo de virus de ovinos infectados con VMV (A4) a cabras. El genotipo B1 solo se ha detectado en cabras (Ravazzolo *et al.*, 2006; Blacklaws, 2012; Ramírez *et al.*, 2013). En cabras infectadas

naturalmente las infecciones persistentes tanto tipo VAEC y VMV se han descrito, y varias quimeras virales generadas por recombinación entre estas variantes han sido descritas (Minardi *et al.*, 2013).

Dependiendo del virus y factores genéticos del hospedador, aproximadamente un tercio de los animales infectados con LvPR muestran signos clínicos de enfermedad (Ravazzolo *et al.*, 2006).

El mayor tropismo de los LvPR es hacia los monocitos/macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, otros tejidos pueden estar infectados y actuar como reservorio del virus. A diferencia de los demás lentivirus, los LvPR no infectan linfocitos, por lo que estas infecciones no causan inmunosupresión como VIH, VIF y VIS (Saltarelli *et al.*, 1994; Ravazzolo *et al.*, 2006; Blaklaws, 2012).

El virus puede infectar *in vitro* células de muflón, venado rojo, corzo y bovino. Estas observaciones sugieren que es posible que el lentivirus ocasione infecciones cruzadas y se adapte a nuevos hospedadores en diferentes condiciones (Arcila, 2010).

La carga viral en sangre y secreciones tiende a ser relativamente baja. Se señala por ejemplo que alrededor de 1×10^6 leucocitos sanguíneos se encuentran infectados (Ravazzolo *et al.*, 2006).

Los macrófagos son las células usadas rutinariamente para el aislamiento viral, debido a su alta producción de virus *in vitro*. Otras células usadas rutinariamente para la producción y cultivo *in vitro* de virus son las de membranas epiteliales sinoviales y células del plexo coroideo. Otras células permisivas al virus utilizadas son explantes de pulmón, fibroblastos de piel, células corneales, de bazo, testiculares, endotelios, epiteliales de glándula mamaria, de la granulosa, de oviducto, microglía, epitelio tubular, hepatocitos, miocitos cardíacos y las células del tercer párpado (Ramírez *et al.*, 2013).

Los monocitos que contienen provirus en su genoma presentan poca o ninguna expresión viral y son capaces de transportar al virus a diferentes órganos. El virus entra en el monocito y transcribe su ARN en ADN y lo integra al genoma de la célula, de esta forma puede evadir al sistema inmune. La maduración de monocitos a macrófagos, que es precedida por la extravasación de estas células en varios tejidos, activa la transcripción

de los factores necesarios para la replicación, iniciando así la producción de los componentes virales (Arcila, 2010).

Recientemente, el receptor de manosa (RM) ha sido descrito en células ovinas, en las cuales se identificó como un receptor potencial para la infección de LvPR. De acuerdo con ello, tres fenotipos de células se han propuesto en los pequeños rumiantes con respecto a la expresión y el uso del RM por los LvPR: células que utilizan esta molécula como el receptor principal (células de la membrana sinovial), células que tienen este y al menos otro receptor principal (macrófagos) y células que carecen del RM y utilizando otro receptor como las células de piel (fibroblastos) (Ramírez *et al.*, 2013).

I.I.VII Transmisión

Conocer las rutas de transmisión es un componente crítico de los programas de control.

a) *Vertical*

Se considera que la ingestión del calostro es la principal vía de transmisión de LvPR, ya que los macrófagos presentes en esta secreción y en la leche de las madres infectadas transportan el virus. Aunque aún no queda claro si la transmisión se da a través de viriones libres o células infectadas. Se ha demostrado en varios estudios que los niveles de virus en glándula mamaria varían dependiendo de la etapa de lactación, se ha correlacionado la expresión del virus con la inducción de la lactancia. Además se ha demostrado que se puede aislar el virus y se puede replicar ADN proviral de las células presentes en la leche y de leche libre de células, además de que no pierde infectividad posterior al congelamiento. Se sabe que las células que trasladan el virus a la leche son principalmente macrófagos, sin embargo, existen estudios donde se ha demostrado la permisividad de las células del epitelio de la glándula mamaria a la replicación *in vitro* y se ha logrado aislar el virus a partir de células epiteliales mamarias de animales seropositivos (Blakwlaws *et al.*, 2004; Ravazzolo *et al.*, 2006; Arcila, 2010).

En un estudio realizado por Arcila y colaboradores en el 2010 demostraron que fetos obtenidos de rastros fueron seropositivos a los LvPR por ELISA, demostrando la presencia de anticuerpos en los fetos y recién nacidos. Los rumiantes son agamaglobulinémicos, al ser la placenta de estas especies impermeable al paso de

inmunoglobulinas maternas, la presencia de anticuerpos es indicador de infección (Arcila *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en fetos positivos y sospechosos demuestran que fueron capaces de generar anticuerpos contra LvPR a partir, al menos, del inicio del segundo tercio de la gestación, 60 días. Por la falta de estímulos y de madurez en un ambiente uterino estéril, el sistema inmune fetal de los rumiantes en desarrollo y diferenciación, igual que el de las demás especies desarrolla principalmente respuestas de la clase IgM, y en menor medida IgG (Arcila *et al.*, 2012).

La vía de transmisión transplacentaria se considera un tema controversial. Algunos autores han aportado evidencias a favor de esta vía de transmisión, mientras que otros han obtenido datos contrarios. El ambiente intrauterino es adecuado para la transmisión desde la madre al feto durante la gestación. Un estudio demostró que las células epiteliales del oviducto pueden ser infectadas *in vitro* con el VAEC, aunque aún no existen reportes *in vivo*. También se ha detectado la presencia del virus en lavados de oviducto de cabras seropositivas al VAEC, así como en muestras de tejido de útero y oviducto, sugiriendo que el feto puede estar expuesto al virus *in vivo*. También existen reportes de infección directa de embriones y fetos de manera experimental. Más evidencias sobre la transmisión transplacentaria han sido sugeridas por diversos grupos que reportan infecciones en cabritos aislados de todo contacto con su madre. En animales alimentados con leche pasteurizada o sustituto lácteo en programas de control, se ha presentado hasta 10% de seroconversión inexplicable (Rowe *et al.*, 1997; Blacklaws *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2016).

b) Horizontal

En el caso de la infección en ovinos, se jerarquiza la transmisión por vía respiratoria a través de aerosoles contaminados por células infectadas, emitidos por las madres y los corderos ya infectados. En este caso se cree que la fuente de la infección es el fluido pulmonar expulsado al toser en forma de aerosoles que contiene monocitos y macrófagos alveolares infectados con el virus (Arcila, 2010; Santiago, 2016).

El contacto directo entre animales también puede ser una vía de transmisión, en casos de hacinamiento por periodos largos aumenta el porcentaje de seroconversión, y con la

separación y aislamiento de animales se tiene buenos resultados para disminuir los porcentajes de infección. Los factores que aumentan el riesgo de infección por esta vía son: edad avanzada, hacinamiento y exposición prolongada (Rowe *et al.*, 1997; Arcila, 2010).

En cuanto a la transmisión sexual existen relativamente pocos estudios sobre esta vía de transmisión. Se ha observado un mayor grado de seroconversión en hembras apareadas con machos infectados; también se ha demostrado la presencia del VAEC en células presentes en el moco estral de cabras infectadas, en epidídimo y vesícula seminal, así como en semen de machos caprinos infectados. Esto también sucede con otros retrovirus, como el VIH, el VIS, el VIB y el VIF, en los cuales ya se ha comprobado su transmisión por esta vía. El semen utilizado para inseminación artificial puede contener virus, sin embargo, a la fecha no existen reportes de que este pueda transmitir la enfermedad, aunque claramente puede representar un riesgo, ya que se ha reportado que se ha detectado por ELISA, PCR e Hibridación *in situ* (Blacklaws *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005; Minardi *et al.*, 2013; de Souza *et al.*, 2013).

La transmisión iatrogénica es dudosa, existen estudios que demuestran que se puede ocasionar seroconversión en hembras durante el ordeño, al inocular células infectadas en el canal del pezón. Sin embargo, la transmisión mecánica a través de máquinas ordeñadoras contaminadas no ha sido demostrada aún. Tampoco la transmisión mecánica a partir de agujas contaminadas u otro instrumental quirúrgico ha sido demostrada, aunque teóricamente debe ser tomada en cuenta (Lerondelle *et al.*, 1989; Blacklaws *et al.*, 2004).

I.I.VIII Patogenia

Actualmente está bien establecido que la transmisión de los LvPR se produce principalmente mediante el contacto con aerosoles de secreciones respiratorias procedentes de animales infectados (vía horizontal) y/o por la ingestión de leche o calostro infectado (vía lactogénica). El virus, en forma libre o asociado a células infectadas (monocitos/macrófagos y células dendríticas), entra en el hospedador a través del tracto respiratorio, la conjuntiva del animal o los capilares fenestrados del intestino en corderos (Glaría, 2015).

Una vez dentro del hospedador, el virus infecta macrófagos y células dendríticas de las mucosas, que migrarán a través del sistema linfático aferente hasta los linfonodos. Allí transmiten la infección a los monocitos, que se diseminarán por la linfa eferente y el conducto torácico, llegando al torrente sanguíneo e instaurando una infección sistémica. Los monocitos que se hallan en la sangre periférica se infectan pero no de una manera productiva, por lo que el virus permanece invisible al sistema inmune y es capaz de distribuirse por los órganos diana a modo de “Caballo de Troya”. En los tejidos, los monocitos maduran a macrófagos activando la replicación del virus que a su vez activa la respuesta inmune frente a los antígenos virales. Se producirá una infiltración de células linfocitarias hacia el tejido y se reclutarán nuevos monocitos, tanto infectados en estado de latencia como no infectados susceptibles de infectarse, estableciéndose los procesos inflamatorios característicos de la infección por LvPR. Se ha propuesto que a través de los monocitos, el virus podría alcanzar la médula ósea e infectar células madre mieloides o células del estroma, lo que resultaría en la instauración de la infección durante toda la vida del animal, ya que la médula ósea actuaría de reservorio y sería una fuente continua de células infectadas (Arcila, 2010; Glaria, 2015).

Tras el primer contacto del virus con el hospedador, se produce una breve viremia inicial que conducirá a la seroconversión del animal por la síntesis de anticuerpos frente a los antígenos virales. Estos anticuerpos pueden neutralizar el virus en un principio, pero no son capaces de eliminar totalmente la infección ya que el virus se inserta en el genoma celular entrando en un período de latencia que puede durar semanas, meses o incluso años. Después de este período y provocado por distintos posibles factores, el virus volverá a replicarse induciendo una reacción inmunitaria acompañada de la infiltración/acumulación de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en el tejido infectado, causando hiperplasia folicular, inflamación no supurativa y fibrosis. La afección de los tejidos provoca la aparición de los cuadros clínicos típicos (Glaria, 2015).

La infección por LvPR, activa la respuesta innata y adaptativa del organismo. Sin embargo, los LvPR inducen débilmente IFN I, de muchas células infectadas, incluidos los macrófagos, que son muy sensibles a la influencia de este tipo de interferón incluso aun siendo monocitos. El IFN I interfiere con la diferenciación y proliferación de monocitos a macrófagos. Existe un interferón inducido por lentivirus (LV-IFN), producido por células T, probablemente una mezcla de IFN- γ I y II que inhibe la proliferación de monocitos a macrófagos y por lo tanto también inhibe la replicación del virus en monocitos. Así mismo

tiene actividad quimio táctica para linfocitos, se ha sugerido que la presencia de este interferón produce la presencia masiva de linfocitos en las células diana. Se ha descrito que la infección por LvPR causa una baja expresión de IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (pro inflamatorias), lo que sugiere un descenso de la respuesta inmune frente a estos virus (Jarczak J., 2016).

La inhibición de muchas expresiones de citosinas en la sangre puede indicar la supresión de la respuesta inmune del organismo infectado, esto ha sido confirmado en parte por la observación de una menor respuesta inmune a antígenos micobacterianos en ovejas infectadas con LvPR (Jarczak J., 2016).

Los tejidos diana de los LvPR son el pulmón, el sistema nervioso central (SNC), las articulaciones y la glándula mamaria, provocando una enfermedad inflamatoria multisistémica que cursa con neumonía, encefalitis, artritis y/o mastitis. Por lo general, uno de los órganos se ve mayormente afectado, aunque varios tejidos pueden mostrar lesión con severidad variable. El tipo y el grado del cuadro clínico que se desarrolla están determinados por distintos factores, por un lado, la base genética de la especie, raza o animal hospedador que condiciona tanto la respuesta inmune innata como adquirida y por otro lado, las características genéticas y biológicas de la estirpe infectante que condicionarán el tropismo y la virulencia (Blacklaws, 2012).

I.I.IX Cuadros clínicos

a) Forma pulmonar

El signo clínico más característico de la afectación pulmonar por LvPR es la disnea o dificultad para respirar. Precisamente es este el significado de “maedi”, término islandés y que estaba acompañada de un aumento en la frecuencia respiratoria, respiración abdominal y jadeo. Este síndrome tiene gran relevancia con respecto a la prevalencia y pérdidas económicas ocasionadas en ovinos, aunque parece no ser tan frecuente en ganado caprino. Los signos clínicos están producidos por una neumonía intersticial, que aumenta el grosor de los septos alveolares y reduce progresivamente la capacidad del intercambio gaseoso de los pulmones afectados. Este aumento en el grosor de los septos está dado por la infiltración de células plasmáticas, linfocitos, monocitos y macrófagos, que lleva a un desequilibrio en el intercambio gaseoso y se acompaña sistémicamente de

una hiperplasia de las fibras musculares lisas. Como consecuencia se produce una pérdida progresiva de peso, que lleva a la caquexia y termina con la muerte del animal por insuficiencia respiratoria (Thomar, 2013; Glaria, 2015; Juste, 2001).

b) Forma mamaria

La forma mamaria fue descrita por primera vez en 1985 tanto en ovejas como en cabras, y ya desde entonces se consideró una vía de transmisión eficiente en los neonatos. La signología observada es una mastitis indurativa difusa, bilateral y crónica que muchas veces está asociada a la forma pulmonar. Afecta a animales adultos, de entre 3 y 5 años y suele pasar desapercibida ya que en estos animales es esperable cierto endurecimiento de las mamas y no cursa con dolor (Glaria, 2015).

c) Forma articular

La forma articular de la enfermedad se describió en los años 80 en Estados Unidos en cabras, aunque se ha descrito en ovinos, la incidencia es más elevada y tiene mayor importancia en ganado caprino. Esta manifestación clínica se caracteriza por una hipertrofia de la articulación, artritis proliferativa crónica y sinovitis que provoca cojera y marcha dificultosa en el animal. Macroscópicamente se observa engrosamiento en la articulación carpal, aunque también puede estar afectada la articulación tarsal, con congestión de las membranas sinoviales y fibrosis de la cápsula articular, por lo que la relación carpo/metacarpo está aumentado. En estadios avanzados puede incluso producirse erosión y destrucción del cartílago y hueso (Zink *et al.*, 1990; Glaria, 2015).

d) Forma nerviosa

La forma nerviosa de la infección comienza con la entrada de monocitos al SNC o la infección de macrófagos perivasculares. El virus provoca una alteración de la barrera hematoencefálica produciendo cambios en la permeabilidad vascular e incrementando la migración de células inflamatorias. Tras la invasión viral, se produce la lesión crónica inflamatoria no purulenta del neuroparénquima, provocando la signología nerviosa, que incluye debilidad del tercio posterior, descoordinación motora o ataxia y parálisis que normalmente conduce a la postración del animal, aunque permanece alerta y responde a estímulos externos (Lazcano, 2013).

Cuando la enfermedad avanza, el animal entra en un estado comatoso que culminará con la muerte. Esta forma clínica se describió por primera vez en Islandia tras la epidemia del VMV que asoló la isla en los años 40, y que denominaron “Visna”, desgaste en Islandes (Blacklaws, 2012).

I.I.X Importancia económica

El consenso general de las pérdidas económicas por LvPR es significativo. Los factores que influyen en las pérdidas económicas son variables, los signos clínicos son de lenta aparición y solo el 30% de los animales infectados muestran signología clínica. Los signos y las pérdidas no son evidentes si no se lleva un registro (Glaria, 2015).

La producción láctea decrece un 10%, causada por la mastitis indurativa, además de afectar la calidad ya que contiene menos grasa, lactosa y extracto seco, así como un alto porcentaje de células somáticas (Glaria, 2015).

Las crías que nacen de madres infectadas nacen con menor peso, esto puede hacer que las muertes perinatales aumenten lo que afecta la rentabilidad de la unidad de producción. Aunado a una alta tasa de reposición de las hembras por disminución de la fertilidad. Así mismo, las ganancias de peso se ven disminuidas y se estima que sucede en un rango de 0.3 a 3 kg por cordero al destete (Dohoo *et al.*, 1987; Peterhans *et al.*, 2004;).

La introducción o exportación de animales infectados es de vital importancia ya que como sucedió con México que al exportar ganado infectado los animales fueron sacrificados, con ello la pérdida económica fue de 3 millones de pesos (Lazcano, 2013).

I.I.XI Prevención y control

Hasta la fecha, no hay tratamientos eficaces contra los lentivirus y los programas de control se basan en la erradicación del agente infeccioso o disminuir la prevalencia de la infección. El primer país en tomar medidas para controlar la infección fue Islandia tras la epidemia sufrida en los años 50, llevando a cabo un reemplazo total de los rebaños que presentaban animales enfermos. Este método, aunque efectivo es económicamente inviable en países con alta tasa de animales infectados. Además, la eliminación de

ejemplares de alto valor en términos de producción iría en detrimento de la calidad genética de las razas (Reina *et al.*, 2009; Glaria, 2015).

La determinación de la prevalencia de la enfermedad debe ser la acción inicial en un programa de control, subsecuentemente se debe ir reduciendo la tasa de seroprevalencia y finalmente la erradicación de la infección. El ELISA y la PCR como pruebas confirmatorias pueden ser aplicadas para consolidar un estatus en rebaños libres (Reina *et al.*, 2009).

Se han descrito varios métodos eficaces para eliminar LvPR mediante la eliminación de rebaños infectados, pero depende de la prevalencia de la infección, el valor genético de los animales y los costos que sean posibles de asumir para la unidad de producción. Algunos autores y organizaciones mencionan una serie de recomendaciones para el control de la enfermedad. La medida de control de los LvPR más extendida se basa en la identificación temprana de animales positivos y el sacrificio selectivo de éstos y su descendencia, utilizando madres seronegativas para la reposición. Muestreos serológicos rutinarios con intervalos de hasta 12 meses, las crías no deben ser alimentadas con calostro o leche no pasteurizada de cabra, los animales introducidos deben ser en la medida de lo posible seronegativos y la importación debe ser monitoreada y controlada, la descendencia de animales seropositivos debe ser aislada, el ordeño de las hembras seropositivas debe ser después de ordeñar las negativas. Si el rebaño es positivo a LvPR no es recomendable separar a las crías de su madre después del parto, ya que si bien se disminuye el riesgo de contagio, pueden aumentar las muertes perinatales (Arcila, 2010; Glaria, 2015).

Con la eliminación de los animales infectados se ha logrado erradicar la infección en rebaños con seroprevalencias cercanas al 30% en un período de 2 a 7 años. En rebaños con seroprevalencias mayores se puede optar por la creación de otro rebaño libre de LvPR, separado físicamente del infectado. Las crías de reposición de este nuevo rebaño son destetadas tras el parto y se alimentan con calostro artificial o leche no infectada. En este caso no se eliminarían animales genéticamente valiosos, pero la necesidad de disponer de dos instalaciones independientes hace que no sea siempre viable. Otras medidas podrían ser la compra anual de animales libres de LvPR para la reposición o la selección genética de animales resistentes (Arcila, 2010; Glaria, 2015; www.sheepandgoathealth.co.uk).

I.I.XII Diagnóstico.

a) *Indirecto*

La manera más conveniente de diagnosticar infecciones por LvPR es la detección indirecta de anticuerpos (Glaría, 2015). Estos anticuerpos no protegen de la enfermedad, pero son buenos indicadores de la infección. Una variedad de técnicas de laboratorio están disponibles para este propósito, aunque no están exentas de problemas, como los derivados de la alta variabilidad genética y antigénica de las estirpes circulantes en el campo, el periodo de producción de anticuerpos y la cantidad producida por los animales, la intermitencia en la seroconversión durante la vida del animal infectado, la conservación de las muestras etc. Estas pruebas incluyen la inmunodifusión en gel de agar (IDGA), ensayo inmunoenzimático (ELISA), radioinmunoprecipitación (RIPA), radioinmunoensayo (RIA) y Western blot (WB). Cada uno de estos métodos de ensayo tiene sus ventajas y desventajas, y se tiene que decidir qué método utilizar en cualquier circunstancia particular. El desempeño de los diferentes métodos puede ser evaluado por la sensibilidad (falsos negativos) y especificidad (falsos positivos) (Peterhans *et al.*, 2004; De Andrés *et al.*, 2005; Glaría, 2015).

Sin embargo, no existe una "prueba de oro" para las infecciones retrovirales y las estimaciones de rendimiento se hacen por lo tanto relativas a alguna otra medida. En algunos estudios, se han utilizado animales con un estado infeccioso definido para este fin (por ejemplo, lotes cerrados negativos a largo plazo, infectados experimentalmente, etc.), mientras que en otros se han utilizado los resultados obtenidos a partir de pruebas previamente desarrolladas en muestras de campo, lo que no hace que deje de ser un poco subjetiva (De Andrés *et al.*, 2005).

Inmunodifusión en gel de agar. Se considera una de las técnicas más ampliamente utilizada para el diagnóstico de LvPR. Esta es la prueba prescrita para fines reglamentarios especificada por la OIE, la sensibilidad de esta prueba para la detección de anticuerpos anti-VAEC depende del antígeno utilizado. Se ha demostrado que las pruebas de IDGA que utilizan la glicoproteína de superficie gp135 presentan una mayor sensibilidad que las que utilizan la proteína de cápside p28 (VAEC) o p25 (VMV). Existen kits comerciales que usan antígenos de VMV o VAEC, pero se considera que tienen una pobre sensibilidad atribuible a la divergencia entre las proteínas Gag (25%) y Env (40%)

de VAEC y VMV. Otro factor relacionado es que la IDGA requiere la participación de múltiples interacciones epítotope-anticuerpos para obtener un resultado positivo. La combinación de las proteínas p24, p28, gp45 y gp135 mejoran mucho los resultados serológicos. La prueba IDGA parece tener una sensibilidad baja en comparación con RIPA, ELISA y WB. La especificidad aunque es alta indica que pueden producirse falsos positivos. Otro punto importante es que aunque la técnica es simple, su interpretación es subjetiva ya que requiere experiencia (Peterhans *et al.*, 2004; De Andrés *et al.*, 2005).

Western blot. Es más sensible que ELISA y es usada rutinariamente como prueba confirmatoria de los resultados indeterminados de ELISA en el caso de VIH, aunque no se ha hecho rutinariamente en el caso de LvPR (Zanoni, 1998; Peterhans *et al.*, 2004; Arcila, 2010).

Otras pruebas como radioinmunoprecipitación y radioinmunoensayo no son consideradas como pruebas rutinarias, ya que consumen mucho tiempo para su desarrollo y no pueden ser ocupadas para analizar un número grande de muestras. Aunque sí se pueden ocupar para validar otras pruebas (Peterhans *et al.* 2004; Arcila, 2010; Glaria, 2015).

Inmunoensayo asociado a enzimas (Enzymed-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Se han descrito más de 30 publicaciones que describen ELISAs para la detección de la infección por LvPR. Las pruebas de ELISA presentan la característica de tener una alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía. Se pueden realizar estudios poblacionales en corto plazo, además de ser sencillas y no requerir instalaciones costosas (De Andrés *et al.*, 2005; Arcila, 2010).

Estas pruebas se pueden categorizar según el uso de virus completo, proteínas recombinantes (o péptidos sintéticos) como antígenos, o ELISAS competitivas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales. Se estiman valores de sensibilidad desde un 92 a 100% y especificidad de 93 a 100% (De Andrés *et al.*, 2005).

b) *Directo*

El aislamiento viral. Los LvPR se pueden aislar *in vitro* en células fibroblásticas derivadas del plexo coroideo o de membrana sinovial. Sin embargo, la presencia de virus

en una muestra no implica necesariamente que sea capaz de infectar el cultivo celular con el que se pone en contacto. Para conseguir el aislamiento del virus se emplean fundamentalmente 2 métodos: el explante primario y el co-cultivo. Con ambos métodos el efecto citopático característico provocado por la replicación viral es la formación de sincitios, normalmente en 2 o 3 semanas, aunque es necesario esperar por lo menos 50 días para dar por negativo un cultivo, o por la actividad RT en el sobrenadante. Este método es lento, caro, laborioso y no se utiliza un número elevado de muestras (Arcila, 2010; Glaria, 2015).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica molecular detecta los ácidos nucleicos y los amplifica en millones de moléculas. La detección del genoma proviral se ha hecho en muestras de sangre (monocitos de sangre periférica (PBMs) y leucocitos derivados de sangre), leche y secreciones mamarias, semen, líquido sinovial. Siendo los monocitos de sangre periférica los más utilizados para esta prueba, aunque es importante resaltar que sólo hay un monocito infectado por cada 10^6 . Aunque cabe resaltar que para esta técnica se requiere el ADN de solo 15000 células, 188 partículas virales o 100 ng de ADN de células de membrana sinovial infectadas. Estudios han concluido que la PCR puede detectar animales infectados incluso antes de la seroconversión. Esto sugiere que la combinación de serología y PCR podría ser óptima para detectar animales infectados. Además en programas de control y erradicación puede ayudar a evaluar animales seronegativos. La PCR es rápida, sensible y específica, aunque es un poco costosa. Se han reportado en algunos trabajos una sensibilidad y especificidad del 91% al 97% respectivamente (De Andrés *et al.*, 2005; Glaria, 2015).

Son muchos los factores que pueden influir en la detección del virus por PCR, tales como el tipo y la calidad de la muestra, la carga viral en sangre que varía durante la infección, la variabilidad de las secuencias y la zona del genoma viral que se escoja para diseñar los iniciadores. Una de las estrategias para aumentar la sensibilidad es el uso de PCRs anidadas o semi-anidadas que implican dos o más rondas de amplificación (Glaria, 2015). Además, se puede combinar con el uso de iniciadores degenerados, que permitirían solventar el problema de la variabilidad entre secuencias. Las zonas conservadas del genoma son apropiadas para el diseño de los iniciadores cuando el propósito es el diagnóstico y zonas variables son más adecuadas para estudios filogenéticos. Las secuencias genómicas que sirven como blanco en las técnicas descritas pertenecen a la región LTR, al gen *pol* y el gen *gag*. Algunas de estas regiones se

consideran más conservadas, por ejemplo: *pol* y LTR son más conservadas que *gag*, a su vez la región *env* es muy variable comparada con las otras tres. LTR se sugiere como diana para el diseño ya que la secuencia está duplicada en la forma proviral insertada en el genoma del hospedador (De Andrés *et al.*, 2005; Arcila, 2010; Glaria, 2015).

II. JUSTIFICACIÓN

La introducción y movilización sin el debido control de ovinos de diferentes países y regiones del país, han sido la causa de la diseminación de esta infección a otros rebaños. Esta condición se ha agravado con prácticas de riesgo como la introducción de pie de cría importado, crianza mixta (caprino y ovino), inseminación artificial e incremento en la transmisión iatrogénica por una mayor aplicación de prácticas zootécnicas.

La importancia económica de esta enfermedad recae en el descenso en la tasa de natalidad y porcentaje de fertilidad, así como en el número de crías por parto, disminución en la producción y calidad de la leche, y en la eliminación prematura de animales infectados. El impacto en estos parámetros reproductivos y productivos tienen implicación directa en la rentabilidad de la unidad de producción y del inventario nacional (Peterhans *et al.*, 2004).

Los estudios realizados con los lentivirus que infectan ovinos y caprinos indican que son genética y antigénicamente muy variables, siendo necesario determinar si las técnicas de diagnóstico utilizadas regularmente en nuestro país son adecuadas para detectar ovinos infectados y que puedan ser adecuadas para el monitoreo rutinario de las infecciones lentivirales de los rumiantes.

III. OBJETIVOS

III.I Objetivo general

Identificar la frecuencia de infección en ovinos por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) en diferentes regiones del país utilizando técnicas de serología y biología molecular

III.II Objetivos particulares

Colectar muestras sanguíneas de ovinos con o sin signología relacionada a la infección por LvPR de diferentes estados del país, para obtener plasma y leucocitos de sangre periférica.

Identificar animales infectados por LvPR utilizando dos ELISAs comerciales y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Calcular valores de sensibilidad, especificidad y concordancia de cada técnica y en combinación para establecer la más adecuada para la identificación de ovinos infectados.

IV. HIPÓTESIS.

Debido a la movilización sin control e importación de animales, es posible identificar ovinos seropositivos a la infección por LvPR en rebaños de diferentes regiones del país, así mismo, estos ovinos seropositivos serán positivos a la técnica de PCR.

V. METODOLOGÍA.

V.I Animales de estudio.

Se realizó un muestreo por conveniencia en rebaños ovinos de 4 estados de país y 18 municipios. Se colectó sangre por venopunción de la vena yugular utilizando tubos Vacutainer® con anticoagulante (heparina), transportando las muestras en refrigeración hasta el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES-Cuautitlán. UNAM.

Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 min., para separar el plasma, la capa flogística y los eritrocitos. Se recuperó el plasma en tubos cónicos para su posterior evaluación en técnicas de ELISA y la capa flogística se conservó en PBS hasta la extracción de ADN para ser utilizado en la técnica de PCR (Apéndice I).

V.II Inmuno Ensayo ligado a Enzimas (ELISA´s)

Las dos pruebas comerciales de ELISA se realizaron conforme a las instrucciones de los fabricantes.

ELISA indirecta (Eradikit SRLV, IN3 diagnostic, Italy). Esta prueba tiene dos fases, la primera es de tamizaje de los animales y la segunda para la genotipificación de las muestras positivas. Este kit utiliza una combinación de péptidos de la región *gag* y *env* de dos genotipos de LvPR diferentes, A y B (Apéndice II). La sensibilidad y especificidad de esta prueba es de 99 % y 90% respectivamente (Rodríguez, 2017). ELISA competitiva (VMRD, U.S.). Esta prueba detecta anticuerpos contra la glicoproteína de superficie gp135. La sensibilidad y especificidad reportada es de 100% y 96.4 % respectivamente, comparada con inmunoprecipitación (Herrmann et al 2003) (Apéndice III).

V.III Extracción de ADN

De la capa flogística (leucocitos) se extrajo el ADN total utilizando el Kit comercial (Favorprep) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez eluido en ADN se mantuvo en conservación a -20° C (Apéndice IV).

V.IV PCR

Para la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron dos iniciadores ubicados en la región LTR, iniciador sentido (TCASKGTGACAAAATGTAA) e iniciador antisentido (TGTTGCACAGAWTWAGGRACG), con los cuales se esperaba un producto de amplificación de 291 pb, el control positivo se obtuvo de un sobrenadante de cultivo celular infectado y se comprobó por secuenciación nucleotídica (Rodríguez, 2017).

La mezcla de reacción fue: 1X de buffer, 2.5 mM de Cl_2Mg , 230 μM de dNTP's, 600 nM de cada iniciador, 5 U/ μl de Taq polimerasa y 500 ng de ADN problema, cbp para 30 μl .

Los ciclos de amplificación fueron: un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 5 min.; 45 ciclos de desnaturalización (95°C, 5 min.), hibridación (58°C, 40 seg.) y extensión (72°C, 40 seg.); y una extensión final de 72 °C por 15 min.

Los productos de la reacción fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados a través de un transiluminador de luz UV.

Las muestras evaluadas por PCR fueron aquellas seropositivas a una o ambas pruebas serológicas y un grupo de muestras seronegativas (n=142) tomadas al azar.

V.V Análisis de resultados

Para la comparación de la eficiencia de las pruebas se calculó el índice de concordancia entre pruebas utilizando el valor kappa de Cohen con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó la herramienta de diagnóstico: concordancia entre pruebas del programa informático Working in Epidemiology disponible en <http://www.winepi.net/sp/index.htm>.

VI. RESULTADOS

Se obtuvieron 582 muestras de sangre de ovinos las cuales se distribuyeron de la siguiente forma según el estado de procedencia: Hidalgo 182 (31%), Estado de México 188 (32%), Veracruz 52 (9%) y Tlaxcala 160 (28%) (Figura 2).



Fig. 2. Procedencia por estado de las muestras evaluadas. Se muestra el porcentaje que represento según el origen de las muestras. Se observa una distribución similar entre los estados de Hidalgo, Estado de México y Tlaxcala.

La población de ovinos de estudio estuvo mayormente representadas por las razas Dorper (24.7%), Suffolk (19.4%), Criollas (17.5%) y ovinos de origen de Nueva Zelanda (11.7%) (Figura 3).



Fig. 3. Esta grafica muestra cómo se agrupan las razas de ovinos por su estado de origen. El total de animales criollos fueron 102, de la raza Dorper 144, Hampshire 33, Kattadine 38, ovinos de origen de Nueva Zelanda 68 y Suffolk 113.

De acuerdo a la metodología del fabricante en las dos pruebas de ELISA comerciales utilizadas se obtuvieron los siguientes resultados en la evaluación serológica (Figura 4 y 5).

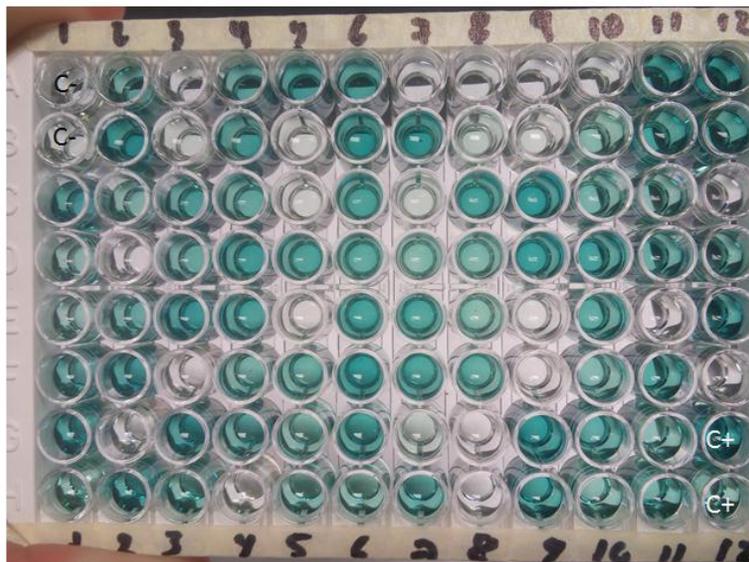


Fig 4. Placa ELISA (Eradikit). En los pozos 1A y 1B se muestran los controles negativos, en los pozos 12G y 12H los controles positivos, los pozos restantes se evaluaron muestras de plasma ovino.

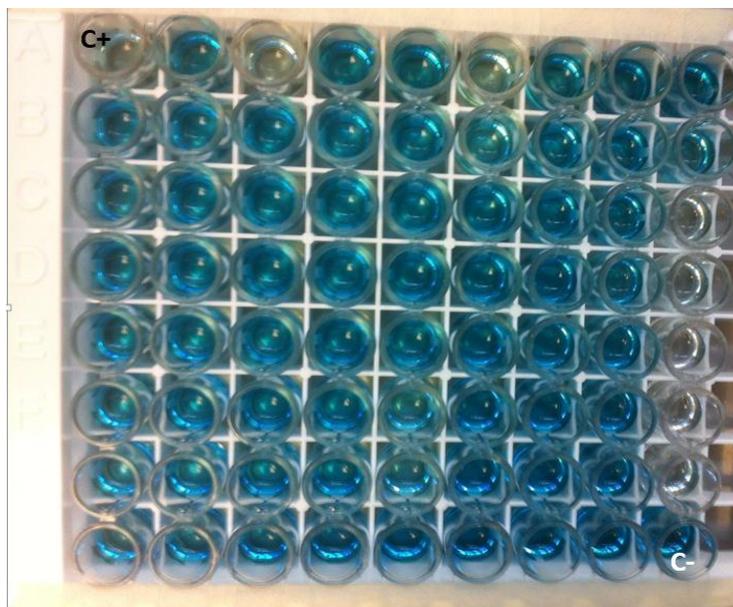


Fig 5. Placa ELISAc (VMRD). En el pozo A1 se muestra el control positivo, en el pozo H9 el control negativo. En los demás pozos se evaluaron muestras de plasma ovino.

Según el estado y municipio de origen se muestran los resultados obtenidos en las dos pruebas de ELISA comerciales utilizadas. Del estado de Hidalgo se muestrearon ovinos de 6 municipios diferentes: Mineral de la Reforma (a), Tezontepec (b), Zempoala (c), Mineral del Monte (d), Mineral del Chico (e), y sin información (f). Del Estado de México 5: Cuautitlán (g), Sultepec (h), Jocotitlan (i), Melchor Ocampo (j) y Nicolas Romero (k). De Veracruz solo un municipio Xaltepec (l) y de Tlaxcala 6 municipios: Hueyotlilpan (m), Alzayanca (n), Huamantla (o), Teacalco (p), Atlangatepec (q) y Muñoz de Domingo (r) (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos utilizando dos Kits comerciales de ELISA que detectan anticuerpos contra LvPR en 582 muestras de ovinos.

Estado	Municipio	N	POSITIVOS (%)		VMRD/ERADIKIT (%)*			
			VMRD	Eradikit	+/+	+/-	-/+	-/-
Hidalgo								
	a	65	18 (27.7)	13 (20)	8 (12.3)	10 (15.4)	5 (7.7)	42 (64.6)
	b	20	0	1 (5)	0	0	1 (5)	19 (95)
	c	45	0	0	0	0	0	45 (100)
	d	34	0	0	0	0	0	34 (100)
	e	11	0	0	0	0	0	11 (100)
	f	7	2 (28.6)	2 (28.6)	2 (28.6)	0	0	5 (71.4)
	Total	182	20 (11)	16 (8.8)	10 (5.5)	10 (5.5)	6 (3.3)	156 (85.7)
Estado de México								
	g	7	0	0	0	0	0	7 (100)
	h	23	0	0	0	0	0	23 (100)
	i	100	50 (50)	33 (33)	32 (32)	18 (18)	1 (1)	49 (49)
	j	27	0	0	0	0	0	27 (100)
	k	31	0	0	0	0	0	31 (100)
	Total	188	50 (26.6)	33 (17.6)	32 (17)	18 (9.6)	1 (0.5)	137 (72.9)
Veracruz								
	l	52	11 (21.2)	8 (15.4)	8 (15.4)	3 (5.8)	0	41 (78.8)
Tlaxcala								
	m	30	0	0	0	0	0	30 (100)
	n	50	0	0	0	0	0	50 (100)
	o	20	0	0	0	0	0	20 (100)
	p	20	0	1 (5)	0	0	1 (5.0)	19 (95)
	q	20	0	2 (10)	0	0	2 (10.0)	18 (90)
	r	20	0	0	0	0	0	20 (100)
	Total	160	0	3 (1.9)	0	0	3 (1.9)	157 (98.1)
Total evaluados		582	81 (13.9)	60 (10.3)	50 (8.6)	31 (5.3)	10 (1.7)	491 (84.4)

Se separaron por estado y municipio, en parentesis el porcentaje (%) y el número de animales a la izquierda del paréntesis.

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

La prueba serológica más eficiente fue el ELISA de VMRD detectando 81 ovinos seropositivos en contraste la prueba de ERADIKIT solo detectó 60, sin embargo, en conjunto las dos técnicas detectaron un total de 91 ovinos seropositivos.

Con la técnica de PCR utilizada para la detección de ADN proviral de LvPR, se visualizaron productos de amplificación positivos de 291 pb (Figura 6), es importante recalcar que todas las muestras seropositivas a uno o ambos kits fueron evaluadas a PCR más algunas muestras seronegativas elegidas al azar.

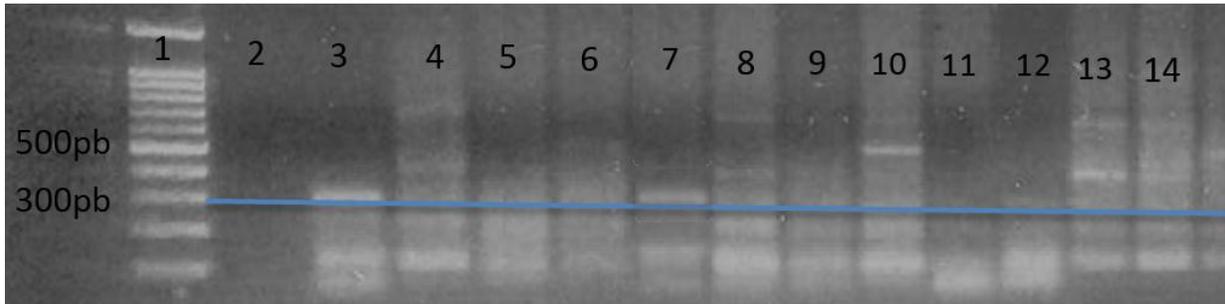


Fig. 6 Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, en el carril 1 se muestra el marcador de pares de bases (pb), en el carril 2 y 3 el control negativo y positivo respectivamente, del carril 4 al 14 son muestras problema, en los carriles 7, 12-14 se muestran amplicones positivo a LTR de LvPR.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en serología (seropositivos a una o ambas técnicas) y PCR en combinación.

Del total de muestras evaluadas (582) a serología se obtuvieron 91 muestras positivas a una o ambas técnicas, 81 a el ELISA de VMRD y 10 más a el ELISA de Eradikit que no detectó el ELISA de VMRD, todas ellas se evaluaron a PCR de LTR junto con algunas muestras seronegativas (n=51) de 18 municipios estudiados elegidas al azar para dar un total de 142 muestras, de las cuales 69 resultaron positivas a PCR (48.6%). De estas 69 muestras positivas a PCR-LTR solo 47 lo fueron en serología y PCR (33.1%). En el caso de seronegativas 22 fueron positivas a PCR (15.5%).

En cuanto a los resultados obtenidos por raza se muestran en la figura 7, donde se observa que el número de animales positivos con el uso combinado de las diferentes técnicas utilizadas, fueron de la raza Dorper (34.7%) y Kattadine (31.6%), resultando con un mayor número de animales infectados.

Tabla 2. Resultados obtenidos por serología y PCR de ovinos de diferentes municipios de 4 estados de la República Mexicana

ESTADO	MPIO	Seropositivos	Evaluadas por PCR	PCR+ (%)	ELISA/PCR (%)*			
					+/+	+/-	-/+	-/-
Hidalgo	A	23	27	0	0	23 (85.2)	0	4 (14.8)
	B	1	2	1 (50)	0	1 (50)	1 (50)	0
	C	0	7	0	0	0	0	7(100)
	D	0	6	2 (33.3)	0	0	2 (33.3)	4 (66.7)
	F	2	2	0	0	2 (100)	0	0
Edo Méx.	I	51	52	38 (73.1)	38 (73.1)	13 (25)	0	1 (1.9)
Veracruz	L	11	22	11(50)	6 (27.3)	5 (22.7)	5 (22.7)	6 (27.3)
Tlaxcala	P	1	11	9(81.8)	1 (9.1)	0	8 (72.7)	2 (18.2)
	Q	2	13	8(61.5)	2 (15.4)	0	6 (46.1)	5 (38.5)
Total		91	142	69(48.6)	47 (33.1)	44 (31)	22 (15.5)	19 (20.4)

Solo se muestran los municipios (letras) en los cuales se identificaron seropositivos o se evaluaron a PCR. Porcentaje dentro del parentesis y número de muestras por la izquierda del paréntesis.

*Resultado obtenido en los ELISAS o PCR y expresado como positivo (+) o negativo (-), mostrando siempre a los ELISAS por la izquierda.



Fig. 7 Resultados de detección de la infección por LVPR mostrados por raza. Se muestran el número total de animales estudiados por raza y el total de animales positivos a LvPR (en al menos serología y/o PCR).

Respecto a los resultados obtenidos por sexo se muestran en la figura 8, sólo se copilaron los datos de sexo en 451 muestras de las 582, de estas 439 fueron hembras y 12 machos. De las hembras 60 (13.7%) fueron positivas en al menos una de las dos pruebas serológicas utilizadas o PCR. De los 12 machos sólo 2 fueron positivos a alguna prueba (16.7%).

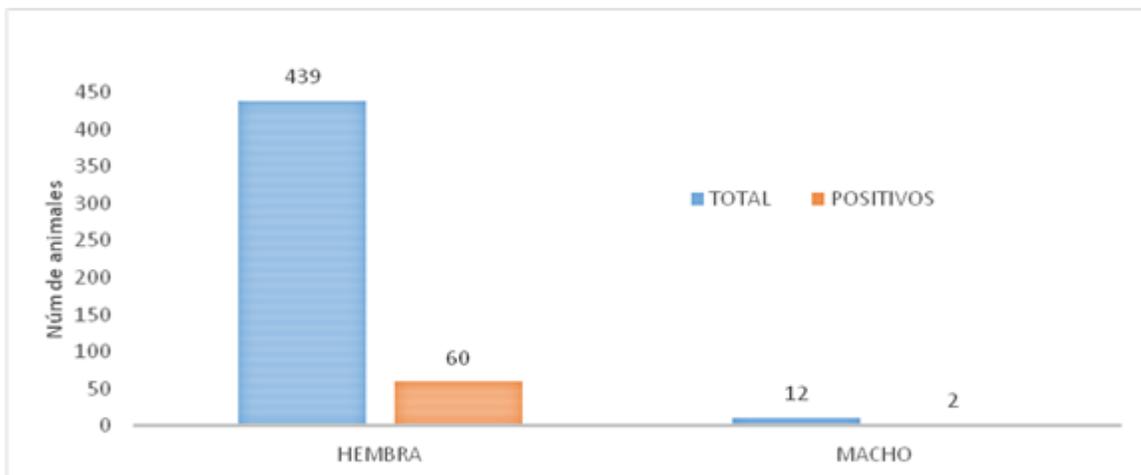


Fig. 8 Resultados obtenidos por serología agrupados por sexo

Con la finalidad de comparar la calidad diagnóstica de las dos pruebas de ELISA comerciales utilizadas se tomo como prueba de referencia la prueba que detectó más animales infectados (ELISAc VMRD) y se realizó una tabla de contingencia de 2x2 (Figura 9) para evaluar el grado de concordancia entre las técnicas utilizando el coeficiente Kappa de Cohen con un nivel de confianza del 95%, obteniendo un coeficiente kappa de 0.670, lo que indicó un grado de concordancia adecuado (bueno) entre ambas pruebas. Así mismo, se encontro una sensibilidad del 61.7 %, especificidad de 98 % y fiabilidad del 93 % para la prueba de Eradikit. Esto indica que un individuo negativo tiene la posibilidad del 94.1 % de ser realmente sano, mientras que un positivo tiene la probabilidad del 83.3 % de ser individuo enfermo.

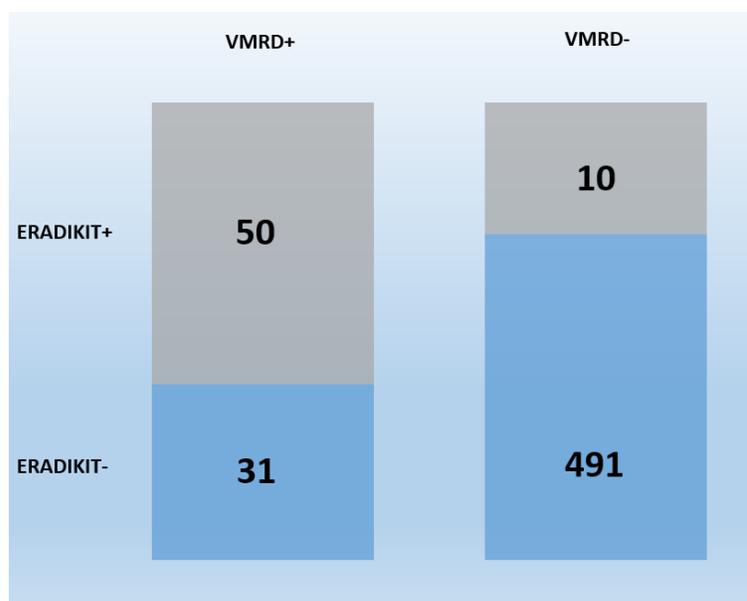


Fig. 9 Tabla de contingencia de 2x2 comparando dos ELISAS comerciales VMRD y Eradikit. Se tomo como prueba de referencia el ELISA de VMRD.

En el caso de la comparación entre la evaluación de serología y PCR, se tomo como prueba de oro los resultados combinados de seropositivos y seronegativos obtenidos en ambas pruebas. Obteniendo como resultado un indice kappa de 0.02, una sensibilidad del 51.6%, especificidad del 46.3 % y prevalencia real de 68.9% en la población estudiada (Fig. 10)

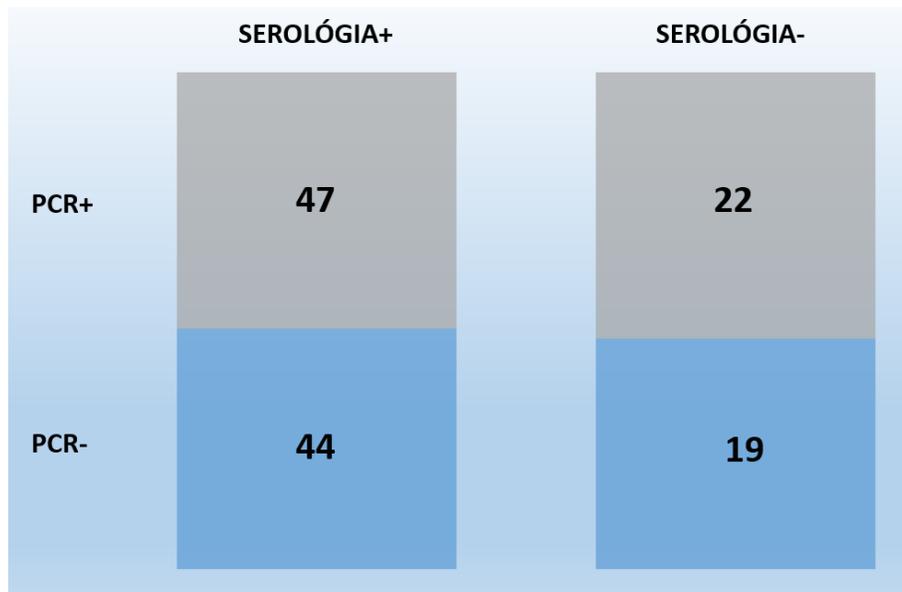


Fig. 10 Tabla de contingencia de 2x2 comparando la serología con la técnica de PCR. Se tomo como prueba de oro el resultado combinado obtenido por serología.

VII. DISCUSIÓN

El total de muestras evaluadas en el presente estudio incluyó un amplio número de municipios (18) de 4 estados de la República Mexicana, los cuales abarcan el 40.6% del total de la población ganadera de ovinos, de acuerdo a los últimos datos disponibles. Los datos obtenidos mostraron la situación de la infección por LVPR en ovinos de algunas zonas de la región central del país. Aunque estos datos no necesariamente reflejan lo que sucede en todo el país. Es importante mencionar que hay pocos estudios de prevalencia de la infección de ovinos por LVPR en el país, el más reciente indica que la prevalencia fue de 17.7%. Por otro lado, la evaluación de la eficacia de las técnicas que pueden utilizarse para el diagnóstico de LVPR en ovinos no se ha estudiado a fondo en nuestro país.

La prueba de ELISA comercial VMRD detectó la mayor cantidad de ovinos seropositivos en comparación con el ELISA Eradikit. Ambas pruebas tienen una base antigénica diferente en su diseño, ya que el ELISA de VMRD incluye la proteína de superficie viral y el de Eradikit péptidos de las proteínas de cápside y matriz, lo que evidentemente marco una diferencia en la detección de anticuerpos contra LVPR como ha sido descrito por de Andrés y cols., (2013). Rodríguez en el 2016 evaluó 10 machos ovinos con el ELISA de VMRD, Elitest y péptidos sintéticos, observando que igual que en el presente estudio el ELISA de VMRD detectó mayor número de animales positivos. Estos estudios refuerzan la idea de que para los ovinos del país, o por lo menos en las regiones evaluadas la prueba de ELISA VMRD tiene una mejor eficiencia de detección de anticuerpos contra LVPR. Esto último se contrasta con lo observado por Ramírez y colaboradores en el 2011, en cuanto a ovinos en el cual utilizó el ELISA de VMRD, un ELISAI (Pourquier), Elitest y Chekit para 80 muestras, resultando todas negativas excepto 2 muestras que fueron positivas a Chekit. Así mismo, Rodríguez en el 2017, evaluó 73 ovinos de Sinaloa obteniendo una mejor detección con Eradikit, ya que este detectó 4 ovinos positivos y el ELISA de VMRD ninguno. Estos trabajos muestran diferencias en la detección de la infección por LVPR en los ovinos, lo que indica que ninguna prueba cubre todo los espectros antigénicos/genéticos de los virus, que la composición antigénica de cada prueba genera resultados diferentes. Posiblemente en el presente trabajo fue más sensible la prueba de ELISA de VMRD porque la proteína de superficie con la cual está diseñado es un antígeno que entra en primera instancia en contacto con el sistema

inmune generando la producción de anticuerpos y no ha si las proteínas de cápside y matriz que estimulan al sistema inmune posteriormente; por otro lado los antígenos utilizados en el ELISA de Eradikit son péptidos y en VMRD es una proteína completa, teniendo esta última más epítomos inmunodominantes de unión para los anticuerpos (Glaría, 2015; Rodríguez, 2017; Ramírez, 2011)..

En cuanto a las seroprevalencias reales para los estados muestreados presentaron un rango amplio que fue desde el 0% en el estado de Tlaxcala hasta un 26.6 % en el estado de México, pasando por un 11% para Hidalgo y 21.2 % para Veracruz. Cabe recalcar que en el Estado de Veracruz se obtuvo un porcentaje de seropositividad alto (21.2%) en comparación con otros estados, y esto puede ser debido a que los hatos muestreados tenían ovinos y caprinos en convivencia y como lo demostró Rodríguez (2017) esta convivencia aumenta los niveles de infección entre especies. Para el caso de Tlaxcala ninguna muestra fue seropositiva al ELISA de VMRD, pero si a Eradikit (3 animales).

Si bien, es difícil concluir cual es la mejor prueba de diagnóstico para detectar ovinos infectados con LVPR, ya que esto no solo depende del Kit elegido, si no de cuestiones inherentes al animal como puede ser el genotipo viral que lo esté infectando, la seroconversión con ese genotipo, susceptibilidad por especie y raza, la interacción con retrovirus endógenos, etc., (Rodríguez, 2017, Martínez, 2004). Martínez en el 2004 encontró diferencias en el tiempo de seroconversión en animales infectados experimentalmente, con la misma carga viral y cantidad de virus pero diferente genotipo (Martínez, 2004). En cuanto al Kit utilizado se debe tener en cuenta la composición genética utilizada como antígeno (existen epítomos inmunodominantes con alta heterogenicidad) y el tipo de este, ya sea virus completo, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, etc.; dada la alta variabilidad genética en ciertas regiones, como por ejemplo el gen *env*. En el caso de VMRD por su diseño, proteína completa, tiene más epítomos inmunodominantes de unión para los anticuerpos. Es por eso que el uso de pruebas comerciales no asegura la detección de todos los genotipos virales presentes en cierta región

Eradikit si bien es un kit nuevo en el mercado mexicano de fabricación Italiana, diseñado con antígenos derivados de cepas Italianas e Islandesas, no se tienen muchos estudios con esta prueba en otros países. La ventaja de este recae en que contiene como antígenos una combinación de péptidos de las proteínas de cápside y matriz, lo que

favorece la detección de un mayor número de genotipos virales (Glaría, 2015; Mordasini *et al*, 2006).

Dado a estas características Eradikit pudo detectar un 1.8% de animales seropositivos adicionales que VMRD no detecto, si bien, Eradikit solo detecto 60 animales positivos, que son menos que los 81 por VMRD. Esta diferencia puede ser debida a que los 10 animales negativos a VMRD y positivos a Eradikit estén infectados con un virus genotipo A (VMV). Esto refuerza la idea de que no hay prueba de oro y es importante la utilización más de una prueba para complementar el diagnóstico (Lazcano, 2013).

En cuanto a los porcentajes de positividad en algunas regiones del país en el presente estudio se obtuvo un 15.63%, comparado con otros autores que reportaron en borregos: 15% (Pérez, 2003), 5.5% (Rodríguez, 2017), 6.95% (Lazcano, 2013); Barrera y colaboradores en el 2016 obtuvieron de 649 ovinos de 6 estados del país una seropositividad del 17.7 %, aunque no de todos los estados evaluados se identificaron ovinos seropositivos (Barrera *et al*, 2016).

En cuanto al número total de machos estudiados se obtuvo una población pequeña, esto es coherente con el número de machos por hembras requerido, ya que en el estudio se evaluaron 12 machos y 439 hembras que da una proporción de 1:36 machos por cada hembra, resultado coherente con lo reportado por algunos autores (Pérez, 2005). La importancia del macho en la explotación recae en el alto número de hembras que puede cubrir y con ello diseminar este u otros problemas infecciosos. Con el uso más extendido de la inseminación artificial también se puede diseminar la enfermedad por el semen o bien por el equipo e instrumental (iatrogenia), según lo reportado por Martínez y cols., (2004) y de Souza y cols., (2013) ya que si bien es controversial la transmisión sexual se ha demostrado la presencia de macrófagos en el tracto reproductor masculino y esto permite presuponer que podrían permitir la presencia viral, ya que el macrófago es la célula blanco de los LVPR y podrían ser fuente de infección en el animal. Además en este trabajo encontraron por inmunotransferencia anticuerpos contra la gp135 en líquido seminal y por inmunocitoquímica en vesícula seminal, glándulas bulbouretrales, etc. Un seminal puede encontrarse clínicamente sano y a la vez infectado, por lo tanto actuar como diseminador de la infección por LVPR (Martínez, 2004; de Souza *et al*, 2013).

Otro punto a discusión es la temporada en la cual se tomaron las muestras sanguíneas, ya que por lo observado por Gómez-Lucia y colaboradores (2014), han determinado que la expresión viral de LvPR aumenta durante el parto y la lactancia en borregos, con el posible aumento en la transmisión de la infección a las crías (Gómez-Lucia *et al.*, 2014).

Si bien las muestras fueron tomadas alrededor de mediados del año 2015 (Hidalgo de agosto a septiembre; Estado de México de septiembre a marzo; Veracruz en marzo y Tlaxcala de febrero a octubre) a mediados de 2016, como se sabe la mayoría de las borregas paren en primavera en nuestro país (Porrás *et al.*, 2003), por lo cual las muestras tomadas en el peri parto y lactación pueden tener una mayor positividad tanto a ELISA como a PCR. Como fue el caso para el estado de Veracruz, en el cual se tomaron las muestras en esta época y los resultados de seropositividad fueron moderados (21.2% y 15.4% a VMRD y Eradikit respectivamente). Si bien, en el Estado de México, municipio de Jocotitlán fue donde se encontró una mayor seropositividad (50% al ELISA de VMRD), este municipio fue muestreado a finales del año contrastando con lo anterior.

En cuanto a los resultados obtenidos por PCR fueron inconsistentes con lo esperado, ya que esperábamos que la mayoría de los ovinos seropositivos fueran positivos a la detección de ADN proviral. Este resultado puede estar influenciado por varias razones: Como puede ser la región de amplificación a la que fue dirigida, que si bien, se escogió LTR por ser una región conservada y que había dado buenos resultados en otros estudios en comparación con otras regiones como gag-pol y pol (Ramírez, 2011). Otro factor que pudo influir fue que en el presente estudio se utilizó el ADN completo derivado del paquete leucocitario y considerando que una cantidad muy baja de monocitos pueden estar infectados en la sangre, el ADN molde viral pudo estar muy pobremente representado, aunque algunos autores estiman que la técnica de PCR es capaz de detectar 100 ng de ADN problema (De Andres *et al.*, 2005). Para resolver esta situación se puede utilizar un gradiente de densidades como lo hizo Martínez en el 2004 (Ficoll-Hypaque), en el cual se pueden separar los mononucleares de las demás células y enriquecer el ADN de interés, pero esta técnica es más laboriosa y costosa. Otras opciones que pueden mejorar la detección de la infección de LVPR por PCR es el uso de PCR semianidadas, ya que al ser reamplificadas las pocas cadenas de ADN se puede asegurar el producto de amplificación en la segunda ronda, como lo observado por Rodríguez en el 2016, ya que utilizó una PCR semianidada punto final y obtuvo un mayor

número de positivos con respecto a la serología. Aunque no fue infalible ya que de las seropositivas (4), solo fueron positivas a PCR dos y las otras dos se escaparon de la detección de ADN proviral (Rodríguez, 2017).

Si bien numerosos autores estiman que la PCR puede detectar positivos antes de que seroconviertan le da un punto a favor para seguir trabajando con esta técnica. En el presente trabajo también se detectaron animales positivos a PCR y no a a las pruebas serológicas.

La técnica de PCR no siempre detecta el ADN proviral, según lo observado por Sanjosé y colaboradores (2015) en un estudio realizado en el que evaluando por PCR diferentes regiones genéticas en diferentes periodos en animales infectados experimentalmente, se observó una fluctuación en la detección de ADN proviral a lo largo del estudio, esto puede ser atribuible a mutaciones que afecten los sitios de unión de los iniciadores o la dinámica de replicación viral *in vivo*, de acuerdo a el tipo de cepa (rápida o lenta) que afecte al animal (Sanjosé *et al.*, 2015).

Cabe resaltar que hasta el momento se han identificado al menos 23 subtipos genéticos de LvPR que infectan a los pequeños rumiantes (Ramírez *et al.*, 2013). Otros estudios han demostrado que el uso combinado de técnicas serológicas y moleculares (Barquero *et al.*, 2013) favorecen la detección de la infección por LvPR.

Al tener mejor identificados los genotipos que infectan el ganado nacional se pueden mejorar los sitios de unión de los primers para una detección mejor del ADN proviral. En el país son escasos los estudios sobre los genotipos virales que infectan el ganado, Ramírez y colaboradores detectaron el genotipo B1. (Ramírez, *et al.*, 2011), por lo cual si se trabaja sobre este tenor, se puede tener información más clara para el diseño de los cebadores y evaluar su capacidad.

Otro punto puede ser que la técnica de PCR no detecta siempre el ADN proviral, según lo observado por Sanjosé y colaboradores (2015) ya que ellos realizaron PCR a diferentes regiones en diferentes periodos en animales infectados experimentalmente y se observó una fluctuación en la detección de ADN proviral a lo largo del estudio, esto puede ser atribuible a mutaciones que afecten los sitios de unión del primer o la dinámica de

replicación viral *in vivo*, de acuerdo a el tipo de cepa (Rápida o lenta) que afecte al animal (Sanjosé *et al.*, 2015)

Si bien los estados muestreados representan el 40.6 % del total nacional de población ganadera según los datos del SIAP a la última fecha reportada, existen otros estados con amplia densidad de ovinos como Guanajuato, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí, que tenían hasta el 2014 un inventario de más de 350 mil cabezas de ganado cada uno. Es importante elaborar un muestreo estratificado y más amplio para conocer con mayor exactitud la incidencia de la infección con LvPR en el país, por lo menos en los estados con mayor cabezas de ganado (SIAP, 2017)

VIII. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de anticuerpos contra lentivirus de Pequeños Rumiantes y DNA proviral de LVPR en ovinos de Hidalgo, Estado de México, Veracruz y Tlaxcala.

El diagnóstico de LvPR se debe complementar con serología y técnicas diagnóstico molecular.

Es necesario seguir trabajando en el genotipado de los LvPR que infectan el ganado nacional para mejorar las herramientas de diagnóstico molecular.

Es necesario realizar muestreos estratificados en todas las regiones importantes en número de cabezas para determinar la situación real del nivel de prevalencia de la infección por LvPR en ovinos en el país.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. DOF. 04/05/2016 http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5436016&fecha=04/05/2016, consultado el 08 de mayo de 2016

Arcila L. G., Martínez R. H., Tortora L. J., Detección de anticuerpos contra lentivirus de pequeños rumiantes en fetos ovinos y caprinos, *Veterinaria México*, 2012, 43, 9-15.

Arcila L. G., Tesis de Maestría "Estudio del virus de Artritis Encefalitis Caprina en glándulas accesorias del aparato reproductor de machos caprinos", UNAM, 2010.

Blacklaws B.A., Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2012, 35, 259-269.

Blacklaws B.A., Berritua E., Torsteinsdottir S., Watt. N., de Andrés D., Klein D., Harkiss G., Transmission of small ruminant lentiviruses, *Veterinary microbiology*, 2004, 101, 199-208.

Barrera C.S., González M. A., Mendiola B. W., Hernández G. J., *et al.*, Detección serológica de lentivirus en México, *Memorias del XIX Congreso Internacional de Ovinocultura*, México, 2016.

Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, consultado el 15 de enero de 2017.

De Souza C. K., Rizaldo P. R., Oliveira S. D., Lomonte L. R., *et al.*, Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination, *Small Ruminant Research*, 2013, 109, 293-198.

De la Concha-Bermejillo A. Retrovirus en Ovinos y Caprinos: Maedi y Artritis Encefalitis Caprina. Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, USA, 1999.

De Andres D., Klein D., Watt N., Berritua E., Torsteinsdottir S., Blacklaws B., Harkiss G., Diagnostic test for small ruminant lentiviruses, *Veterinary microbiology*, 2005, 107, 49-62.

Dohoo I.R., Heaney D., Steverson R., Samagh B., Rhodes C., The effects of Maedi-visna virus infection on productivity in ewes, *Preventive Veterinary Medicine*, 1987, 4, 471-484.

Eguiluz C., De Aluja A.S., Neumonía intersticial progresiva (Maedi) y Adenomatosis pulmonar en vísceras de ovidos decomisadas, *Nota Informativa, Veterinaria México.*, 1981, 12.

Gendelman H., Narayan O., Kennedy-stoskopf S., Kennedy P., *et al.*, Infection and Virus Gene Expression Increase during Maturation of Monocytes to Macrophages. *Journal of Virology*, 1986, 58, 67-74.

Glaría E. I., Tesis Doctoral "Base genética del tropismo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3", Universidad Pública de Navarra, España, 2015

Gomez-Lucia E., Sanjosé L., Crespo O., Reina R., *et al*, Modulation of the long terminal repeat promoter activity of small ruminant lentiviruses by steroids, *The Veterinary Journal*, 2014, 202, 323-328.

Herrmann L., Cheevers W., McGuire T., Scott Adams D., Hutton M., Gavin W., Knowles D., 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*, 2003, 10, 267-271.

Jarczak J., Kaba J., Reczynska D., Bagnicka E., Impaired expression of cytokines as a result of viral infections with an emphasis on small ruminant lentivirus infection in goats, *Viruses*, 2016, 8, 186.

Juste R.A., De la Concha A., "Maedi-Visna", *Rev Ovis*, 2001, 77, 9-26

Lazcano R. M., Tesis de Licenciatura "Detección de anticuerpos en sementales carpinos y ovinos a lentivirus de pequeños rumiantes, en 7 estados del país", Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2013.

Lerondelle, C., Fleury, C., Vialard, J. The mammary gland: target organ for infection with the caprine arthritis and encephalitis virus, *Animal Research Veterinary*, 1989; 20, 57-63.

Martínez R. H., Tesis Doctoral "Diseminación del virus artritis encefalitis caprina (AEC) a partir de machos caprinos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor", UNAM, 2004.

Martínez R. H., Ramírez A. H., Tórtora P. J., Aguilar S. A., *et al*, Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos, *Veterinaria México*., 2005, 36 (2), 159-176.

Minadi C. J., Kumar S. D., Lamara A., Chebloune Y., Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) Break the Species Barrier to Acquire New Host Range, *Viruses*, 2013, 5, 1867-1884.

Molina M. R., Trigo T. J., Cutlip R. C., Estudio serológico de la neumonía progresiva ovina en México, *Veterinaria México*, 1986, 17.

Mordasini F., Vogt H., Zahno M., Maeschili A., Nenci C., Zaroni R., Peterhans E., Bertoni G., Analysis of the Antibody Response to an Immunodominant Epitope of the Envelope Glycoprotein of a Lentivirus and Its Diagnostic Potential, *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44, 981-991.

Peterhans E., Greenland T., Badiola J., Harkiss g., Bertoni G., Amorena B., *et al.*, Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes, *Veterinary Research*, 2004, 24, 204-274.

Pepin M., Vitu C., Russo P., Mornex J., Peterhans E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary Research*, 1998, 29 (3-4), 341-367.

Pérez S. A., Tesis de Licenciatura "Identificación de anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos ovinos por las técnicas de inmunoelectrotransferencia (Western blot) y ELISA indirecta, UNAM, 2005

Porras A. A., Zarco Q. L., Valencia M. J., Estacionalidad reproductiva en ovejas, *Ciencia Veterinaria*, 2003, 9, 1-25.

Ramírez H., Glaria I., de Andrés X., Martínez H., et al. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico", *The Veterinary Journal*, 2011, 190, 169-172.

Ramírez H., Reina R., Amorena B., de Andres D., Martínez H. A., Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis, *Viruses*, 2013, 5, 1175-1207.

Ravazzolo A.P., Nenci C., Vogt. H., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhans E., Bertoni G., Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus, *Virology*, 2006, 350, 116–127.

Reina R., Berriatua E., Luján L., Juste R., Sanchez A., de Andres D., Amorena B., Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update., *Veterinary Journal*, 2009, 182, 31-37.

Rodríguez A. A., Tesis de licenciatura "Detección de DNA proviral por PCR de Lentivirus de Pequeños Rumiantes a partir de células del epitelio prepucial y mononucleares en sementales ovinos y caprinos", UNAM, 2017

Rodríguez M. C., Tesis de licenciatura "Detección de Lentivirus de pequeños rumiantes en rebaños mixtos de ovinos y caprinos por serología y PCR", UNAM, 2017.

Rowe, J.D., East, N. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1997, 13, 35-53.

Saltarelli MJ., Schoborg R., Pavlakis GN., Clements JE., Identification of the caprine arthritis encephalitis virus Rev protein and its cis-acting Rev-responsive element. *Virology*, 1994, 199, 47-55.

Sánchez J., Martínez H., García M., Garrido G., *et al.*, The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep, *Theriogenology*, 2016, 1-5.

Sanjosé L., Pinczowski P., Crespo H., Pérez M., Glaria I., Gimeno M., de Andres D., Amorena B., Luján L., Reina R., Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA, *The Veterinary Journal*, 2015, 204, 88-93.

Santiago B. C., Tesis de Licenciatura “Diagnóstico serológico de lentivirus de pequeños rumiantes en rebaños caprinos del estado de Guanajuato”, UNAM, México, 2016.

Scotland’s Rural College, www.sheepandgoathealth.co.uk consultado el 20 de febrero de 2017

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166001/ovino.pdf>, consultado el 6 de junio de 2017.

Straub O.C. Maedi–Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 2004, 27, 1–5.

Thomar H., The origin of lentivirus research: Maedi-visna virus, *Current HIV Reserch*, 2013, 11(1), 2-9.

Torres- Acosta, Gutierrez E., Butles V., Schmidt A., et al, Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico, *Small ruminant research*, 2003, 49, 2, 207-211

Urcastegi R.H. Ovinos mexicanos sacrificados en Colombia. *Acontecer ovinos caprino*, 2007, VIII, 35.

Zanoni R. G., Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses, *Journal of General Virology*, 1998, 79, 1951–1961.

Zink MC, Yager JA, Myers JD. Pathogenesis of Caprine Arthritis Encephalitis Virus - Cellular Localization of Viral Transcripts in Tissues of Infected Goats, *American Journal of Pathology*, 1990, 136, 843-54.

X. APÉNDICES.

Apéndice I

Protocolo para la extracción de células y plasma de muestras de sangre

1. Centrifugar la muestra a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos para separar la fase líquida, 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 que contiene 5 Mm de $MgCl_2$, hasta 10 ml y homogenizar (vortex).
5. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos y desechar el sobrenadante (decantar).
6. Repetir los pasos 4 y 5 con lisis II que contiene 5 Mm de $MgCl_2$ y 0.1% de NONIDET (NP40) con la finalidad de que las células blancas queden libres de eritrocitos.
7. En el caso de que existan remanentes importantes de eritrocitos el paquete celular puede ser tratado con 1ml de agua bidestilada y completar con 7ml de PBS. Homogenizar por 1 minuto.
8. Se homogeniza y centrifuga a 2000 rpm por 5 minutos.
9. Se decanta y las células se deben resuspender en 300 microlitros con la misma solución de PBS y se colocan en un microtubo.
10. Etiquetar y guardar a -20 C hasta su uso.

Apéndice II

VMRD

1. Cargar los controles y muestras de suero en la placa cubierta de antígeno con la mayor rapidez posible. El volumen de la muestra debe ser superior a los 50 µl. Golpear un lado de la placa varias veces para asegurarse que las muestras cubran la parte inferior del pozo. Teniendo cuidado de no derramar muestra de pozo a pozo. Incubar la placa una hora a temperatura ambiente (23+/-2°C)
2. Después de la hora de incubación lavar la placa en tres tiempos: Vaciar el contenido de los pozos en un fregadero y eliminar los sueros y controles restantes golpeando bruscamente las placas invertidas. Llenar inmediatamente cada pozo con solución de lavado. Vaciar la solución de lavado y golpear la placa invertida bruscamente como la anterior. Repita el proceso de lavado 2 veces más.
3. Adicionar 50 µl de conjugado a cada pozo Golpear un lado de la placa varias veces para asegurarse que las muestras cubran la parte inferior del pozo. Incubar la placa 30 minutos a temperatura ambiente (23+/-2°C)
4. Después de los 30 minutos de incubación lavar los pozos en tres tiempos como en el paso 2
5. Adicionar 50 µl de solución de sustrato a cada pozo. Golpear un lado de la placa varias veces para asegurarse que la solución de sustrato cubra la parte inferior del pozo. Incubar la placa 20 minutos a temperatura ambiente (23+/-2°C). No vaciar los pozos.
6. Adicionar 50 µl de solución de paro a cada pozo. Golpear un lado de la placa varias veces para mezclar la solución de sustrato y la solución de paro. No vaciar los pozos.
7. Inmediatamente después de agregar la solución de paro la placa debe leerse con espectrofotómetro con una densidad óptica (D.O) de 630 nm.

Calculo de porcentaje de inhibición

$$\% = 100(1 - (\text{DO muestras} \div \text{DO control negativo}))$$

Test de validación

La media de la densidad óptica del control negativo debe ser ≥ 0.300

La media del control positivo debe producir $\geq 35\%$ inhibición.

Interpretación de resultados

Si una muestra de pruebas produce $\geq 35\%$ inhibición, es positiva.

Si una muestra de pruebas produce $< 35\%$ inhibición, es negativa.

Apéndice III

ERADIKIT

Tamizaje:

Agregar 95 microlitros de buffer de dilución de suero (1) en cada pozo.

Agregar 5 microlitros del control negativo en los pozos A1, B1.

Agregar 5 microlitros del control positivo en los pozos C1, D1.

Agregar 5 microlitros de la muestra de suero en los pozos siguientes.

Incubar la placa por 60 min., a 37 °C.

Diluir el buffer de lavado 20X (2) 1:20 con agua pura.

Lavar la placa 3 veces con 300 microlitros /pozo.

Diluir el conjugado 10x (PG.01) antes de usar, en buffer de dilución de conjugado (3b).

Agregar 100 microlitros del conjugado diluido en cada pozo.

Incubar la placa por 20 minutos a 37°C.

Lavar como se hizo previamente.

Agregar 100 microlitros del sustrato (4d) en cada pozo.

Incubar la placa a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.

Parar la reacción agregando 100 microlitros de solución de paro (5a) en cada pozo.

Leer la placa a 405 nm.

Para la interpretación se calcula el porcentaje de reactividad de cada muestra con la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{D O \text{ muestra} - D O \text{ cneg}}{D O \text{ cpos} - D O \text{ cneg}} \right) * 100$$

Las muestras con una reactividad igual o mayor a 40 % son consideradas positivas.

Apéndice IV

Protocolo para la extracción de ADN de células mononucleares de sangre periférica.

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

1. Anadir 200 µl de FATG1 Buffer y homogenizar la muestra de células otra vez con el micropeste o micromartinete.
2. Anadir 20 µl de Proteinasa K que se encuentra en una concentración de 10mg/ml.
3. Mezclar bien por agitación y centrifugar brevemente para bajar el residuo de las paredes.
4. Incubar a 60° C por 15 minutos en el termomezclador (400 rpm) y centrifugar brevemente a 14000 rpm para remover los residuos.
5. Anadir 200 µl de FATG2 Buffer y mezclar en vortex.
6. Incubar a 70° C por 10 minutos en el termomezclador (400 rpm) y centrifugar brevemente a 14000 rpm para remover los residuos.
7. Agregar 200 µl de etanol (90/100), mezclar bien y centrifugar brevemente.
8. Colocar una minicolumna FATG Mini en un tubo colector de 2 ml y transferir la mezcla anterior a la mini columna y centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
9. Lavar la mini columna FATG Mini con Buffer W1 (500 µl) y centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
10. Deseche residuo del tubo colector.
11. Lavar la minicolumna FATG Mini con Buffer Wash y centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
12. Deseche el residuo del tubo colector.
13. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos nuevamente para secar la minicolumna FATG Mini.
14. Colocar la minicolumna FATG Mini en el tubo de elución y añadir de 25- 30 µl de Buffer de Elución por el centro de membrana de la columna FATG Mini y dejar reposar por 5 minutos.
15. Centrifugar a 15000 rpm durante 1 minuto y esperar 5 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 minutos para posteriormente centrifugarlo a 14000 rpm durante dos minutos.
17. Almacenar el ADN a -20 y realizar cuantificación de ADN.
18. Para la cuantificación de ADN utilizar 2 μ l de ADN muestra previa calibración con agua miliQ o agua grado biología molecular.