



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE CUAUTITLÁN

**“Detección serológica y molecular de Lentivirus de Pequeños  
Rumiantes en sangre y semen de ovinos”**

**TESINA**

Que para obtener el título de

**ESPECIALISTA EN PRODUCCIÓN DE OVINOS Y CAPRINOS**

PRESENTA

**Juan Manuel Jordan Betancur**

TUTOR

**Dr. Hugo Ramírez Álvarez**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2020



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.

## DEDICATORIA

A Jesucristo mi Dios, mi fortaleza y mi esperanza.

A mi padre, mi madre y mi hermana por el soporte, el amor y la incondicionalidad.

A México, lindo y muy querido, en reciprocidad a su cariño.

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM

De forma especial a la Familia Hernández de Labra

Al Dr. Hugo Ramírez Álvarez, Dr. Eduardo Acevedo, M en C Cecilia Rodríguez Murillo y equipo del Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES-C

A los ovinocultores, al EPOC Víctor Román, Dr. Arturo Trejo y Dra. Guadalupe Prado

A los proyectos titulados:

- Uso de herramientas moleculares y bioinformáticas para la identificación de agentes infecciosos, con clave PIAPI1610. Dentro del Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación.
- Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia* spp, *Brucella melitensis*, *Leptospira* spp y *Coxiella burneti*, en ovinos y caprinos” Proyecto financiado por Fondos Sectoriales SAGARPA CONACYT, No. 291311.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>3</b>
Generalidades	3
Respuesta a la infección	9
Presentación clínica	11
Transmisión	13
Diagnóstico	15
Estrategias de control	17
<b>Justificación</b>	<b>20</b>
<b>Objetivos</b>	<b>20</b>
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
<b>Materiales y métodos</b>	<b>21</b>
<b>Resultados</b>	<b>25</b>
<b>Discusión</b>	<b>30</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>39</b>
<b>Referencias</b>	<b>40</b>
<b>Anexos</b>	<b>43</b>

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Condiciones de la PCR anidada para amplificar un fragmento del gen *gag* de SRLV en muestras de ADN obtenidas de semen y leucocitos de ovinos. **23**
- Cuadro 2.** Condiciones de la PCR punto final para amplificar un fragmento del gen constitutivo SDHA en muestras de ADN obtenidas de semen y leucocitos de ovinos. **24**
- Cuadro 3.** Resultados de la detección serológica y molecular, por los municipios en los que se obtuvieron animales positivos. **27**
- Cuadro 4.** Total de animales evaluados mediante técnicas serológica y molecular, con los resultados que coinciden en ambas técnicas. **29**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación esquemática de los SRLV con los principales componentes estructurales del virión. 4
- Figura 2.** Representación del mapa genómico de los SRLV. 5
- Figura 3.** Diagrama de flujo del procesamiento de muestras de sangre y semen de ovinos para la detección serológica y molecular de SRLV. 21
- Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR – *gag A*. 26
- Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR – *SDHA*. 26

## RESUMEN

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) pertenecen a la familia *Retroviridae* e incluyen diversos genotipos que frecuentemente cruzan la barrera de especies entre ovejas y cabras, causando una infección cosmopolita que afecta la producción de pequeños rumiantes generando pérdidas económicas. El éxito de los programas de control depende del conocimiento preciso y detallado del diagnóstico, y las rutas de transmisión de la enfermedad. **OBJETIVO GENERAL:** detectar ovinos machos infectados por LvPR mediante el uso de técnicas serológicas y moleculares en sangre periférica y semen. **METODOLOGÍA:** se llevó a cabo un muestreo no probabilístico de 73 machos mayores a 7 meses de edad, de diferentes rebaños en los Estados de México e Hidalgo. La sangre se obtuvo por punción de la vena yugular y el semen se colectó usando vagina artificial o electroeyaculador según la condición del macho. Las muestras fueron conservadas en frío y transportadas al Laboratorio de Virología. Se centrifugó la sangre para obtener plasma sanguíneo (PS) y los leucocitos de sangre periférica (LSP). Del semen se obtuvo fluido seminal (FS) y células seminales (CS). PS y FS fueron utilizados para la detección serológica mediante un ELISA indirecto basado en el uso de la proteína recombinante p16 (ELISAI-p16) derivada de secuencias de un LvPR genotipo B. Se extrajo el ADN de LSP y CS para la detección de ADN proviral por PCR anidada que amplifica una región parcial del gen *gag* del genotipo A. Los productos obtenidos de la segunda ronda de PCR se cargaron en geles de agarosa y se realizó la electroforesis, posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron usando un transiluminador. **RESULTADOS:** cinco machos resultaron positivos al ELISAI-p16 de plasma sanguíneo y ninguna muestra de fluido seminal resultó positiva. De los ovinos evaluados en PCR, 23 resultaron positivos en LSP y 32 en células seminales, de los cuales 14 ovinos resultaron positivos en ambas muestras, para un total de 41 positivos por PCR. Tres de los animales positivos a PCR también lo fueron en el ELISAI-p16. Dos de los cinco machos seropositivos coincidieron con los resultados de PCR para ambas muestras (LSP y CS) y uno de ellos coincidió con un resultado positivo para PCR de CS. En total de 73 ovinos evaluados, 43 resultaron positivos por una o ambas técnicas de diagnóstico. Estas diferencias en la detección entre la prueba de ELISAI-p16 y la nPCR pueden ser debido al genotipo infectante en los animales de estudio. **CONCLUSIONES:** fue más eficiente la detección de ovinos machos infectados por LvPR mediante el uso de nPCR en sangre y semen. Se identificó la presencia de anticuerpos contra LvPR utilizando una prueba de ELISAI-p16 solo en plasma sanguíneo. El estudio destaca el valor del semen como muestra en el diagnóstico de LvPR, demuestra la importancia de usar más de un método de diagnóstico que incluya el genotipo/antígeno prevalente en las regiones y enfatiza en la necesidad de realizar más investigaciones sobre la importancia de la transmisión a través del semen.

## ABSTRACT

Small ruminant lentiviruses (SRLV) belong to the family *Retroviridae* and include various genotypes that frequently cross the species barrier between sheep and goats, causing a cosmopolitan infection that affects small ruminant production bringing about economic losses. The success of the control programs depends on precise and detailed knowledge of the diagnosis, and the routes of disease transmission. **Objective:** The aim of this study was to detect rams infected by SRLV using serological and molecular techniques in blood and semen. **Material & Methods:** A non-probabilistic sampling of 73 males over seven months of age, from different herds in the states of Mexico and Hidalgo, was carried out. Blood was collected by puncturing the jugular vein and sperm was collected from rams by electroejaculation or using an artificial vagina. The samples were cold-preserved and transported to the Virology Laboratory. Blood was centrifuged to obtain blood plasma (BP) and peripheral blood leukocytes (PBL). Seminal fluid (SF) and seminal cells (SC) were obtained from semen. BP and SF were used for serologic detection using an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on the use of the recombinant protein p16 (iELISA-p16) derived from sequences of a SRLV genotype B. DNA of PBL and SC was extracted to detect the proviral DNA by nested Polymerase Chain Reaction (nPCR) that amplifies a partial region of the gag gene of SRLV. The products obtained from the second round of nPCR were loaded on agarose gels and electrophoresis was performed, then stained with ethidium bromide and observed using a transilluminator. **Results:** Five males were positive for iELISA-p16 in BP and no sample of SF was positive. Gag region amplifications were found in PBL and SC of 41 rams: 23 were positive in PBL and 32 in SC, of which 14 rams were positive in both samples. Three nPCR positive rams were also in iELISA-p16. Two of the five seropositive males coincided with the PCR results for both samples (PBL and SC) and one of them coincided with a positive result for nPCR in SC. In total, of 73 rams, 43 tested positive using one or both diagnostic techniques. These differences in detection between the iELISA-p16 test and the nPCR may be due to the infective genotype in the studied animals. **Conclusions:** Detection of rams infected with SRLV was more efficient through the use of nPCR in blood and semen. The presence of antibodies against SRLV was identified using an iELISA-p16 test only in blood plasma. This study highlights the value of semen as a sample in the diagnosis of SRLV, demonstrates the importance of using more than one diagnostic method that includes the genotype / antigen prevalent in the regions, and emphasizes the need to conduct further research on the importance of transmission through semen

# DETECCIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES EN SANGRE Y SEMEN DE OVINOS

## MARCO TEÓRICO

### GENERALIDADES

El género no oncogénico Lentivirus, pertenece al Orden *Ortervirales*, familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*. Los retrovirus se caracterizan por la capacidad de transcribir inversamente el ARN viral a ADN bicatenario (ADNs) a través de la acción de la transcriptasa reversa (RT). El género Lentivirus incluye los virus de inmunodeficiencia humana (VIH), inmunodeficiencia de simios (SIV), inmunodeficiencia felina (FIV), inmunodeficiencia bovina (BIV), anemia infecciosa equina (EIAV) y los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV), anteriormente conocidos como Maedi Visna (MV) y Artritis Encefalitis Caprina (AEC) (Minguijón et al, 2015).

El virión es esférico con una estructura única de tres capas. El tamaño de los viriones es de aproximadamente 80 – 100 nm de diámetro. La parte central del virus es un complejo que incluye el genoma-nucleoproteína, asociado con la retrotranscriptasa. La estructura que encierra el genoma, es una cápside de morfología icosaédrica que está rodeada por una envoltura derivada de la membrana plasmática de la célula huésped. Su genoma es un dímero idéntico de ARN monocatenario de sentido positivo de 9,2 kilobases (kb) de tamaño, que se transcribe inversamente en ADN proviral, algunos de los cuales se integrarán en el ADN cromosómico. La organización genética típica de los lentivirus comprende tres genes estructurales: *gag* que codifica para cápside, nucleocápside y proteína de matriz; *pol* que codifica para las enzimas como retrotranscriptasa, proteasa e integrasa y *env* que codifica para glicoproteínas de transmembrana y superficie. El ADN proviral está flanqueado por secuencias repetidas conocidas como repeticiones terminales largas (LTR) no codificantes, que contienen elementos promotores que inician la transcripción del ADN y juegan un papel importante en el tropismo celular y en la patogénesis (Pépin et al, 1998; Ramírez et al, 2013; Minguijón et al, 2015).

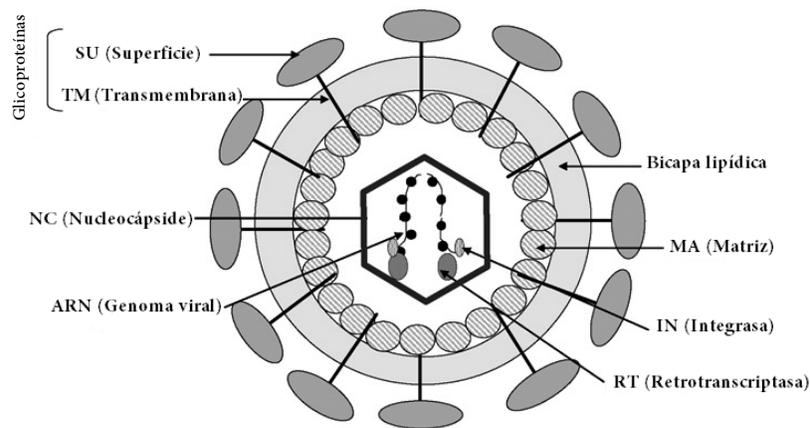


Figura 1. Representación esquemática de los SRLV con los principales componentes estructurales del virión. Modificado de Leroux & Mornex, 2008.

El gen *gag* codifica para las tres proteínas estructurales internas: la cápside (CA, p25), la nucleocápside (NC, p14) y la proteína de la matriz (MA, p16), esta última asegura el enlace entre la cápside y la envoltura. La proteína p25, es la proteína más abundante del virión, una proteína larga que provoca una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección, estimula así la producción de anticuerpos en el hospedador por lo que se usa con frecuencia en diagnóstico serológico, lo cual es valioso para las pruebas serológicas (Gómez et al, 2018).

El gen *pol* codifica para la transcriptasa inversa, la enzima clave de los retrovirus que es una ADN polimerasa dependiente de ARN, que permite la transcripción del ARN viral en ADN. En cada virión, numerosas moléculas de transcriptasa inversa e integrasa están asociadas con el ARN viral. Después de la transcripción inversa, el provirus migra hacia el núcleo y el genoma de ADN bicatenario se integra en el ADN de la célula huésped mediante un mecanismo mediado por la integrasa (Pépin et al, 1998).

El gen *env* codifica para las glicoproteínas insertadas en la envoltura del virus: la glicoproteína de superficie (SU, gp135) y la glicoproteína de transmembrana (TM, gp46). La TM está anclada en la bicapa lipídica, por su capacidad de fusión de membranas permite la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula huésped, es una proteína mucho más conservada, por lo que es buen candidato para ser utilizado en técnicas de ELISA que funcionen en diferentes ubicaciones geográficas, porque contienen los

epítomos responsables tanto de la inducción de anticuerpos neutralizantes como de la interacción del virus con el receptor de la célula huésped. La SU contiene dominios que son reconocidos por la célula receptora y permiten la entrada, esto estimula la producción de anticuerpos y también es genéticamente variable, por lo que las modificaciones en SU determinan la variabilidad antigénica de los diferentes aislados (Gómez et al, 2018).

Existen tres genes auxiliares que tienen funciones reguladoras: *Vpr-like*, *vif* y *rev*, los cuales contienen información para codificar proteínas que regulan la replicación viral, entre ellos están el gen *vif*, cuyo producto es necesario para hacer que el virus sea infeccioso, identificado como un factor importante para luchar contra los mecanismos de defensa de la célula. El gen *Vpr-like* que actúa en la transactivación y el gen *rev* que regula la expresión viral (Gómez et al, 2018; Olech et al, 2019).

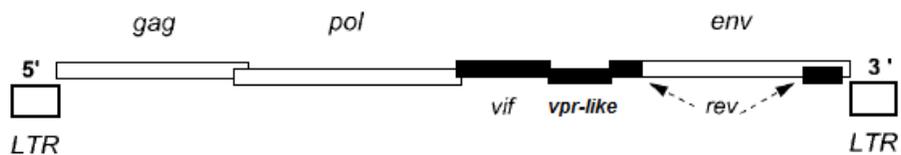


Figura 2. Representación del mapa genómico de los SRLV. Modificado de Pépin et al, 1998.

La variabilidad genética es una característica clave de los lentivirus de pequeños rumiantes y su conocimiento es esencial para el diagnóstico preciso y los estudios de epidemiología molecular (Minguijón et al, 2015). Entender esta propiedad es importante para favorecer la precisión de los programas de erradicación, ya que proporcionan información sobre la evolución de los lentivirus de pequeños rumiantes (Olech et al, 2019).

Pese a la alta tasa de evolución en los lentivirus muchos elementos del genoma, así como algunos elementos de replicación y de empaquetamiento, se conservan. Los genes estructurales *gag*, *pol* y algunas regiones del gen *env* están relativamente conservadas, pero otras, como las que codifican sitios de unión a anticuerpos, como las proteínas de superficie son altamente variables (Ramírez et al, 2013). Los virus cuentan con diferentes canales de variabilidad genética para establecer una respuesta de

supervivencia y perpetuar la infección, estas conducen a la habilidad de los lentivirus para evadir el sistema inmunitario (Minguijón *et al.*, 2015).

Debido a que la retrotranscripción conlleva a una alta tasa de errores y no cuenta con mecanismos de corrección, la replicación de los lentivirus involucra una alta frecuencia de mutaciones, a menudo inserciones y deleciones. 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 viral se define como un conjunto de virus encontrados en un individuo infectado derivadas de un mismo virus. La diversidad genética mostrada como cuasiespecie viral es característica de la infección retroviral. La falta de factores de corrección en el funcionamiento de la RT podría explicar los niveles extremadamente altos de variación genética observados *in vivo*. Sin embargo, la heterogeneidad genética y flexibilidad adaptativa observada *in vivo* no puede atribuirse completamente a los problemas de la RT y mutaciones (Ramírez *et al.*, 2013), ya que existen otras vías.

La recombinación es un mecanismo de diversificación que puede ensamblar combinaciones genéticas beneficiosas difíciles de generar solo por mutación y que puede eliminar mutaciones letales. A diferencia de los cambios causados en la mutación, la recombinación es una fuerza evolutiva más intensa, ya que facilita la reparación de los genomas virales a nivel físico o a nivel de segmentos que acumulan mutaciones en ausencia de recombinación (Ramírez *et al.*, 2013). Este mecanismo surge como resultado de la coinfección de dos virus en la misma célula y el empaquetamiento de dos copias no idénticas del genoma de ARN en cada virión (Negroni & Buc, 2001). En infecciones naturales se han identificado recombinaciones de SRLV entre los genotipos A y B, y entre variantes genéticas del subtipo B1 en cabras (Ramírez *et al.*, 2011).

La variabilidad es una herramienta del virus para evadir la respuesta inmune del huésped, entre otros medios que tiene para garantizar la persistencia de la infección en el hospedador (Gómez *et al.*, 2018). Este medio de evasión también puede estar involucrado en la transgresión de la barrera específica, como se ha visto en especies de rumiantes salvajes infectadas natural y experimentalmente. Un mecanismo que contribuye a la creciente diversidad de los SRLV es la capacidad de infectar tanto a ovinos como a caprinos. Múltiples estudios han descrito el fenómeno de la transmisión entre especies, lo que puede impulsar la aparición de nuevas cepas, posiblemente mostrando nuevas propiedades biológicas. El alto

grado de variabilidad genética propende por la aparición de una variedad de cepas y cuasiespecies divergentes que ha llevado a la formación de pequeños grupos heterogéneos con un rango variable de huéspedes y propiedades patogénicas (Minguijón et al, 2015; Olech et al, 2019).

Debido a su alta variabilidad, los SRLV se han podido clasificar filogenéticamente, basado en un fragmento genético de 1,8 kb de la región *gag-pol* y una secuencia del gen *pol* de 1,2 kb, en cinco grupos principales o genotipos, A-E, cuyas secuencias de nucleótidos difieren en un 25-37% entre sí y a la vez se han establecido diferentes subtipos (Ramírez et al, 2013).

Hasta ahora se han reconocido veintidós subtipos (A1 – A22) dentro del grupo A, el grupo B se divide en cinco subtipos (B1 – B5), mientras que el genotipo E tiene dos subtipos (E1 y E2). Los virus similares que incluyen cepas tipo MV y AEC, clasificados en los grupos A y B, respectivamente, están ampliamente distribuidos en todo el mundo, mientras que los virus de los grupos C-E están restringidos geográficamente (de Andrés et al, 2013; Molaee et al, 2020). Cada que se obtienen más secuencias virales, los subtipos pertenecientes a infectar una sola especie, tienden a desaparecer, encontrándose en ambas especies (Minguijón et al, 2015). A medida que se analizan más cepas locales aparecen nuevos subtipos, lo que muestra la necesidad continua de nuevos diseños diagnósticos (de Andrés et al, 2013).

La replicación viral se realiza a través de varios pasos biológicos únicos que a su vez inciden en la patogénesis. Después de la entrada del virus a la célula, la información genética codificada en el ARN viral se copia a ADN de doble cadena por retrotranscripción. Este ADN migra al núcleo, se integra en el ADN cromosómico de la célula y luego se transcribe en un nuevo ARN viral. El ARN del virus recién creado se exporta al citoplasma, el cual servirá para ensamblarse con los viriones de progenie, y los ARNm promueven la síntesis de proteínas virales que en conjunto con los nuevos genomas de ARN se ensamblaran para formar los nuevos viriones en el citoplasma (Burrell et al, 2017).

La replicación viral empieza cuando el virión entra en contacto con la célula blanco llevando a cabo el reconocimiento del receptor de las células permisivas por la glicoproteína de la envoltura viral (SU). Aunque no se ha identificado un receptor único para los SRLV, se ha identificado en los últimos estudios un receptor de manosa que al parecer es el receptor celular que usa el virus para penetrar la célula (Gómez et al, 2018). Producida la entrada, 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. La eliminación del recubrimiento libera el complejo de nucleoproteína (Burrell et al, 2017).

La transcriptasa inversa comienza en el citoplasma a sintetizar el ADN del genoma viral a partir de ARN viral. La doble cadena de ADN retrotranscrita migra al núcleo a lo largo de los microtúbulos y varias de esas moléculas se integran como provirus en sitios aleatorios en el ADN celular, por acción de la integrasa (Burrell et al, 2017). Las células infectadas contienen pocas, normalmente sólo una, copias integradas en el ADN celular del hospedador (Minguijón et al, 2015), puesto que existen fenómenos de interferencia que impiden que una célula ya infectada vuelva a infectarse (Lago, 2012).

Una vez integrado en el ADN nuclear el provirus se mantiene completamente estable y puede permanecer en estado de latencia por tiempo indefinido, produciendo una infección persistente de por vida (Gómez et al, 2018), sólo se expresa cuando la célula se divide. La expresión del virus depende de factores ambientales, uno de estos es el grado de maduración de las células, por ejemplo, cuando el monocito madura a macrófago se puede inducir la activación de la transcripción, que es realizada por la maquinaria celular (Lago, 2012). Por lo tanto, los monocitos y los macrófagos inmaduros actúan como "Caballos de Troya", permitiendo que el virus escape de las respuestas inmunes y permitiendo su llegada a los órganos diana (Gómez et al, 2018).

La ARN polimerasa II sintetiza el ARN genómico viral y los ARNm que codifican para las proteínas del virus, a partir del provirus integrado. Las proteínas de la envoltura (**Env**) se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso y son glicosiladas en el aparato de Golgi, para ser transportadas a la cara interna de la membrana citoplasmática de la célula para iniciar el ensamble. Las proteínas Gag y Pol se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos, se asocian al genoma viral y se incorporan con las 12 glicoproteínas ancladas en la membrana citoplasmática. Las partículas víricas formadas se liberan por gemación. La maduración del precursor de las proteínas Gag y Pol se produce por acción de la proteasa viral, que otorga la infectividad a los viriones (Burrell et al, 2017).

Ya en contacto con el hospedador el virus atraviesa las barreras mucosas e infecta macrófagos y células dendríticas allí residentes, que migrarán a través del sistema linfático aferente hasta los linfonodos, allí ocurre la transmisión de la infección a los monocitos/macrófagos, los cuales se diseminan por la linfa

eferente y el conducto torácico, para llegar al torrente sanguíneo estableciendo así una infección sistémica (Gómez et al, 2018).

En los monocitos infectados en sangre, que actúan como “Caballo de Troya”, no se da una replicación viral significativa, por lo que el virus pasa desapercibido por el sistema inmunológico y se disemina hacia los órganos diana (Lago, 2012). El tropismo tisular parece variar entre las cepas de SRLV, de acuerdo con una comprensión incompleta de factores que involucran interacciones hospedero-patógeno (Pinczowski et al, 2017), no se han encontrado aún los patrones firma que definen el tropismo hacia los órganos, cada variante de virus particular puede limitarse a un compartimento, órgano o tejido dentro del individuo (Ramírez et al, 2013).

El virus posee un periodo de incubación largo y muy variable, siendo el resultado final una infección persistente (Lago, 2012), que puede deberse a que la respuesta inmune que se genera frente a la infección, contenga fallas que le impidan eliminar el virus (Pepin et al, 1998). Cuando los monocitos maduran a macrófagos, en los tejidos se desencadena un factor que da lugar a la activación de la expresión viral (Lago, 2012).

Después del primer contacto del virus con el hospedador se produce una breve viremia inicial que conduce a la seroconversión del animal, debido a la síntesis de anticuerpos contra los antígenos virales. Ya que el provirus está en el genoma celular, el virus puede entrar en un período de latencia perpetuado hasta desencadenarse un proceso inflamatorio en los órganos diana, que es cuando el virus volverá a replicarse induciendo una reacción inmunitaria cuya afección en los tejidos trae como consecuencia la aparición del cuadro clínico clásico (Acevedo, 2018).

## **RESPUESTA A LA INFECCIÓN**

Existen diferentes mecanismos que dificultan el éxito de la infección por SRLV. El hospedador puede mostrar una variedad de estrategias tanto a nivel celular como a nivel del organismo. Además, algunos rasgos genéticos pueden explotarse para criar razas más resistentes. Un conocimiento más profundo sobre cómo actúan, puede ayudar a mejorar la salud de nuestros rebaños, haciéndolos más rentables y sostenibles (Gómez et al, 2018).

Cuando el organismo se halla frente a una infección viral por SRLV el sistema inmune establece dos tipos de respuesta para su control. La primera es la respuesta inmune innata que funciona como una de las primeras líneas de defensa. Esta implica una variedad de células y proteínas no específicas que pueden atacar y destruir a los patógenos invasores. Por su parte, 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 (Stonos et al, 2014).

El linaje de monocitos / macrófagos y células dendríticas representa un puente entre las inmunidades innatas y adaptativas contra SRLV (Gómez et al, 2018), son células importantes en la interfaz de la respuesta inmune de ambos tipos, 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).

Se podría decir que toda infección celular por parte del virus es exitosa pero aún no se ha comprobado. La célula posee varios mecanismos de defensa, ya que, al verse amenazada por la entrada del virus moléculas de la inmunidad innata y adquirida empiezan a limitar la infección (Gómez et al, 2018).

Las moléculas restrictivas de inmunidad innata son proteínas antivirales que tienen diversas funciones, por ejemplo TRIM5 que puede unirse a las cápsidas virales, inhibiendo las etapas de integración y pasos posteriores, también puede reconocer estructuras dentro de las proteínas de la cápside, eliminarlas e interferir así con el proceso de encapsidación, evitando la retrotranscripción y la continuación del ciclo viral. Las proteínas APOBEC3 (A3) tienen actividad citosina-deaminasa que genera 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. Estas mutaciones causan la expresión anormal de proteínas virales no funcionales, lo que resulta en interrupciones del ciclo de vida viral. El efecto antiviral es contrarrestado por la proteína *Vif* del virus que puede inhibir la actividad de las proteínas A3 (Gómez et al, 2018; Minguijón et al, 2015).

Otro sistema de defensa son los interferones y citosinas que producidas en respuesta a una infección viral, generan el llamado estado antiviral de la célula (Gómez et al, 2018).

Se ha percibido 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 TCD4+ e inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (Stonos et al, 2014).

Las respuestas de anticuerpos pueden surgir de 2 a 4 semanas después de la infección y se ha observado que tienden a fluctuar durante los primeros 6 meses de infección (Pinczowski et al, 2017).

El virus y el huésped evolucionan conjuntamente de acuerdo con la presión que ejerce el sistema inmune innato y adaptativo, para alcanzar un equilibrio que favorece la infección (del virus) o la oposición (del huésped). La restricción heteróloga por factores de inmunidad innata suele ser más extendida y potente que la homóloga; este hallazgo puede tener implicaciones profilácticas y terapéuticas contra las infecciones lentivirales (Mingujón et al, 2015).

## **PRESENTACIÓN CLÍNICA**

Los primeros signos que se han observado en ovejas infectadas son la pérdida de la condición corporal y la disnea causada por diferentes grados de neumonía intersticial. Estos signos respiratorios pueden estar asociados con una mastitis indurativa y una disminución en la producción de leche en el período posparto. Aunque se describe con menos frecuencia, los ovinos también pueden verse afectados por artritis, presentando agrandamiento de la articulación carpiana con claudicación leve, así como puede manifestarse la forma neurológica, que resulta en ataxia, hipermetría o parálisis. En caprinos, los SRLV generalmente producen la forma nerviosa y articular, aunque también se puede observar neumonía intersticial (Pinczowski, 2017).

Existen cuatro formas clínicas principales en las que se puede manifestar la infección por SRLV en el hospedador, estas son: articular, mamaria, pulmonar y nerviosa, provocando una enfermedad inflamatoria multisistémica y progresiva que cursa con artritis, mastitis, neumonía y/o encefalitis (Leroux & Mornex, 2008; Blacklaws, 2012). La presentación articular involucra la presencia de articulaciones agrandadas, afectando principalmente a la articulación del carpo, pero también a la articulación del tarso y raramente otras articulaciones (Pérez et al, 2015).

La forma mamaria cursa como una mastitis indurativa difusa, bilateral y crónica que muchas veces se encuentra asociada a la forma pulmonar (Pinczowski, 2017) y afecta animales adultos de entre 3 y 5 años de manera desapercibida. Esta forma subclínica de la enfermedad genera, además del impacto sanitario, un impacto productivo y económico (Leroux & Mornex, 2008; Aragão et al, 2017).

En la manifestación pulmonar, los signos clínicos como disnea, polipnea y el patrón abdominal, son producidos por una neumonía intersticial (Pinczowski, 2017) y la forma nerviosa causa encefalitis y/o mielitis. Por lo general, es uno de los órganos que se ve mayormente afectado, aunque varios tejidos pueden mostrar lesión con severidad variable (Pérez et al, 2015). Estas formas de presentación conducen a un estado de caquexia y muerte al provocar una disfunción respiratoria o alteración general del sistema nervioso (Blacklaws, 2012).

Se ha identificado una inmunodeficiencia asociada, la cual se caracteriza por la incapacidad del animal para generar respuestas de memoria frente a numerosos antígenos. Así es como las infecciones clínicas por SRLV representan predisposición para otras enfermedades, ya que disminuye su capacidad de responder a otros microorganismos patógenos, a pesar de que éste continúe presentando elevados niveles de anticuerpos frente a antígenos virales a lo largo de su vida (Blacklaws, 2012).

Hallazgos patológicos en las articulaciones del carpo y los pulmones de animales inoculados confirman que las formas clínicas pueden coexistir en el mismo animal (Minguijón et al, 2015; Pinczowski, 2017). Se han hallado lesiones en órganos reproductivos tanto masculinos como femeninos, algunos sin mostrar signos clínicos de la enfermedad. Sin embargo, es importante tener en cuenta esto, porque a pesar de ser asintomáticos los animales afectados son potencialmente diseminadores de la infección (Martínez et al, 2005; Fieni et al, 2012).

Así mismo, aunque se suelen considerar las formas pulmonar y nerviosa más comunes en ovejas y las formas mamaria y articular más frecuentes en cabras (Pérez et al., 2015). Ambas especies son susceptibles a la manifestación de la infección en todos los cuadros de presentación clínica (Pinczowski, 2017).

## TRANSMISIÓN

Del conocimiento preciso y detallado de las rutas de transmisión de la infección, depende el éxito que se obtenga en los programas de control, ya que esta consideración es un componente crítico en ellos (Peterhans et al, 2004). Las principales vías de transmisión de los SRLV son la horizontal, que ocurre a través del contacto directo entre los animales y la vía vertical lactogénica, que ocurre a través del consumo de calostro o leche infectados (Sánchez et al, 2016).

La transmisión por aerosoles del tracto respiratorio entre animales de todas las edades en contacto cercano y a distancias hasta de varios metros, parece ser una ruta importante de diseminación de los SRLV, tanto entre individuos como entre rebaños y desempeña un papel importante en la permanencia de la infección, particularmente en condiciones de hacinamiento, donde se favorece la aspiración de aerosoles respiratorios procedentes de animales infectados (East et al, 1993; Peterhans et al, 2004). Las coinfecciones con otros virus o bacterias también pueden contribuir a su propagación a través de exudados pulmonares (Pépin et al, 1998). Esta vía se ha destacado como importante en la transmisión del virus entre ovinos (Jowen et al, 1993). En esta especie, el contacto entre oveja y cordero también representa un factor de riesgo importante en la transmisión de tipo horizontal al recién nacido. Puede explicarse por la transmisión de aerosoles desde el tracto respiratorio, siendo los pulmones un órgano diana importante en ovinos (Peterhans et al, 2004).

El calostro y la leche se consideran de importancia primordial en la transmisión de los SRLV por vía vertical (Peterhans et al, 2004), una característica clave de la epidemiología de la enfermedad. En un rebaño infectado naturalmente, las células infectadas con virus y el virus libre pasan de ovejas a corderos por vía lactogénica. La permeabilidad del intestino de los corderos recién nacidos favorece la infección. Por la mastitis frecuente en los animales afectados, la transmisión puede verse facilitada por el reclutamiento de células mononucleares infectadas a las glándula mamaria. La duración de la infección en la oveja y el grado de contaminación de la progenie parecen estar correlacionados. Naturalmente, el parto es un momento de alta expresión de lentivirus, lo que facilita la propagación de la infección (Pépin et al, 1998).

La transmisión del virus a través del útero se ha considerado de menor importancia, los hallazgos de hembras seropositivas que infectan fetos *in útero* parecen ser de baja frecuencia y por ende con una baja tasa de transmisión vertical (Sánchez et al., 2016). Este es un tema controvertido y su importancia real es poco clara, pero se han observado casos de corderos seropositivos en programas con estrictos controles al parto (Pépin et al, 1998) y resultados positivos por PCR de aproximadamente el 10% de corderos analizados antes de la ingestión de calostro (Arcila et al, 2012), además algunos estudios han demostrado la presencia del virus en el tracto reproductivo femenino, particularmente en el útero. Así mismo ya se ha reportado la vía intrauterina como vía de transmisión vertical de los SRLV (Hasegawa et al, 2017).

Así como la vía uterina, la infección a través del semen no ha tomado relevancia dentro de las vías en las que la infección se trasmite, ya que en general la vía sexual se considera de menor importancia (Gómez et al, 2018). Sin embargo, se ha demostrado no solo la presencia del virus en semen (Peterhans et al, 2004; Ali Al; Martínez et al, 2005; Ahmad et al, 2008; Cruz et al, 2009; Fieni et al, 2012), sino también, se ha descrito la transmisión mediante inseminación artificial (Souza et al, 2013), tema objeto de este trabajo y su discusión.

En cuanto a la transmisión iatrogénica y por fómites, considerada la menos importante desde el punto de vista epidemiológico (Sánchez et al, 2016). Esta puede contribuir a la propagación de la infección al no cambiarse de ropa, botas y equipo cuando se trata de rebaños infectados y no infectados (Peterhans et al, 2004). Estudios que han usado una dosis infecciosa intravenosa muy baja indican que la transmisión iatrogénica por medio de agujas e instrumentos contaminados reutilizados puede ocurrir y es algo que debe evitarse (Minguijón et al, 2015). La transmisión por máquinas de ordeño contaminadas se considera un factor de riesgo (Peterhans et al, 2004). La transmisión a través de fómites comunes como en el agua, generada por contaminación fecal se ha probado experimentalmente, además se ha detectado SRLV en bebederos. Así que los objetos contaminados y el papel del agua en la transmisión son objeto de atención (Minguijón et al, 2015).

El virus libre o asociado a células infectadas, entra en el hospedador a través del tracto respiratorio, las membranas mucosas o los capilares fenestrados del intestino de los corderos (Blacklaws et al, 2012). Es poco probable que especies como perros o gatos desempeñen un papel en la transmisión viral (Peterhans et al, 2004).

## DIAGNÓSTICO

Existe una gama de pruebas para el diagnóstico de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes. La prueba de tipo serológico que se utilizaba con mayor frecuencia fue la inmunodifusión en gel de agar (AGID), al ser una prueba de diagnóstico recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE (Oliveira et al, 2009; OIE, 2018). Sin embargo, esta prueba no permitía el diagnóstico temprano o certero en los animales. El diagnóstico de SRLV actualmente se lleva a cabo principalmente por pruebas serológicas indirectas, consideradas como pruebas tamiz, siendo el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) el más usado por ser altamente sensible, objetivo y automatizado. Los ELISAs pueden ser utilizados para la detección de animales expuestos a diferentes genotipos de SRLV, sin embargo, se debe tener en cuenta la utilización de antígenos provenientes de cepas virales apropiadas, ya que éstas son heterogéneas y pueden variar los epítopes antigénicos entre unas y otras. La técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se usa como método confirmatorio debido a la mencionada heterogeneidad y a la baja carga viral relacionada a la proporción de células infectadas, comparado con la cantidad de anticuerpos que pudieran generarse (de Andrés et al, 2013; San José et al, 2015).

Actualmente el ELISA puede utilizarse para detectar anticuerpos en suero, leche y semen (de Andrés et al, 2013; Peterhans et al, 2004; Ramírez et al, 2009). Los ELISAs indirectos y competitivos, se han utilizado para el diagnóstico de la infección y en los programas de erradicación de los SRLV (San José et al, 2015). Estas pruebas de tipo serológico suelen ser más sensibles cuando se utilizan antígenos provenientes de diferentes cepas virales y se ha demostrado que con la combinación de antígenos de diferentes estructuras virales (TM/CA o MA/CA), se obtienen pruebas más sensibles (Rosati et al, 2004).

Los antígenos derivados de genotipo A son más adecuados para detectar anticuerpos de reacción heteróloga, que los antígenos derivados de genotipo B o E (de Andrés et al, 2013; San José et al, 2015). Las dificultades 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, factores que también limitan otras pruebas. El uso de péptidos sintéticos podría permitir el desarrollo de pruebas de diagnóstico a medida que se ajusten a los epítopes específicos del genotipo viral bajo investigación (San José et al, 2015).

La técnica de PCR permite un 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 o de tamizaje (Sanjosé et al, 2015). Como se menciona, 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 objeto de diseño 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 LTR están más conservadas en comparación con el gen *env*, que tiene la mayor variabilidad, lo que lo hace menos adecuado para ser empleado en el diagnóstico, a diferencia de la región *gag* (Cruz et al, 2009; Gómez et al, 2018).

Los monocitos de sangre periférica que son células diana del virus se utilizan como muestra para el diagnóstico molecular por PCR. Teniendo en cuenta que estas células corresponden a una pequeña proporción de las células circulantes en sangre periférica y que sólo alrededor de  $1/10^6$  de los leucocitos contienen al virus, los ensayos de PCR pueden no amplificar el material genético porque la cantidad de molde está por debajo del límite de detección de la prueba (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.

Los SRLV se han detectado mediante técnicas de PCR en muestras de campo que utilizan sangre, leche y semen, pero la mayoría de estas técnicas tienen una sensibilidad menor que la del ELISA y deben validarse oficialmente antes de una aplicación más extensa (Ramírez et al, 2009).

Pruebas como el radioinmunoensayo (RIA), la radioinmunoprecipitación (RIPA) y el western blot (WB), las cuales se consideran pruebas complementarias, son discriminadores útiles para los resultados indeterminados obtenidos en los análisis de detección por ELISA y PCR, aunque se debe tener cuidado con los resultados, ya que no son métodos estandarizados para el diagnóstico de SRLV, aunque sirven en el establecimiento de un estándar de oro artificial (de Andrés et al, 2005; Ramírez et al, 2009). El uso de ensayos relevantes y sensibles se vuelve esencial a medida que se busca el diagnóstico oportuno y el establecimiento de medidas de control (de Andrés et al, 2013).

El título de anticuerpos puede variar a lo largo de la vida del animal, lo que puede llevar a un diagnóstico erróneo por ELISA. Estos hallazgos, junto con la alta variabilidad genética / antigénica inherente a estos virus y la baja carga viral, hacen que una sola técnica no sea suficiente para usar como "estándar de oro" que determine el estado de infección o no del animal. En ausencia de este estándar, la positividad de al menos dos técnicas de diagnóstico, basadas en la detección relacionada con anticuerpos o virus, se ha utilizado en algunos estudios como criterio para la presencia de infección. La seroconversión puede reaparecer esporádicamente, disminuyendo el valor del rebaño (de Andrés et al, 2013).

Por último, debido al curso crónico de la enfermedad, cuyos cuadros clínicos se caracterizan muchas veces por ser subclínicos el diagnóstico a través de la semiología es una opción que no resulta viable, además los signos apreciados pueden relacionarse a otras etiologías (de Andrés et al, 2005).

## **ESTRATEGIAS DE CONTROL**

Determinar la prevalencia de la infección ha de ser la primera acción en cualquier programa de control. Posteriormente, el objetivo debería ser disminuir la seroprevalencia y finalmente erradicar la infección (Peterhans *et al*, 2004). A nivel de rebaño, se han identificado muchos factores que afectan la progresión de la infección, denominados factores de riesgo. Algunos de ellos pueden explicarse a través de otros principales, que incluyen el tamaño del rebaño, siendo 70 individuos el límite por encima del cual existe un mayor riesgo de infección lentiviral, y el tipo de producción, ya que se ha encontrado una seroprevalencia mayor en sistemas intensivos que en semi-intensivos y extensivos. Son los factores de riesgo claros los que permiten un análisis y aproximación a las estrategias de control aplicables para cada productor según sus necesidades y posibilidades (Gómez et al, 2018; Bojar et al, 2018).

Debido a que no existe un tratamiento o vacunas eficaces disponibles, el control de la infección por SRLV siguen siendo el único enfoque para evitarlo. Estos programas se basan en el diagnóstico oportuno y conveniente manejo de los animales infectados, así como de la implementación de estrategias que eviten la diseminación del virus (Reina *et al*, 2009).

La recomendación que se ha establecido es la realización de un monitoreo anual de los rebaños de animales de más de 7 meses de edad. Se debe elegir un programa de control, adaptado al sistema de

producción, a la prevalencia y a las condiciones de manejo de cada productor. De acuerdo a la seroprevalencia, los rebaños se clasifican en: alta (> 50%), intermedia (20-50%), baja (10-20%), muy baja (1-9%) y negativa o libre de LvPR. 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 LvPR difiere entre países de 2 a 5 pruebas, llevadas a cabo cada 6 meses, anualmente o cada 2 años (Rowe and East, 1997; Reina *et al*, 2009). El sacrificio de animales infectados y su sustitución por animales libres de SRLV fue la estrategia efectiva para controlar la epidemia en Islandia (Blacklaws *et al*, 2004). Por otro lado, los programas de erradicación de los gobiernos en Oceanía han tenido buenos resultados (Rowe and East, 1997).

El aislamiento de los neonatos 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 procedente de hembras no infectadas, con calostro tratado térmicamente o con fórmulas comerciales. La reintroducción de los animales jóvenes al rebaño conlleva el riesgo de que éstos sean infectados por otros animales por vía horizontal, por lo que, a partir de entonces, deben incluirse en el monitoreo serológico (Reina *et al*, 2009).

Actualmente se hace referencia al tratamiento térmico del calostro, un tratamiento durante 30 minutos a una temperatura de entre 56 a 58° C o a 45°C durante 60 minutos, impide la transmisión de SRLV a los neonatos. El calostro puede calentarse y mantenerse en una botella o congelarse para su posterior uso. Cuando se supera una temperatura de 59° C, el calostro tiende a sufrir desnaturalización de las inmunoglobulinas y a desarrollar grumos. Este calostro sobrecalentado debe descartarse, ya que generalmente produce diarrea osmótica además de no contener las inmunoglobulinas en calidad y cantidad necesarias. Muchos estudios han informado una reducción significativa en la seroprevalencia del rebaño asociada a la crianza con calostro pasteurizado (Rowe & East, 1997), por lo tanto, es una estrategia de control adaptable a muchos productores y sus sistemas, por ser una alternativa económica.

Se considera que la infección por SRLV conduce a una disminución de la producción, enfermedad clínica, sacrificio temprano y restricciones comerciales, pero los programas de control también son costosos, por lo tanto, ha de analizarse el costo/beneficio antes de su implementación (Minguijón *et al*, 2015). Estudios

realizados han permitido ver que todas las medidas de parámetros de productividad han estado reducidas en los grupos seropositivos tanto para cabras como para ovejas (Gómez et al, 2018). Así es como el efecto de la infección en la producción de leche es un tema controvertido, porque hay estudios que evidencian los efectos económicos de la infección en la producción de leche, también hay referencias que indican que la producción de leche se ha encontrado inalterada en pequeños rebaños. Esto no es lo común y puede explicarse por la disminución de la virulencia de las cepas virales, entre varias otras razones (Minguijón et al, 2015; Aragão et al, 2017).

La mayoría de programas de control se centran en la eliminación de animales infectados y su progenie. Esta estrategia cubre dos factores de riesgo que son la susceptibilidad heredada y la transmisión vertical. Por otro lado, los avances en la identificación de marcadores genéticos de resistencia/susceptibilidad a las infecciones por SRLV pueden permitir la selección de animales genéticamente resistentes a través de la selección asistida por marcadores (Minguijón et al, 2015). Las perspectivas de control apuntan a lo mencionado porque ciertas razas se han asociado consistentemente con probabilidades más altas o más bajas de infección. Además, las diferencias de raza en la prevalencia y la concentración proviral indican una fuerte base genética para la susceptibilidad a la infección por SRLV en ovejas (Gómez et al, 2018).

Sin embargo, aunque los hallazgos prueben que existe resistencia genética, la implementación de programas de selección enfrenta problemas a evaluar, como son: la pérdida de variabilidad genética asociada con la selección, posible obstáculo del progreso genético logrado en rasgos productivos, equilibrio de producción/infección y eficiencia en términos de costo/beneficio; teniendo en cuenta las pérdidas de producción, los costos del diagnóstico de infección, los costos de detección de marcadores, costos de cría y sacrificio. Al igual que en otras enfermedades, la selección que favorece la resistencia puede interferir con la selección centrada en producción, así que los científicos y los mejoradores pueden adoptar la resiliencia en lugar de la resistencia como un objetivo más realista (Minguijón et al, 2015). La eliminación y los problemas a evaluar de la selección basada en resistencia, son factores que deberían contemplarse con cuidado en programas de conservación de recursos genéticos de especies o ganado en peligro de extinción, con un número relativamente bajo de animales (Cruz et al, 2009), en los que la estrategia de control recae en otros aspectos a evaluar más adelante.

## JUSTIFICACIÓN

Estudios realizados que han detectado SRLV en el semen han identificado tanto la presencia de anticuerpos como ADN proviral en las células de este fluido. La tendencia en la utilización de biotecnología reproductiva como parte esencial de la producción en programas de mejoramiento genético, sumado a las consideraciones ya mencionadas sobre esta infección lentiviral, en especial a la falta de signos clínicos en ovinos infectados en el país, destacan la importancia de la detección temprana con el fin de establecer estrategias de prevención y control que propendan la reducción de la transmisión por esta vía, así como hallar alternativas diagnósticas más eficientes.

## OBJETIVO GENERAL

Detectar ovinos machos infectados por Lentivirus de Pequeños Rumiantes mediante el uso de técnicas serológicas y moleculares en sangre periférica y semen.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◊ Identificar la presencia de anticuerpos contra LvPR utilizando un ELISA indirecto basado en el uso de la proteína recombinante p16, en muestras de plasma y fluido seminal.
- ◊ Identificar ADN proviral en leucocitos de sangre periférica y células espermáticas de ovinos, utilizando la técnica de PCR anidada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

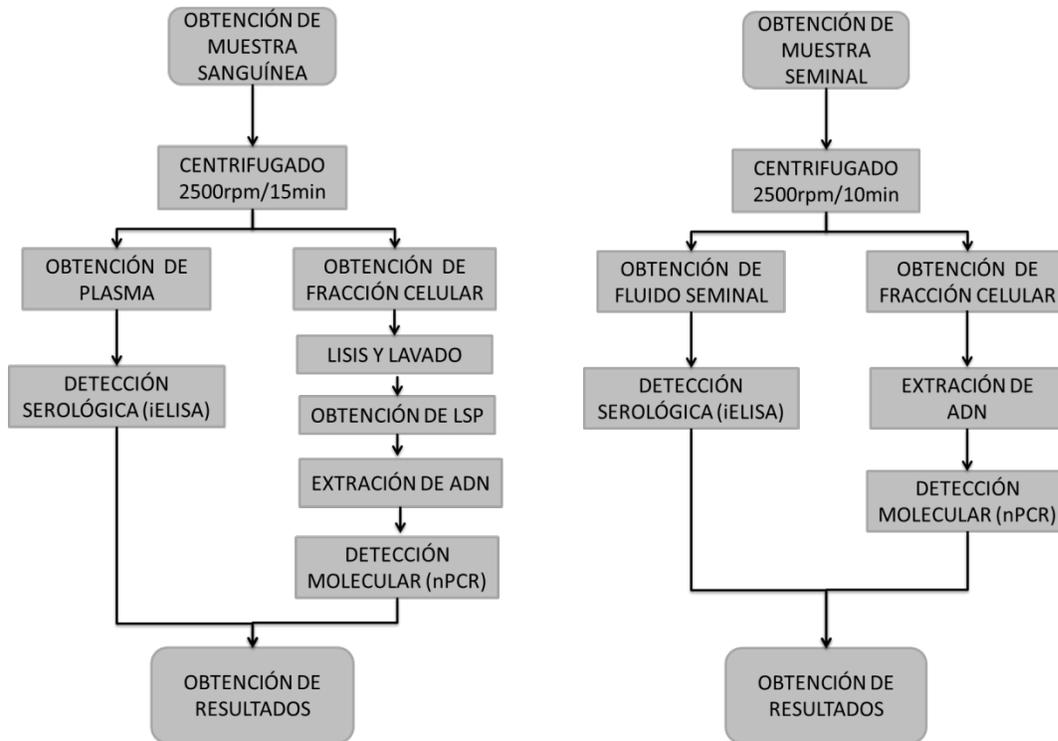


Figura 3. Diagrama de flujo del procesamiento de muestras de sangre y semen de ovinos para la detección serológica y molecular de ISRLV.

### Colección de muestras

El trabajo se realizó con la colaboración de productores cooperantes. Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico en rebaños ovinos, de machos de más de 7 meses de edad, sin distinción de raza, de diferentes predios ubicados en los Estados de México e Hidalgo. El total de ovinos machos muestreados fue de 73 animales procedentes de diferentes municipios. La obtención de muestras de sangre se realizó por punción de la vena yugular, fue colectada en tubos estériles Vacutainer® con heparina. El semen se colectó en tubos Falcon™ de 15 ml estériles con la ayuda de vagina artificial o electroeyaculador según la edad y condiciones de los machos en estudio. Las muestras fueron refrigeradas en una nevera de poliestireno para su transporte y posterior procesamiento en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán.

## Procesamiento de las muestras

Sangre: se realizó la separación de las fracciones mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos con el fin de obtener el plasma sanguíneo, que fue utilizado para el diagnóstico serológico mediante un ELISA indirecto basado en la proteína de matriz (p16), y el botón de células que posteriormente se sometió a un proceso de lisis y lavado (anexo 1) para recuperar los leucocitos de sangre periférica (LSP), de los que se extrajo el ADN para la realización de la detección de ADN proviral de SRLV por PCR. Tanto el plasma como los leucocitos de sangre periférica se colectaron en tubos Eppendorf™ de 1,5 ml y se conservaron a -70° C.

Semen: las muestras de semen fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos para separar el fluido seminal y el botón de células seminales, cada uno de los cuales se dispuso en tubos Eppendorf™ de 1,5 ml y se conservaron a -70° C. El plasma seminal fue usado para el diagnóstico serológico por ELISA indirecto y las células seminales se procesaron para obtener el ADN, que posteriormente se utilizó en la detección de LvPR por PCR.

La extracción de ADN se hizo mediante la utilización del kit comercial FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Pingtung, Taiwan), 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.

## Detección molecular

Para la detección molecular de animales positivos se utilizó una técnica de PCR anidada que tuvo como blanco amplificar una región parcial del gen *gag* del genotipo "A", a partir de ADN proviral de Lentivirus de Pequeños Rumiantes. En la detección se utilizaron los siguientes iniciadores (Acevedo, 2018) GAG A FW1 y GAG A RV1 para obtener un primer producto de amplificación 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. Los reactivos utilizados en la primera ronda de PCR, utilizando una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL fueron: Buffer 1X (AMPLIQON, Dinamarca), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> (AMPLIQON, Dinamarca), 230 µM de dNTPs (Kapa Biosystems), 600 nM de cada iniciador, 5 U de Taq polimerasa (AMPLIQON, Dinamarca), 700 ng de ADN y agua grado biología molecular para aforar. En la segunda reacción se adicionaron 5 µL del producto de la primera reacción en una dilución 1:5, sustituyendo los 700 ng de ADN. Las condiciones de amplificación para ambas rondas de PCR fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95° C, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95° C por 40 segundos, alineamiento a 47° C por 40

segundos y extensión a 72° C por 50 segundos, finalizando con una extensión a 72° C por 5 minutos (cuadro 1). Como control positivo se usó ADN complementario retrotranscrito obtenido previamente en el laboratorio.

Cuadro 1. Condiciones de la PCR anidada para amplificar un fragmento del gen *gag* de SRLV en muestras de ADN obtenidas de semen y leucocitos de ovinos.

REACTIVOS		CONDICIONES PARA AMBAS REACCIONES
1° Reacción	2° Reacción	
♦Agua grado biología molecular	♦Agua grado biología molecular	
♦Buffer 1X	♦Buffer 1X	
♦MgCl <sub>2</sub> : 2.0 mM	♦MgCl <sub>2</sub> : 2.0 mM	
♦dNTPS: 230 µL	♦dNTPS: 230 µL	
♦Iniciadores: 600 nM c/u	♦Primers: 600 nM c/u	
♦Taq Polimerasa: 5 U	♦Taq Polimerasa: 5 U	
♦ADN: 700 ng	♦Primer producto: 5µL	
Volumen de reacción 25µL	Volumen de reacción 25µL	

Se llevó a cabo una PCR punto final de las muestras que resultaron negativas en la detección molecular, con el fin de evaluar la integridad del ADN. Dicha prueba consistió en la detección de un segmento del gen constitutivo de la succinato deshidrogenada (SDHA). Los iniciadores amplifican un producto de 348 pb: SDHA – FW (5'- CATGGAGGAGGACAACACTG-3') y SDHA – RV (5'-TGGTAGATCTTCCCATCTTC-3') y se utilizaron los siguiente reactivos por reacción para un volumen final de 25 µl: Buffer 1X (AMPLIQON, Dinamarca), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (AMPLIQON, Dinamarca), 230 µM de dNTPs (Kapa Biosystems), 600 nM de cada iniciador, 5 U de Taq polimerasa (AMPLIQON, Dinamarca), 300 ng de ADN y agua grado biología molecular para aforar. En este caso las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial por 5

minutos a 95° C, seguidos por 45 ciclos de desnaturalización a 95° C por 40 segundos, alineamiento a 53° C por 35 segundos y extensión a 72° C por 40 segundos, finalizando con una extensión a 72° C por 5 minutos (cuadro 2), siguiendo el protocolo de Acevedo, 2018.

Cuadro 2. Condiciones de la PCR punto final para amplificar un fragmento del gen constitutivo SDHA en muestras de ADN obtenidas de semen y leucocitos de ovinos.

REACTIVOS	CONDICIONES
<ul style="list-style-type: none"> <li>♦Agua grado biología molecular</li> <li>♦Buffer 1X</li> <li>♦MgCl<sub>2</sub>: 1.5 mM</li> <li>♦dNTPS: 230 µL</li> <li>♦Iniciadores: 600 nM c/u</li> <li>♦Taq Polimerasa: 5 U</li> <li>♦ADN: 300 ng</li> </ul>	
<p>Volumen de reacción 25µL</p>	

Los productos obtenidos de la PCR se cargaron en geles de agarosa al 1.5% y la electroforesis se llevó a cabo con TAE 1X a 110 Volts durante 1 hora. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 µg/ml) para su posterior observación usando un transiluminador de luz ultravioleta (UVP, M-20E, USA).

#### Detección serológica

El diagnóstico serológico de la infección se realizó mediante una técnica de ELISA indirecto en el que se usó una proteína recombinante de la proteína de matriz (MA) p16 derivada de un SRLV del genotipo B como antígeno (proporcionado amablemente por la Dra. Laura Cobos). La placa fue sensibilizada con este antígeno durante 18 horas, a una temperatura de entre 4 y 8°C. Para el bloqueo de sitios inespecíficos se utilizó caseína al 2.5%. El plasma sanguíneo fue diluido 1:10 con caseína al 1.5%, misma que se utilizó

para la preparación del conjugado (Proteína G peroxidasa). En el caso del fluido seminal no se realizó dilución. Entre cada paso se hicieron incubaciones de 1 hora, a 37° C y lavados con solución de PBS + Tritón. Por último, se agregó ABTS como sustrato para posteriormente realizar la lectura de la absorbancia en un lector de placas a 405 nm de longitud.

## RESULTADOS

### ELISA

Las muestras analizadas mediante serología (iELISA) fueron consideradas como positivas al tener un valor mayor o igual a 0.5, negativas con valor menor o igual a 0.4 e indeterminadas al tener un valor  $<0.5/>0.4$ . Se corrigieron las lecturas de absorbancia promediando las lecturas de los dos pozos con antígeno y restando el valor de lectura del pozo sin antígeno al valor obtenido del promedio, este resultado se contrastó con el punto de corte establecido en el laboratorio para este ELISA-p16 (Zamora, 2020).

Fueron evaluados los 73 machos del estudio mediante ELISA-p16 utilizando las muestras de plasma sanguíneo y fluido seminal obtenidos, excepto en el caso de 8 machos de los cuales no se contó con alguna de las dos muestras. De 3 individuos se obtuvo muestra de plasma sanguíneo pero no de fluido seminal y de 5 individuos se contó con fluido seminal más no con plasma sanguíneo. De los ovinos evaluados por serología, 5 resultaron positivos al ELISA de plasma sanguíneo y ninguna muestra de fluido seminal se identificó positiva.

### PCR

Las muestras analizadas mediante PCR para detectar el ADN proviral de SRLV, fueron consideradas como positivas al observar una banda de 578 pb como producto esperado (figura 4). Para el caso del gen constitutivo SDHA se observó una banda de 348 pb como producto esperado para la PCR (figura 5).

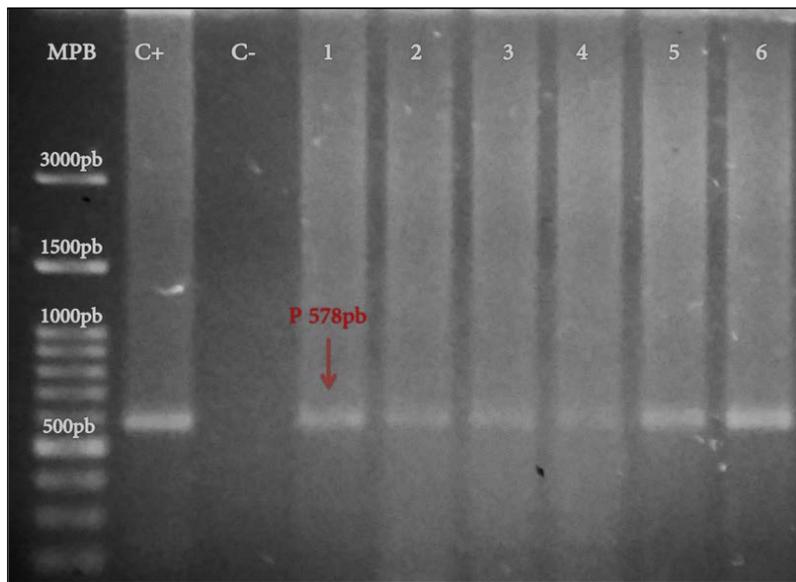


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR – *gag A*. MPB = Marcador de pares de bases. C+= Control positivo. C-= control negativo. 1-6= Muestras. P= Producto esperado de 578 pb.

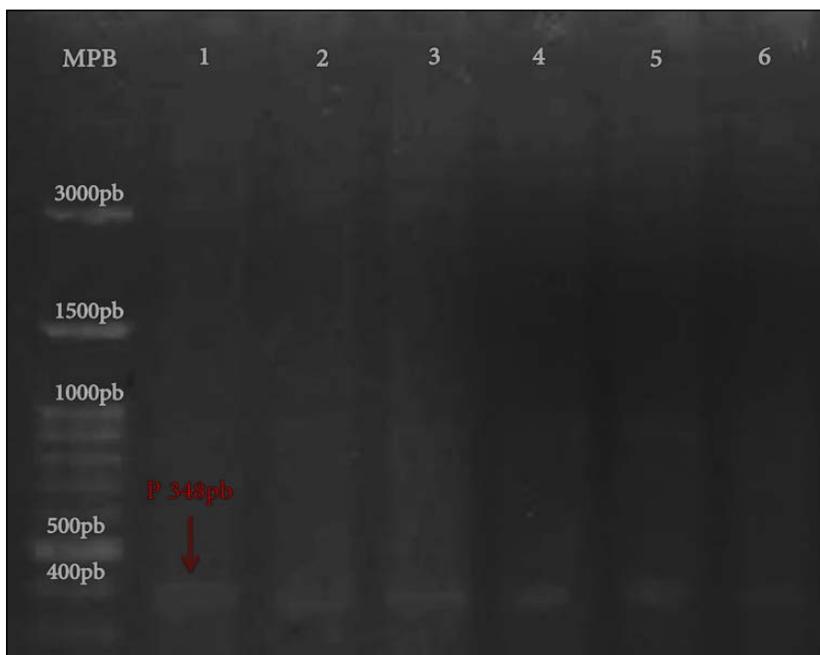


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR – *SDHA*. MPB = Marcador de pares de bases. 1-6= Muestras negativas a la PCR – *gag A*. P= Producto esperado de 348 pb.

Fueron evaluados los 73 machos del estudio mediante PCR a partir de ADN derivado de células seminales y LSP, a excepción de 8 machos de los cuales no se contó con alguna de las dos muestras. De 5 individuos se tenía muestra de células seminales pero no de LSP y de 3 individuos viceversa.

El ADN extraído tanto de los LSP como de las células seminales se evaluó con PCR anidada para el gen *gag* del genotipo A. De los ovinos evaluados 23 resultaron positivos a la PCR de LSP, 32 a la PCR de células seminales y 14 a la prueba para ambas muestras. De esta manera 9 animales fueron detectados positivos solo para muestras de LSP y 18 animales solo para muestras de células seminales, para un total de 41 ovinos positivos por PCR (cuadro 4).

El ADN extraído de los LSP y células seminales de los animales negativos a ambas PCR se evaluó con la PCR del gen constitutivo (SDHA) y se halló que todas las muestras resultaron positivas, corroborando la integridad del ADN (figura 5).

Cuadro 3. Resultados de la detección serológica y molecular, por los municipios en los que se obtuvieron animales positivos.

N° ANIMAL	MUNICIPIO	ELISA-p16		nPCR	
		FS	PS	LSP	CS
1	Zumpango	-	-	+	+
2	Zumpango	-	-	+	+
3	Zumpango	-	-	+	-
4	Zumpango	-	-	+	+
5	Zumpango	-	-	+	+
6	Zumpango	-	-	+	-
9	Zumpango	-	0	0	+
10	Zumpango	-	-	-	+
11	Zumpango	-	-	-	+
12	Zumpango	-	-	-	+
15	Zumpango	-	-	+	-
18	Zumpango	-	-	+	-
19	Zumpango	-	-	+	+
21	Zumpango	-	-	+	+
22	Zumpango	-	-	+	+

24	Zumpango	-	0	0	+
25	Zumpango	-	-	-	+
26	Zumpango	-	-	+	-
27	Zumpango	-	-	+	+
28	Zumpango	-	-	-	+
29	Zumpango	-	-	+	-
30	Zumpango	-	-	+	-
35	Zumpango	-	-	-	+
36	Zumpango	-	-	-	+
37	Zumpango	-	-	-	+
38	Zumpango	-	-	+	-
39	Zumpango	-	0	0	+
40	Zumpango	-	+	+	+
41	Zumpango	-	-	+	+
42	Zumpango	-	-	+	+
43	Zumpango	-	-	+	+
44	Zumpango	-	-	-	+
45	Zumpango	0	+	-	0
46	Zumpango	-	-	+	+
50	Zumpango	-	-	-	+
51	Zumpango	-	+	+	+
53	Zumpango	-	-	-	+
54	Zumpango	-	-	-	+
55	Zumpango	-	+	-	+
69	Ixmiquilpan	-	-	-	+
70	C. Izalli	-	-	-	+
71	C. Izalli	-	-	+	-
73	C. Izalli	-	+	-	-

ELISA-p16: ELISA indirecto basado en la proteína p16 de LvPR; nPCR: PCR anidada; FS: fluido seminal; PS: plasma sanguíneo; LSP: leucocitos de sangre periférica; CS: células seminales; +: positivo; -: negativo; 0: muestra no colectada.

Tres de los animales positivos evaluados por PCR, coincidieron en este resultado con los datos obtenidos del ELISA-p16, confirmando así el diagnóstico. Dos de los cinco machos seropositivos coincidieron con los resultados de PCR para ambas muestras y uno de ellos coincidió con un resultado positivo para PCR de células seminales (cuadro 4).

El total de animales evaluados fue de 73, de los cuales 43 resultaron positivos por una o ambas técnicas de diagnóstico. 5 de los machos fueron evaluados solo a partir de muestras derivadas de semen y 3 machos solo de las muestras derivadas de sangre.

Cuadro 4. Total de animales evaluados mediante técnicas serológica y molecular, con los resultados que coinciden en ambas técnicas.

<b>POSITIVOS = 43</b>					
ELISA-p16 = 5			nPCR = 41		
FS	PS	A	LSP	CS	A
0	5	0	23	32	14
<b>CONCORDANTES = 3</b>					
ELISA-p16 PS – nPCR CS <sup>a</sup>			ELISA-p16 PS – nPCR LSP & CS <sup>b</sup>		
1			2		

ELISA-p16: ELISA basado en p-16; nPCR: PCR anidada; FS: fluido seminal; PS: plasma sanguíneo; A: ambos; LSP: leucocitos de sangre periférica; CS: células seminales; a: positivos para ELISA-p16 en plasma sanguíneo y en nPCR de células seminales; b: positivos para ELISA-p16 en plasma sanguíneo y en nPCR tanto de leucocitos de sangre periférica como de células seminales.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se identificaron ovinos infectados por lentivirus de pequeños rumiantes tanto en leucocitos de sangre periférica como en células seminales, detectando la presencia de ADN proviral por PCR y en pocos casos por la presencia de anticuerpos contra SRLV en plasma.

Pese a la aparente poca importancia que tienen órganos diferentes a los ya bien caracterizados, los cuales tienen un tropismo marcado del virus y están relacionados a la presentación clínica, alta replicación, participación en la transmisión y epidemiología de los SRLV (Sánchez et al, 2016); diferentes estudios permiten esclarecer y confirmar la presencia e infección de células de los órganos sexuales de machos y hembras por lentivirus (Martínez et al, 2005; Fieni et al, 2012), lo que hace algún tiempo era objeto de controversia (Pépin et al, 1998). A través de diferentes investigaciones se demuestra la presencia de ADN proviral en los tejidos del tracto genital de machos infectados naturalmente y se puede confirmar que esta infección se acompaña de la presencia de provirus y ARN en plasma seminal y en elementos celulares de semen. Se ha demostrado la posibilidad de transmisión por semen durante el apareamiento o inseminación artificial (Ali Al Ahmad et al, 2008; Cruz et al, 2009; Fieni et al, 2012).

Se han establecido diferentes situaciones de riesgo que demuestran que los SRLV se transmiten sexualmente: 1. Recolección de semen de machos infectados y detección del agente en la muestra; 2. Inseminación *in vivo* en ovejas no infectadas, y 3. El establecimiento de signos de infección en esas hembras (Peterson et al, 2008). Los autores reportaron hallazgos de la eliminación del ADN proviral en el semen de pequeños rumiantes, así como resultados positivos de ADN en tejidos genitales; los cuales respaldan el primer paso para probar la transmisión sexual de SRLV. Resultados de otros autores citados antes y a continuación, sirven para respaldar los otros dos pasos, en particular *Costa de Souza et al, (2013)* concluyen que la transmisión por semen infectado experimentalmente es una posibilidad clara. El aporte del presente trabajo a esa hipótesis, fue dar sustento a la primera situación de riesgo, ya que se colectó y detectó ADN proviral de SRLV en semen de ovinos por PCR.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede apreciar que la PCR permite el diagnóstico molecular de machos ovinos infectados por SRLV, a través de células seminales (CS) y de leucocitos de sangre periférica (LSP). Sin embargo, los datos obtenidos resultaron discordantes entre las

muestras evaluadas por PCR. La detección por PCR fue mayor en muestras de CS, mientras que la detección por PCR en LSP resultó menor y aún más escasa fue la detección serológica en el plasma sanguíneo; y mucho más contrastante fue la falta de detección de anticuerpos en las muestras de fluido seminal, que en ningún caso se obtuvieron resultados positivos, adicional a esto, hubo una moderada asociación entre los resultados de PCR positivos en sangre y PCR positivos en células seminales, como ya se ha informado en otros estudios (Peterson et al, 2008; Ramírez et al, 2009).

Estas diferencias en la detección entre la prueba de ELISAI-p16 y la nPCR pueden ser debido al genotipo infectante en los animales de estudio. Otra hipótesis de la discrepancia de los resultados puede estar relacionada a que los medios diagnósticos utilizaban objetivos diferentes. La proteína recombinante del ELISA indirecto fue una proteína de matriz del genotipo B, mientras los cebadores para el diagnóstico molecular fueron diseñados para hibridarse en el gen *gag* de lentivirus del genotipo A, esta última prueba identificó más animales infectados que la primera. Esta diferencia en el diseño de las técnicas pudo contribuir en el aumento de la cobertura de detección de la infección, pero no necesariamente el resultado de una prueba confirmaría el de la otra. Por otro lado, infecciones recientes y la tardía seroconversión, aunado a que se desconoce el momento de infección de los animales, pueden ser causas de las bajas detecciones serológicas con ELISA.

Resultados similares, basados en diferentes metodologías de diagnóstico se han reportado con anterioridad, guardando diferencia en el número de muestras evaluadas, Cruz et al (2009) obtuvieron 4 animales con resultados discordantes. Por otro lado, en otro estudio se hallaron animales "discrepantes" que por serología fueron positivos en fluido seminal y negativos en suero o viceversa. Animales positivos solo a PCR de células seminales también fueron hallados. En el mismo estudio, una de las pruebas de ELISA solo detectó un animal en plasma sanguíneo y ninguno en fluido seminal (Ramírez et al, 2009), como sucedió en el presente trabajo. En el estudio mencionado se estableció la infección con el uso de un estándar de oro de acuerdo con el criterio "al menos dos positivo en las pruebas utilizadas", debido a que no existe una técnica que por sí sola permita la detección de la infección (Ramírez et al, 2009), sin embargo, resulta limitado realizar el establecimiento de un estándar de oro en el presente trabajo porque el número de recursos diagnósticos fue menor, aunque en 3 machos se haya establecido el diagnóstico de al menos dos resultados positivos a diferentes pruebas y en 14 ovinos al menos en dos muestras distintas del mismo animal, utilizando la misma técnica.

En contraste a los animales que siendo seronegativos en plasma sanguíneo y fluido seminal, se encontraron PCR-positivos en semen; en el estudio de Ramírez et al, (2009) se hallaron animales infectados que fueron negativos para la PCR de muestras seminales, tal vez debido a una disminución de la sensibilidad de la PCR en el semen en comparación con la de la sangre o un período de bajo nivel de infección relacionado al provirus que se ha descrito en otros estudios (Peterson et al, 2008). De igual manera, la PCR y secuenciación que realizaron para comparar células seminales versus células sanguíneas, indicaron que el provirus se detectó con mayor frecuencia en sangre que en semen, corroborando esto en los resultados de Alialmahad et al, (2018) y Peterson et al, (2008), y contrastando con los resultados del presente estudio en los que la frecuencia de detección fue mayor en el semen.

Resultados negativos obtenidos a partir de una PCR de células seminales pueden atribuirse a un bajo rendimiento de ADN en estas fracciones de las muestras, por lo que algunos autores han agrupado varios eyaculados para aumentar el número de células y tratar de garantizar que resultados negativos no se deban a este factor (Reina et al, 2011). Esto no se pudo realizar en este trabajo.

Se han realizado trabajos con resultados de alta correlación entre las pruebas serológicas y PCR (Peterson et al, 2008), y otros en los que la presencia de ADN proviral en el semen de machos infectados naturalmente tiene una correlación positiva con la presencia del virus en la sangre, con casi la mitad de los animales positivos en semen y en los análisis de sangre; aun así, los mismos estudios reportan machos con PCR negativa para células sanguíneas que excretan SRLV en algunas fracciones de semen infectado. Por lo tanto, la detección molecular de ADN proviral en los monocitos sanguíneos no es un método confiable para seleccionar animales con semen libre de SRLV, ya que la ausencia de carga proviral en la sangre no descarta la excreción del agente patógeno en el plasma seminal (Ali Al Ahmad et al, 2008), ya que podría argumentarse que los resultados positivos en la PCR requieren un cierto nivel de replicación viral en el huésped para que el ADN proviral esté presente en una muestra de sangre específica (Peterson et al, 2008). Además, los reservorios de la población de virus en el semen pueden ser distintos de los de la sangre y probablemente esto se relacione con la falta de correlación entre la presencia del virus en sangre y la eliminación en semen (Cruz et al, 2009). Los reservorios celulares potenciales de SRLV en eyaculados incluyen células no espermáticas, como macrófagos, células germinales inmaduras y células de revestimiento epitelial (Peterson et al, 2008; Lamara et al, 2013).

Los resultados de nuestro estudio fueron obtenidos a través del uso de una PCR anidada y ELISA indirecto. La PCR se ha descrito útil como técnica confirmatoria para detectar infecciones en el semen, proporcionando datos para establecer el estado de infección porque las técnicas serológicas indirectas pueden no detectarla en etapas particulares de la vida, dado que la producción de anticuerpos puede variar durante la vida del animal, de manera que la PCR sirve para el diagnóstico en infecciones tempranas o en etapas de eliminación del virus (Peterson et al, 2008). Además, la PCR proporciona información útil sobre epidemiología molecular, ya que es de uso especial para determinar la propagación de infecciones relacionadas con el macho y los tipos genéticos virales de la población en estudio a través de la secuenciación (Ramírez et al, 2009).

La PCR anidada se ha definido como una técnica con alta especificidad y sensibilidad. Varios estudios han descrito el uso de métodos de PCR en sangre y otros tejidos, aunque se han hecho pocas estimaciones de sensibilidad y especificidad, se ha descrito que los iniciadores diseñados en la región *gag* detectaron carga proviral en un 60% de los animales de estudio *in vivo* (Cruz et al, 2009). Otros estudios (Ali Al Ahmad et al, 2008) demostraron la presencia de ADN proviral en semen y tejido reproductivo de machos por PCR, basado precisamente en el uso de iniciadores para una región del gen *gag* (Cruz et al, 2009), mientras otras PCR han variado su validez en diferentes estudios (Peterson et al, 2008; Oliveira et al, 2009).

Entre las limitantes de la prueba, existen dos dificultades principales para desarrollar PCR adecuadas: la variación de cepa y la carga proviral (Cruz et al, 2009). Adicionalmente, la baja asociación de resultados, junto con la liberación intermitente de virus (Peterson et al, 2008), puede dificultar el desempeño de la PCR como única técnica de diagnóstico a gran escala en el semen, porque además puede arrojar información limitada como se ha observado en este y en otros trabajos (Ali Al Ahmad et al, 2008; Peterson et al, 2008; Ramírez et al, 2009).

Se considera que las técnicas de diagnóstico utilizadas en el presente estudio son adecuadas para la detección de SRLV en machos ovinos, ya que diversos autores han descrito su efectividad y los resultados obtenidos que aunque han sido similares en cuando a discrepancias, han permitido establecer el estado de la infección en los animales evaluados. Además se muestra la importancia del uso de varios métodos diagnósticos para aumentar la confiabilidad de los resultados, esto debido a las limitantes que presenta cada prueba, según las muestras utilizadas y que en base a ello no existe aún la técnica perfecta para la

detección de SRLV, es por ello que se recomienda la utilización de serología y PCR como pruebas complementarias, para una óptima detección de animales infectados (Cruz et al, 2009).

Bien se podría emplear la prueba serológica en el fluido seminal para detectar de forma segura la infección por SRLV en machos asintomáticos. Por su puesto, tomando en cuenta que la prueba contenga la genética/antígenos que se encuentre infectando a los animales. Epidemiológicamente puede resultar útil, en especial para el caso en que los machos empleados no pueden ser evaluados de manera directa, y solo se cuente con el semen, máxime si los hallazgos histológicos sugieren la multiplicación y diseminación del virus en el tracto reproductor, lo que indica el valor del semen como muestra en el diagnóstico para SRLV (Martínez et al, 2005; Ramírez et al, 2009). Por su parte Peterson et al, (2008) recomiendan tomar una muestra de sangre y no de semen, para determinar si un donante de semen individual está infectado.

No obstante, los resultados obtenidos en el presente trabajo con el fluido seminal no permiten apoyar lo mencionado anteriormente, ya que la técnica empleada no permitió la detección serológica en muestras de fluido seminal, posiblemente a que hay dificultad en el uso de fluido seminal como muestra por la disminución en la concentración de anticuerpos en comparación con la del suero, además, un animal puede tener una infección del tracto reproductivo conducente a síntesis local de inmunoglobulinas que pueden no estar relacionado con las concentraciones sistémicas, ya que el título de anticuerpos locales presentes en el líquido seminal aumenta con la exposición al antígeno local, de manera que también se relaciona al tiempo de infección (Ramírez et al, 2009). Sin embargo, la baja detección de animales seropositivos en plasma refuerza la hipótesis, de que la baja detección de animales seropositivos se relacionó con el antígeno del genotipo B utilizado en las pruebas de ELISA, probablemente si se hubiera utilizado un ELISA basado en antígenos del genotipo A se podría haber obtenido resultados positivos en el fluido seminal, sin embargo, no se realizó.

Una observación común a tener en cuenta para explicar los resultados, además del subtipo viral infectante utilizado en las técnicas, es cuán errática es la presencia de anticuerpos (Gómez et al, 2018). Las pruebas serológicas se aplican rutinariamente para detectar infecciones por SRLV, aunque los ELISAs modernos son altamente sensibles y específicos a nivel de animales individuales, la seroconversión puede ser relativamente lenta y variable, y no existe una relación simple entre el momento de conversión y el momento real de infección (Peterson et al, 2018), al ser una enfermedad crónica que puede presentar un

largo período de seroconversión y los animales infectados pueden permanecer asintomáticos durante años (Oliveira et al, 2009).

El hallazgo de ovinos positivos a PCR con resultados seronegativos consistentemente y ovinos seropositivos pero constantemente negativos para tres PCR empleadas en un estudio realizado en ovinos españoles, confirma los hallazgos obtenidos en el presente estudio y se considera como una confirmación adicional del valor diagnóstico complementario de ambos métodos en infecciones lentivirales asintomáticas (Pinczowski et al, 2017), además confirma que un problema general en el diagnóstico es que las pruebas que detectan anticuerpos y las que detectan el genoma proviral pueden dar resultados opuestos. Aunque las discordancias pueden estar relacionadas con las pruebas de diagnóstico en sí mismas, es más probable que estén asociadas con la evolución de los anticuerpos y la presencia de ADN proviral en las células de los animales (Gómez et al, 2018).

Se sabe que en la infección lentiviral, la respuesta serológica y los resultados de la PCR pueden ser intermitentes y modificados durante el curso de la infección (Pinczowski et al, 2017), además que la probabilidad es relativamente reducida de encontrar resultados positivos para PCR en diferentes muestras biológicas (Ramírez et al, 2019). Esto apoya la sugerencia de que la combinación de diferentes pruebas de diagnóstico pueden mejorar la detección de animales infectados y mejorar la eficacia en la detección en las campañas de control y erradicación (Gómez et al, 2018), ya que actualmente los programas de erradicación se ven obstaculizados por la seroconversión tardía y por la ausencia de anticuerpos detectables en animales infectados, lo que retrasa el diagnóstico y promueve la diseminación de la infección (Oliveira et al, 2009).

A causa de la eliminación intermitente del virus descrito por Peterson et al, (2008) los autores recomiendan el uso de PCR en sangre para los programas de control, ya que parece tener un mejor valor predictivo que la PCR de células seminales. Expresan que una sola muestra de semen negativa para PCR no puede usarse como herramienta diagnóstica que prediga que las eyaculaciones posteriores serán libres de SRLV, sin embargo, en consenso general es la aplicación de dos o más técnicas de diagnóstico.

Las investigaciones que demuestran que el semen puede constituir una fuente de contagio para otros animales se ven respaldadas por los siguientes hechos:

Se ha demostrado la resistencia de los espermatozoides a la infección, posiblemente por las proteínas epididimarias, número limitado de divisiones celulares, por el metabolismo basal o ausencia de receptores para internalizar el virión (Ali Al Ahmad et al, 2008). Sin embargo, en el eyaculado hay otros tipos celulares como macrófagos, células germinales inmaduras y células epiteliales del epidídimo (CEE). El provirus no está igualmente representado en las fracciones celulares del semen, sino que predomina en la fracción con partículas citoplasmáticas y macrófagos (Peterson et al, 2008). Adicionalmente, se ha determinado la susceptibilidad y capacidad de las CEE de replicar el virus y de su estrecha relación con los espermatozoides (Lamara et al, 2013). Se considera que la ruta de eliminación del virus es vía circulación sanguínea al semen y está mediada por monocitos/macrófagos infectados. A esto pueden atribuirse los resultados discordantes de machos seropositivos y positivos en PCR a partir de células sanguíneas, pero no del semen, porque pueden los ovinos no estar infectado de manera sistemática con virus (Reina et al, 2011).

Relacionado a lo expuesto por Ali Al Ahmad et al, (2008) el ADN proviral de SRLV no se detectó en la fracción de espermatozoides del semen infectado experimentalmente para fertilización *in vitro* (FIV). Aunque se reporta que algunas partículas virales pueden penetrar en la cabeza de los espermatozoides y transferir el patógeno del espermatozoide al ovocito, embriones resultantes de ovocitos fertilizados con semen infectado fueron negativos en PCR y fue posible generar embriones libres de SRLV por FIV con espermatozoides infectados (Fieni et al, 2012).

Ali Al Ahmad et al, (2012) hallaron resultados similares a los descritos por Fieni et al, (2012), independientemente del estado infeccioso del semen. Sin embargo, enfatizan en que la inseminación artificial (IA) con semen infectado o el apareamiento con un macho infectado puede provocar la transmisión y destacan la necesidad de estudios para determinar si la transmisión de ADN proviral a través de la IA o el apareamiento da como resultado una infección. Reina et al, (2011) sugirieron de forma preliminar que el semen de machos ovinos infectados podría usarse para IA sin constituir un riesgo de contagio para las hembras, pero también destacaron la necesidad de más estudios. Souza et al, (2013) confirmaron la infección por lentivirus cuando determinaron la seroconversión en las hembras posterior a la inseminación con semen infectado, así que la evidencia de transmisión por SRLV a través de la IA fue alcanzada.

Dos hipótesis podrían explicar la presencia de ADN proviral en el semen: 1. Los monocitos/macrófagos, que son las principales células diana y transportadores del virus *in vivo*, pueden estar presentes en la luz de los conductos espermáticos y epidídimos a concentraciones suficientes para permitir la detección. 2. El ADN proviral puede infectar células epiteliales, que comúnmente se pueden encontrar en el semen (Ali Al Ahmad et al, 2008). La infección de las células epiteliales del tracto reproductor masculino ya se ha demostrado (Martínez et al, 2005; Lamara et al, 2013). Además, hallazgos histológicos de la presencia de macrófagos hallados en el tracto reproductor masculino permite asumir que son el vehículo que explica la presencia viral en el semen. La migración de macrófagos infectados al tejido reproductor se puede incrementar en procesos inflamatorios, sin embargo, hay permanente migración al material seminal (Martínez et al, 2005).

La vigilancia a través del diagnóstico preventivo es fundamental, porque el solo determinar ausencia de alteraciones del aparato reproductor, no permite confirmar la falta de riesgo por utilizar machos infectados, que aún pese a la infección pudieran mantener buenos parámetros reproductivos. Estos animales podrían diseminar el virus a rebaños libres por ellos mismos o a través de su semen utilizado en IA, así como, mantener la infección en los rebaños siendo portadores (Martínez et al, 2005).

Con la confirmación de la presencia de ADN proviral en el tracto reproductivo y semen, su potencial transmisión por este medio y sabiendo que las prácticas de manejo clásicas recomendadas para el control de SRLV, en muchas ocasiones son insuficientes, se justifica la necesidad de usar machos libres de SRLV criados en rebaños especiales y probados regularmente como donantes de esperma para la inseminación artificial en los programas de selección genética (Ali Al Ahmad et al, 2008; Lamara et al, 2013); máxime cuando la práctica predominante en México es el sistema de monta directa, intercambio, préstamos o venta de sementales, como se constató en entrevistas hechas a propietarios de animales muestreados para estudios similares (Martínez et al, 2005; Santiago et al, 2017).

Es así como las prácticas y costumbres arraigadas en el sistema de producción común, podrían ayudar a diseminar la infección por lentivirus de un rebaño a otro, tomando en cuenta que otra característica en los sistemas de producción es el poco reemplazo y tenencia prolongada de machos en calidad de sementales. Esto se suma al potencial que tiene el macho como reservorio de la enfermedad y siendo generalmente el animal más longevo, permite que aumente el riesgo de diseminación de la infección a hatos libres, aun cuando el sistema sea extensivo (Martínez et al, 2005; Gómez et al, 2018).

Se destaca la importancia de realizar diagnóstico en los machos y concientizar a los productores respecto de las prácticas que fomentan la transmisión de SRLV y otras enfermedades. A pesar de considerar como causas principales de alta prevalencia, en países desarrollados, el sistema de crianza intensiva en confinamiento, comparada con países menos desarrollados donde prima la crianza extensiva (Gómez et al, 2018; Bojar et al, 2018); este dato puede resultar del poco diagnóstico de la infección lentiviral que se realiza en países con menos desarrollo. El desconocimiento, el costo, entre otros, pueden ser las causas de esta situación. Sin embargo, trabajos como este y otros concordantes, dejan dilucidar que el virus ha sido poco diagnosticado de forma rutinaria, pero propenden por las actividades que favorezcan el conocimiento de la enfermedad, la situación actual y la consecuente obtención de alternativas y soluciones en pro del campo mexicano, tanto en materia sanitaria y como productiva.

Este trabajo deja brecha para continuar con el estudio y diagnóstico de LvPR a través de muestras de semen y estandarizar técnicas que permitan un oportuno diagnóstico tanto serológico como molecular, permitiendo la versatilidad de la detección para los casos en los que no se cuenta con todas las muestras, los machos no estén disponibles y sobre todo para que los productores que desean hacer un diagnóstico de sus rebaños y puedan tener opciones asequibles. El estudio del semen es interesante desde el punto de vista epidemiológico, ya que proporciona una visión del entorno del tracto genital donde se genera el semen (Ali Al Ahmad et al, 2008) y respalda la posibilidad de que los SRLV se propaguen por eyaculación durante el apareamiento o la inseminación artificial (Lamara et al, 2013).

El estudio confirma que el ADN proviral de SRLV puede ser hallado en el semen y que las pruebas diagnósticas disponibles son aplicables a este diagnóstico. Adicional a esto y tomando como referencia los estudios citados, el semen es una potencial vía de transmisión y diseminación de la infección, que aunado a las prácticas de los sistemas productivos en México, es menester considerar las estrategias de control y posible erradicación del virus.

## CONCLUSIONES

Se detectaron ovinos machos infectados por Lentivirus de Pequeños Rumiantes mediante el uso de técnicas serológicas y moleculares.

Se identificó la presencia de anticuerpos contra Lentivirus de Pequeños Rumiantes utilizando una prueba de ELISA indirecto, en plasma sanguíneo. No fue posible detectar la presencia de anticuerpos en fluido seminal.

Se identificó por PCR anidada la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes en machos ovinos a través de muestras de leucocitos de sangre periférica y células seminales.

Hubo discrepancias en los resultados, similar a los reportes de otros autores.

El estudio destaca la importancia de realizar más más investigaciones en el desarrollo de pruebas de diagnóstico para LVPR y muestras útiles para la detección.

## REFERENCIAS

Acevedo, G. E. (2018). TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA Y GENÉTICA DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOSRUMIANTES: ANÁLISIS COMPARATIVO. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Al MZA, Chebloune Y, Chatagnon G, Pellerin JL, Fieni F. Is caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) transmitted vertically to early embryo development stages (morulae or blastocyst) via *in vitro* infected frozen semen? *Theriogenology*, 2012; 77(8):1673–8.

Al MZA, Fieni F, Pellerin JL, Guiguen F, Cherel Y, Chatagnon G, et al. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology*, 2008; 69:473–80.

Alana D, Azevedo A De, Warlington V, Lídia A, Sousa M De, Peixoto RM, et al. Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. *Arq. Inst. Biol*, 2017;1–10.

Arcila G, Alejandro H, Rodríguez M, Pérez JT. Detection of antibodies against small ruminant lentiviruses in ovine and caprine fetuses. *Vet. Méx*, 2014; 52(55):9–15.

Biescas E, Reina R, Glaria I, Mari B, Andre D De. Small Ruminant Lentivirus – Induced Arthritis : Clinicopathologic Findings in Sheep Infected by a Highly Replicative SRLV B2 Genotype. *Veterinary Pathology*, 2015; 52(1):132–9.

Blacklaws, B., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N., de Andres, D., Klein, D., & Harkiss, G.. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 2004; 101 (3), 199–208.

Blacklaws, B. A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2012; 35 (3), 259–269.

Bojar W, Junkuszew A, Dudko P, Olech M. Risk factors associated with small-ruminant lentiviruses in sheep fold buildings. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2018; 25(3):383–7.

Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Retroviruses. In Fenner and White's Medical Virology (pp. 317–344). Elsevier."

Cruz JCM, Gouveia AMG, Souza KC, Braz GF, Teixeira BM, Heinemann MB, et al. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Ruminant Research*, 2009; 85:149–52.

Domenech A. Maedi-Visna virus : current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 2018;11–21

East, N. E., Rowe, J. D., Dahlberg, J. E., Theilen, G. H., & Pederson, N. C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant Research*, 1993; 10 (3), 251–262.

Fieni F, Pellerin JL, Roux C, Poulin N, Baril G, Fatet A. Can caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) be transmitted by in vitro fertilization with experimentally infected sperm? *Theriogenology*, 2012; 77(3):644–51.

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. An experimental study on the vertical transmission of caprine arthritis-encephalitis virus from naturally infected females to their offspring. *Small Ruminant Research*, 2017; 149, 23–27.

Herrera LE. Diagnóstico serológico de Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) en rebaños caprinos del estado de Guanajuato. *Quehacer Científico en Chiapas*, 2017;12(1):15–9.

Lago, N. (2012) MAEDI VISNA EN EL GANADO OVINO DE CARNE DE GALICIA: ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO COMO APROXIMACIÓN A SU CONTROL. Tesis doctoral. UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

Lamara A, Fieni F, Chatagnon G, Larrat M, Dubreil L, Chebloune Y. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. *Comparative Immunol Microbiol Infect Dis*, 2013; 36(4):397–404.

Leroux, C., Mornex, J.F. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Ruminant Research*, 2008; 76:68–76.

Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., ... Juste, R. A. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*, 2015; 181 (1–2), 75– 89.

Molaei, V., Bazzucchi, M., De Mia GM., et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Scientific Reports*, 2020; 10:2243.

Olech M, Murawski M, Kuźmak J. Molecular analysis of small-ruminant lentiviruses in Polish flocks reveals the existence of a novel subtype in sheep. *Arch Virol*, 2019; 164(4):1193–8.

Pépin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J. F., & Peterhans, E. Maedi-visna virus infection in sheep: A review. *Veterinary Research*, 1998; 29 (3–4), 341–367.

Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., ... Pépin, M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research*, 2004; 35 (3), 257–274.

Pinczowski, P., Sanjosé, L., Gimeno, M., Crespo, H., Glaria, I., Amorena, B., ... Luján, L. Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Veterinary Pathology*, 2017; 54 (3), 413–424."

Ramírez, H., Glaria, I., Andrés, X. de, Martínez, H. A., Hernández, M. M., Reina, R., ... Andrés, D. de. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *The Veterinary Journal*, 2011; 190 (1), 169–172.

Ramírez, H., Reina, R., Amorena, B., Andrés, D., & Martínez, H. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Viruses*, 2013; 5 (4), 1175–1207.

Ramírez, H., San Román, B. Reina, R., Andrés, D., Amorena, Glaria I.; & Andrés, X. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology*, 2009; 72 (4), 1085–1096.

Reina R, Glaria I, Cianca S, Crespo H, Andrés X De, Goñi C, et al. Use of small ruminant lentivirus-infected rams for artificial insemination. *The Veterinary Journal*, 2011; 189:106–7.

Reina, R., Berriatua, E., Luján, L., Juste, R., Sánchez, A., de Andrés, D., & Amorena, B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *The Veterinary Journal*, 2009; 182 (1), 31–37.

Rodríguez M, Ramírez H, Pérez JT, Antonio J, Crespo M. falta Reproductive system of male goats. *Vet Mex*; 2005; 36(2):159–76.

Rômulo N, Paula DO, Andrioli A, Fátima J De, Cardoso S, Rizaldo R, et al. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Ruminant Research*; 2009; 85:27–33.

Rowe JD, East NE. Risk factors for transmission and methods for control of caprine virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; 1997;13(1):35–53.

Sánchez, J. H., Martínez, H. A., García, M. M., Garrido, G., Gómez, L., Aguilar, J. A., ... Ramírez, H. The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology*, 2016; 86 (8), 1–5.

Sanjosé, L., Pinczowski, P., Crespo, H., Pérez, M., Glaria, I., Gimeno, M., ... Reina, R. Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. *The Veterinary Journal*, 2015; 204 (1), 88–93.

Souza D, Rizaldo R, Oliveira D, Lomonte R, Brito L De, et al. Transmission of the caprine arthritis –encephalitis virus through artificial insemination. *Small Rumin Res*; 2013;109(2-3):193–8.

Souza, K. C. de, Pinheiro, R. R., Santos, D. O., Brito, R. L. L. de, Rodrigues, A. de S., Sider, L. H., ... Andrioli, A. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, 2013; 109 (2–3), 193–198.

Stonos, N., Wootton, S., & Karrow, N. Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections. *Viruses*, 2014; 6 (8), 3311–3333.

Zamora, R. (2020). DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LENTIVIRUS CAPRINOS UTILIZANDO ANTÍGENOS DERIVADOS EN GEN GAG Y ENV DEL GENOTIPO B. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

## ANEXO

### 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  $\mu$ l de PBS en un microtubo de 1.5 ml estéril.
9. Etiquetar y almacenar a  $-70^{\circ}$  C hasta su uso.