



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA Y GENÉTICA DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS
RUMIANTES: ANÁLISIS COMPARATIVO”

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
GABRIEL EDUARDO ACEVEDO JIMÉNEZ

TUTOR:
DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ – FES-CUAUTITLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. LAURA COBOS MARÍN – FMVZ, UNAM
DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ – FES-CUAUTITLÁN, UNAM

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE, 2018.



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.

DEDICATORIAS

A mi familia, especialmente a Balbina Jiménez, mi madre, por su apoyo incondicional.

A Ceci por acompañarme y ser parte de esta aventura desde antes que iniciara.

Al Dr. Hugo y al Dr. Tórtora por permitirme formar parte de este proyecto.

A todos en el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES – Cuautitlán.

AGRADECIMIENTOS

A los productores y médicos de campo.

A quienes participaron de manera importante en la elaboración este trabajo: Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez, Dr. Germán Isauro Garrido Fariña y Dr. Ernesto Marín Flamand.

Al comité tutor: Dra. Laura Cobos Marín y Dr. Hugo Ramírez Álvarez por su orientación y aportaciones.

Al jurado: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dr. José Álvaro Aguilar Setién y Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez por su atención y comentarios.

A todos lo que contribuyeron de alguna manera para la realización de este trabajo, gracias.

Al programa de becas del CONACyT por el apoyo otorgado a los estudiantes de posgrado.

Este estudio fue financiado por el proyecto CONACyT No. 221285: Genotipificación del gen *env* de retrovirus que impactan la salud de rumiantes domésticos.

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él”

Louis Pasteur

CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1. Primeras descripciones de la infección por SRLV.....	3
1.2. Antecedentes de la infección por SRLV en México.....	5
1.3. Características generales de los SRLV.....	5
1.4. Diversidad genética.....	7
1.5. Clasificación filogenética.....	9
1.6. Ciclo de replicación.....	11
1.7. Patogenia.....	12
1.8. Formas clínicas de la infección.....	14
1.8.1. Forma pulmonar.....	14
1.8.2. Forma mamaria.....	15
1.8.3. Forma articular.....	15
1.8.4. Forma nerviosa.....	16
1.9. Respuesta inmune a la infección.....	17
1.9.1. Inmunidad innata.....	18
1.9.2. Inmunidad adquirida.....	19
1.10. Transmisión.....	20
1.11. Control.....	21
1.12. Diagnóstico.....	22
1.13. Serotipificación de SRLV.....	24
2. Justificación.....	26
3. Hipótesis.....	27
4. Objetivos.....	28
4.1. General.....	28
4.2. Específicos.....	28
5. Materiales y métodos.....	29
5.1. Animales de estudio.....	29
5.2. Colección de muestras.....	29

5.3.	Procesamiento de las muestras sanguíneas.....	30
5.4.	Detección de anticuerpos contra SRLV.....	30
5.5.	Serotipificación.....	30
5.6.	Extracción de ADN.....	30
5.7.	Diseño de iniciadores.....	30
5.8.	Reacción en cadena de la polimerasa.....	31
5.9.	PCR – SDHA.....	34
5.10.	Electroforesis.....	35
5.11.	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	35
5.12.	Secuenciación y análisis de secuencias.....	35
6.	Resultados.....	36
6.1.	Detección de anticuerpos con dos pruebas comerciales de ELISA.....	36
6.2.	Serotipificación.....	37
6.3.	PCR – <i>gag</i>	39
6.4.	Especificidad de los iniciadores de la PCR – <i>gag</i>	41
6.5.	Comparación entre serotipificación y genotipificación de SRLV.....	42
6.6.	Secuenciación.....	44
6.7.	Árbol filogenético.....	47
6.8.	Histopatología.....	49
7.	Discusión.....	51
8.	Conclusiones.....	55
9.	Referencias.....	56
10.	Anexos.....	68
11.	Apéndices.....	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Rastros de los que proceden las muestras colectadas de sangre completa y tejidos de ovinos.....	29
Cuadro 2. Iniciadores diseñados por genotipo (A y B) para amplificar una región en el gen gag de los SRLV mediante PCR anidada.....	31
Cuadro 3. Condiciones finales establecidas para la primera reacción de la PCR gag, genotipo A.....	32
Cuadro 4. Condiciones finales establecidas para la segunda reacción (anidada) de la PCR-gag, genotipo A.....	33
Cuadro 5. Condiciones finales establecidas para la primera reacción de la PCR-gag, genotipo B.....	33
Cuadro 6. Condiciones finales establecidas para la segunda reacción (anidada) de la PCR-gag, genotipo B.....	34
Cuadro 7. Condiciones finales establecidas para la PCR – SDHA.....	35
Cuadro 8. Ovinos seropositivos a la infección por SRLV evaluados con dos pruebas comerciales de ELISA (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening).....	36
Cuadro 9. Caprinos seropositivos a la infección por SRLV evaluados con dos pruebas comerciales de ELISA (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening).....	37
Cuadro 10. Resultados de la PCR para la detección de los genotipos A y B.....	40
Cuadro 11. Comparación de los resultados de tipificación serológica y genética de SRLV en ovinos.....	43
Cuadro 12. Comparación de los resultados de tipificación serológica y genética de SRLV en caprinos.....	44
Cuadro 13. Resultados de la PCR – gag de los órganos de ovinos de rastro seropositivos a SRLV.....	49
Cuadro 14. Ovinos seropositivos por estado con dos pruebas comerciales de ELISA para la detección de SRLV (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening).....	69
Cuadro 15. Caprinos seropositivos por estado con dos pruebas comerciales de ELISA para la detección de SRLV (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening).....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura viral y mapa genómico de los lentivirus de pequeños rumiantes.....	6
Figura 2. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias nucleotídicas completas de SRLV disponibles en el GenBank que ilustra a los principales genotipos (A – E) y subtipos.....	10
Figura 3. Ciclo de replicación de los lentivirus de pequeños rumiantes.....	12
Figura 4. Frecuencia de los serotipos en 102 ovinos evaluados con una prueba comercial de ELISA (Eradikit™ SRLV Genotyping).....	38
Figura 5. Frecuencia de los serotipos en 168 ovinos evaluados con una prueba comercial de ELISA (Eradikit™ SRLV Genotyping).....	38
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR- <i>gag</i> A.....	39
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR- <i>gag</i> B.....	40
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR – SDHA.....	40
Figura 9. Alineamiento de los iniciadores utilizados en la PCR – <i>gag</i> A y en la PCR – <i>gag</i> B con las secuencias de referencia de los genotipos A y B.....	41
Figura 10. Resultados de la búsqueda BLAST de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de un ovino positivo a ambos genotipos en la PCR – <i>gag</i>	42
Figura 11. Comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia K1514, correspondiente al genotipo A con las secuencias obtenidas a partir de muestras de ovinos y caprinos positivos a la PCR – <i>gag</i> A.....	45
Figura 12. Comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia It – 128, correspondiente al genotipo B con las secuencias obtenidas a partir de muestras de ovinos y caprinos positivos a la PCR – <i>gag</i> B.....	46
Figura 13. Árbol filogenético construido con las secuencias nucleotídicas obtenidas de una región parcial del gen <i>gag</i>	48
Figura 14. Secciones de pulmón (A= 100X, B= 400X), glándula mamaria (C= 100X, D= 400X) e hígado (D= 100X, E= 400X) de uno de los ovinos seropositivos a SRLV.....	50

RESUMEN

Los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) infectan a ovinos y caprinos, generando cuadros clínicos que pueden incluir neumonía, mastitis, artritis y encefalitis. Se han descrito cinco genotipos (A, B, C, D, y E) y 22 subtipos, siendo los dos primeros genotipos de distribución cosmopolita. En México, la infección por SRLV es reconocida como endémica, sin embargo, hay poca información disponible acerca de los genotipos que infectan a los rebaños nacionales. El objetivo de este trabajo fue comparar dos métodos de tipificación para SRLV; el primero basado en serología con una prueba comercial de ELISA (Eradikit™ SRLV Genotyping) y el segundo mediante genotipificación por PCR. Se obtuvieron muestras sanguíneas de ovinos y caprinos procedentes de 12 estados del país, a partir de las cuales se separó el plasma y los leucocitos de sangre periférica (LSP). Las muestras de plasma se evaluaron inicialmente con dos pruebas comerciales de ELISA (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening) para detectar la infección por SRLV. Posteriormente, las muestras de plasma que resultaron seropositivas en la prueba de Eradikit™ SRLV Screening se evaluaron nuevamente con Eradikit™ SRLV Genotyping para serotipificar al virus infectante (A/B). A partir de los LSP se extrajo el ADN para detectar el genoma proviral mediante dos técnicas de PCR anidada, cada una diseñada para detectar SRLV del genotipo A o B, amplificando una región parcial del gen *gag*. Por serología se evaluaron 1940 animales, y se encontró que el nivel de concordancia entre ambas pruebas comerciales de ELISA fue considerable (κ de Cohen = 0.767). Con Eradikit™ SRLV Screening se detectaron 418 animales seropositivos, de los cuales 270 se evaluaron después con Eradikit™ SRLV Genotyping para hacer la serotipificación. Con la prueba comercial de ELISA, se pudo serotipificar el 65.19% de las muestras de plasma de ovinos y caprinos, clasificándolos en los serotipos A y B, así como coinfecciones. Los animales que resultaron indeterminados con la prueba comercial de ELISA resultaron estar infectados con los genotipos A o B, encontrando coinfecciones en ambas especies con la genotipificación mediante PCR. El análisis de las secuencias reveló que los genotipos A y B se encuentran circulando en los rebaños nacionales de ovinos y caprinos. Los SRLV encontrados en los ovinos tienden a agruparse con los subtipos genéticos A2 y B1, mientras que los encontrados en los caprinos tienden a agruparse con los subtipos genéticos A1 y B1. La serotipificación no mostró ser un método confiable para la predicción del genotipo viral en las infecciones causadas por SRLV, debido a que sólo el 25.7% de los resultados de la tipificación por serología con la prueba comercial de ELISA coincidieron con la genotipificación mediante PCR. De manera adicional, a partir de 2 ovinos seropositivos procedentes de rastro, se colectaron tejidos para análisis histopatológico, encontrando la presencia de infiltrados de leucocitos mononucleares en pulmón, glándula mamaria e hígado. Además, se detectó el genoma proviral de SRLV en algunos de estos tejidos mediante PCR.

ABSTRACT

Small ruminant lentiviruses (SRLV) infect sheep and goats, which can cause clinical forms that include pneumonia, mastitis, arthritis and encephalitis. Five genotypes have been described (A, B, C, D, and E) and 22 subtypes, being the first two genotypes of cosmopolitan distribution. In Mexico, the infection by SRLV is recognized as endemic, however, there is few information available about the genotypes that infect national herds. The aim of this work was to compare two typing methods for SRLV; the first based on serology with a commercial ELISA test (Eradikit™ SRLV Genotyping) and the second one by PCR genotyping. Blood samples were obtained of sheep and goats from 12 states of the country, plasma and peripheral blood leukocytes (PBL) were separated. Plasma samples were initially evaluated with two commercial ELISA tests (VMRD™ and Eradikit™ SRLV Screening) to detect SRLV infection. Subsequently, the plasma samples that were seropositive in the Eradikit™ SRLV test were evaluated again with Eradikit™ SRLV Genotyping to serotyping the infecting virus (A/B). From the PBL, the DNA was extracted to detect the proviral genome by two nested PCRs, each of them designed to detect the genotype A or B, amplifying a partial region of the *gag* gene. By serology, 1940 animals were evaluated, and it was found that the level of concordance between both commercial ELISA tests was substantial (Cohen's kappa = 0.767). With Eradikit™ SRLV Screening, 418 seropositive animals were detected, of which 270 were evaluated later with Eradikit™ SRLV Genotyping for serotyping. With the commercial ELISA test, 65.19% of the plasma samples of sheep and goats could be classifying into A and B serotypes, as well as coinfections. The animals that were indeterminate with the commercial ELISA test were found to be infected with A or B genotypes, finding coinfections in both species with genotyping by PCR. The analysis of the sequences reveal that the genotypes A and B are circulating in Mexican herds of sheep and goats. The SRLV found in the sheep tend to group with the genetic subtypes A2 and B1, while those found in the goats tend to group with the genetic subtypes A1 and B1. Serotyping was not a reliable method for predicting viral genotype in infections caused by SRLV, because only 25.7% of the results of serotyping with the commercial ELISA test coincided with PCR genotyping. Additionally, from 2 seropositive slaughtered sheep, tissues were collected for histopathological analysis, finding the presence of mononuclear leukocyte infiltrates in lung, mammary gland and liver. In addition, the proviral genome of SRLV was detected in some of these tissues by PCR.

1. Introducción

El género no oncogénico *Lentivirus* pertenece al orden *Ortervirales*, familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* (Krupovic *et al.*, 2018). Los retrovirus se caracterizan por la capacidad para transcribir inversamente el ARN viral a ADN de doble cadena a través de la acción de la transcriptasa inversa (RT) (Mullard, 2008). El género *Lentivirus* incluye los virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), el virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV), el virus de la inmunodeficiencia de los bovinos (BIV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), así como el virus de maedi visna (MVV) y el virus de artritis encefalitis caprina (CAEV) (Minguijón *et al.*, 2015), que se agrupan actualmente como lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV), debido a su proximidad filogenética y a la transmisión natural entre ovinos y caprinos (Shah *et al.*, 2004b).

Las infecciones causadas por los lentivirus que afectan a los pequeños rumiantes, comparten características con la infección causada por el virus de inmunodeficiencia humana, tales como un largo periodo de incubación que puede ser de meses o incluso años y un lento desarrollo de la enfermedad (Pépin *et al.*, 1998). Los SRLV, infectan a ovejas y cabras distribuidas por todo el mundo causando un cuadro multisistémico que incluye: neumonía intersticial, mastitis, encefalitis, linfadenopatía, artritis y pérdida de peso crónica. Lo anterior puede causar pérdidas económicas importantes (Pépin *et al.*, 1998).

1.1. Primeras descripciones de la infección por SRLV

Una enfermedad que en la actualidad se sabe que estaba asociada con la infección por lentivirus en ovinos, fue descrita por primera vez en Sudáfrica por Mitchell en 1915 y se denominó neumonía progresiva ovina. El siguiente reporte fue en Montana, Estados Unidos en 1923 en ovinos con neumonía intersticial crónica severa que resultó en la muerte de los animales afectados. En Islandia, aproximadamente una década después, apareció "Maedi", una forma crónica de

neumonía, en una raza local de ovejas islandesas, que progresó asociada con una importante pérdida de peso y dificultad para respirar. También se identificó una forma neurológica de la enfermedad, "Visna", asociada con la parálisis y el desvanecimiento que afectaron a las ovejas islandesas durante la década siguiente. Estudios epidemiológicos mostraron que la aparición de las enfermedades de Maedi y Visna en Islandia, inició después de la importación de 20 carneros Karakul que no mostraban signos clínicos y eran provenientes de Halle, Alemania en 1933, lo que resultó en la diseminación de la infección en la mayoría de los rebaños (Bose *et al.*, 2015; Pálsson, 1972; Sigurdsson *et al.*, 1952; Thormar, 2013).

El MVV se descubrió en ovinos por Sigurdsson en Islandia a inicio de la década de 1950. El concepto de "virus lentos" resultante de este descubrimiento condujo a la asignación del nombre de lentivirus [*lentus* (lat.) = lento] al género al cual pertenece el MVV. Dos situaciones patológicamente distintas caracterizaron a las principales manifestaciones clínicas de la infección por el MVV. La primera, llamada maedi (disnea en islandés), es una neumonía progresiva y la segunda llamada Visna (desvanecimiento – estado de apatía progresiva en islandés), es una leucoencefalomielitis desmielinizante. El MVV también puede infectar a otros órganos o tejidos, particularmente a las articulaciones, en las cuales causa artritis y a la glándula mamaria, donde causa mastitis. Después de su descubrimiento en Islandia, las infecciones por el MVV se detectaron en varios países, aunque con diferente prevalencia (Pálsson, 1990; Pépin *et al.*, 1998; Sigurdsson *et al.*, 1957).

En los años de 1959 en Suiza y de 1969 en Alemania se reportaron cambios patológicos en caprinos con artritis y encefalitis, mismos que actualmente se atribuyen a la infección por el CAEV (Stavrou *et al.*, 1969; Stünzi *et al.*, 1964). Posteriormente, el aislamiento del agente etiológico se realizó a partir de las articulaciones de una cabra artrítica (Crawford *et al.*, 1980) y de varios tejidos de una cabra con artritis y encefalitis (Narayan *et al.*, 1980). Más tarde, el virus fue aislado de cabras en todo el mundo. En la actualidad, todos los aislamientos de lentivirus procedentes de ovinos y caprinos se conocen como lentivirus de pequeños rumiantes (Minguijón *et al.*, 2015).

1.2. Antecedentes de la infección por SRLV en México

En México, en un estudio serológico realizado en 308 caprinos procedentes del Estado de México, Aguascalientes, Puebla, Querétaro, Zacatecas y Guanajuato se detectaron 22 seropositivos en el Estado de México y Guanajuato entre 134 animales que habían sido importados de Estados Unidos (Adams *et al.*, 1984). El virus se aisló y se identificó mediante PCR a partir de dos cabras seropositivas de la raza Nubia con signos clínicos de artritis, disnea y pérdida de peso crónica, las cuales provenían de un hato lechero localizado al norte de la Ciudad de México (Daltabuit *et al.*, 1999). La infección por SRLV se ha diseminado en el país, siendo más común en cabras que se crían en sistemas de producción intensivos, en las que causa artritis crónica (Torres-Acosta *et al.*, 2003).

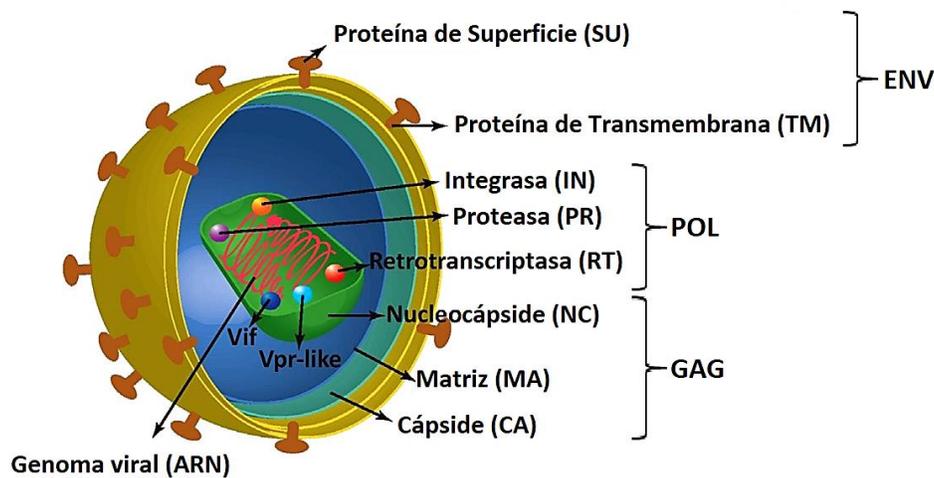
La infección por SRLV en ovinos es de reciente reconocimiento por las autoridades sanitarias del país, sin embargo, existen estudios que indicaban la presencia de la infección desde hace décadas. La primera descripción de la infección en ovinos se realizó a partir de un estudio patológico de pulmones obtenidos de rastros de la Ciudad de México (Eguiluz & De Aluja, 1981). En 1986 en un estudio serológico realizado a 1000 ovinos procedentes de la Ciudad de México, se encontraron 82 casos seropositivos (Molina *et al.*, 1986). En 2011 se realizó la detección serológica y/o mediante PCR del virus en ovinos de la raza Columbia y en caprinos de la raza Alpina del centro del país y se secuenció el genoma completo del virus a partir de una cabra que presentaba cuadro artrítico (Ramírez *et al.*, 2011).

1.3. Características generales de los SRLV

El virión tiene un diámetro de 80 – 100 nm (Minguijón *et al.*, 2015). El genoma de los SRLV está protegido por la nucleocápside (NC), que a su vez está rodeada de la cápside (CA) y de la proteína de matriz (MA). Posee una envoltura exterior lipídica procedente de la membrana plasmática celular, donde están embebidas las glicoproteínas de la envoltura viral (ENV) formadas por las subunidades de transmembrana (TM) y de superficie (SU). En la NC, además del genoma se encuentran proteínas virales asociadas como la retrotranscriptasa (RT), la proteasa

(PR) y la integrasa (IN) (Glaría, 2015). Los lentivirus están conformados de 60% de proteínas, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN (Minguijón *et al.*, 2015). El genoma de los SRLV está constituido por dos cadenas idénticas de ARN monocatenario positivo de entre 8.4 y 9.2 Kb. Se encuentran tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) y genes accesorios: *vif*, *vpr-like* y *rev*. En la forma proviral, el genoma está flanqueado por una región repetida no codificante, denominada Long Terminal Repeat (LTR) (Glaría, 2015). El gen *gag* codifica para las proteínas de NC, CA y MA; *pol* codifica para RT, PR, IN y dUTPasa ; y *env* codifica para las glicoproteínas TM y SU (figura 1) (Minguijón *et al.*, 2015).

a) Estructura de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes



b) Genoma (provirus)

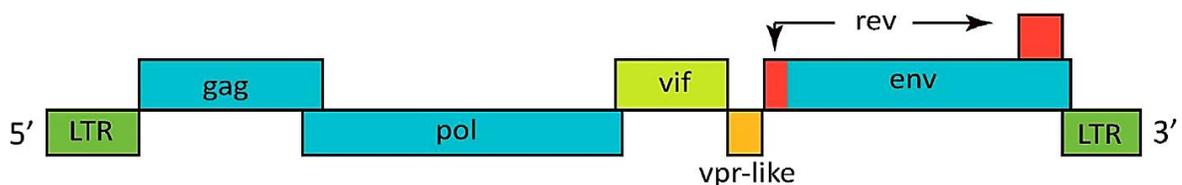


Figura 1. Estructura viral y mapa genómico de los lentivirus de pequeños rumiantes. Modificado de (Minguijón *et al.*, 2015).

Las principales células diana del virus son los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas. En los monocitos, la replicación productiva inicia después de la maduración de monocitos a macrófagos (Blatti-Cardinaux *et al.*, 2016; Narayan *et al.*, 1982, 1983).

1.4. Diversidad genética

La variabilidad genética es una característica clave del genoma de los lentivirus de pequeños rumiantes y su conocimiento, además de proporcionar información acerca de las interacciones entre el virus y el hospedador, es esencial para el diagnóstico preciso y los estudios de epidemiología molecular.

Debido a que el mecanismo de retrotranscripción es propenso a errores y no cuenta con mecanismos de corrección, la replicación de los lentivirus involucra una alta frecuencia de mutaciones puntuales, a menudo inserciones y deleciones, las cuales se estiman en un rango de 0.1 – 2 mutaciones por genoma y ciclo de replicación. Entre los genes estructurales de los lentivirus, *gag*, *pol* y ciertas regiones de *env* son relativamente conservadas, pero otras partes de *env*, principalmente regiones de unión a anticuerpos son altamente variables. La mutación conduce a una alta variabilidad de secuencias incluso dentro de un mismo individuo, formando en conjunto una cuasiespecie (Minguijón *et al.*, 2015). El concepto de cuasiespecie fue propuesto por Manfred Eigen y se define como una población de variantes genéticas de las cuales una es dominante. El tipo de virus que originalmente infecta al animal persiste y coexiste con nuevas variantes. Bajo circunstancias de presión selectiva, como la ejercida por el sistema inmune, la frecuencia de las formas genéticas en la población viral puede cambiar (Domingo *et al.*, 1995; Minguijón *et al.*, 2015; Ojosnegros *et al.*, 2011).

En el VIH se ha descrito la presencia de hipermutaciones en el genoma con hasta el 40% de sustituciones de guanina por adenina (Vartanian *et al.*, 1991). Este tipo de hipermutación es el resultado de la desaminación de las citosinas por enzimas de edición del ácido nucleico, APOBEC. Las proteínas APOBEC se empaquetan con los viriones y se asocian con el complejo de retrotranscripción en la célula

diana, donde desaminan los residuos de citosina en uracilo en la cadena negativa de ADN monocatenario, lo que conduce a la mutación por sustitución de G por A en la cadena positiva (Bishop *et al.*, 2004; Salter *et al.*, 2016). Además, los macrófagos tienen una relación intracelular de dUTP:dTTP desequilibrada, con un exceso de dUTP. El uracilo puede incorporarse en el ADN debido a la incapacidad de la RT para distinguir entre dTTP y dUTP, lo que conduce a un incremento en la tasa de mutaciones (Glaria, 2015).

Por otra parte, la recombinación es un mecanismo de diversificación genética que puede originar combinaciones genéticas beneficiosas, que serían difíciles de generar solo por mutación y también puede eliminar eficazmente mutaciones letales. En contraste con los cambios causados por las mutaciones, la recombinación es una fuerza evolutiva mucho más intensa. En ausencia de recombinación, los lentivirus tienden a acumular deleciones que reducen la aptitud viral en cada ciclo de replicación, por lo que este mecanismo facilita la reparación de los genomas virales (Minguijón *et al.*, 2015).

La recombinación en los retrovirus surge como resultado de la coinfección con dos virus en la misma célula y el empaquetamiento simultáneo de dos copias del genoma de ARN en cada virión. Cuando una célula se coinfecta con dos o más virus diferentes, los genomas de ARN correspondientes pueden conjuntarse en la progenie viral (Negroni & Buc, 2001a). Durante la retrotranscripción, la transcriptasa inversa cambia fácilmente entre estas dos plantillas de ARN, lo que conduce a la producción de ADN recombinante. Si estas plantillas son idénticas, el cambio de plantilla será genéticamente neutral y no se detectará la recombinación. Por el contrario, si estos dos genomas no son idénticos, el cambio de plantilla dará lugar a la recombinación viral (Negroni & Buc, 2001b). En infecciones naturales se han identificado recombinaciones de SRLV entre los genotipos A y B (Pisoni *et al.*, 2007a) y entre variantes genéticas del subtipo B1 en cabras (Ramírez *et al.*, 2011).

1.5. Clasificación filogenética

Los SRLV están divididos filogenéticamente dentro de 5 genotipos (A, B, C, D y E), los cuales comprenden diferentes subtipos, basado en dos segmentos del genoma, un segmento *gag-pol* de 1.8 kb y un segmento *pol* de 1.2 kb (Shah *et al.*, 2004a). Las secuencias nucleotídicas difieren entre los genotipos de 25% a 37%. Adicionalmente, los genotipos A, B y E contienen subtipos que difieren entre 15% y 27% de su secuencia. El genotipo A tiene hasta ahora 17 subtipos reconocidos (A1-A17); el genotipo B tiene tres subtipos (B1-B3); y el genotipo E tiene dos subtipos (E1 y E2) (Olech *et al.*, 2018; Ramírez *et al.*, 2013).

Los genotipos B, C y D y algunos subtipos del genotipo A (A1, A3, A4, A5, A6, A9, A11, A12 y A13) se han encontrado tanto en ovejas como en cabras, mientras que otros subtipos solo se han descrito en ovejas (A2 y A15) o en cabras (A7, A8, A10, A14, A16, A17, E1 y E2). Sin embargo, a medida que se obtienen más secuencias virales, los subtipos pertenecientes a una sola especie tienden a desaparecer, encontrándose en ambas especies (Minguijón *et al.*, 2015; Olech *et al.*, 2018).

Los genotipos A y B incluyen cepas de tipo MVV y tipo CAEV respectivamente, que son comunes entre las infecciones por SRLV en todo el mundo. Se ha descrito el genotipo C en ovejas y cabras de Noruega. El genotipo D sólo ha sido descrito en Suiza y España, basándose en segmentos del gen *pol*, aunque el análisis filogenético basado en secuencias del gen *gag* lo agrupa dentro del genotipo A, lo que sugiere que el genotipo D es en realidad genotipo A, exhibiendo divergencia en el gen *pol*. El genotipo E ha sido reportado en cabras de Italia (Ramírez *et al.*, 2013; Sanjosé *et al.*, 2015). Los ancestros de los SRLV se han localizado en Turquía (Muz *et al.*, 2013), y el establecimiento de diferentes cepas puede atribuirse a la migración de ovejas de Medio Oriente a Europa hace miles de años, lo que condujo a la diversificación del virus (Minguijón *et al.*, 2015).

Existen secuencias nucleotídicas de los genomas completos de SRLV disponibles en el GenBank (figura 2). Del genotipo A: SA-OMVV de Sudáfrica (Querat *et al.*, 1990); KV1514, KV1772 y LV1 de Islandia (Andresson *et al.*, 1993; Sonigo *et al.*, 1985; Staskus *et al.*, 1991); EV1 de Reino Unido (Sargan *et al.*, 1991); P1OLV de Portugal (Torres & Santos, 2004); 85/34 de Estados Unidos (Karr *et al.*, 1996); 697 de España (Glaria *et*

al., 2012) y A4 de Suiza (Shah *et al.*, 2004a). Del genotipo B: CAEV-CO de Estados Unidos (Narayan *et al.*, 1980; Saltarelli *et al.*, 1990); Gansu y Shanxi de China (Huang *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2005); FESC-752 de México (Ramírez *et al.*, 2011); 496 de España (Glaría *et al.*, 2009) y Fonní y Volterra de Italia (Bertolotti *et al.*, 2011). Del genotipo C: 1GA de Noruega (Gjerset *et al.*, 2006 , 2007). Del genotipo E: Roccaverano y Seui de Italia (Reina *et al.*, 2009b, 2010).

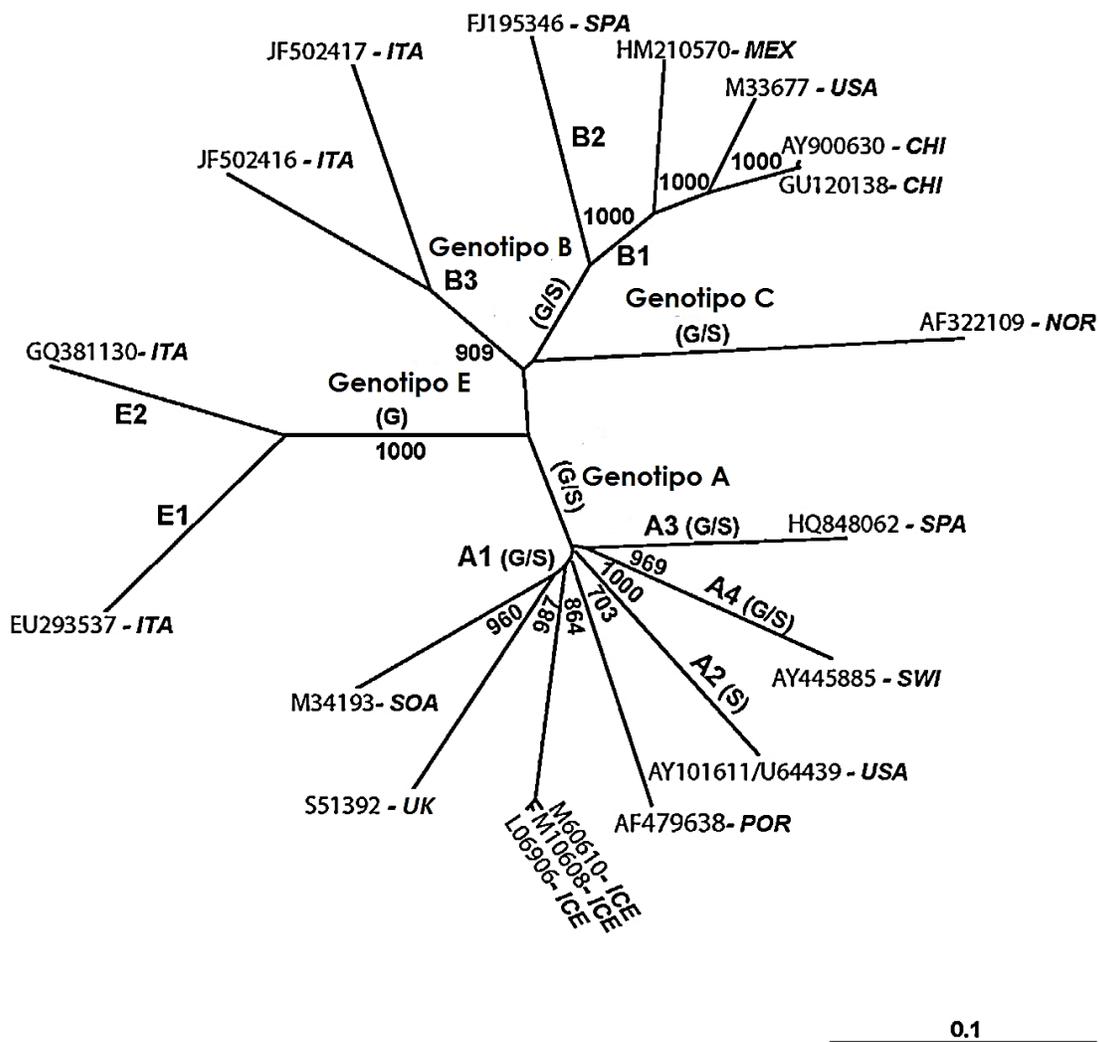


Figura 2. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias nucleotídicas completas de SRLV disponibles en el GenBank que ilustra a los principales genotipos (A – E) y subtipos. Se indica el número de acceso del aislado y el país de origen; CHI: China; ICE: Islandia; ITA: Italia; MEX: México; NOR: Noruega; POR: Portugal; SOA: Sudáfrica; SPA: España; SWI: Suiza; UK: Reino Unido; USA: Estados Unidos de América. Modificado de (Minguijón *et al.*, 2015).

1.6. Ciclo de replicación

El ciclo inicia con el reconocimiento del receptor de las células permisivas por la glicoproteína de superficie del virus (SU). Posteriormente, se da la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, lo que conduce a la liberación de la cápside viral en el citoplasma. Aunque no se ha identificado un receptor único para los SRLV, se han propuesto moléculas implicadas en el ingreso del virus a las células (Bruett *et al.*, 2000; Crane *et al.*, 1991), incluso la expresión del receptor de manosa (MR) parece tener un papel importante en la patogénesis viral (Crespo *et al.*, 2011, 2012). También se ha descrito que la unión a los receptores celulares podría variar en función de la cepa viral involucrada (Hötzel & Cheevers, 2002).

La retrotranscripción inicia en el citoplasma a partir del ARN viral por acción de la retrotranscriptasa que sintetiza la doble cadena de ADN. El ADN bicatenario retrotranscrito es transportado al núcleo celular donde se integra en el ADN genómico en su forma proviral por acción de la integrasa (Ballandras-Colas *et al.*, 2017). Las células infectadas contienen pocas (frecuentemente sólo una) copias integradas en el ADN celular del hospedador (Minguijón *et al.*, 2015). Aunque la integración parece ser un fenómeno aleatorio en cuanto a la región del genoma nuclear en la que tiene lugar, no es inespecífica, ya que las secuencias adyacentes al provirus son muy similares, por lo que existen señales de integración a lo largo del genoma nuclear (Tang *et al.*, 1999).

El genoma proviral puede permanecer en estado de latencia por tiempo indefinido. Existen factores ambientales que regulan la expresión del virus. La maduración de monocitos a macrófagos y el estrés de la lactancia pueden inducir la activación de la transcripción, misma que es realizada por la maquinaria celular. La ARN polimerasa II sintetiza el ARN genómico viral y los ARNm que codifican para las proteínas del virus (Gendelman *et al.*, 1986; Narayan *et al.*, 1983).

Las proteínas de la envoltura codificadas por *env* se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso y son glicosiladas en el aparato de Golgi, para posteriormente ser transportadas a la cara interna de la membrana celular para iniciar el ensamble. Las proteínas de los genes *gag* y *pol* se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos, se asocian al genoma viral y se incorporan con las

glicoproteínas ancladas en la membrana citoplasmática. Posteriormente, las partículas víricas de reciente formación se liberan al medio por gemación. La maduración del precursor de las proteínas Gag y Pol se produce por acción de la proteasa viral, confiriendo la infectividad a los viriones (figura 3) (Burrell *et al.*, 2017).

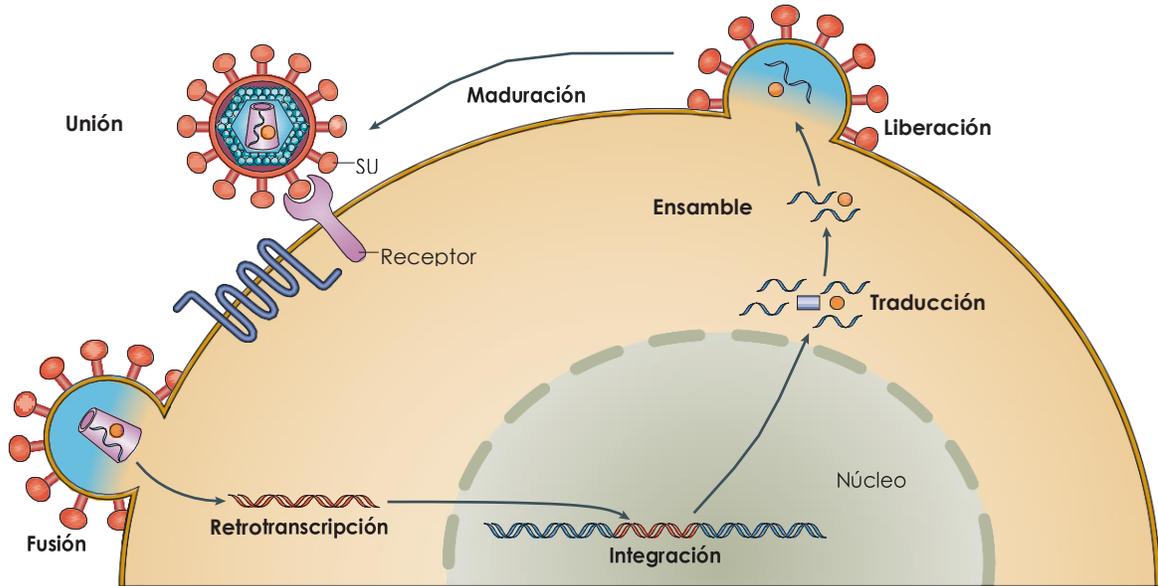


Figura 3. Ciclo de replicación de los lentivirus de pequeños rumiantes. Modificado de (Laskey & Siliciano, 2014).

1.7. Patogenia

Dentro del hospedador, el virus infecta a macrófagos y a células dendríticas de las mucosas, éstos migrarán a través del sistema linfático aferente hasta los linfonodos. Ahí es donde ocurre la transmisión de la infección a los monocitos/macrófagos, los cuales se diseminarán por la linfa eferente y el conducto torácico, para llegar al torrente sanguíneo, estableciendo la infección sistémica. Los monocitos que se hallan en sangre periférica se infectan, pero no ocurre la replicación viral de manera productiva, por lo que el virus pasa desapercibido por el sistema inmunológico y continúa diseminándose hacia los órganos diana (Peluso *et al.*, 1985). En los tejidos, los monocitos se diferencian en macrófagos, lo que da lugar a la activación de la replicación viral, que a su vez activa la respuesta inmune contra los antígenos virales (Gendelman *et al.*, 1986). Posteriormente, ocurre la infiltración de células linfocitarias hacia el tejido y el reclutamiento de nuevos monocitos, tanto

infectados en estado de latencia como no infectados susceptibles a infectarse, dando lugar a los procesos inflamatorios característicos de la infección por SRLV. Existe evidencia de que a través de los monocitos el virus podría llegar a la médula ósea e infectar a células madre mieloides o células del estroma, lo que resulta en la perpetuación de la infección durante toda la vida del animal, ya que la médula ósea actuaría como reservorio del virus, liberando de manera continua células infectadas (Grossi *et al.*, 2005). Después del primer contacto del virus con el hospedador, se produce una breve viremia inicial que conducirá a la seroconversión del animal debido a la síntesis de anticuerpos contra los antígenos virales (Begara *et al.*, 1996). Debido a que el virus se inserta en el genoma celular, puede entrar en un período de latencia que puede durar semanas, meses o incluso años. Después de este período, 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 (Pépin *et al.*, 1998). La afección de los tejidos trae como consecuencia la aparición del cuadro clínico clásico (Cutlip *et al.*, 1988).

La incidencia y severidad de la enfermedad depende principalmente de dos factores. El primero es el componente genético de los animales, que parece influenciar la susceptibilidad a la infección y tener un impacto importante en la frecuencia y severidad de las lesiones inducidas (Blatti-Cardinaux *et al.*, 2016). Se ha descrito la susceptibilidad y resistencia a la infección por SRLV de acuerdo con la raza; Assaf, Texel, Border Leicester, Finnish Landrace y Pelibuey son razas de ovinos que han mostrado ser susceptibles, mientras que otras razas como Columbia, Rambouillet y Suffolk han mostrado ser resistentes (Sánchez *et al.*, 2016). El segundo de ellos inherente a la virulencia de los SRLV que es altamente variable, incluyendo desde cepas muy virulentas, hasta cepas con aparente baja o nula virulencia (Blatti-Cardinaux *et al.*, 2016).

1.8. Formas clínicas de la infección

Los SRLV pueden producir 4 formas clínicas principales: pulmonar, nerviosa, mamaria y articular, provocando una enfermedad inflamatoria multisistémica que cursa con neumonía, encefalitis, artritis y/o mastitis (Blacklaws, 2012). Clínicopatológicamente, la forma pulmonar se caracteriza por disnea, neumonía intersticial y caquexia; la forma nerviosa causa encefalitis y/o mielitis; la forma mamaria produce mastitis intersticial y reducción de la producción lechera y, finalmente, la forma articular está caracterizada por artritis proliferativa crónica y sinovitis. Por lo general, uno de los órganos se ve mayormente afectado, aunque varios tejidos pueden mostrar lesión con severidad variable. Las formas pulmonar, mamaria y nerviosa son más comunes en ovejas, mientras que las formas nerviosa y articular son más frecuentes en cabras (Pérez *et al.*, 2014).

1.8.1. Forma pulmonar

En la forma pulmonar, el signo característico de la afección por SRLV es la disnea o dificultad para respirar, acompañada de un aumento en la frecuencia respiratoria, respiración abdominal y jadeo (Thormar, 2013). Los signos clínicos son producidos por una neumonía intersticial, que aumenta el grosor de los septos alveolares y la organización de nódulos linfoides en el parénquima, que sustituyen al tejido alveolar, lo que reduce progresivamente la capacidad de intercambio gaseoso de los pulmones afectados (Mornex *et al.*, 1994). De igual manera, se produce pérdida progresiva de peso, que conduce a la caquexia y trae como consecuencia la muerte del animal por insuficiencia respiratoria (Cadoré *et al.* 1996). Macroscópicamente los pulmones muestran una coloración grisácea y un incremento notable de tamaño y peso, aunado a una linfadenitis severa con tumefacción de los nódulos linfáticos. También, suele visualizarse a menudo, un punteado gris en la superficie pleural. Dichas lesiones se caracterizan por una acumulación linfocitaria, con predominio de los linfocitos T CD8+, en conjunto con hiperplasia del músculo liso y fibrosis de los pulmones. En los linfonodos mediastínicos y traqueobronquiales se observa una hiperplasia de las áreas corticales y paracorticales (Watt *et al.*, 1992).

1.8.2. Forma mamaria

La forma mamaria ha sido descrita tanto en ovejas como en cabras (van der Molen *et al.*, 1985). Esta cursa como una mastitis indurativa difusa, bilateral y crónica que muchas veces se encuentra asociada a la forma pulmonar. Afecta a animales adultos de entre 3 y 5 años y suele pasar desapercibida, aunque en estos animales se presenta cierto endurecimiento de la glándula mamaria que no cursa con dolor (Preziuso *et al.*, 2003). A nivel macroscópico se observa una mastitis intersticial crónica con hiperplasia de folículos linfoides y una intensa fibrosis que modifica la estructura normal de los acinos glandulares. La replicación del virus en macrófagos y células epiteliales de los acinos produce una reacción inflamatoria intensa que afecta al parénquima glandular, septo interlobular y conductos galactóforos, cuya luz se obstruye parcial o totalmente provocando atrofia del tejido disminuyendo la producción de leche (Bolea *et al.*, 2006; Christodoulopoulos, 2006).

1.8.3. Forma articular

La forma articular de la enfermedad ha sido descrita tanto en ovejas como en cabras, aunque la incidencia es más elevada y tiene mayor importancia en el ganado caprino (Narayan & Cork, 1985). Esta forma involucra la presencia de articulaciones agrandadas, afectando principalmente a la articulación del carpo, pero también a la articulación del tarso y raramente a otras articulaciones (Pérez *et al.*, 2014). La manifestación clínica se caracteriza por una hipertrofia de la articulación, artritis proliferativa crónica y sinovitis que provoca cojera y dificultad en la marcha. Macroscópicamente se observa engrosamiento de la articulación, con congestión de las membranas sinoviales y fibrosis de la cápsula articular (Glaría, 2015). En estadíos avanzados puede incluso producirse erosión y destrucción del cartílago y hueso (Pérez *et al.*, 2014). A nivel microscópico se observa una sinovitis proliferativa crónica, apreciándose hiperplasia, angiogénesis, infiltración de células mononucleares y necrosis de la membrana sinovial. En el líquido sinovial se detecta un aumento de macrófagos, células plasmáticas y linfocitos T, predominantemente CD8+, mientras que en los infiltrados perivasculares se acumulan células B, responsables del incremento del título de anticuerpos frente

al virus, que además puede correlacionarse directamente con la severidad de la artritis (Knowles *et al.*, 1990; Wilkerson *et al.*, 1995).

1.8.4. Forma nerviosa

La forma nerviosa de la infección comienza con la entrada de monocitos al sistema nervioso central o la infección de macrófagos perivasculares. Esto favorece la migración de células inflamatorias al tejido nervioso (Polledo *et al.*, 2012). Después de la invasión viral, se produce la lesión inflamatoria crónica de tipo no purulento en el neuroparénquima, lo que provoca la signología nerviosa, que incluye ataxia y paresia de miembros posteriores, ceguera o nistagmo, que normalmente conduce a la paraplejía (Benavides *et al.*, 2006). Esta forma clínica ha sido descrita en animales jóvenes. En un estudio realizado en corderos de 4 a 6 meses se reportó la presencia de encefalitis no purulenta de moderada a severa que afectaba principalmente a los pedúnculos cerebelosos (Benavides *et al.*, 2007). Las lesiones en el cerebro o la médula espinal no son frecuentes, aunque se ha identificado daño tisular severo con licuefacción de zonas de la sustancia blanca del encéfalo y malacia en zonas de la médula espinal. Histopatológicamente, se observa una meningoencefalitis no purulenta crónica, la cual va acompañada generalmente de desmielinización. Se han descrito tres patrones de lesión distintos, según la localización del daño: un patrón vascular, en el cual las células mononucleares se organizan en forma de manguitos perivasculares, uno infiltrativo, en el que se produce además infiltración no purulenta del neuroparénquima y otro malácico, cuya principal característica es la desmielinización (Benavides *et al.*, 2006). Se ha reportado que puede coexistir más de un patrón de lesión en un mismo animal (Benavides *et al.*, 2009).

A pesar de que las formas mamaria y articular no suelen por sí solas causar caquexia y muerte del animal, provocan un reemplazo prematuro debido a un descenso en la producción de leche y dificultades locomotoras. En contraparte, las formas respiratoria y neurológica conducen a un estado de caquexia y muerte, ya que provocan disfunción respiratoria o alteración general del sistema nervioso (Blacklaws, 2012).

Asimismo, aparece un tipo de inmunodeficiencia asociada con las manifestaciones clínicas de la infección, la cual se caracteriza por la incapacidad del animal para producir respuestas de memoria frente a antígenos diversos. Este fallo del sistema inmune se relaciona con la disminución de los niveles de moléculas coestimuladoras B7 necesarias para la correcta presentación de los antígenos, la anergia de los linfocitos T y los bajos niveles de producción de interferón gamma (Pyrah & Watt, 1996; Reina *et al.*, 2007). Por esta razón, las infecciones clínicas por SRLV representan predisposición para otras enfermedades en el animal, ya que disminuye su capacidad de responder adecuadamente a otros microorganismos patógenos, a pesar de que el animal continúe presentando elevados niveles de anticuerpos frente a antígenos virales a lo largo de su vida (Blacklaws, 2012).

1.9. Respuesta inmune a la infección

Existen dos tipos de respuesta inmune involucradas en el control de la infección por SRLV. La primera es la respuesta inmune innata que funciona como una de las primeras líneas de defensa contra la invasión de patógenos. La respuesta inmune innata implica una variedad de células y proteínas no específicas que pueden atacar y destruir a los patógenos invasores. En cambio, la respuesta inmune adquirida lleva tiempo para desarrollarse, pero es responsable de la producción de subconjuntos de células T y B específicas para los patógenos y contribuye al desarrollo de anticuerpos específicos. La respuesta inmune adquirida se puede subdividir adicionalmente en Th1 o respuesta inmune mediada por células (CMIR) y respuesta Th2 o respuesta inmune mediada por anticuerpos (AbMIR). Estas respuestas cumplen funciones diferentes, ya que la respuesta inmune Th1 implica a los subconjuntos de células T antígeno-específicas para atacar a los patógenos intracelulares como los virus. Sin embargo, la respuesta inmune Th2 se caracteriza por la proliferación de células B, con la consecuente producción de anticuerpos (Stonos *et al.*, 2014).

Los macrófagos y las células dendríticas son células importantes en la interfaz de la respuesta inmune innata / adaptativa, ya que actúan como células presentadoras

de antígeno para la estimulación de las respuestas de las células T. Por lo tanto, la infección por SRLV puede interferir con esta importante función celular y así alterar la respuesta inmune del individuo (Blacklaws, 2012).

1.9.1. Inmunidad innata

Los receptores de reconocimiento de patrones (Pattern-Recognition Receptors, PRRs) reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007). Los PRRs inhiben de manera indirecta la infección viral al inducir la producción de interferón y respuestas proinflamatorias. Durante la infección por SRLV, los receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs) 7 y 8 se activan induciendo la producción de IFN- α , IL-6 y TNF- α , con la subsecuente expresión de proteínas antivirales (Blacklaws, 2012).

Los factores de restricción son proteínas antivirales expresadas de manera constitutiva en ciertos tipos celulares o inducidas por interferón en otros, mismas que inhiben algún paso del ciclo de replicación viral. Sin embargo, su expresión puede verse aumentada tras la infección viral (Glaría, 2015).

TRIM5 α se une a la cápside viral, inhibiendo las etapas de integración y post-integración del ciclo viral (Jauregui *et al.*, 2012). Las proteínas APOBEC3 (A3) tienen actividad citosina deaminasa, generando una gran cantidad de cambios de citosina a uracilo con lo cual el ADN viral rico en uracilos puede degradarse o generar un provirus hipermutado (Nakano *et al.*, 2017). Las hipermutaciones pueden conducir a cambios de aminoácidos en las proteínas y acumulación de codones de paro que generarían partículas virales defectuosas, pudiendo ser letales para la viabilidad viral (Romani *et al.*, 2009). Sin embargo, la proteína Vif del virus puede inhibir la actividad de las proteínas APOBEC3 (LaRue *et al.*, 2008). Por su parte, la teterina impide la liberación viral. Esta proteína se concentra en las zonas por las que el virus realiza la salida de la célula y se incorpora en la membrana lipídica de los viriones, manteniéndolos anclados a la membrana celular (Le Tortorec *et al.*, 2011).

1.9.2. Inmunidad adquirida

Dado que a diferencia del VIH-1, los SRLV no infectan a las células T CD4 +, el mantenimiento de las poblaciones de células T CD4 + durante la infección por SRLV podría permitir el desarrollo y mantenimiento de CTLs específicos de SRLV (Stonos *et al.*, 2014). Sin embargo, los SRLV pueden interferir con la proliferación de células T CD4 + ya que cabras artríticas infectadas con CAEV redujeron la proliferación de células T CD4 + en comparación con cabras infectadas sin signos clínicos (Perry *et al.*, 1995). De manera adicional, los SRLV pueden disminuir la expresión de moléculas coestimuladoras B7 en ovejas con signos clínicos de la enfermedad (Reina *et al.*, 2007). Esto sugiere que la infección por SRLV parece interferir con la presentación antigénica y, por lo tanto, limita la capacidad de las células presentadoras de antígenos para activar a las células T CD4 + e inducir respuestas de CTLs (Stonos *et al.*, 2014).

A pesar del conocido papel de la CMIR en la defensa contra infecciones virales, la respuesta Th1 se ha encontrado débil en animales infectados con SRLV, por lo que la presencia de citocinas tipo 1 no es suficiente para controlar la replicación viral (Minguijón *et al.*, 2015). De hecho, citocinas Th1 como IFN- γ , TNF- α y GM-CSF activan el promotor de los SRLV en la región U3 de la LTR a través de la vía de STAT1 e inducen la transcripción viral. (Murphy *et al.*, 2006, 2007; Stonos *et al.*, 2014).

La respuesta de anticuerpos contra SRLV puede aparecer desde 2-4 semanas después de la infección, tiende a incrementar gradualmente durante los primeros 6 meses de infección y se dirige generalmente a epítomos de las proteínas Gag y Env (Rachid *et al.*, 2013). Los anticuerpos a pesar de no ser neutralizantes, pueden desempeñar un papel importante en la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) (Singh *et al.*, 2006). Los epítomos del virus pueden mutar en respuesta a la presión de selección impuesta por las inmunoglobulinas del hospedador (Narayan *et al.*, 1981). Estas mutaciones tienden a producirse en el cuarto dominio variable de la proteína SU, cambiando el epítomo de neutralización (Haflidadottir *et al.*, 2008). Aunado a lo anterior, los anticuerpos neutralizantes son de inducción lenta, de baja afinidad y de título relativamente bajo (Blacklaws, 2012). La respuesta inmune en animales con manifestaciones clínicas de la infección es de tipo

humoral, mientras que en animales que no muestran signos clínicos prevalece una respuesta mediada por células (Perry *et al.*, 1995). Es por esto que respuestas humorales elevadas no se asocian con un buen pronóstico del curso de la infección. La respuesta de anticuerpos, en general, parece ser un indicador de la progresión de la enfermedad causada por SRLV, ya que los animales infectados sin signos clínicos tienden a montar una CMIR con un título bajo de IgG2 específica para la proteína SU, mientras que los animales con signos clínicos muestran niveles muy altos de IgG1 (Trujillo *et al.*, 2004). La AbMIR no es suficiente para controlar la infección por SRLV y se asocia con la progresión más rápida de la enfermedad (Stonos *et al.*, 2014).

1.10. Transmisión

Las principales vías de transmisión de los SRLV son la horizontal, que ocurre a través del contacto directo entre los animales y la lactogénica, que ocurre a través del consumo de calostro o leche infectados (Sánchez *et al.*, 2016). El virus en forma libre o asociado a células infectadas, entra en el hospedador a través del tracto respiratorio, la conjuntiva del animal o los capilares fenestrados del intestino en corderos (Blacklaws *et al.*, 2004). Ambas vías de transmisión sugieren que la genética viral y del hospedador puede estar involucrada. Otras vías se han considerado como menos importantes desde el punto de vista epidemiológico e incluyen las vías iatrogénica e intrauterina (Sánchez *et al.*, 2016).

El calostro y la leche se consideran de primordial importancia en la transmisión de los SRLV de la madre a la descendencia (Peterhans *et al.*, 2004). La glándula mamaria es un órgano blanco de los SRLV, encontrándose tanto las lesiones patológicas como el virus (Cutlip *et al.*, 1985; Kennedy-Stoskopf *et al.*, 1985; van der Molen *et al.*, 1987). Estudios muestran que el virus se puede encontrar en el tejido mamario, así como en las células del epitelio mamario y en los macrófagos del calostro y de la leche, por lo que la transmisión de los SRLV puede ocurrir a través de su ingestión (Carrozza *et al.*, 2003; Leroux *et al.*, 1997; Mselli-Lakhal *et al.*, 1999).

La transmisión por aerosoles del tracto respiratorio entre animales en contacto cercano, parece ser una ruta importante de diseminación de los SRLV, particularmente en condiciones de hacinamiento donde se favorece la aspiración de aerosoles de las secreciones respiratorias procedentes de los animales infectados (East *et al.*, 1993; Houwers & van der Molen, 1987).

Se ha reportado la vía intrauterina como vía de transmisión de los SRLV (Hasegawa *et al.*, 2017), sin embargo, su importancia continúa siendo poco clara. Aunque la vía sexual no se considera importante, se ha descrito la transmisión mediante inseminación artificial (Souza *et al.*, 2013).

Además del calostro, la leche, los fluidos pulmonares y el semen, se han detectado SRLV en las secreciones nasales, la saliva y la orina (Minguijón *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha detectado la presencia del virus en el agua de los bebederos (Villoria *et al.*, 2013).

1.11. Control

Dado que no hay tratamiento o vacunas eficaces disponibles, el control de la infección por SRLV se basa en el diagnóstico oportuno de los animales infectados y de la implementación de estrategias que eviten la diseminación del virus (Reina *et al.*, 2009a).

La determinación de la prevalencia de la enfermedad debe ser la acción inicial en cualquier programa de control. Posteriormente, el objetivo debería ser disminuir la seroprevalencia y finalmente erradicar la infección (Peterhans *et al.*, 2004). Los rebaños deben monitorearse al menos una vez al año, a partir de animales de más de 6 meses de edad. Se debe elegir un programa de control, adaptado al sistema de producción, a la prevalencia y a las condiciones de manejo. Los rebaños pueden clasificarse de acuerdo con la seroprevalencia en: alta (> 70%), intermedia (40-69%), baja (10-39%), muy baja (1-9%) y negativa (libre de SRLV). La erradicación y acreditación, que es el último paso de un programa de control, puede aplicarse cuando la seroprevalencia es menor al 10% con el fin de incrementar el valor del rebaño y la posibilidad de exportar animales. El número y la frecuencia de las

pruebas necesarias para alcanzar definitivamente el estado libre de SRLV difiere entre países de 2 a 5 pruebas, llevadas a cabo cada 6 meses, anualmente o cada 2 años (Reina *et al.*, 2009a).

El sacrificio de animales infectados y su sustitución por animales libres de SRLV fue la estrategia efectiva para controlar la epidemia islandesa (Blacklaws *et al.*, 2004). Sin embargo, el sacrificio se puede aplicar justificadamente en rebaños con baja prevalencia. Si no se dispone de animales de reemplazo libres del virus o la prevalencia es alta, puede ser conveniente separar al rebaño (positivos / negativos). Si se aplica estrictamente, este procedimiento puede controlar la infección en unos pocos años, no obstante, debe considerarse que los requerimientos de instalaciones y manejo serán mayores (Reina, *et al.*, 2009a).

El aislamiento de los neonatos de sus madres inmediatamente después del parto, es una estrategia de control que permite conservar las ganancias genéticas del rebaño (Blacklaws *et al.*, 2004). Es importante destacar que los recién nacidos deben ser alimentados con calostro/leche procedente de hembras no infectadas, con calostro/leche tratados térmicamente (45°C durante 60 minutos) o con fórmulas comerciales (Balbin & Mingala, 2017; Berriatua *et al.*, 2003). La reintroducción de los animales jóvenes al rebaño conlleva el riesgo de que éstos sean infectados por otros animales, por lo que a partir de entonces, deben incluirse en el monitoreo serológico (Reina *et al.*, 2009a).

Un programa de control adecuado debe contemplar conjuntamente la infección por SRLV en ovinos y en caprinos, con la finalidad de evitar la transmisión cruzada entre especies (Brulisauer *et al.*, 2005).

1.12. Diagnóstico

En la actualidad, el diagnóstico de la infección con SRLV se lleva a cabo principalmente mediante métodos serológicos, y la inmunodifusión en gel de agar (AGID) se sustituye cada vez más por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) como resultado de su mayor sensibilidad, objetividad y automatización. A pesar de que el ELISA es generalmente una técnica más

sensible que la prueba de AGID para la detección de anticuerpos contra SRLV, debe considerarse que para obtener una mayor sensibilidad en la prueba se requiere la utilización de al menos un antígeno del core y un antígeno de la envoltura viral (de Andrés *et al.*, 2005). Los ELISAs indirectos y competitivos, se han utilizado ampliamente para el diagnóstico de la infección y en los programas de erradicación de los SRLV (Sanjosé *et al.*, 2015).

Las pruebas serológicas suelen ser más sensibles cuando se utilizan antígenos provenientes de diferentes cepas virales (Grego *et al.*, 2002). De igual manera, se ha demostrado que con la combinación de antígenos de diferente origen (TM/CA o MA/CA), se tienen pruebas más sensibles (Rosati *et al.*, 2004; Tolari *et al.*, 2013). Además, los antígenos derivados del genotipo A son más propensos a detectar anticuerpos de reacción cruzada que los antígenos derivados del genotipo B o E (Sanjosé *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha reportado que existen epítomos tipo-específicos en MA y CA, por lo que pueden utilizarse como un marcador del genotipo viral causante de la infección (Grego *et al.*, 2002, 2005). Las limitaciones de las pruebas serológicas monovalentes actuales pueden explicarse por la variación antigénica y la tasa de mutación de los SRLV, asociada a la aparición de diferentes genotipos. El uso de péptidos sintéticos podría permitir el desarrollo de pruebas de diagnóstico a medida que se ajusten a los epítomos específicos del genotipo viral bajo investigación (Sanjosé *et al.*, 2015).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite el diagnóstico precoz, el genotipificado y la cuantificación del material genético viral, pero se emplea principalmente como prueba confirmatoria o con fines de investigación, ya que la heterogeneidad genética viral y la baja carga viral limitan su uso como un ensayo de diagnóstico comercial (Sanjosé *et al.*, 2015).

Existen dos dificultades principales para el desarrollo de pruebas de PCR: la variación de las cepas de SRLV y la baja carga del virus *in vivo*. Las secuencias diana para los iniciadores abarcan regiones en todo el genoma e incluyen a los genes *gag*, *pol*, *env* y la LTR. Algunas regiones en los genes *gag*, *pol* y en la LTR están más conservadas en comparación con el gen *env*, que tiene la mayor variabilidad (de Andrés *et al.*, 2005).

Los monocitos de sangre periférica suelen utilizarse como las células diana para la PCR. Sin embargo, dado que sólo alrededor de $1/10^6$ de los leucocitos contienen al virus, los ensayos de PCR pueden no amplificar el material genético viral porque la cantidad de molde está por debajo del límite de detección del ensayo (de Andrés *et al.*, 2005). En general, las pruebas de PCR tienden a ser menos sensibles que muchas pruebas de ELISA, aunque la PCR es capaz de detectar animales infectados antes de la seroconversión, por lo que se sugiere que una combinación de serología y PCR podría ser óptima para detectar animales infectados, utilizando a la PCR en los animales seronegativos (Extramiana *et al.*, 2002). Además, el desarrollo de ensayos adaptados para cada región podría ayudar a resolver el problema de las altas tasas de mutación de estos virus, por lo que la secuenciación de los SRLV del área geográfica de interés es un requisito previo para este enfoque (de Andrés *et al.*, 2005).

Las pruebas complementarias como el radioinmunoensayo (RIA), la radioinmunoprecipitación (RIPA) y el western blot (WB) son discriminadores útiles para los resultados indeterminados obtenidos en los análisis de detección, aunque se debe tener cuidado al interpretar los resultados, ya que no son verdaderos métodos estándar para el diagnóstico de SRLV (de Andrés *et al.*, 2005).

1.13. Serotipificación de SRLV

La serotipificación es una herramienta que permite la clasificación de microorganismos con base en sus antígenos. En los lentivirus de pequeños rumiantes el principio de esta manera de tipificación tiene su fundamento en estudios en los que se han reportado epítomos tipo-específicos en antígenos codificados por el gen *gag*, los cuales podrían utilizarse como indicadores del genotipo viral causante de la infección de acuerdo con la respuesta de anticuerpos dirigida de manera específica hacia los antígenos derivados de alguno de los genotipos (Grego *et al.*, 2002, 2005).

En este estudio se utilizó una prueba comercial de ELISA (Eradikit™ SRLV) que en una primera placa evalúa a las muestras de plasma sanguíneo para identificar a

los animales positivos a la infección por SRLV (*screening*). Los animales positivos en esta primera fase son evaluados nuevamente en una segunda placa para serotipificación del virus infectante. La placa de *screening* está sensibilizada con tres péptidos recombinantes derivados de las proteínas de TM, MA y CA de los genotipos A y B; mientras que la placa para serotipificación está sensibilizada sólo con una subunidad recombinante de la CA que deriva de virus pertenecientes al genotipo A o al genotipo B, lo que permite hacer la serotipificación de las muestras de acuerdo con su reactividad hacia el antígeno derivado del genotipo A o B. Esta prueba de serotipificación se basa en la existencia de un epítipo inmunodominante de la cápside en el que se han reportado diferencias en los últimos 9 aminoácidos del extremo carboxilo terminal en los genotipos A y B de SRLV, siendo la secuencia de aminoácidos del péptido del genotipo A: GNRAQKELIQGKLNEEAERWVRQNPPGPN y la secuencia del péptido del genotipo B: GNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPPPA (Grego *et al.*, 2002).

2. Justificación

A pesar de que la infección por SRLV en ovinos y caprinos es reconocida en México como endémica, son convenientes más estudios acerca de los genotipos virales que infectan a los rebaños del país y de la eficiencia de las técnicas de diagnóstico. Eradikit™ SRLV es un kit comercial de ELISA que ofrece la tipificación de los SRLV con base en la respuesta de anticuerpos dirigida hacia alguno de los tipos virales, en los que se han descrito epítomos específicos de genotipo en antígenos codificados por el gen *gag*, por lo que podrían utilizarse para tipificar al genotipo viral infectante. Es de importancia conocer la eficiencia de la tipificación serológica como método de predicción del genotipo viral y su implicación epidemiológica en las infecciones causadas por SRLV en ovinos y caprinos de México.

3. Hipótesis

La tipificación viral mediante una prueba comercial de ELISA puede compararse y ser igualmente efectiva que la información obtenida a partir de la PCR – secuenciación de los SRLV que infectan a ovinos y caprinos en México.

4. Objetivos

4.1. General

- Determinar la asociación existente entre la tipificación serológica y la genética de SRLV en ovinos y caprinos infectados naturalmente en México.

4.2. Específicos

- Detectar la presencia de anticuerpos contra SRLV en ovinos y caprinos con dos pruebas comerciales de ELISA.
- Tipificar al virus infectante con una prueba de ELISA comercial diseñada para la detección de los genotipos A y B de SRLV.
- Detectar el genoma proviral de SRLV mediante PCR y secuenciar los amplicones positivos obtenidos a partir de ADN de leucocitos de sangre periférica de ovinos y caprinos.
- Comparar los resultados de tipificación por serología con los obtenidos de la caracterización genética mediante PCR.

5. Materiales y métodos

5.1. Animales de estudio

Se realizó un muestreo por conveniencia en diferentes rebaños de ovinos y caprinos de 12 estados del país. Se incluyeron un total de 1006 ovinos y 934 caprinos. Adicionalmente, se incluyeron 255 ovinos procedentes de 5 rastros del Estado de México, con edad mayor a 2 años, sin distinción de sexo y raza, con algún signo clínico sugerente de la infección por SRLV (cuadro 1). Este proyecto fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación, CICUAE – FESC con la clave C18_13.

Cuadro 1. Rastros de los que proceden las muestras colectadas de sangre completa y tejidos de ovinos.

Rastro	Número de ovinos
Capulhuac, Estado de México.	11
Coyotepec, Estado de México.	66
“El Rojo”, Texcoco, Estado de México.	50
San Lorenzo, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.	113
San Lorenzo (T.I.F.), Cuautitlán Izcalli, Estado de México.	15
Total	255

5.2. Colección de muestras

Se obtuvo sangre completa por punción de la vena yugular utilizando tubos estériles con heparina de litio/sodio (BD Vacutainer®, México) y aguja calibre 21 (BD, México). En el caso de los ovinos de rastro, una vez sacrificados se colectaron muestras de pulmón, glándula mamaria, hígado, riñón y bazo, mismas que se fijaron en formol amortiguado al 10%. Las muestras de tejidos pertenecientes a animales seropositivos se procesaron para su posterior análisis histopatológico.

5.3. Procesamiento de las muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos para separar al plasma de la fracción celular. Los leucocitos de sangre periférica se obtuvieron mediante la lisis de eritrocitos (Anexo 1). El plasma y los leucocitos de sangre periférica se colectaron en microtubos de 1.5 mL y se conservaron a -70°C.

5.4. Detección de anticuerpos contra SRLV

Para detectar la presencia de anticuerpos en los animales se utilizaron las pruebas de ELISA comercial: Small Ruminant Lentivirus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD™, USA) y Eradikit™ SRLV Screening (In3 Diagnostic, Italia), siguiendo las instrucciones del fabricante. La prueba de VMRD™ es un ELISA de tipo competitivo basado en la proteína SU de una cepa tipo CAEV. La prueba de Eradikit™ SRLV Screening es un ELISA de tipo indirecto que está basada en péptidos de TM, MA y CA del genotipo A (tipo VMV) y del genotipo B (tipo CAEV).

5.5. Serotipificación

Las muestras de plasma positivas en la prueba de ELISA indirecto (Eradikit™ SRLV Screening, In3 Diagnostic, Italia) se evaluaron posteriormente con Eradikit™ SRLV Genotyping (In3 Diagnostic, Italia), que se basa en una subunidad de la CA del genotipo A o del genotipo B, lo que permite la tipificación serológica.

5.6. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total a partir de los LSP y de los tejidos embebidos en parafina de las muestras de animales seropositivos, usando el kit comercial FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extracción Mini Kit (Favorgen®, Taiwán), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó a la longitud de onda de 260–280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, USA). El ADN obtenido se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.7. Diseño de iniciadores

Se diseñaron cuatro parejas de iniciadores para amplificar una región del gen gag mediante PCR anidada. Dos parejas de iniciadores se basaron en secuencias de

SRLV disponibles en el GenBank correspondientes al genotipo A, mientras que las otras dos parejas de iniciadores se basaron en secuencias del genotipo B (cuadro 2).

Cuadro 2. Iniciadores diseñados por genotipo (A y B) para amplificar una región en el gen gag de los SRLV mediante PCR anidada.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Posición ^a	Tamaño del producto
GAG A FW1	AGCAAGGCTCAAAGGAGAA	513 – 531	733 pb
GAG A RV1	GTTTGCCTACTCCCATTATTG	1223 – 1245	
GAG A FW2	GGGAATTGTCTATGGGCATT	617 – 636	578 pb
GAG A RV2	GGATTTTGTCTTACCCACCT	1175 – 1194	
GAG B FW1	GTCTTACAGGCCACATTAGC	784 – 804	783 pb
GAG B RV1	TCTCCACACTAGCCTGTTG	1547 – 1566	
GAG B FW2	TGCAAACAGTAGCAATGCA	1008 – 1026	529 pb
GAG B RV2	CCTAGTACTCTATCCATCTGCT	1515 – 1536	

^a Posiciones basadas en la secuencia EV1 (S51392.1) para el genotipo A y en la secuencia CAEV-CO (M33677.1) para el genotipo B.

5.8. Reacción en cadena de la polimerasa

La detección del genoma proviral se realizó mediante dos PCR anidadas que amplifican una región parcial del gen gag. La primera para detección del genotipo A y la segunda para detección del genotipo B a partir del ADN extraído de los LSP y de los tejidos embebidos en parafina de animales cuyo plasma había sido evaluado previamente en la serotipificación con Eradikit™. Para la detección de genotipo A se utilizaron los iniciadores GAG A FW1 y GAG A RV1 para obtener el primer producto de 733 pb. El segundo producto de 578 pb se obtuvo en la segunda reacción (anidada) con los iniciadores GAG A FW2 y GAG A RV2. Para detectar el genotipo B se utilizaron los iniciadores GAG B FW1 y GAG B RV 1 para obtener el primer producto de 783 pb. El segundo producto de 529 pb se obtuvo

en la segunda reacción (anidada) con los iniciadores GAG B FW2 y GAG B RV2. Como control positivo se utilizó ADNc retrotranscrito obtenido a partir del ARN de sobrenadante de cultivos celulares de membrana sinovial de feto caprino infectados con la cepa EV1 (subtipo A1) y con la cepa FESC – 752 (subtipo B1). Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Buffer 1X (AMPLIQON, Dinamarca), 2.5 mM de MgCl₂ (AMPLIQON, Dinamarca), 230 μM de dNTPs (Kapa Biosystems), 600 nM de cada iniciador, 5 U de Taq DNA polimerasa (AMPLIQON, Dinamarca) y 0.7 μg de ADN por reacción en un volumen final de 25 μl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguidos por 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 segundos, alineamiento según la pareja de iniciadores utilizados, extensión a 72°C por 50 segundos y extensión final a 72°C durante 5 minutos (cuadros 3–6).

Cuadro 3. Condiciones finales establecidas para la primera reacción de la PCR gag, genotipo A.

Reactivos	Condiciones
<ul style="list-style-type: none"> • Agua grado biología molecular • Buffer 1X • MgCl₂: 2.5 mM • dNTPs: 230 μM • Iniciadores: 600 nM c/u • Taq polimerasa: 5 U • ADN: 700 ng <p>Volumen de reacción: 25 μl</p>	<p>Desnaturalización inicial: 95°C / 5 min (1 ciclo)</p> <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <p>Desnaturalización: 95°C / 40 seg</p> <p>Alineamiento: 47 °C / 40 seg</p> <p>Extensión: 72 °C / 50 seg</p> </div> <div style="font-size: 3em; margin: 0 10px;">}</div> <p>45 ciclos</p> </div> <p>Extensión final: 72 °C / 5 min (1 ciclo)</p>

Cuadro 4. Condiciones finales establecidas para la segunda reacción (anidada) de la PCR-gag, genotipo A.

Reactivos	Condiciones
<ul style="list-style-type: none"> • Agua grado biología molecular • Buffer 1X • MgCl₂: 2.5 mM • dNTPs: 230 μM • Iniciadores: 600 nM c/u • Taq polimerasa: 5 U • Reacción anterior: 5 μl <p>Volumen de reacción: 25 μl</p>	<p>Desnaturalización inicial: 95°C / 5 min (1 ciclo)</p> <p>Desnaturalización: 95°C / 40 seg</p> <p>Alineamiento: 47 °C / 40 seg</p> <p>Extensión: 72 °C / 50 seg</p> <p>Extensión final: 72 °C / 5 min (1 ciclo)</p> <p style="text-align: right;">} 45 ciclos</p>

Cuadro 5. Condiciones finales establecidas para la primera reacción de la PCR-gag, genotipo B.

Reactivos	Condiciones
<ul style="list-style-type: none"> • Agua grado biología molecular • Buffer 1X • MgCl₂: 2.5 mM • dNTPs: 230 μM • Iniciadores: 600 nM c/u • Taq polimerasa: 5 U • ADN: 700 ng <p>Volumen de reacción: 25 μl</p>	<p>Desnaturalización inicial: 95°C / 5 min (1 ciclo)</p> <p>Desnaturalización: 95°C / 40 seg</p> <p>Alineamiento: 48 °C / 40 seg</p> <p>Extensión: 72 °C / 50 seg</p> <p>Extensión final: 72 °C / 5 min (1 ciclo)</p> <p style="text-align: right;">} 45 ciclos</p>

Cuadro 6. Condiciones finales establecidas para la segunda reacción (anidada) de la PCR-gag, genotipo B.

Reactivos	Condiciones
<ul style="list-style-type: none"> • Agua grado biología molecular • Buffer 1X • MgCl₂: 2.5 mM • dNTPs: 230 μM • Iniciadores: 600 nM c/u • Taq polimerasa: 5 U • Reacción anterior: 5 μl <p>Volumen de reacción: 25 μl</p>	<p>Desnaturalización inicial: 95°C / 5 min (1 ciclo)</p> <p>Desnaturalización: 95°C / 40 seg</p> <p>Alineamiento: 50 °C / 40 seg</p> <p>Extensión: 72 °C / 50 seg</p> <p>Extensión final: 72 °C / 5 min (1 ciclo)</p> <p style="text-align: right;">} 45 ciclos</p>

5.9. PCR – SDHA

Para evaluar la integridad del ADN de las muestras negativas en las pruebas de la PCR – gag, se probaron con una PCR para detección de un segmento del gen de la succinato deshidrogenasa (SDHA), utilizando los iniciadores SDHA – FW (5'-CATGGAGGAGGACAACACTG-3') y SDHA – RV (5'-TGGTAGATCTTCCCATCTTC-3') para obtener un producto de 348 pb. Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Buffer 1X (AMPLIQON, Dinamarca), 1.5 mM de MgCl₂ (AMPLIQON, Dinamarca), 230 μM de dNTPs (Kapa Biosystems), 600 nM de cada iniciador, 5 U de Taq DNA polimerasa (AMPLIQON, Dinamarca) y 0.3 μg de ADN por reacción en un volumen final de 25 μl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguidos por 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 segundos, alineamiento a 53°C por 35 segundos, extensión a 72°C por 40 segundos y extensión final a 72°C durante 5 minutos (cuadro 7).

Cuadro 7. Condiciones finales establecidas para la PCR – SDHA.

Reactivos	Condiciones
<ul style="list-style-type: none">• Agua grado biología molecular• Buffer 1X• MgCl₂: 2.5 mM• dNTPs: 230 µM• Iniciadores: 600 nM c/u• Taq polimerasa: 5 U• ADN: 300 ng Volumen de reacción: 25 µl	Desnaturalización inicial: 95°C / 5 min (1 ciclo) Desnaturalización: 95°C / 40 seg Alineamiento: 53 °C / 35 seg Extensión: 72 °C / 40 seg Extensión final: 72 °C / 5 min (1 ciclo)

5.10. Electroforesis

Los productos de la PCR se cargaron en geles de agarosa al 1.5% y se corrieron con TAE 1X a 110 Volts durante 1 hora. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 µg/ml) y se observaron en el transiluminador (UVP, M-20E, USA). Las bandas de los amplicones positivos se cortaron con una navaja de bisturí para su posterior purificación.

5.11. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de los amplicones se realizó con el kit comercial FavorPrep™ GEL / PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwán) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5. 12. Secuenciación y análisis de secuencias

Los amplicones purificados se enviaron para su secuenciación mediante el método de Sanger al Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) ubicado en la FES-Iztacala, UNAM. Las secuencias obtenidas se analizaron con herramientas bioinformáticas.

6. Resultados

6.1. Detección de anticuerpos con dos pruebas comerciales de ELISA

De los 1006 ovinos evaluados, con el ELISA VMRD™, se detectaron 129 seropositivos (12.8%) y 877 seronegativos (87.2%); mientras que con el ELISA Eradikit™ SRLV Screening, se detectaron 102 seropositivos (10.1%) y 904 seronegativos (89.9%). Del total de ovinos evaluados (n= 1006), 79 animales resultaron discordantes entre ambas técnicas, 53 se detectaron como seropositivos con el ELISA VMRD™ y seronegativos con el ELISA Eradikit™; y 26 se detectaron como seropositivos con el ELISA Eradikit™ y seronegativos con el ELISA VMRD™ (cuadro 8). De los 934 caprinos evaluados, con el ELISA VMRD™, se detectaron 373 seropositivos (39.9%) y 561 seronegativos (60.1%); mientras que con el ELISA Eradikit™ SRLV Screening, se detectaron 316 seropositivos (33.8%) y 618 seronegativos (66.2%). Del total de caprinos evaluados (n= 934), 85 animales resultaron discordantes entre ambas técnicas, 71 se detectaron como seropositivos con el ELISA VMRD™ y seronegativos con el ELISA Eradikit™; y 14 se detectaron como seropositivos con el ELISA Eradikit™ y seronegativos con el ELISA VMRD™ (cuadro 9). Se calculó el coeficiente kappa de Cohen, obteniéndose un valor de 0.767, por lo que la concordancia entre ambas pruebas de ELISA fue considerable.

Cuadro 8. Ovinos seropositivos a la infección por SRLV evaluados con dos pruebas comerciales de ELISA (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening).

Ovinos (n = 1006)			
VMRD		ERADIKIT	
Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
129	877	102	904
Discordantes: 79			
VMRD (+) / ERADIKIT (-)		ERADIKIT (+) / VMRD (-)	
53		26	

Cuadro 9. Caprinos seropositivos a la infección por SRLV evaluados con dos pruebas comerciales de ELISA (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening).

Caprinos (n = 934)			
VMRD		ERADIKIT	
Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
373	561	316	618
Discordantes: 85			
VMRD (+) / ERADIKIT (-)		ERADIKIT (+) / VMRD (-)	
71		14	

Los 255 ovinos procedentes de cinco rastros del Estado de México se evaluaron con el ELISA Eradikit™ SRLV Screening, detectando a dos animales seropositivos (0.78%). Las muestras de tejido colectadas de estos ovinos se procesaron para su posterior análisis histopatológico.

6.2. Serotipificación

Las muestras de plasma sanguíneo de 102 ovinos y 168 caprinos detectados previamente como positivos a la infección con el ELISA Eradikit™ SRLV Screening, se evaluaron en la fase de serotipificación con el ELISA ERADIKIT™ SRLV Genotyping. De los 102 ovinos evaluados, 32 fueron positivos al serotipo A, 10 al serotipo B, 4 a ambos serotipos, por lo que se consideraron como coinfectados y 56 no fueron positivos a ninguno de los serotipos, por lo que se categorizaron como indeterminados (figura 4). De los 168 caprinos evaluados, 7 fueron positivos al serotipo A, 55 al serotipo B, 68 coinfectados y 38 indeterminados (figura 5).

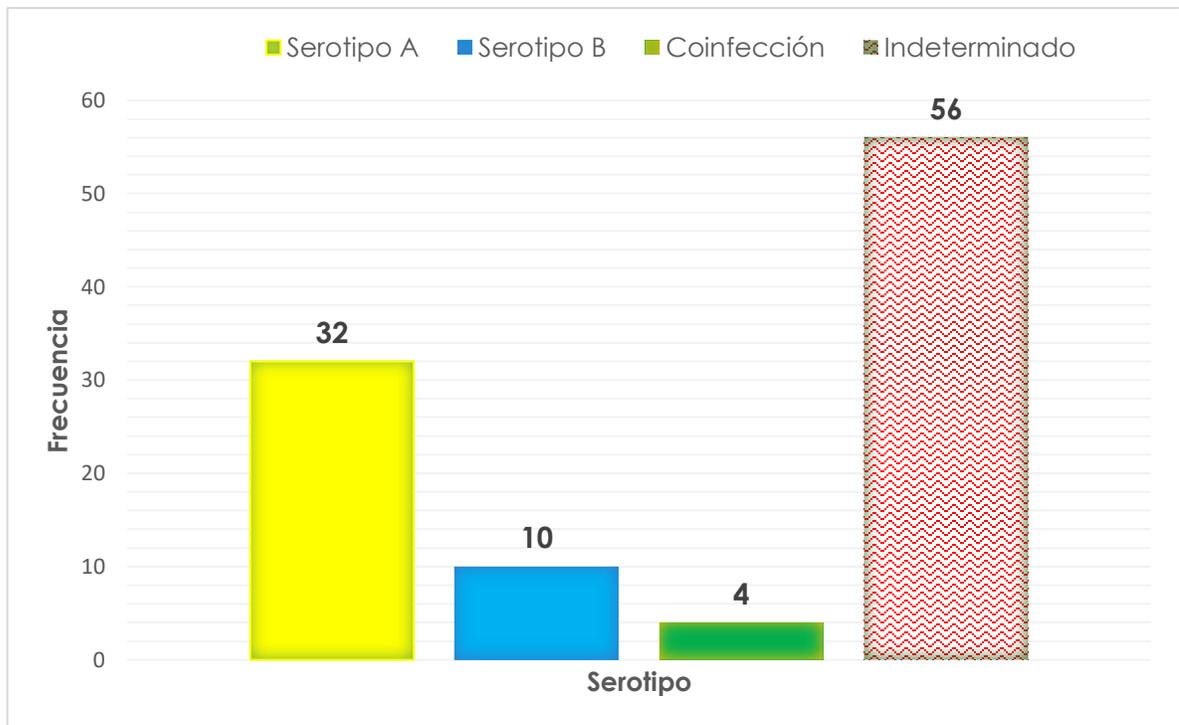


Figura 4. Frecuencia de los serotipos en 102 ovinos evaluados con una prueba comercial de ELISA (Eradikit™ SRLV Genotyping). Serotipo A (amarillo), serotipo B (azul), coinfección (verde) e indeterminado (rayado).

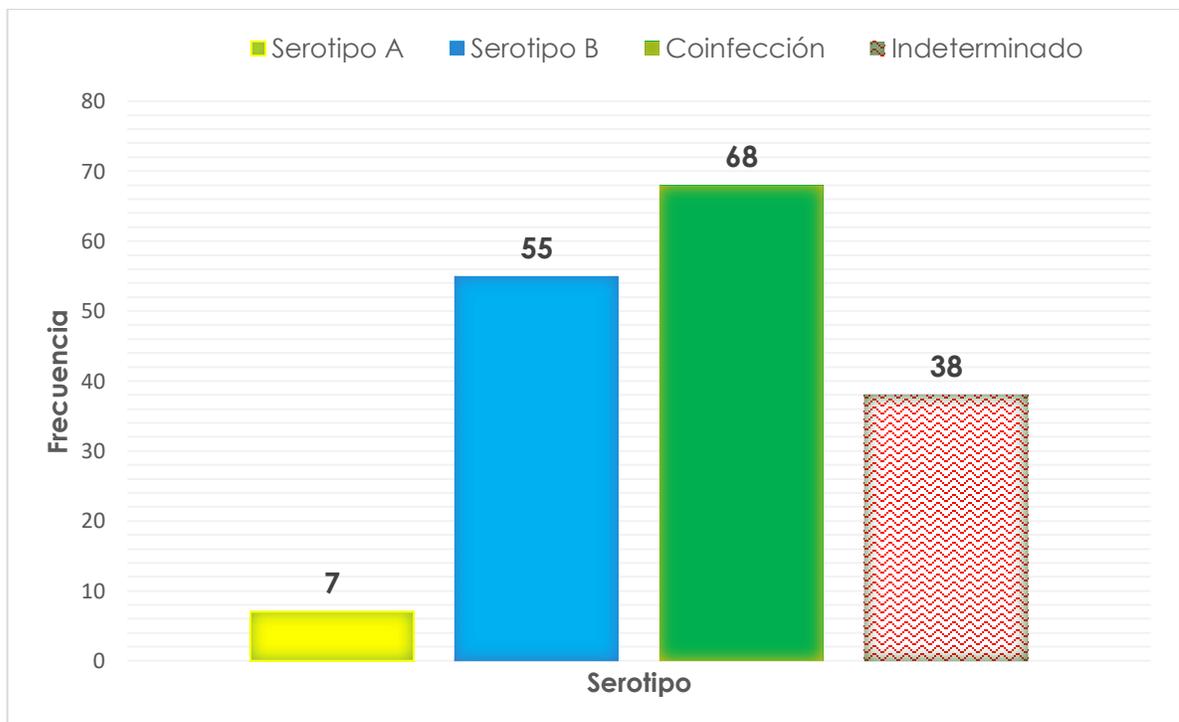


Figura 5. Frecuencia de los serotipos en 168 caprinos evaluados con una prueba comercial de ELISA (Eradikit™ SRLV Genotyping). Serotipo A (amarillo), serotipo B (azul), coinfección (verde) e indeterminado (rayado).

6.3. PCR – gag

De los 102 ovinos tipificados previamente mediante serología con ERADIKIT™ SRLV Genotyping, se evaluaron 66 por PCR, en los que se incluyeron 16 que habían resultado positivos al serotipo A, 7 al serotipo B, 2 coinfectados y 41 indeterminados; mientras que de los 168 caprinos previamente serotipificados, se evaluaron 81 mediante PCR, en los que se incluyeron 3 que habían resultado positivos al serotipo A, 28 al serotipo B, 38 coinfectados y 12 indeterminados. El ADN extraído de los LSP de los 66 ovinos y los 81 caprinos serotipificados se evaluó con ambas PCR anidadas para la detección de los genotipos A y B (PCR-gag A y PCR-gag B) (figuras 6 y 7). De los ovinos evaluados por PCR, 33 resultaron positivos a la PCR-gag A, 5 a la PCR-gag B y 2 a ambas pruebas. De los caprinos evaluados por PCR, 14 fueron positivos a la PCR-gag A, 12 a la PCR-gag B y 3 a ambas pruebas (cuadro 10). El ADN extraído de los LSP de los animales negativos a ambas PCR para detección de genotipos (PCR-gag A y PCR-gag B) se evaluó con la PCR – SDHA (gen constitutivo), en la que todas las muestras resultaron positivas, corroborando la integridad del ADN (figura 8).

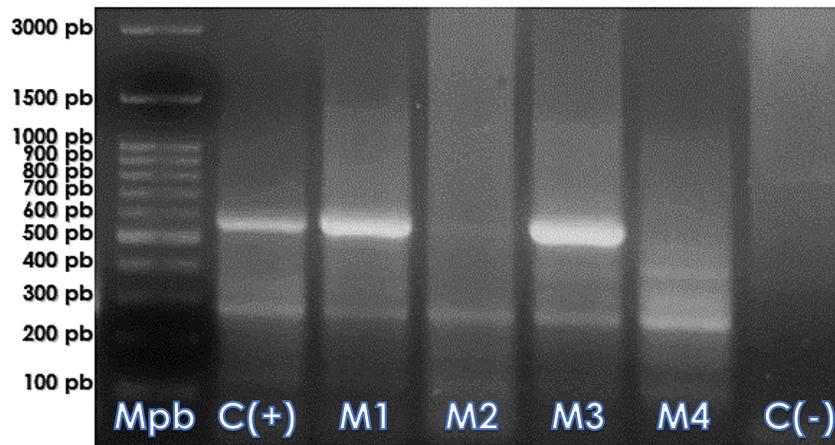


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR-gag A. El producto esperado es era de 578 pb. Mpb = Marcador de pares de bases. C = Controles. M1-M4 = Muestras.

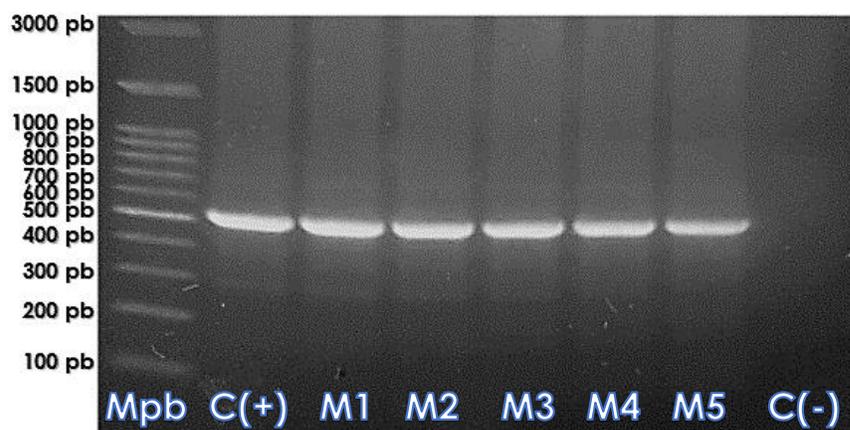


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR-gag B. El producto esperado era de 529 pb. Mpb = Marcador de pares de bases. C = Controles. M1-M5 = Muestras.

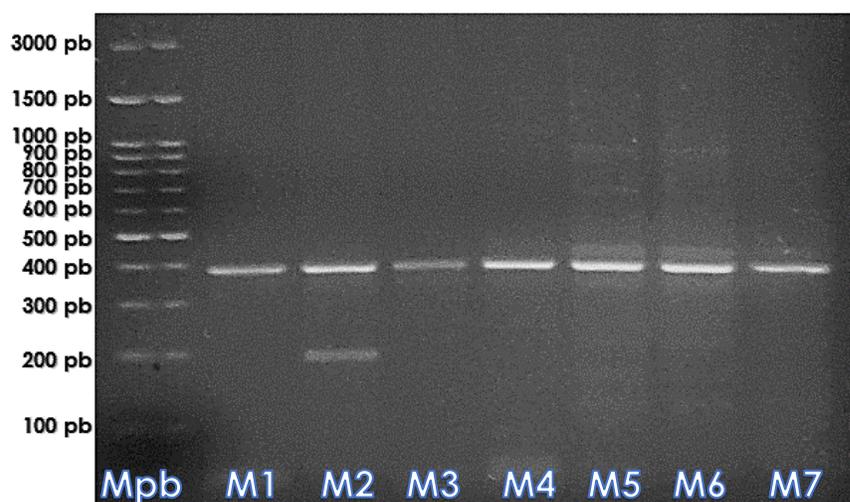


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR – SDHA. El producto esperado era de 348 pb. Mpb = Marcador de pares de bases. M1-M7= Muestras negativas a la PCR – gag.

Cuadro 10. Resultados de la PCR para la detección de los genotipos A y B.

PCR – gag	Genotipo A	Genotipo B	Genotipo A y B	Negativos	Total
Ovinos	33	5	2	26	66
Caprinos	14	14	3	50	81
Total	47	19	5	76	147

6.4. Especificidad de los iniciadores de la PCR – gag

El diseño de los iniciadores utilizados en la PCR – gag se basó en secuencias pertenecientes al genotipo A (PCR – gag A) o al genotipo B (PCR – gag B). Los iniciadores se alinean en diferentes posiciones genéticas de los SRLV de referencia (figura 9), por lo que el tamaño de los productos de PCR fue diferente en ambos casos: 578 pb para los obtenidos del genotipo A y 529 pb para los obtenidos del genotipo B. Esto pudo corroborarse mediante la secuenciación de los productos obtenidos a partir de ambas PCR. De las 25 secuencias obtenidas de la PCR – gag A y de las 12 secuencias de la PCR – gag B, el 100% correspondió a genotipo A y B respectivamente, tanto en ovinos como en caprinos; incluso en las coinfecciones, en las que fue posible obtener secuencias pertenecientes a ambos genotipos (A y B) a partir de la misma muestra (figura 10). Adicionalmente, al hacer una búsqueda BLAST de las secuencias de nucleótidos de los iniciadores, no se encontró similitud al 100% con secuencias que no fueran homólogas a las de SRLV.

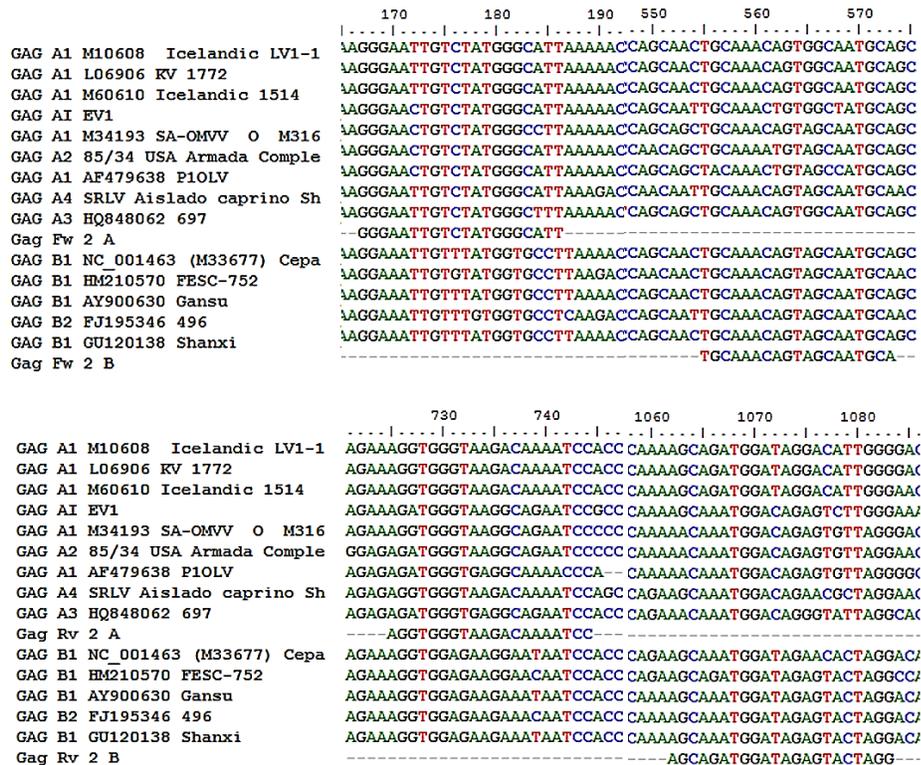


Figura 9. Alineamiento de los iniciadores utilizados en la PCR – gag A y en la PCR – gag B con las secuencias de referencia de los genotipos A y B. En el alineamiento superior se muestran los iniciadores sentido (Fw) y en el alineamiento inferior se muestran los iniciadores antisentido (Rv).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	A	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>		Visna/maedi virus isolate 6-19 gag.protein (gag).gene.,partial cds	763	763	100%	0.0	93%	KC155804.1
<input type="checkbox"/>		Visna/maedi virus isolate 6-17 gag.protein (gag).gene.,partial cds	758	758	100%	0.0	93%	KC155802.1
<input type="checkbox"/>		Visna/maedi virus isolate 6-14 gag.protein (gag).gene.,partial cds	736	736	100%	0.0	92%	KC155799.1
<input type="checkbox"/>		Visna/maedi virus isolate 6-8 gag.protein (gag).gene.,partial cds	736	736	100%	0.0	92%	KC155794.1
<input type="checkbox"/>		Visna/maedi virus isolate 6-20 gag.protein (gag).gene.,partial cds	730	730	100%	0.0	92%	KC155805.1
<input type="checkbox"/>		Visna/maedi virus isolate 6-16 gag.protein (gag).gene.,partial cds	730	730	100%	0.0	92%	KC155801.1
<input type="checkbox"/>		Visna/maedi virus isolate 6-15 gag.protein (gag).gene.,partial cds	730	730	100%	0.0	92%	KC155800.1

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	B	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>		Small ruminant lentivirus strain FESC-752, complete genome	746	746	100%	0.0	99%	HM210570.1
<input type="checkbox"/>		Small ruminant lentivirus strain 5-13 gag.protein.gene.,partial cds	652	652	100%	0.0	95%	KJ641335.1
<input type="checkbox"/>		Caprine arthritis encephalitis virus isolate CAN_9-11CAEV gag.protein.gene.,partial cds	652	652	100%	0.0	95%	KC241941.1
<input type="checkbox"/>		Caprine arthritis encephalitis virus isolate CAN_8-8CAEV gag.protein.gene.,partial cds	652	652	100%	0.0	95%	KC241936.1
<input type="checkbox"/>		Small ruminant lentivirus strain 18E-MG/Br gag.protein.gene.,partial cds	646	646	100%	0.0	94%	KF861558.1
<input type="checkbox"/>		Small ruminant lentivirus strain 17E-MG/Br gag.protein.gene.,partial cds	646	646	100%	0.0	94%	KF861554.1
<input type="checkbox"/>		Small ruminant lentivirus strain 16-21 gag.protein-like.gene.,partial sequence	643	643	100%	2e-180	94%	KJ641360.1

Figura 10. Resultados de la búsqueda BLAST de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de un ovino positivo a ambos genotipos en la PCR – gag. Los resultados del alineamiento de la secuencia obtenida de la PCR – gag A se muestran en la parte superior (A), mientras que los resultados del alineamiento de la secuencia obtenida de la PCR – gag B se muestran en la parte inferior (B).

6.5. Comparación entre serotipificación y genotipificación de SRLV

Al hacer la comparativa entre los resultados de la genotipificación de SRLV mediante PCR con los de la tipificación por serología, se consideraron además de los resultados obtenidos en la PCR – gag para detección de los genotipos A y B (cuadro 10), los generados por PCR – secuenciación de la región V4 del gen env (González, 2018), para las muestras que no lograron amplificarse en la PCR – gag. Se encontró que de 35 ovinos detectados por PCR como genotipo A, sólo 10 coincidieron con el resultado de serotipificación, de los 25 restantes, 24 fueron indeterminados y 1 había resultado como coinfectado en la prueba serológica. De 8 ovinos detectados por PCR como genotipo B, 3 coincidieron con el resultado de

serotipificación, de los 5 restantes, 2 resultaron serotipo A y 3 fueron indeterminados en la prueba de ELISA. De 2 ovinos detectados como coinfectados por PCR, ninguno coincidió con el resultado de serotipificación, ya que uno había resultado serotipo B y el otro fue indeterminado en la prueba de ELISA (cuadro 11). Por otra parte, de 15 caprinos detectados por PCR como genotipo A, ninguno coincidió con los resultados de serotipificación, ya que 4 resultaron serotipo B, 10 coinfectados y 1 indeterminado con la prueba de ELISA. De 34 caprinos detectados por PCR como genotipo B, 11 coincidieron con el resultado de serotipificación, de los 23 restantes, 1 resultó serotipo A, 13 coinfectados y 9 indeterminados en la prueba serológica. De 3 caprinos detectados como coinfectados por PCR, 1 coincidió con el resultado de serotipificación y 2 resultaron serotipo B (cuadro 12). Es así como de manera general, considerando a ambas especies, coincidieron 25 resultados de 97 (25.7%) en ambas técnicas.

Cuadro 11. Comparación de los resultados de tipificación serológica y genética de SRLV en ovinos.

ELISA	PCR						Total
	Genotipo A		Genotipo B		Coinfección		
	<i>gag</i>	<i>env</i>	<i>gag</i>	<i>env</i>	<i>gag</i>	<i>env</i>	
Serotipo A	9*	1*	1	1	-	-	12
Serotipo B	-	-	3*	-	1	-	4
Coinfección	1	-	-	-	-	-	1
Indeterminados	24	-	1	2	1	-	28
Total	35		8		2		45

gag: Resultados positivos en la PCR – *gag*; *env*: Resultados de PCR – secuenciación de la región V4 del gen *env*. *Resultados que coinciden en ambas técnicas.

Cuadro 12. Comparación de los resultados de tipificación serológica y genética de SRLV en caprinos.

ELISA	PCR						Total
	Genotipo A		Genotipo B		Coinfección		
	<i>gag</i>	<i>env</i>	<i>gag</i>	<i>env</i>	<i>gag</i>	<i>env</i>	
Serotipo A	-	-	-	1	-	-	1
Serotipo B	4	-	6*	5*	2	-	17
Coinfección	9	1	5	8	1*	-	24
Indeterminados	1	-	3	6	-	-	10
Total	15		34		3		52

gag= Resultados positivos en la PCR – *gag*; *env*= Resultados de PCR – secuenciación de la región V4 del gen *env*. *Resultados que coinciden en ambas técnicas.

6.6. Secuenciación

De las 71 muestras positivas en la PCR – *gag*, se obtuvieron 37 secuencias nucleotídicas; 25 del genotipo A y 12 del genotipo B, a partir de las cuales se hizo la deducción a aminoácidos (figuras 11 y 12) para comparar un epítipo inmunodominante de la cápside, en el que se ha reportado diferencia entre los genotipos A y B en los últimos 9 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. De las 25 secuencias correspondientes al genotipo A, 5 de ellas, pertenecientes a ovinos (ovinos 16 – 20) mostraron variabilidad en la secuencia de aminoácidos con respecto al péptido de referencia. Las secuencias de los ovinos 16 – 19 presentan un cambio en la posición 12 del péptido de K (lisina) a R (arginina). En el ovino 20, la secuencia presenta un cambio en la posición 24 del péptido N (asparagina) a D (aspartato). El resto de las secuencias no mostró variabilidad con respecto al péptido de referencia del genotipo A hasta la posición 24, debido a que los nucleótidos que codifican a los últimos 5 aminoácidos del extremo carboxilo terminal no fueron secuenciados (figura 11). No se encontró un patrón diferente en las secuencias de aminoácidos que pudiera relacionarse con el resultado obtenido en la prueba de serotipificación.

De las 12 secuencias correspondientes al genotipo B, 4 de ellas mostraron variabilidad en la secuencia de aminoácidos con respecto al péptido de referencia, una perteneciente a un ovino y tres pertenecientes a caprinos. El ovino 5 presentó un cambio en la posición 29 del péptido de A (alanina) a Q (glutamina); el caprino 1 presentó dos cambios, uno en la posición 19 de R a N y el segundo en la posición 23 de N a H; el caprino 2 presentó dos cambios, uno en la posición 19 de R a N y el segundo en la posición 28 de P a Q; y el caprino 3 presentó un cambio en la posición 28 de P a Q (Figura 12).

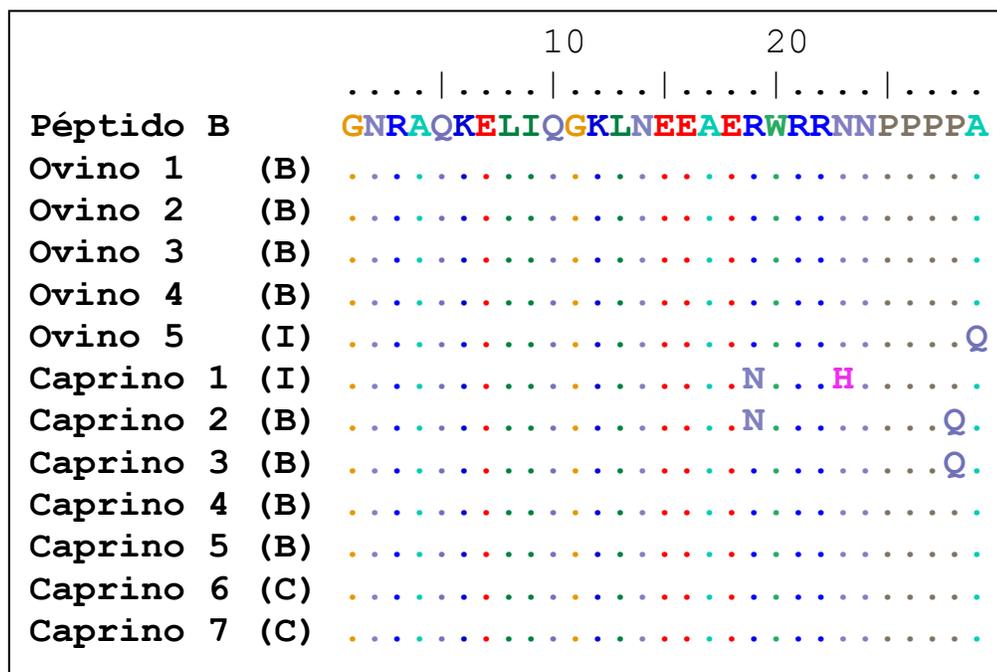


Figura 12. Comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia It – 128, correspondiente al genotipo B (Grego *et al.*, 2002), con las secuencias obtenidas a partir de muestras de ovinos y caprinos positivos a la PCR – gag B. Se muestra una región de la cápside en la que existen diferencias de acuerdo con el genotipo. Entre los paréntesis se indica el resultado obtenido en la prueba de serotipificación; A: serotipo A; B: serotipo B; C: coinfección; I: indeterminado.

6.7. Árbol filogenético

Se construyó un árbol filogenético con las secuencias nucleotídicas de SRLV obtenidas de ovinos y caprinos mediante inferencia bayesiana (MrBayes), utilizando el programa Geneious 11.1.4. Se incluyeron las secuencias de referencia disponibles en el GenBank. Del genotipo A: P1OLV (AF479638.1) de Portugal; LV1-1 (M10608.1), KV1772 (L06906.1) y 1514 (M60610.1) de Islandia; SA-OMVV (M34193.1) de Sudáfrica; EV1 (S51392.1) de Reino Unido; 85/34 (AY101611.1) de Estados Unidos; 6-17 (KC155802.1), 6-19 (KC155804.1), 19-6 (KJ641278.1) y O23F-18 (HQ158134.1) de Canadá; 697 (HQ848062.1) de España y A4 (AY445885) de Suiza. Del genotipo B: CAEV-CO (M33677.1) de Estados Unidos; Shanxi (GU120138.1) y Gansu (AY900630.1) de China; FESC-752 (HM210570.1) de México; 496 (FJ195346.1) de España; Fonni (JF502416.1) y Volterra (JF502417.1) de Italia. Del genotipo C: 1GA (AF322109.1) de Noruega. Del genotipo E: Roccaverano (EU293537.2) y Seui (GQ381130.1) de Italia. Las secuencias obtenidas en este estudio procedentes de ovinos del genotipo A, se agruparon en su mayoría con las secuencias de referencia del subtipo A2 de Canadá (6-17, 6-19, 19-6 y O23F-18). Las secuencias de caprinos del genotipo A, así como dos secuencias obtenidas de tejidos de ovinos de rastro (glándula mamaria y bazo), se agruparon con el subtipo A1 de Reino Unido (EV1). Las secuencias de ovinos y caprinos del genotipo B tendieron a agruparse con el subtipo B1 (figura 13).

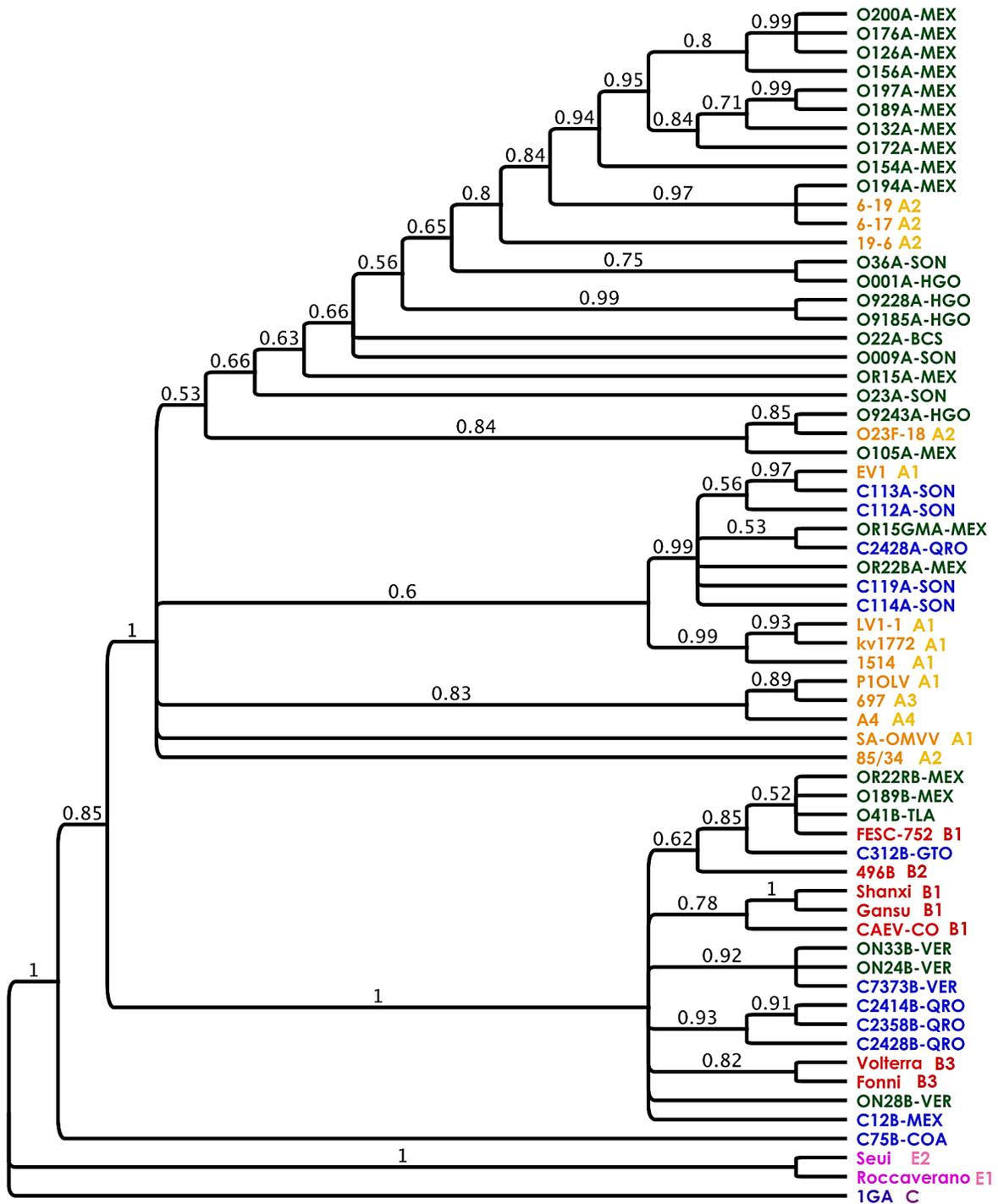


Figura 13. Árbol filogenético construido con las secuencias nucleotídicas obtenidas de una región parcial del gen gag. Se muestran los valores de Bootstrap como soporte estadístico entre las ramas principales. Las secuencias obtenidas en este estudio se indican en color verde para ovinos y en azul para caprinos. Después de la clave de identificación de los animales se indica el estado del país al que pertenecen (BCS: Baja California Sur; COA: Coahuila; GTO: Guanajuato; HGO: Hidalgo; MEX: México; QRO: Querétaro; SON: Sonora; VER: Veracruz). Las secuencias de referencia se muestran en varios colores de acuerdo con el genotipo. En amarillo las pertenecientes al genotipo A, en rojo las del genotipo B, en morado la del genotipo C y en rosa las del genotipo E.

6.8. Histopatología

Los tejidos de los órganos colectados de los dos ovinos seropositivos procedentes de rastro se procesaron para el análisis histopatológico, encontrándose de manera general la presencia de infiltrados de leucocitos mononucleares (figura 14). De igual manera, se detectó la presencia del provirus mediante la PCR – gag en algunos de los órganos (cuadro 13). Esto es sugerente de que la presencia de infiltrados podría estar relacionada con la infección por SRLV. Sin embargo, son necesarias pruebas adicionales para corroborar esta conjetura.

Cuadro 13. Resultados de la PCR – gag de los órganos de ovinos de rastro seropositivos a SRLV.

Ovino	LSP		Pulmón		Glándula mamaria		Hígado		Riñón		Bazo	
	gen A	gen B	gen A	gen B	gen A	gen B	gen A	gen B	gen A	gen B	gen A	gen B
1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-

LSP: leucocitos de sangre periférica, gen A: PCR – gag A (detección de genotipo A), gen B: PCR – gag B (detección de genotipo B).

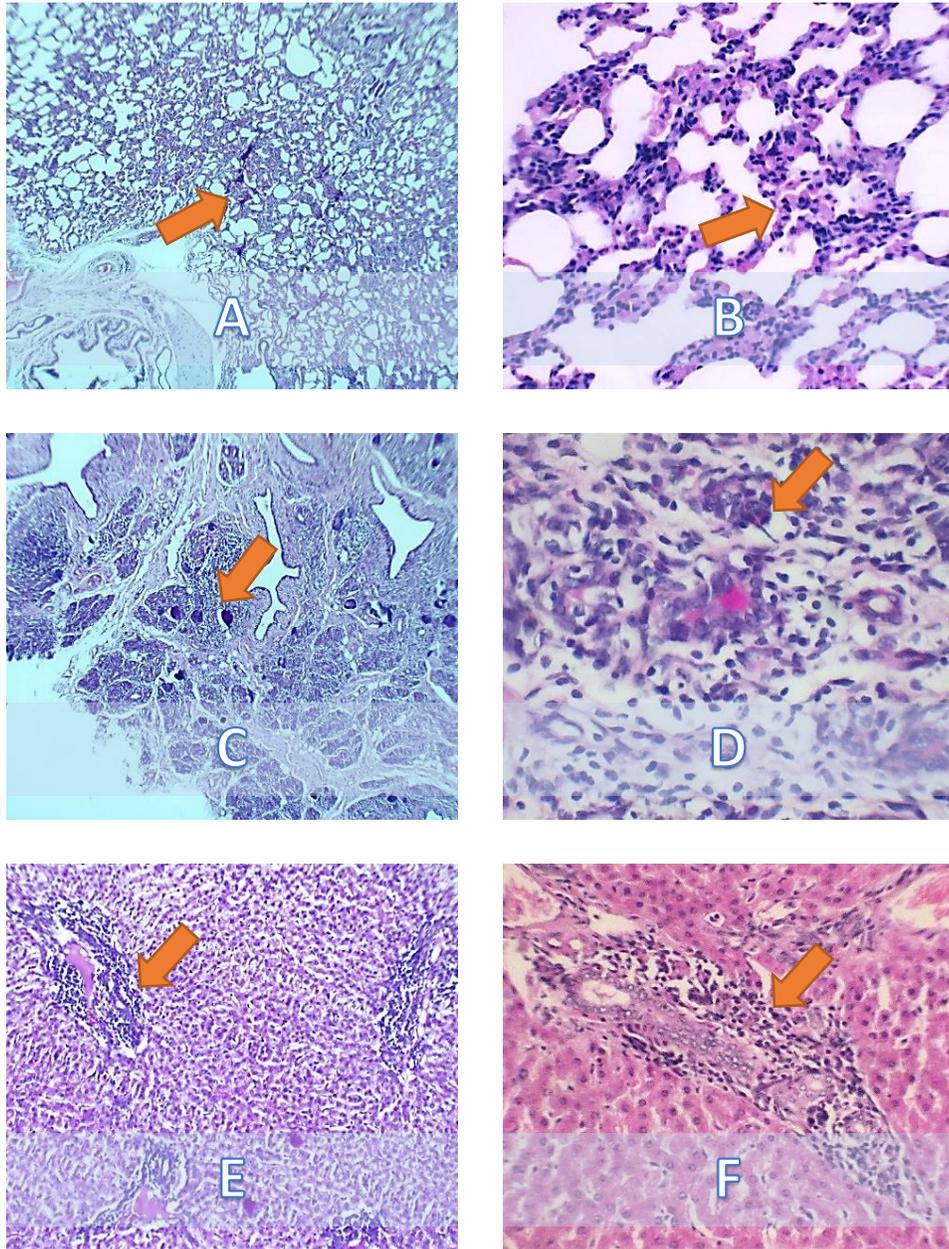


Figura 14. Secciones de pulmón (A= 100X, B= 400X), glándula mamaria (C= 100X, D= 400X) e hígado (D= 100X, E= 400X) de uno de los ovinos seropositivos a SRLV, en los que se observa infiltración de leucocitos mononucleares (flechas). Tinción de hematoxilina - eosina.

7. Discusión

En el presente trabajo se detectó la presencia de lentivirus de pequeños rumiantes en ovinos y caprinos procedentes de diferentes rebaños del país, utilizando dos pruebas comerciales de ELISA. Sin embargo, los niveles de seroprevalencia encontrados no reflejan los niveles reales de infección, debido a que el muestreo realizado fue de tipo no probabilístico.

A pesar de que no existe una “prueba de oro” para el diagnóstico de la infección por SRLV, la detección de anticuerpos mediante ELISA es la prueba que más se utiliza en la actualidad debido a que en comparación con otras técnicas se tienen buenos niveles de sensibilidad, además de que es fácil de realizar, los resultados se obtienen rápidamente, la interpretación de los mismos es objetiva y su costo es razonable (de Andrés *et al.*, 2005; Sanjosé *et al.*, 2015).

En este estudio se compararon dos pruebas comerciales de ELISA, la primera de ellas de origen estadounidense (VMRD), basada en la proteína de superficie (SU) de una cepa tipo CAEV (genotipo B) y la segunda de origen italiano (Eradikit), basada en péptidos recombinantes de transmembrana (TM), cápside (CA) y matriz (MA) pertenecientes a virus de los genotipos A y B. Aunque se encontró un nivel considerable de concordancia entre ambas técnicas, el ELISA de VMRD detectó más animales positivos, lo que contrasta con otros estudios, en los que se obtiene una mayor sensibilidad cuando se utilizan en conjunto antígenos derivados del gen *gag* y del gen *env* de más de un genotipo (Rosati *et al.*, 2004; Tolari *et al.*, 2013). Con los resultados obtenidos se pudo corroborar que el ELISA VMRD, aunque está basado únicamente en una cepa del genotipo B es eficiente para la detección de SRLV tanto en ovinos como en caprinos infectados con los genotipos A y B (Herrmann *et al.*, 2003a, 2003b). Esto puede deberse a que, en comparación con otras pruebas de ELISA, el ELISA VMRD no requiere la dilución de las muestras de plasma como ocurre en el caso del ELISA Eradikit, en el que la dilución del plasma podría ser un factor que incrementa el número de resultados falsos negativos en animales con bajo título de anticuerpos (Herrmann *et al.*, 2003b).

En el presente estudio se comparó el resultado de la tipificación serológica con la tipificación genética de los SRLV, a fin de conocer si existe asociación entre ambas técnicas. La genotipificación de los SRLV se realizó mediante dos técnicas de PCR anidada que amplifican una región del gen *gag* o del gen *env*. La prueba serológica no fue capaz de clasificar a 34.8% de las muestras en alguno de los serotipos (indeterminados), debido a la ausencia de reactividad en la placa de serotipificación, a pesar de haber sido positivos previamente en la placa de *screening*. Esto podría deberse a una disminución de la sensibilidad ocasionada por la ausencia de los epítomos de TM y MA en la placa de serotipificación que sí están presentes en la placa de *screening*. De los 97 casos evaluados mediante ambas maneras de tipificación (serológica y genética), sólo coincidieron 25 (25.7%), lo que indica que la serotipificación no mostró ser un método confiable para la predicción del genotipo viral infectante. Sin embargo, en otros casos, como ocurre con el virus de la hepatitis C, la tipificación serológica y genética son equivalentes en la determinación del tipo viral, debido a que se obtienen buenos niveles de concordancia (72.6–86.6%) entre ambas metodologías (Tisminetzky *et al.*, 1995; van Doorn *et al.*, 1996).

Con la PCR – *gag* se obtuvieron resultados positivos en 48.29% de las muestras evaluadas, a pesar de que todas ellas procedían de animales seropositivos. No obstante, generalmente en el caso de los SRLV la técnica de PCR tiende a ser menos sensible que el ELISA (Barquero *et al.*, 2013; Extramiana *et al.*, 2002). Esto ocurre principalmente por la escasez de ADN molde, debido a que los SRLV infectan a monocitos, con lo que aproximadamente 1/10⁶ leucocitos contienen al virus (de Andrés *et al.*, 2005). En los SRLV, la PCR se emplea principalmente como una prueba complementaria o con fines de investigación, además de que permite la genotipificación del virus infectante (Sanjosé *et al.*, 2015). En este estudio, PCR – *gag* amplificó un segmento del gen *gag* que incluye a una región que codifica para un epítomo presente en la cápside, en el que se ha reportado que existen diferencias en la secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de acuerdo con el genotipo. Este epítomo es utilizado en la prueba de serotipificación (Grego *et al.*, 2002). Al analizar los aminoácidos deducidos a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas de las muestras positivas a la PCR – *gag*, se

encontró que de manera general la región del péptido se conserva con respecto a los péptidos de referencia. En las secuencias del genotipo B existen algunos cambios de aminoácidos que no parecen guardar relación con el resultado de la tipificación serológica. En las secuencias del genotipo A parece existir una situación similar, sin embargo, esto no se pudo aseverar, ya que no se logró la secuenciación completa del péptido. Por esta razón, no es posible saber si en los aminoácidos faltantes podrían existir diferencias importantes con respecto al péptido de referencia. Es importante señalar que los iniciadores utilizados en este estudio fueron diseñados con la finalidad de detectar ya sea el genotipo A o el genotipo B de SRLV, lo que se confirmó con las secuencias obtenidas, debido a que todas ellas correspondían con el genotipo que la PCR detectaba (A o B). Incluso en los animales coinfectados, en los que se evaluó la misma muestra en la PCR – gag A y en la PCR – gag B, fue posible obtener secuencias del genotipo A y B, de acuerdo con el set de iniciadores utilizados. Lo anterior guarda relación con otros estudios en los que los iniciadores se diseñan con la finalidad de detectar un genotipo en específico (De Regge & Cay, 2013; Kuhar *et al.*, 2013). Con la PCR – gag fue posible detectar dos coinfecciones en ovinos y tres en caprinos, siendo un evento que ya ha sido reportado en las infecciones causadas por SRLV (Olech *et al.*, 2018; Pisoni *et al.*, 2007a). Aunque fue posible detectar mediante PCR los genotipos A y B tanto en ovinos como en caprinos, los resultados muestran que el genotipo A predomina en los ovinos con un 77.77%, mientras que el genotipo B predomina en los caprinos con un 65.38%.

En el árbol filogenético construido, las secuencias del genotipo A obtenidas de ovinos se agruparon con secuencias de referencia del subtipo A2. En cambio, las obtenidas a partir de caprinos se asociaron con el subtipo A1. Por el contrario, las secuencias del genotipo B procedentes de ovinos y caprinos tendieron a agruparse con el subtipo B1. Lo anterior resulta interesante, ya que en el país ha sido descrita formalmente la presencia del subtipo B1 (Ramírez *et al.*, 2011). No obstante, la clasificación actual de los SRLV se basa en secuencias de mayor longitud que involucran a los genes *gag* y *pol*, por lo que para tener datos más exactos acerca de los subtipos genéticos, sería importante considerar una región más representativa del genoma para tal fin (Shah *et al.*, 2004a). La importancia de

conocer las variantes genéticas que infectan a los rebaños nacionales es esencial para el desarrollo de herramientas de diagnóstico más precisas (Kuhar *et al.*, 2013; Reina *et al.*, 2009c; Sanjosé *et al.*, 2015).

Por otro lado, el análisis histopatológico de los órganos colectados en rastro de los dos ovinos seropositivos determinó la presencia de infiltrados de leucocitos mononucleares en pulmón, glándula mamaria e hígado de ambos animales, lo que coincide con lo reportado en otros estudios (Brellou *et al.*, 2007; Pinczowski *et al.*, 2017; Spuria *et al.*, 2017). En contraste, no se encontraron lesiones en el riñón de ambos ovinos, a pesar de tratarse de un órgano en el que se ha descrito la presencia de lesiones (Angelopoulou *et al.*, 2006). Aunque se ha señalado que órganos linfoides como los linfonodos y el bazo pueden presentar hiperplasia folicular como consecuencia de la infección por SRLV (Brellou *et al.*, 2007), en este estudio el bazo no mostró tener cambios patológicos aparentes. Sin embargo, los resultados de PCR obtenidos a partir de los tejidos de estos dos animales indicaron que el primer ovino fue positivo en uno de los órganos (glándula mamaria) al genotipo A, mientras que el segundo ovino fue positivo en pulmón, glándula mamaria, hígado y riñón al genotipo B; y positivo en bazo al genotipo A. No obstante, son necesarias pruebas adicionales como hibridación *in situ* o inmunohistoquímica con el propósito de localizar la ubicación del material genético viral o de sus productos respectivamente dentro de los tejidos para confirmar que la presencia de los infiltrados de leucocitos mononucleares son consecuencia de la infección por SRLV (Pérez *et al.*, 2014). Aunque se ha demostrado que diferentes genotipos de SRLV pueden infectar tanto a ovinos como a caprinos (Pisoni *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2004b) y que la coinfección es un evento que puede ocurrir en condiciones naturales (Pisoni *et al.*, 2007a). Falta información acerca de la distribución que diferentes genotipos tendrían en los diferentes tejidos en los animales coinfectados (Pisoni *et al.*, 2007b).

8. Conclusiones

- Se detectó la presencia de anticuerpos contra SRLV en muestras plasmáticas de ovinos y caprinos de rebaños nacionales, utilizando dos pruebas comerciales de ELISA. El nivel de concordancia entre ambas pruebas fue considerable (κ de Cohen = 0.767).
- Con la prueba comercial de ELISA Eradikit se serotipificó el 65.19% de las muestras de plasma de ovinos y caprinos, clasificándolos en los serotipos A y B, así como coinfecciones. Esta prueba comercial de ELISA no pudo determinar el serotipo del 34.81% de las muestras.
- Se detectó el genoma proviral de SRLV mediante PCR anidada en ovinos y caprinos seropositivos, así como también en tejidos de ovinos con lesiones sugestivas de la infección por SRLV.
- Los resultados de la secuenciación indicaron la presencia de los genotipos A y B, existiendo coinfecciones, en ovinos y caprinos.
- La serotipificación no mostró ser un método confiable para la predicción del genotipo viral en las infecciones causadas por SRLV. Únicamente el 25.7% de resultados de tipificación por serología coincidieron con los obtenidos mediante PCR.

9. Referencias

- Adams, D., Oliver, R., Ameghino, E., DeMartini, J., Verwoerd, D., Houwers, D., ... Et, A. (1984). Global survey of serological evidence of caprine arthritis–encephalitis virus infection. *Veterinary Record*, *115*(19), 493–495. <https://doi.org/10.1136/vr.115.19.493>
- Andresson, Ó. S., Elser, J. E., Tobin, G. J., Greenwood, J. D., Gonda, M. A., Georgsson, G., ... Pétursson, G. (1993). Nucleotide Sequence and Biological Properties of a Pathogenic Proviral Molecular Clone of Neurovirulent Visna Virus. *Virology*, *193*(1), 89–105. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1106>
- Angelopoulou, K., Brellou, G. D., & Vlemmas, I. (2006). Detection of Maedi–Visna Virus in the Kidneys of Naturally Infected Sheep. *Journal of Comparative Pathology*, *134*(4), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.jcpha.2006.01.002>
- Balbin, M. M., & Mingala, C. N. (2017). Caprine Arthritis–Encephalitis. In J. Bayry (Ed.), *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock* (1st ed., Vol. 16, pp. 191–213). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47426-7_7
- Ballandras-Colas, A., Maskell, D. P., Serrao, E., Locke, J., Swuec, P., Jónsson, S. R., ... Cherepanov, P. (2017). A supramolecular assembly mediates lentiviral DNA integration. *Science*, *355*(6320), 93–95. <https://doi.org/10.1126/science.aah7002>
- Barquero, N., Domenech, A., Arjona, A., Fernández-Garayzabal, J. F., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., & Gomez-Lucia, E. (2013). Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, *94*(3), 817–819. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.004>
- Begara, I., Luján, L., Collie, D. D. S., Miller, H. R. P., & Watt, N. J. (1996). Early pulmonary cell response during experimental maedi–visna virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *55*(1–3), 115–126. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05623-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05623-1)
- Benavides, J., Fuertes, M., García-Pariente, C., Ferreras, M. C., Marín, J. F. G., & Pérez, V. (2006). Natural Cases of Visna in Sheep with Myelitis as the Sole Lesion in the Central Nervous System. *Journal of Comparative Pathology*, *134*(2–3), 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.jcpha.2005.11.003>
- Benavides, J., García-Pariente, C., Carmen Ferreras, M., Fuertes, M., Francisco García-Marín, J., & Pérez, V. (2007). Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi–Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Veterinary Journal*, *174*(3), 655–658. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.014>
- Benavides, J., García-Pariente, C., Fuertes, M., Ferreras, M. C., García-Marín, J. F., Juste, R. A., & Pérez, V. (2009). Maedi–Visna: the Meningoencephalitis in Naturally Occurring Cases. *Journal of Comparative Pathology*, *140*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcpha.2008.07.010>
- Benavides, J., Gomez, N., Gelmetti, D., Ferreras, M. C., Garcia-Pariente, C., Fuertes, M., ... Perez, V. (2006). Diagnosis of the nervous form of maedi–visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain. *Veterinary Record*, *158*(7), 230–235. <https://doi.org/10.1136/vr.158.7.230>
- Berriatua, E., Álvarez, V., Extramiana, B., González, L., Daltabuit, M., & Juste, R. (2003).

- Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, *60*(4), 265–279. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00163-6)
- Bertolotti, L., Mazzei, M., Puggioni, G., Carrozza, M. L., dei Giudici, S., Muz, D., ... Rosati, S. (2011). Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the mediterranean basin. *Journal of General Virology*, *92*(8), 1923–1929. <https://doi.org/10.1099/vir.0.032334-0>
- Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M., Davidson, N. O., Cho, S.-J., & Malim, M. H. (2004). Cytidine Deamination of Retroviral DNA by Diverse APOBEC Proteins. *Current Biology*, *14*(15), 1392–1396. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.057>
- Blacklaws, B. ., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N. ., de Andres, D., Klein, D., & Harkiss, G. . (2004). Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, *101*(3), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.006>
- Blacklaws, B. A. (2012). Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *35*(3), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.003>
- Blatti-Cardinaux, L., Pisoni, G., Stoffel, M. H., Zanoni, R., Zahno, M. L., & Bertoni, G. (2016). Generation of a molecular clone of an attenuated lentivirus, a first step in understanding cytopathogenicity and virulence. *Virology*, *487*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.027>
- Bolea, R., Monleón, E., Carrasco, L., Vargas, A., de Andrés, D., Amorena, B., ... Luján, L. (2006). Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Veterinary Research*, *37*(1), 133–144. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005048>
- Bose, D., Gagnon, J., & Chebloune, Y. (2015). Comparative Analysis of Tat-Dependent and Tat-Deficient Natural Lentiviruses. *Veterinary Sciences*, *2*(4), 293–348. <https://doi.org/10.3390/vetsci2040293>
- Brellou, G. D., Angelopoulou, K., Poutahidis, T., & Vlemmas, I. (2007). Detection of Maedi-Visna Virus in the Liver and Heart of Naturally Infected Sheep. *Journal of Comparative Pathology*, *136*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcpha.2006.10.001>
- Bruett, L., Barber, S. A., & Clements, J. E. (2000). Characterization of a Membrane-Associated Protein Implicated in Visna Virus Binding and Infection. *Virology*, *271*(1), 132–141. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0309>
- Brulisauer, F., Vogt, H.-R., Perler, L., & Rufenacht, J. (2005). Risk factors for the infection of Swiss goat herds with small ruminant lentivirus: a case-control study. *Veterinary Record*, *157*(8), 229–233. <https://doi.org/10.1136/vr.157.8.229>
- Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Retroviruses. In *Fenner and White's Medical Virology* (pp. 317–344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00023-0>
- Cadoré, J. L., Greenland, T., Cordier, G., Guiguen, F., & Mornex, J. F. (1996). Histogenesis of the pulmonary lesions in the course of visna maedi virus-induced pneumonia. *Veterinary Research*, *27*(4–5), 419–426. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822612>
- Carrozza, M. L., Mazzei, M., Bandecchi, P., Arispici, M., & Tolari, F. (2003). In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome

- in tissue sections of sheep infected naturally. *Journal of Virological Methods*, *107*(2), 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00208-2)
- Christodoulouopoulos, G. (2006). Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Ruminant Research*, *62*(1–2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.046>
- Crane, S. E., Buzy, J., & Clements, J. E. (1991). Identification of cell membrane proteins that bind visna virus. *Journal of Virology*, *65*(11), 6137–6143. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1656089>
- Crawford, T., Adams, D., Cheevers, W., & Cork, L. (1980). Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, *207*(4434), 997–999. <https://doi.org/10.1126/science.6153243>
- Crespo, H., Jauregui, P., Glaria, I., Sanjosé, L., Polledo, L., García-Marín, J. F., ... Reina, R. (2012). Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Veterinary Research*, *43*(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-43>
- Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., ... de Andrés, D. F. (2011). Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Veterinary Research*, *42*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-28>
- Cutlip, R. C., Lehmkuhl, H. D., Brogden, K. A., & Bolin, S. R. (1985). Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, *46*(2), 326–328. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2986491>
- Cutlip, R. C., Lehmkuhl, H. D., Schmerr, M. J. F., & Brogden, K. A. (1988). Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Veterinary Microbiology*, *17*(3), 237–250. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90068-5)
- Daltabuit Test, M., de la Concha-Bermejillo, A., Espinosa, L. E., Loza Rubio, E., & Aguilar Setién, A. (1999). Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, *63*(3), 212–215. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480464>
- de Andrés, D., Klein, D., Watt, N. J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B. A., & Harkiss, G. D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, *107*(1–2), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.012>
- De Regge, N., & Cay, B. (2013). Development, validation and evaluation of added diagnostic value of a q(RT)-PCR for the detection of genotype A strains of small ruminant lentiviruses. *Journal of Virological Methods*, *194*(1–2), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.09.001>
- Domingo, E., Holland, J., Biebricher, C., & Eigen, M. (1995). Quasi-species: the concept and the word. In A. J. Gibbs, C. H. Calisher, & F. Garcia-Arenal (Eds.), *Molecular Basis of Virus Evolution* (pp. 181–191). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511661686.015>
- East, N. E., Rowe, J. D., Dahlberg, J. E., Theilen, G. H., & Pederson, N. C. (1993). Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant Research*, *10*(3), 251–262. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(93\)90130-A](https://doi.org/10.1016/0921-4488(93)90130-A)
- Eguiluz, C., & De Aluja, A. S. (1981). Progressive interstitial pneumonia (Maedi) and pulmonary

adenomatosis in confiscated ovine viscera. *Veterinaria Mexico*, 12.

- Extramiana, A. , González, L., Cortabarría, N., García, M., & Juste, R. . (2002). Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Ruminant Research*, 44(2), 109–118. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00044-5)
- Gendelman, H. E., Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Kennedy, P. G., Ghotbi, Z., Clements, J. E., ... Pezeshkpour, G. (1986). Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *Journal of Virology*, 58(1), 67–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3005660>
- Gjerset, B., Jonassen, C. M., & Rimstad, E. (2007). Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus Research*, 125(2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.12.014>
- Gjerset, B., Storset, A. K., & Rimstad, E. (2006). Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: Characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 87(3), 573–580. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81201-0>
- Glaria, I. (2015). *Base genética del tropismo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3*. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Glaria, I., Reina, R., Crespo, H., de Andrés, X., Ramírez, H., Biescas, E., ... de Andrés, D. (2009). Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Veterinary Microbiology*, 138(1–2), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.002>
- Glaria, I., Reina, R., Ramírez, H., de Andrés, X., Crespo, H., Jauregui, P., ... de Andrés, D. (2012). Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Veterinary Microbiology*, 155(2–4), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.027>
- González, A. S. (2018). *Estudio de la variabilidad de la región V4 del gen ENV de lentivirus de pequeños rumiantes y su asociación en el desarrollo de diferentes cuadros clínicos en ovinos y caprinos infectados naturalmente*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Grego, E., Bertolotti, L., Carrozza, M. L., Profiti, M., Mazzei, M., Tolari, F., & Rosati, S. (2005). Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 106(3–4), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.007>
- Grego, E., Profiti, M., Giammarioli, M., Giannino, L., Rutili, D., Woodall, C., & Rosati, S. (2002). Genetic Heterogeneity of Small Ruminant Lentiviruses Involves Immunodominant Epitope of Capsid Antigen and Affects Sensitivity of Single-Strain-Based Immunoassay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(4), 828–832. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.4.828-832.2002>
- Grossi, P., Giudice, C., Bertolotti, I., Cioccarelli, G., Brocchi, E., Cammarata, G., & Gelmetti, D. (2005). Immunohistochemical Detection of the p27 Capsid Protein of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) in Bone-marrow Cells of Seropositive Goats. *Journal of Comparative Pathology*, 133(2–3), 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.01.009>

- Hafliðadóttir, B. S., Matthíasdóttir, S., Agnarsdóttir, G., Torsteinsdóttir, S., Petursson, G., Andresson, O. S., & Andresdóttir, V. (2008). Mutational analysis of a principal neutralization domain of visna/maedi virus envelope glycoprotein. *Journal of General Virology*, *89*(3), 716–721. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83410-0>
- Hasegawa, M. Y., Custódio de Souza Hunold Lara, M. do C., Monteforte Cassaro Villa Lobos, E., Carrillo Gaeta, N., Hayashi, M., Shirayama, L., ... Gregory, L. (2017). An experimental study on the vertical transmission of caprine arthritis–encephalitis virus from naturally infected females to their offspring. *Small Ruminant Research*, *149*, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.01.010>
- Herrmann, L. M., Cheevers, W. P., Marshall, K. L., McGuire, T. C., Hutton, M. M., Lewis, G. S., & Knowles, D. P. (2003a). Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis–encephalitis virus competitive–inhibition enzyme–linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *10*(5), 862–865. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.5.862-865.2003>
- Herrmann, L. M., Cheevers, W. P., McGuire, T. C., Adams, D. S., Hutton, M. M., Gavin, W. G., & Knowles, D. P. (2003b). Immunosorbent Assay for Detection of Serum Antibodies to Caprine Arthritis–Encephalitis Virus: Diagnostic Tool for Successful Eradication Competitive–Inhibition Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum Antibodies to Caprine Arthritis–Ence. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *10*(2), 267–271. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.2.267>
- Hötzel, I., & Cheevers, W. P. (2002). Differential Receptor Usage of Small Ruminant Lentiviruses in Ovine and Caprine Cells: Host Range but not Cytopathic Phenotype Is Determined by Receptor Usage. *Virology*, *301*(1), 21–31. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1575>
- Houwers, D. J., & van der Molen, E. J. (1987). A Five–Year Serological Study of Natural Transmission of Maedi–Visna Virus in a Flock of Sheep, Completed with Post Mortem Investigation. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *34*(1–10), 421–431. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1987.tb00416.x>
- Huang, J., Sun, Y., Liu, Y., Xiao, H., & Zhuang, S. (2012). Development of a loop–mediated isothermal amplification method for rapid detection of caprine arthritis–encephalitis virus proviral DNA. *Archives of Virology*, *157*(8), 1463–1469. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1322-y>
- Jauregui, P., Crespo, H., Glaria, I., Lujan, L., Contreras, A., Rosati, S., ... Reina, R. (2012). Ovine TRIM5 Can Restrict Visna/Maedi Virus. *Journal of Virology*, *86*(17), 9504–9509. <https://doi.org/10.1128/JVI.00440-12>
- Karr, B. M., Chebloune, Y., Leung, K., & Narayan, O. (1996). Genetic Characterization of Two Phenotypically Distinct North American Ovine Lentiviruses and Their Possible Origin from Caprine Arthritis–Encephalitis Virus. *Virology*, *225*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0569>
- Kennedy–Stoskopf, S., Narayan, O., & Strandberg, J. D. (1985). The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis–encephalitis virus. *Journal of Comparative Pathology*, *95*(4), 609–617. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(85\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0021-9975(85)90030-1)
- Knowles, D., Cheevers, W., McGuire, T., Stem, T., & Gorham, J. (1990). Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis–encephalitis virus. *Journal of Virology*, *64*(5), 2396–2398. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2325206>

- Krupovic, M., Blomberg, J., Coffin, J. M., Dasgupta, I., Fan, H., Geering, A. D., ... Kuhn, J. H. (2018). Ortervirales: New Virus Order Unifying Five Families of Reverse-Transcribing Viruses. *Journal of Virology*, *92*(12), e00515–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00515-18>
- Kuhar, U., Barlič-Maganja, D., & Grom, J. (2013). Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. *BMC Veterinary Research*, *9*(1), 172. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-172>
- LaRue, R. S., Jónsson, S. R., Silverstein, K. A., Lajoie, M., Bertrand, D., El-Mabrouk, N., ... Harris, R. S. (2008). The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Molecular Biology*, *9*(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-104>
- Laskey, S. B., & Siliciano, R. F. (2014). A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(11), 772–780. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3351>
- Le Tortorec, A., Willey, S., & Neil, S. J. D. (2011). Antiviral Inhibition of Enveloped Virus Release by Tetherin/BST-2: Action and Counteraction. *Viruses*, *3*(5), 520–540. <https://doi.org/10.3390/v3050520>
- Leroux, C., Lerondelle, C., Chastang, J., & Mornex, J. F. (1997). RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Veterinary Research*, *28*(2), 115–121. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9112733>
- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., ... Juste, R. A. (2015). Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*, *181*(1–2), 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.007>
- Molina, R. M., Trigo, F. J., & Cutlip, R. C. (1986). Estudio serológico de la neumonía progresiva ovina en México. *Veterinaria México*, *17*(4), 269–273.
- Mornex, J. F., Lena, P., Loire, R., Cozon, G., Greenland, T., Guigen, F., ... Cordier, G. (1994). Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. *Veterinary Research*, *25*(5), 478–488. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7951350>
- Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Du, J., Favier, C., Durand, J., ... Chebloune, Y. (1999). Goat Milk Epithelial Cells Are Highly Permissive to CAEV Infection in Vitro. *Virology*, *259*(1), 67–73. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9752>
- Mullard, A. (2008). Reverse transcription: Do the flip. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(7), 501–501. <https://doi.org/10.1038/nrm2432>
- Murphy, B. G., Hötzel, I., Jasmer, D. P., Davis, W. C., & Knowles, D. (2006). TNF α and GM-CSF-induced activation of the CAEV promoter is independent of AP-1. *Virology*, *352*(1), 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.04.017>
- Murphy, B., Jasmer, D. P., White, S. N., & Knowles, D. (2007). Localization of a TNF-activated transcription site and interactions with the gamma activated site within the CAEV U3 70 base pair repeat. *Virology*, *364*(1), 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.02.020>

- Muz, D., Oğuzoğlu, T. Ç., Rosati, S., Reina, R., Bertolotti, L., & Burgu, İ. (2013). First molecular characterization of visna/maedi viruses from naturally infected sheep in Turkey. *Archives of Virology*, *158*(3), 559–570. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1518-1>
- Nakano, Y., Aso, H., Soper, A., Yamada, E., Moriwaki, M., Juarez-Fernandez, G., ... Sato, K. (2017). A conflict of interest: the evolutionary arms race between mammalian APOBEC3 and lentiviral Vif. *Retrovirology*, *14*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0355-4>
- Narayan, O., Clements, J. E., Griffin, D. E., & Wolinsky, J. S. (1981). Neutralizing antibody spectrum determines the antigenic profiles of emerging mutants of visna virus. *Infection and Immunity*, *32*(3), 1045–1050.
- Narayan, O., Clements, J. E., Strandberg, J. D., Cork, L. C., & Griffin, D. E. (1980). Biological Characterization of the Virus Causing Leukoencephalitis and Arthritis in Goats. *Journal of General Virology*, *50*(1), 69–79. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-1-69>
- Narayan, O., & Cork, L. C. (1985). Lentiviral Diseases of Sheep and Goats: Chronic Pneumonia Leukoencephalomyelitis and Arthritis. *Clinical Infectious Diseases*, *7*(1), 89–98. <https://doi.org/10.1093/clinids/7.1.89>
- Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Sheffer, D., Griffin, D. E., & Clements, J. E. (1983). Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity*, *41*(1), 67–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6862634>
- Narayan, O., Wolinsky, J. S., Clements, J. E., Strandberg, J. D., Griffin, D. E., & Cork, L. C. (1982). Slow Virus Replication: the Role of Macrophages in the Persistence and Expression of Visna Viruses of Sheep and Goats. *Journal of General Virology*, *59*(2), 345–356. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-59-2-345>
- Negróni, M., & Buc, H. (2001a). Mechanisms of Retroviral Recombination. *Annual Review of Genetics*, *35*(1), 275–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090551>
- Negróni, M., & Buc, H. (2001b). Retroviral recombination: what drives the switch? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(2), 151–155. <https://doi.org/10.1038/35052098>
- Ojosnegros, S., Perales, C., Mas, A., & Domingo, E. (2011). Quasispecies as a matter of fact: Viruses and beyond. *Virus Research*, *162*(1–2), 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.018>
- Olech, M., Valas, S., & Kuźmak, J. (2018). Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. *PLOS ONE*, *13*(3), e0193892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193892>
- Palsson, P. A. (1972). Maedi-visna. *Journal of Clinical Pathology*, *s3-6*(1), 115–120. <https://doi.org/10.1136/jcp.s3-6.1.115>
- Pálsson, P. A. (1990). Maedi-Visna. History and Clinical Description. In G. Pétursson & R. Hoff-Jørgensen (Eds.), *Maedi-Visna and Related Diseases* (pp. 3–17). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1613-8_2
- Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M., & Ventura, P. (1985). A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology*, *147*(1), 231–236. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90246-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90246-6)

- Pépin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J. F., & Peterhans, E. (1998). Maedi-visna virus infection in sheep: A review. *Veterinary Research*, *29*(3–4), 341–367.
- Pérez, M., Biescas, E., Reina, R., Glaria, I., Marín, B., Marquina, a, ... Luján, L. (2014). Small Ruminant Lentivirus-Induced Arthritis: Clinicopathologic Findings in Sheep Infected by a Highly Replicative SRLV B2 Genotype. *Veterinary Pathology*, *52*(1), 132–139. <https://doi.org/10.1177/0300985813519654>
- Perry, L. L., Wilkerson, M. J., Hullinger, G. A., & Cheevers, W. P. (1995). Depressed CD4+ T Lymphocyte Proliferative Response and Enhanced Antibody Response to Viral Antigen in Chronic Lentivirus-Induced Arthritis. *Journal of Infectious Diseases*, *171*(2), 328–334. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.2.328>
- Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., ... Pépin, M. (2004). Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research*, *35*(3), 257–274. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004014>
- Pichlmair, A., & Reis e Sousa, C. (2007). Innate Recognition of Viruses. *Immunity*, *27*(3), 370–383. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.012>
- Pinczowski, P., Sanjosé, L., Gimeno, M., Crespo, H., Glaria, I., Amorena, B., ... Luján, L. (2017). Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Veterinary Pathology*, *54*(3), 413–424. <https://doi.org/10.1177/0300985816688742>
- Pisoni, G., Bertoni, G., Puricelli, M., Maccalli, M., & Moroni, P. (2007a). Demonstration of Coinfection with and Recombination by Caprine Arthritis-Encephalitis Virus and Maedi-Visna Virus in Naturally Infected Goats. *Journal of Virology*, *81*(10), 4948–4955. <https://doi.org/10.1128/JVI.00126-07>
- Pisoni, G., Moroni, P., Turin, L., & Bertoni, G. (2007b). Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology*, *369*(1), 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.021>
- Pisoni, G., Quasso, A., & Moroni, P. (2005). Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology*, *339*(2), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.013>
- Polledo, L., González, J., Benavides, J., Martínez-Fernández, B., Ferreras, M. C., & Marín, J. F. G. (2012). Perivascular inflammatory cells in ovine Visna/maedi encephalitis and their possible role in virus infection and lesion progression. *Journal of NeuroVirology*, *18*(6), 532–537. <https://doi.org/10.1007/s13365-012-0131-0>
- Prezioso, S., Taccini, E., Rossi, G., Renzoni, G., & Braca, G. (2003). Experimental Maedi Visna Virus Infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *European Journal of Histochemistry: EJH*, *47*(4), 373–378. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706934>
- Pyrh, I. T., & Watt, N. J. (1996). Immunohistological study of the depressed cutaneous DTH response in sheep naturally infected with an ovine lentivirus (Maedi-Visna virus). *Clinical and Experimental Immunology*, *104*(1), 32–36. Retrieved from <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-661.x>
- Qu, J., Guo, W., Zhao, L., Sheng, R., & Xiang, W. (2005). The gene cloning and sequence

- analysis of the whole genome of Caprine Arthritis Encephalitis virus (CAEV) GANSU strain. *Chin. J. Virol*, *21*, 389–392.
- Querat, G., Audoly, G., Sonigo, P., & Vigne, R. (1990). Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology*, *175*(2), 434–447. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90428-T](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90428-T)
- Rachid, A., Croise, B., Russo, P., Vignoni, M., Lacerenza, D., Rosati, S., ... Valas, S. (2013). Diverse host-virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats. *Journal of General Virology*, *94*(Pt_3), 634–642. <https://doi.org/10.1099/vir.0.044768-0>
- Ramírez, H., Glaria, I., Andrés, X. de, Martínez, H. A., Hernández, M. M., Reina, R., ... Andrés, D. de. (2011). Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *The Veterinary Journal*, *190*(1), 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.005>
- Ramírez, H., Reina, R., Amorena, B., Andrés, D., & Martínez, H. (2013). Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Viruses*, *5*(4), 1175–1207. <https://doi.org/10.3390/v5041175>
- Reina, R., Berriatua, E., Luján, L., Juste, R., Sánchez, A., de Andrés, D., & Amorena, B. (2009a). Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *The Veterinary Journal*, *182*(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.05.008>
- Reina, R., Bertolotti, L., Dei Giudici, S., Puggioni, G., Ponti, N., Profiti, M., ... Rosati, S. (2010). Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Veterinary Microbiology*, *144*(1–2), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.020>
- Reina, R., Glaria, I., Benavides, J., de Andrés, X., Crespo, H., Solano, C., ... Amorena, B. (2007). Association of CD80 and CD86 expression levels with disease status of Visna/Maedi virus infected sheep. *Viral Immunology*, *20*(4), 609–622. <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0071>
- Reina, R., Grego, E., Bertolotti, L., De Meneghi, D., & Rosati, S. (2009b). Genome Analysis of Small-Ruminant Lentivirus Genotype E: a Caprine Lentivirus with Natural Deletions of the dUTPase Subunit, vpr-Like Accessory Gene, and 70-Base-Pair Repeat of the U3 Region. *Journal of Virology*, *83*(2), 1152–1155. <https://doi.org/10.1128/JVI.01627-08>
- Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P., Quasso, A., ... Rosati, S. (2009c). Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Veterinary Microbiology*, *138*(3–4), 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.005>
- Romani, B., Engelbrecht, S., & Glashoff, R. H. (2009). Antiviral roles of APOBEC proteins against HIV-1 and suppression by Vif. *Archives of Virology*, *154*(10), 1579–1588. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0481-y>
- Rosati, S., Profiti, M., Lorenzetti, R., Bandecchi, P., Mannelli, A., Ortoffi, M., ... Ciabatti, I. M. (2004). Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. *Journal of Virological Methods*, *121*(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.001>
- Saltarelli, M., Querat, G., Konings, D. A. M., Vigne, R., & Clements, J. E. (1990). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate

- infectious virus. *Virology*, *179*(1), 347–364. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90303-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90303-9)
- Salter, J. D., Bennett, R. P., & Smith, H. C. (2016). The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(7), 578–594. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.001>
- Sánchez, J. H., Martínez, H. A., García, M. M., Garrido, G., Gómez, L., Aguilar, J. A., ... Ramírez, H. (2016). The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology*, *86*(8), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.017>
- Sanjosé, L., Pinczowski, P., Crespo, H., Pérez, M., Glaria, I., Gimeno, M., ... Reina, R. (2015). Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. *The Veterinary Journal*, *204*(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.012>
- Sargan, D. R., Bennet, I. D., Cousens, C., Roy, D. J., Blacklaws, B. A., Dalziel, R. G., ... McConnell, I. (1991). Nucleotide Sequence of EV1, a British Isolate Of Maedi-Visna Virus. *Journal of General Virology*, *72*(8), 1893–1903. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-8-1893>
- Shah, C., Böni, J., Huder, J. B., Vogt, H. R., Mühlherr, J., Zanoni, R., ... Schüpbach, J. (2004a). Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: Evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, *319*(1), 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.047>
- Shah, C., Huder, J. B., Boni, J., Schonmann, M., Mühlherr, J., Lutz, H., & Schupbach, J. (2004b). Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *Journal of Virology*, *78*(14), 7518–7522. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7518-7522.2004>
- Sigurdsson, B., Grimsson, H., & Pálsson, P. (1952). Maedi, a Chronic, Progressive Infection of Sheep's Lungs. *Journal of Infectious Diseases*, *90*(3), 233–241. <https://doi.org/10.1093/infdis/90.3.233>
- Sigurdsson, B., Pálsson, P. A., & Grímsson, H. (1957). Visna, a Demyelinating Transmissible Disease of Sheep. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *16*(3), 389–403. <https://doi.org/10.1097/00005072-195707000-00010>
- Singh, I., McConnell, I., Dalziel, R., & Blacklaws, B. A. (2006). Serum containing ovine IgG2 antibody specific for maedi visna virus envelope glycoprotein mediates antibody dependent cellular cytotoxicity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *113*(3–4), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.06.006>
- Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., ... Wain-Hobson, S. (1985). Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*, *42*(1), 369–382. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(85\)80132-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80132-X)
- Souza, K. C. de, Pinheiro, R. R., Santos, D. O., Brito, R. L. L. de, Rodrigues, A. de S., Sider, L. H., ... Andrioli, A. (2013). Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, *109*(2–3), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.031>
- Spuria, L., Biasibetti, E., Bisanzio, D., Biasato, I., De Meneghi, D., Nebbia, P., ... Capucchio, M. T. (2017). Microbial agents in macroscopically healthy mammary gland tissues of small

- ruminants. *PeerJ*, 5, e3994. <https://doi.org/10.7717/peerj.3994>
- Staskus, K. A., Retzel, E. F., Lewis, E. D., Silsby, J. L., Sheila Cyr, S. T., Rank, J. M., ... Zachow, K. R. (1991). Isolation of replication-competent molecular clones of visna virus. *Virology*, 181(1), 228–240. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90488-W](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90488-W)
- Stavrou, D., Deutschländer, N., & Dahme, E. (1969). Granulomatous encephalomyelitis in goats. *Journal of Comparative Pathology*, 79(3), 393–IN28. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(69\)90057-7](https://doi.org/10.1016/0021-9975(69)90057-7)
- Stonos, N., Wootton, S., & Karrow, N. (2014). Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections. *Viruses*, 6(8), 3311–3333. <https://doi.org/10.3390/v6083311>
- Stünzi, H., Büchi, H. F., & Le Roy, H. L. (1964). Endemische Arthritis chronica bei Ziegen. *Schw. Arch. Tier*, 106(12), 778–788. <https://doi.org/http://doi.org/10.5169/seals-593685>
- Tang, H., Kuhlen, K. L., & Wong-Staal, F. (1999). Lentivirus Replication and Regulation. *Annual Review of Genetics*, 33(1), 133–170. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.133>
- Thormar, H. (2013). The Origin of Lentivirus Research: Maedi-Visna Virus. *Current HIV Research*, 11(1), 2–9. <https://doi.org/10.2174/1570162X11311010002>
- Tisminetzky, S., Gerotto, M., Pontisso, P., Chemello, L., Prescott, L. E., Rose, K. A., ... Alberti, A. (1995). Comparison of genotyping and serotyping methods for the identification of hepatitis C virus types. *Journal of Virological Methods*, 55(3), 303–307. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(95\)00067-X](https://doi.org/10.1016/0166-0934(95)00067-X)
- Tolari, F., Al-Ramadneh, W., Mazzei, M., Carrozza, M. L., Forzan, M., Bandecchi, P., ... Rosati, S. (2013). Small ruminant lentiviruses in Jordan: Evaluation of sheep and goat serological response using recombinant and peptide antigens. *Tropical Animal Health and Production*, 45(6), 1335–1340. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0366-7>
- Torres-Acosta, J. F. J., Gutierrez-Ruiz, E. J., Butler, V., Schmidt, A., Evans, J., Babington, J., ... Lightsey, J. (2003). Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small Ruminant Research*, 49(2), 207–211. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00093-2)
- Torres, M., & Santos, S. (2004). Caracterização biológica e molecular de um lentivírus de ovino isolado em Portugal / Biological and molecular characterization of an ovine lentivirus isolated in Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99(549), 27–39. Retrieved from http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf3_2004/549_27_39.pdf
- Trujillo, J. D., Hötzel, K. J., Snekvik, K. R., & Cheevers, W. P. (2004). Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. *Virology*, 325(1), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.048>
- van der Molen, E. J., & Houwers, D. J. (1987). Indurative lymphocytic mastitis in sheep after experimental infection with maedivisna virus. *Veterinary Quarterly*, 9(3), 193–202. <https://doi.org/10.1080/01652176.1987.9694100>
- van der Molen, E. J., Vecht, U., & Houwers, D. J. (1985). A chronic indurative mastitis in sheep, associated with maedi/visna virus infection. *Veterinary Quarterly*, 7(2), 112–119. <https://doi.org/10.1080/01652176.1985.9693966>
- van Doorn, L. J., Kleter, B., Pike, I., & Quint, W. (1996). Analysis of hepatitis C virus isolates by

- serotyping and genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7), 1784–1787. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229115/>
- Vartanian, J. P., Meyerhans, A., Asjö, B., & Wain-Hobson, S. (1991). Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *Journal of Virology*, 65(4), 1779–1788. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2002543>
- Villoria, M., Leginagoikoa, I., Luján, L., Pérez, M., Salazar, E., Berriatua, E., ... Minguijón, E. (2013). Detection of Small Ruminant Lentivirus in environmental samples of air and water. *Small Ruminant Research*, 110(2–3), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.025>
- Watt, N. J., MacIntyre, N., Collie, D., Sargan, D., & McConnell, I. (1992). Phenotypic analysis of lymphocyte populations in the lungs and regional lymphoid tissue of sheep naturally infected with maedi visna virus. *Clinical and Experimental Immunology*, 90(2), 204–208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1992.tb07929.x>
- Wilkerson, M. J., Davis, W. C., Baszler, T. V., & Cheevers, W. P. (1995). Immunopathology of chronic lentivirus-induced arthritis. *The American Journal of Pathology*, 146(6), 1433–1443. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7778682>

10. Anexos

Anexo 1. Protocolo para la obtención de leucocitos de sangre periférica y plasma.

1. Centrifugar el tubo de sangre con anticoagulante a 2500 rpm durante 15 minutos para la separación del plasma y la fracción celular.
2. Transferir con una pipeta Pasteur el plasma en microtubos de 1.5 ml y la capa leucocitaria a un tubo Falcon de 15 ml.
3. Agregar 10 ml de solución de lisis I al tubo Falcon y homogenizar con Vórtex.
4. Centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos, desechar cuidadosamente el sobrenadante por decantación.
5. Repetir los pasos 3 y 4 con solución de lisis II.
6. Agregar 7 ml de PBS al paquete de células blancas.
7. Homogenizar y centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.
8. Decantar, recuperar las células blancas y resuspenderlas en 300 μ l de PBS en un microtubo de 1.5 ml estéril.
9. Etiquetar y almacenar a -70°C hasta su uso.

11. Apéndices

Cuadro 14. Ovinos seropositivos por estado con dos pruebas comerciales de ELISA para la detección de SRLV (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening).

Estado	VMRD		Eradikit	
	Seropositivos	%	Seropositivos	%
BCS*	9/69	13.04	5/69	7.25
Chiapas	0/50	0.00	1/50	2.00
Edo. Méx.	75/248	30.24	52/248	20.97
Hidalgo	19/180	10.56	17/180	9.44
Sinaloa	0/71	0.00	4/71	5.63
Sonora	15/176	8.52	12/176	6.82
Tlaxcala	0/160	0.00	3/160	1.88
Veracruz	11/52	21.15	8/52	15.38
TOTAL	129/1056	12.21	102/1056	9.65

*BCS: Baja California Sur

Cuadro 15. Caprinos seropositivos por estado con dos pruebas comerciales de ELISA para la detección de SRLV (VMRD™ y Eradikit™ SRLV Screening).

Estado	VMRD		Eradikit	
	Seropositivos	%	Seropositivos	%
BCS*	5/51	9.80	5/51	9.80
Coahuila	10/45	22.22	8/45	17.78
Durango	3/52	5.77	3/52	5.76
Edo. Méx.	32/60	53.33	27/60	45.00
Guanajuato	96/160	60.00	89/160	55.62
Querétaro	53/63	84.13	40/63	63.49
Sinaloa	33/257	12.84	35/257	13.61
Sonora	16/32	50.00	14/32	43.75
Tlaxcala	1/46	2.17	1/46	2.17
Veracruz	126/168	75.00	94/168	55.95
TOTAL	375/934	40.15	316/934	33.83

*BCS: Baja California Sur