



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CLONACIÓN DE LA REGIÓN LTR DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES PARA SU CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

WOLFANG PÁVEL SAMYASA MENDIOLA BELLO

TUTOR:

HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR:

LAURA COBOS MARÍN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO

CENID-MICROBIOLOGÍA - INIFAP

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

Junio 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

Este trabajo de tesis está dedicado a mi madre, que siempre estuvo ahí en las buenas y en las malas, siempre apoyándome, nunca permitió que me detuviera ante la adversidad.

Hermana, gracias por tu apoyo incondicional.

Gracias por haber estado ahí en toda esta odisea, Neli, Marcos, Sandra, Ana, Fernando, David, sin risas y sin amigos, la vida no vale nada.

Doctor Hugo, gracias por todo lo que me enseñó y principalmente por su paciencia y tiempo invertido.

Doctor Alejandro, gracias por siempre estar disponible para tener una amena charla.

Doctora Cobos y Doctora Cuevas, gracias por su dedicación y atención a lo largo de todo este tiempo.

Doctor Díaz y Doctor Ducoing gracias por sus acertadas observaciones que fueron moldeando este trabajo.

Ale, Ara, Ceci, Lalo, Juan, Yesi, Lucia, Carlitos y el todo el equipo del laboratorio, gracias por los buenos y divertidos momentos que me dieron.

Agradecimientos

Se le agradece enormemente a Julieta Sandra Cuevas Romero; José Luis Cerriteño Sánchez; Amanda Gayosso Vázquez y Rogelio Alejandro Alonso Morales y a su personal por la amable disposición de prestar sus instalaciones y tiempo para la capacitación en la técnica de clonación.

Proyecto financiado por CONACyT - **Genotipificación del gen *env* de retrovirus que impactan la salud de rumiantes domésticos**, con clave **No. 221285..**

Financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) - **ELISAs basadas en el uso de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos para la detección serológica de lentivirus en caprinos**, con clave **IT201217.**

Número de beca CONACyT: **599338**

Programa de Apoyo Económico a los Estudiantes de Posgrado UNAM

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	II
TABLA DE CONTENIDO.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Situación de la enfermedad en México.....	3
1.2 Situación pecuaria nacional de pequeños rumiantes.....	3
1.3 Cuadros clínicos	4
1.4 Transmisión	6
1.5 Diagnóstico.....	7
1.6 Etiología	8
1.7 Genoma.....	9
1.8 Ciclo de replicación.....	11
1.9 Patogénesis y respuesta inmune	12
1.10 Clonación.....	14
1.11 Filogenia.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6. RESULTADOS.....	24
7. DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIONES.....	39
9. REFERENCIAS.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

LVPR. Lentivirus de Pequeños Rumiantes

Pol. Polimerasa

Gag. Antígeno específico de grupo.

Env. Envoltura

Gp. Glicoproteína

SU. Proteína de superficie

TM. Proteína de transmembrana

NC. Nucleocápside

MA. Proteína de matriz

CA. Cápside

IN. Integrasa

RNasa H. Ribonucleasa H

dTTP. Desoxitimidina trifosfato

dUTP. Desoxiuridin trifosfato

dUTPasa. Desoxiuridin trifosfatasa

PR. Proteasa

ADN. Ácido desoxirribonucleico

Vif. Factor de infectividad viral

Vpr-like. Proteína viral R

Rev. Proteína reguladora de la expresión del virión

LTR. Long Terminal Repeat

ARN. Ácido ribonucleico

AP-1. Proteína activadora 1

AP-4. Proteína activadora 4

TATA. Caja TATA

Pb. Pares de bases

Pi. Post infección

IgG1. Inmunoglobulina G1

IgG2. Inmunoglobulina G2

IDAG. Inmunodifusión en agar gel

ELISA. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

cELISA. ELISA competitiva

Fw. Iniciador sentido

Rv. Iniciador antisentido

SDHA. Succinato deshidrogenasa subunidad A

ng . Nanogramos

µl. Microlitros

PCR-LTR. Reacción en cadena de la polimerasa - Long Terminal Repeat

LB. Luria-Bertani

Ovinos. O

Caprinos. C

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de reactivos utilizados en la PCR-LTR de LVPR.....	18
Cuadro 2. Condiciones de amplificación para la PCR-LTR de LVPR.....	19
Cuadro 3. Concentraciones de reactivos utilizados en la PCR-SDHA.....	19
Cuadro 4. Condiciones de amplificación de la PCR-SDHA	20
Cuadro 5. Reactivos utilizados en la reacción de ligación. El volumen final varía entre 10 y 20 µl por la alta variabilidad de la concentración de ADN del producto de PCR purificado a utilizar en la reacción.....	22
Cuadro 6. Número de granjas muestreadas y evaluadas por cELISA por Estado de la República y por especie para la detección de anticuerpos contra LVPR, además se muestran las granjas y animales positivos por Estado y por especie.....	24
Cuadro 7. Muestras positivas a la PCR-LTR para la detección de ADN proviral de LVPR por Estado de la República y por especie.....	25
Cuadro 8. Se presenta el número total de muestras positivas a cELISA evaluadas por PCR-LTR y aquellas que resultaron positivas a la PCR-LTR y además la relación de positivos entre ambas pruebas expresada en porcentaje.....	26
Cuadro 9. Muestras negativas a la PCR-LTR para la detección de ADN proviral por Estado de la República y especie.....	27
Cuadro 10. Muestras evaluadas por PCR-SDHA por Estado de la República y especie, se muestran primero aquellas positivas (verdaderas negativas) y a continuación las negativas.....	28
Cuadro 11. Número de muestras clonadas y secuenciadas por Estado del país y por especie.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema de la estructura de los LVPR. Tomado de Cortez-Romero et al., 2013.....	10
Figura 2. Estructura esquemática del genoma de LVPR. Tomado de Blacklaws, 2008.....	10
Figura 3. Esquema del plásmido pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific™ USA).....	21
Figura 4. Escala del marcador de pares de bases. La banda de 500 pb tiene una concentración de ADN de 90 ng/5 µl (18ng/µl), así pues, un purificado de PCR con intensidad similar a la banda de 500 pb, tendrá 18ng de ADN por µl, siempre y cuando se carguen volúmenes idénticos de marcador y purificado. (Clever Scientific Ltd®, Reino Unido)	21
Figura 5. Resumen esquemático de la técnica de clonación. (Thermo Fisher Scientific™ USA).....	22
Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% con amplificados de la PCR-LTR. MPB: marcador de pares de bases. C-: control negativo. C+: control positivo. 1-8: muestras de pequeños rumiantes.....	26
Figura 7. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% con purificados de la PCR-LTR. MPB: marcador de pares de bases. 1-7: purificados de muestras de pequeños rumiantes.....	26
Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% con amplificados de la PCR-SDHA. MPB, marcador de pares de bases; 1-5, muestras de pequeños rumiantes positivas; 6, muestra negativa	28
Figura 9. A. Placa de agar LB con ampicilina, Xgal e IPTG con bacterias transformadas con producto de PCR-LTR. B. Zoom de una placa con colonias blancas y azules para demostrar la clara distinción entre ambas.....	30
Figura 10. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% con 10 amplificados de la PCR-LTR a partir de 2 µl de ADN plasmídico extraído con miniprep de bacterias transformadas.	30

Figura 11. Mapa de México mostrando los Estados muestreados, en verde donde no se lograron muestras positivas a la PCR-LTR y en naranja donde se consiguieron secuencias de LTR de LVPR a partir de ovinos y/o caprinos. A-BCS-O&C, B-Son-O&C, C-Sin-C, D-Coah-C, E-Gua-C, F-Que-C, G-Hid-O, H-Mex-O&C, I-Tla-C, J-Ver-O&C, K-DUR, L-CHP.....	31
Figura 12. Árbol filogenético construido con el algoritmo MrBayes utilizado en el programa bioinformático Geneious, se muestran los valores de bootstraps significativos que soportan las ramas. Las secuencias de referencia del genotipo A se muestran en un recuadro azul, el genotipo B dentro de un recuadro rojo junto con las secuencias conseguidas por clonación del presente estudio, en verde el genotipo C y B3, y en amarillo el genotipo E representadas como outgroup. Las secuencias clonadas fueron nombradas con su origen geográfico (Estado del país), en seguida de la especie, Ca para caprino y Ov para ovino, y al final el número de la muestra por Estado.....	32
Figura 13a. Alineamiento de secuencias de referencia del genotipo B y aquellas obtenidas por clonación. Se encierran en un recuadro verde el sitio de unión a factores de transcripción AML (vis), en color azul los sitios AP-1 y en color amarillo el sitio AP-4.....	33
Figura 13b. Alineamiento de secuencias de referencia del genotipo B y aquellas obtenidas por clonación. Se encierra en un recuadro rojo la caja TATA y se marcan los límites de la región U3 y la región.....	34
Figura 13c. Alineamiento de secuencias de referencia del genotipo B y aquellas obtenidas por clonación. Se encierra en un recuadro morado el sitio poli A y se marcan los límites de la región R con la región U5.....	35

Resumen

Los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) pertenecen a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*. Estos fueron identificados en ovinos en 1930 y en caprinos en 1974. Producen infecciones de por vida que pueden generar cuadros clínicos de mastitis; artritis; encefalitis y neumonía. La clasificación basada en su genoma y divergencia es de cinco genotipos, genotipo A, B, C, D y E. Los LVPR cuentan con tres genes principales, *pol*, *gag* y *env*. La región LTR se encuentra en ambos extremos del genoma y presenta distintos sitios de unión a factores de transcripción en la región U3, entre estos se han identificado sitios AP-1, AP-4 y el AML (vis). El objetivo del presente estudio fue obtener secuencias de LVPR que infectan pequeños rumiantes de distintas regiones del país, clonaras para asegurar su calidad y número, y posteriormente analizarlas filogenéticamente. Inicialmente mediante un cELISA comercial se realizó un tamizaje previo utilizando como muestra plasma de ovinos y caprinos para determinar la seropositividad de las mismas y enseguida con una PCR punto final se corroboró la infección detectando la presencia de ADN proviral en leucocitos de sangre periférica. Se seleccionaron muestras positivas para clonar y posteriormente secuenciar, con estas se construyó un árbol filogenético. Se lograron secuenciar 28 muestras de distintas regiones del país, en el alineamiento se observaron sitios altamente conservados, AML (vis), AP-4 y la caja TATA, no obstante, se encontraron diferencias nucleotídicas considerables en los sitios AP-1. El árbol filogenético mostró que todas las secuencias mexicanas de LVPR obtenidas de ovinos y caprinos se agruparon con los genotipos B1, en especial con Caev-Co, una cepa americana.

Palabras clave: LVPR, clonación, PCR, Filogenia, LTR.

ABSTRACT

The Small Ruminant Lentivirus (SRLV) form part of the family *Retroviridae*, genus Lentivirus and were described in sheep in the 1930 and in goat in 1974. Produce infections for life and mastitis, arthritis, encephalitis and/or pneumonia can arise. The classification by their divergence and genome comprehend five genotypes, A, B, C, D and E. SRLV possess three principal genes, *pol*, *gag* and *env*. The LTR region is found at both sides of the genome, here is where different transcription factors binding sites lies at the U3 region, some of these factors are the AP-1, AP-4 and AML (v). The aim of the present study was to gather sequences of SRLV infecting sheeps and goats in different regions of Mexico, cloning them for the assurance of good quality and quantity, for phylogenetic studies. With a commercial cELISA a screening was made using plasma from sheep and goat for the determination of seropositive samples for its later use in an end point PCR looking for provirus on peripheral blood leukocytes, a way to ensure the presence of the infection. These samples were cloned and then sequenced, with the sequences a phylogenetic tree and alignments were made. 28 samples were sequenced, in the alignments highly conserved binding sites were observed, this where AML (v), AP4 and the TATA box, on the other hand, in the AP-1 site many nucleotide differences were observed. The phylogenetic tree showed an aggrupation of the samples within the genotype B1, in special with the Caev-Co strain, which is American.

Key words: SRLV, cloning, PCR, phylogeny, PCR

1. Introducción

1.1 Situación pecuaria nacional de pequeños rumiantes

Según cifras del SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera) del año 2015, en México la población nacional de ovinos es de 8, 710, 781 de cabezas de ganado, la principal producción se encuentra representada en su mayoría por los siguientes Estados: Estado de México con 1, 410, 238; Hidalgo con 1, 206, 673; Veracruz con 666, 805; Oaxaca con 521, 458 y Puebla con 503, 384. En cuanto a caprinos se cuenta con un total nacional de 8, 724, 946, los cinco Estados con mayor número de cabezas son: Puebla con 1, 280, 607; Oaxaca con 1, 250, 869; Guerrero con 655, 055; Coahuila con 645, 903 y San Luis Potosí con 617, 514.

1.2 Situación de la infección por lentivirus en ovinos y caprinos de México

En México desde hace más de dos décadas se ha descrito la presencia de la infección por lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) en caprinos, enfermedad previamente conocida como artritis encefalitis caprina (Leyva et al., 1998). Posteriormente Daltabuit et al., (1999) reportaron el primer aislamiento del virus a partir de caprinos con artritis. Por otro lado, la infección en ovinos se conocía como *maedi/visna* y en 1983 se demostró una seroprevalencia del 23% en un estudio que se realizó en el Estado de México y la Ciudad de México con 200 ovinos. En 1986 en un rebaño de 1000 cabezas de ganado ovino de la Ciudad de México se observó una seroprevalencia del 8.2%; en el año 2000 un estudio en 1078 cabras en Yucatán arrojó una seropositividad del 0.4%, en 2003 en distintos estados del país (Estado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Zacatecas) se demostró en 70 ovinos una seropositividad del 17% y en 2011 se identificaron ovinos seropositivos en el Estado de México, Jalisco y Chiapas (Ramírez et al., 1983; Molina et al., 1986; Pérez et al., 2003; Torres-Acosta et al., 2003; Martínez et al., 2011; Sánchez et al., 2013).

La importancia de estudiar la presencia de la infección por LVPR en ganado ovino tomó mayor fuerza debido al hecho de que en 2007, 265 ovinos de distintas razas (Kathadin, Damara, Blackbelly, Pelibuey, Dorset, Hampshire, Dorper y Mestizos) exportados a Colombia fueron objeto de sacrificio por la detección de 17 animales seropositivos, lo que significó una pérdida de aproximadamente 3 millones de pesos (Urcastegui et al., 2007 Tórtora et al., 2008). Así mismo en los países norteamericanos se han reportado prevalencias de LVPR del 26% y en México frecuentemente se lleva a cabo la importación de ganado ovino de Norteamérica sin controles sanitarios adecuados. En la última década han sido introducidos animales provenientes de Nueva Zelanda en el Estado de México e Hidalgo (Egiluz y Aluja, 1981; Torres-Acosta et al, 2003; Tórtora et al, 2008; Ramírez et al., 2011; Stonos et al, 2013).

El maedi/visna, como se encuentra publicado en el diario oficial de la federación del 4 de mayo del 2016, pertenece al grupo 3 que incluye a las enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y son consideradas como endémicas. La artritis encefalitis caprina se incluyó en este grupo desde la publicación en el diario oficial de la federación del 5 de marzo de 1999.

1.3 Cuadros clínicos

1.3.1 Neumonía intersticial

Se observa principalmente en adultos de más de dos años de edad y , una mala alimentación, el clima adverso y eventos como la gestación o la lactación promueven la presentación de signos. La evidencia más temprana es el retraso de la marcha en terrenos con pendientes, posteriormente se presenta disnea, respiración abdominal, extensión de cuello con ollares dilatados. Al progresar la enfermedad los signos se hacen más evidentes y el animal termina con caquexia. En los pulmones se observa inflamación intersticial con infiltración de linfocitos, macrófagos, monocitos y células plasmáticas, hiperplasia del músculo interalveolar y fibrosis (Trigo, 1991; Murphy et al., 2012; Gonzales et al., 2013).

1.3.2 Leucoencefalomielitis

Se presenta principalmente en cabritos de dos a cuatro meses de edad, los signos clínicos tempranos incluyen cojera, ataxia de miembros posteriores e hiperreflexia. Los signos aumentan gradualmente hasta presentarse paraparesia, tetraparesia o parálisis, marcha en círculos, inclinación de la cabeza, ceguera y nistagmos. Histológicamente se observan áreas multifocales de necrosis y malacia en cerebro y médula espinal, desmielinización perivascular, displasia cerebelar, inflamación difusa linfoplasmocítica y acumulación masiva de macrófagos en la materia blanca e infiltración de linfocitos (Campbell et al., 1998; Callan et al., 2004; Gonzales et al., 2013).

1.3.3 Mastitis indurativa

Se presenta de manera difusa, bilateral, crónica y sin dolor. La producción láctea se ve afectada hasta en un 10% y en casos graves puede presentarse agalactia. Las lesiones microscópicas observadas son infiltraciones nodulares o difusas con predominio de linfocitos en el intersticio y en la periferia de los ductos de la base del epitelio e hiperplasia de los linfonodos retromamarios (Lujan et al., 2001; Ravazzolo et al., 2006; Murphy et al., 2012; Gonzales et al., 2013).

1.3.4 Artritis

Puede presentarse de forma uni o bilateral, afecta principalmente la articulación de los carpos pero también pueden afectarse otras, como la articulación del tarso o femoro-tibio-patelar. Se caracteriza principalmente por un aumento en el tamaño y engrosamiento de la cápsula articular, tumefacción articular, sinovitis proliferativa, fibrosis y mineralización. El proceso inflamatorio disminuye la movilidad de los animales afectados causando una pérdida de peso progresiva por la falta de movilidad. A nivel celular ocurre una hiperplasia de la membrana sinovial con infiltración perivascular de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (Luján et al., 2001; Murphy et al., 2007; Gonzales et al., 2013).

1.4 Transmisión

1.4.1 Transmisión vertical

El virus es transmitido por la ingesta de leche o calostro infectado, ya que el virus puede ser encontrado en tejido mamario y células epiteliales mamarias *in vivo*. Se han hecho estudios demostrando que los niveles del virus en el tejido mamario puedan variar según el estado de lactación, época de parición, así como la inducción a la lactación, lo cual puede estar relacionado con la expresión del mismo virus. La alta permeabilidad del intestino del cordero en las primeras 48 hrs después del nacimiento puede facilitar la entrada del virus libre o asociado a células por medio de la infección del calostro, aunque el mecanismo de entrada vía intestino no está totalmente dilucidado (Preziuso, 2004; Álvarez, 2005; Daltaubuit, 2005; Álvarez, 2006; Ponti, 2008; Reina 2008; Konishi et al., 2011; Stonos et al., 2013, Hasegawa et al., 2017). Se ha descrito también la transmisión intrauterina y/o transplacentarina en diferentes trabajos demostrando la presencia de ADN proviral en los tejidos de útero, oviducto, ovario y cordón umbilical (Ravazzolo, 2006; Reina, 2008; Sánchez, 2016; Martins et al., 2017).

1.4.2 Transmisión horizontal

El comercio de animales infectados se considera la principal causa de transmisión horizontal de los LVPR, se considera que todas las secreciones corporales son una fuente de infección. El confinamiento y hacinamiento de animales enfermos con sanos resulta en el incremento de la diseminación de la infección. Algunos autores sugieren que la presencia del virus en semen se debe a la excreción de las células epiteliales del epidídimo o leucocitos presentes en el semen. También se ha demostrado que de manera intermitente hay ADN proviral en semen de caprinos naturalmente infectados y en tejidos del tracto genital (Callan et al., 2004; Ali Ahmad et al., 2008; Lamara et al., 2013; Peterson et al., 2008; Stonos et al., 2013; Tu et al., 2017).

1.5 Diagnóstico

Un diagnóstico eficaz debe basarse en un análisis que considere los niveles de anticuerpos de una muestra. Las pruebas usuales para el diagnóstico son: la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDAG) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Aunque una cantidad elevada de animales infectados nunca presentarán signos clínicos, debe tenerse en cuenta que cualquier animal infectado lo estará de por vida por la presencia del provirus. Algunos métodos de diagnóstico son muy poco sensibles y pueden fallar, dando reacciones negativas cuando el número de anticuerpos en el suero es relativamente bajo. Los métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) hacen posible la detección de animales infectados sin seroconversión al no depender de la presencia de anticuerpos, esta técnica se basa en demostrar la presencia de material genético viral en el animal infectado. Sin embargo, una de las dificultades encontradas en el diagnóstico molecular es la carga de material proviral limitado en sangre de animales infectados y la alta variabilidad genética que tiene implicaciones en la hibridación de los iniciadores (De Andrés et al., 2005; Lacerenza et al., 2006; Blacklaws, 2008; Leginagoikoa et al., 2009; Brinkhof et al., 2010; Barquero et al., 2013; Sanjosé et al., 2015). Actualmente existen en el mercado kits de diagnóstico basados en ELISA, algunos de estos son: cELISA CAEV de VMRD Inc.; AG-CHEKIT de IDEXX y ELITEST-MVV de Biomed (Sanjosé et al., 2015; Sánchez et al., 2016).

1.6 Etiología

Los LVPR pertenecen a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus* y fueron descritos desde 1930 en ovinos exportados a Islandia, por eso el nombre de *maedi/visna*, palabras en islandés que podrían traducirse como disnea y emaciación, respectivamente (Blacklaws, 2008). En caprinos la enfermedad se reportó por primera vez en E.U. en 1974 por Cork et al. y se aisló en 1980, posteriormente se identificó en Nueva Zelanda en 1982 y se le denominó artritis encefalitis caprina por la signología encontrada en los caprinos afectados. Estos virus se caracterizan por tener un periodo de incubación largo y de infección de por vida (Cork et al., 1974; Crawford et al., 1980; Rowe et al., 1997; IICAB., 2015). Para su estudio los LVPR se han dividido en cinco genotipos: A, B, C, D y E, entre estos existe hasta un 37% de diferencia en sus nucleótidos. De igual manera estos genotipos se dividen en un gran número de subtipos, el genotipo A en al menos 17, donde los subtipos A1, A3, A4, A5, A6, A9, A11, A12, A13, A16 y A17 han sido aislados en ovinos y caprinos, el A2 y A15 sólo en ovinos y el A7, A8, A10 y A14 sólo en cabras; en cuanto al genotipo B se ha dividido en B1, B2 y B3, estos se presentan tanto en ovinos como caprinos, los genotipos A y B son los más extensamente distribuidos en el mundo; el genotipo C se ha encontrado en ovinos y caprinos de Noruega; el D en ambas especies en Suiza y España y el genotipo E cuenta con dos subtipos E1 y E2 encontrados sólo en caprinos de Italia. En un estudio realizado por Ramírez et al., (2011) se determinó la presencia de cepas asociadas al genotipo B infectando ovinos y caprinos del Estado de México. Anteriormente se pensaba que la infección trans-especie no ocurría, sin embargo, se ha observado que es posible la infección de ovinos por genotipos virales conocidos previamente como exclusivos de caprinos y viceversa (Shah et al., 2004a; Reina et al., 2006; Denner et al., 2007; Glaria et al., 2012; De Regge y Cay., 2013; Fras et al., 2013; Ramírez et al., 2013; Santry et al., 2013; Pittavino et al., 2014).

1.7 Genoma

El genoma de los LVPR está constituido por tres genes principales, ellos son *gag*, *pol* y *env*; el gen *gag* codifica para las proteínas estructurales p14 (nucleocápside, NC), p17 (proteína de matriz, MA) y la p25 (cápside, CA); el gen *pol* codifica para la transcriptasa reversa (RT), pieza angular de la retrotranscripción; RNasa H (ribonucleasa H) degrada el ARN genómico para permitir la síntesis de ADN; la dUTPasa que promueve la formación de dTTP inhibiendo la presencia de dUTP; la proteasa (PR) que ayuda a la maduración de los viriones cortando la poliproteína *gag-pol* y la integrasa (IN) reconoce el recién formado ADN viral y lo transfiere al núcleo para integrarlo al ADN celular; el gen *env* codifica para dos proteínas de la envoltura, la gp135 (proteína de superficie, SU) y la gp44 (proteína de transmembrana, TM). Existen además otros genes accesorios con funciones regulatorias, estos son el *vif* (Viral Infectivity Factor) que eleva la infectividad viral; *vpr-like* (Viral Protein R) que incrementa la expresión génica y el *rev* (Regulator of virion protein expression) que regula la expresión de proteínas. La región LTR (Long Terminal Repeat) presenta algunos sitios conservados y se ubica en los extremos 5' y 3' del ADN proviral y está compuesta por la región U3, R y U5. La LTR interviene en la integración del ADN viral en el ADN hospedero con la ayuda de la IN, en la transcripción y en la poliadenilación del ARN viral (Hess et al., 1989; Peppin et al., 1998; Villet et al., 2003; Barros et al., 2005; De Andrés et al., 2005; Gudmundsdóttir et al., 2010; Cardinaux et al., 2013; Santry et al., 2013).

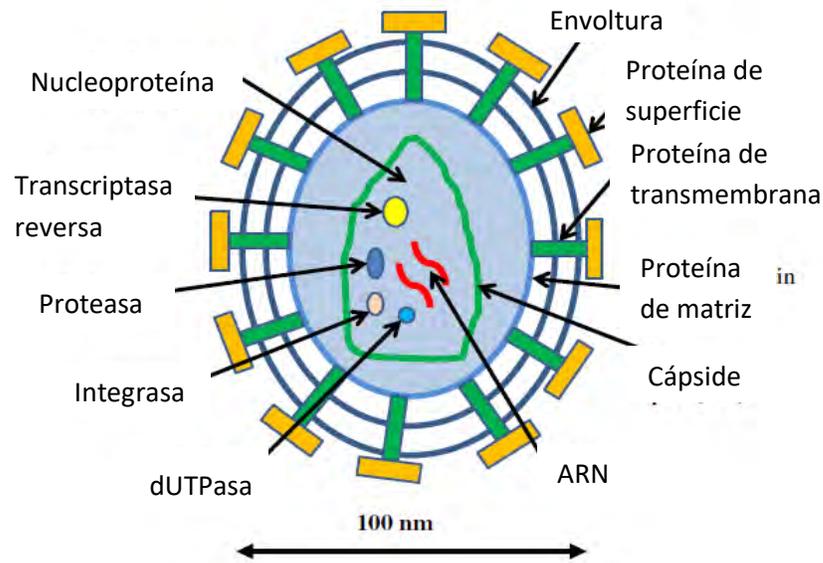


Figura 1. Esquema de la estructura de los LVPR. Tomado de Cortez-Romero et al., 2013.

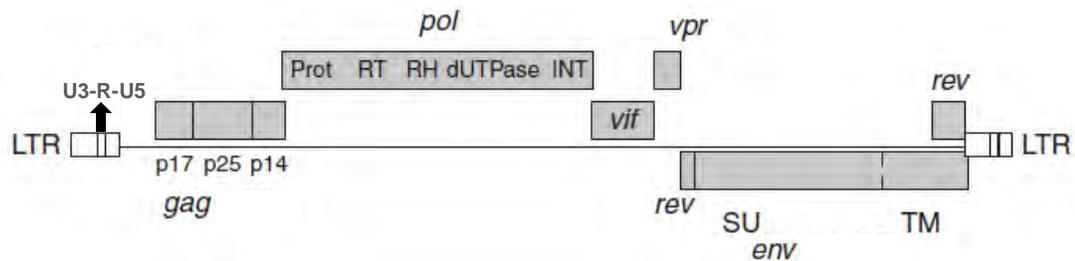


Figura 2. Estructura esquemática del genoma de LVPR. Tomado de Blacklaws, 2008.

La activación transcripcional en la LTR se lleva a cabo y es regulada por la unión de factores de transcripción a los sitios específicos dentro de la región U3. Estos factores son principalmente los sitios AP-1, AP-4 y AML (*vis*). Los sitios de unión a AP-1 presentan más copias que los demás, para que en casos de presentarse mutaciones o deleciones no quede abatida la transcripción. Al tener más copias de sitios de unión a factores de transcripción en un virus, ésta se vería multiplicada y con ello el desarrollo de enfermedad.

Otro elemento importante en la región U3 es la caja TATA, la cual es un promotor de transcripción, en los LVPR se ha observado que la caja TATA y el sitio AP-4 son altamente conservados entre genotipos. La región LTR puede tener influencia en el tropismo viral, puesto que la transcripción depende de la presencia de los factores apropiados, la alta divergencia genética provoca distintos virus con distintas actividades transcripcionales. Se han encontrado deleciones en la región R en infecciones sin aparente signología, aunque también se han encontrado signos clínicos aún en presencia de deleciones en esta región (Hess et al., 1989; Sutton et al., 1997; Angelopoulou et al., 2006; Reina et al., 2006; Angelopoulou et al., 2008; Reina et al., 2008; Gomez-Lucia et al., 2013 Blatti-Cardinaux et al., 2016).

1.8 Ciclo de replicación

El ciclo de replicación viral de los LVPR comienza con la unión de la SU del virus con su receptor en la superficie de la célula blanco. Se ha descrito que los receptores de manosa pueden ser utilizados por los LVPR, posteriormente se fusiona la membrana celular con la viral para que la cápside pueda internalizarse. Una vez dentro, el ARN genómico es retro-transcrito por la transcriptasa reversa para conseguir un ADN de doble cadena, es en este paso cuando se forma la LTR. Esta doble cadena se une al ADN del hospedero por medio de la IN reconociendo los extremos de la LTR, a este ADN viral integrado se le conoce como provirus. El virus depende de la maquinaria de transcripción del hospedero donde los factores de transcripción se unen a la LTR en la región U3 y R de la LTR 5'. Se producen los precursores *gag*, *gag-pol* y *env*, éste último viaja al retículo endoplasmático rugoso para ser glicosilado y llevado al aparato de Golgi donde es dividido en la SU y la TM. El ensamblaje ocurre en el citoplasma con los precursores y las copias del ARN viral, la PR fragmenta los precursores formando al virión maduro y en la zona de la membrana celular donde se encuentra la TM y SU, el virión se externaliza por gemación de la célula (Blacklaws, 2008; Gudmundsdóttir, 2010; Pedersen et al., 2011).

1.9 Patogénesis y respuesta inmune

A pesar de ser una infección intratable, la mortalidad por LVPR es generalmente baja, ésta puede verse aumentada por co-infecciones bacterianas o en presencia de condiciones climáticas desfavorables. Las infecciones con estos virus afectan principalmente las articulaciones carpales, el sistema nervioso central, la glándula mamaria y pulmones. Estos virus presentan un tropismo por monocitos/macrófagos y células dendríticas, aunque también se han encontrado proteínas, ARN y ADN en células epiteliales renales, esplénicas, cardíacas y neuroglía (Tesoro et al., 2003; Angelopoulou et al., 2006b; Peterson et al., 2006; Brellou et al., 2007; Pritchard et al., 2007; Blacklaws, 2012; Konishi et al., 2011; Barquero et al., 2013; Minguijón et al., 2015; Tu et al., 2017).

Una vez que se integra el ADN a la célula, ésta puede permanecer persistente/latente con poca o nula expresión viral o también puede presentarse una infección productiva. En esta última los factores de transcripción presentes en la LTR activan la transcripción viral de manera más franca y su presencia aumentada o disminuida conlleva implicaciones en los niveles de patogenicidad viral. El genotipo E presenta una delección total de la dUTPasa, del *vpr-like* y además otra de 70 pares de bases (pb) en la región U3, lo que provoca que la infección generada por este genotipo sea latente y sin desarrollo de signología. Se ha especulado que la infección con el genotipo E pueda disminuir la artritis en coinfecciones, mediante una inducción de resistencia a una superinfección o al disminuir la viremia. *In vitro* las cepas de LVPR reciben la clasificación de slow/low o rapid/high según su tasa de replicación, la cual se ve afectada por la presencia o ausencia de sitios de unión a factores de transcripción (Angelopoulou et al., 2006; Reina et al., 2008; Juganaru et al., 2010).

Un ejemplo de esto es la cepa P1OLV, denominada slow/low por la ausencia del sitio AML (*vis*), aun cuando de forma experimental se le han adicionado otros factores AP-1 para tratar de aumentar la transcripción; un ejemplo de cepa rapid/high es la cepa K1514, la cual se aisló de ovinos con signología neuronal, ésta posee una copia extra de AML (*vis*) y además Óskarsson en el 2007 mencionó que existe una secuencia específica (CANNTG) en la LTR que puede tener una influencia importante para el tropismo neuronal, sobre todo si se encuentran dos copias, ya que una copia no parece ser suficiente y si se eliminan por completo no ocurre la transcripción. En la cepa SA-OMVV se encuentra una deleción en la región U3 de la LTR, sin embargo, presenta dos copias más de AML (*vis*) y AP-1, lo que indica que este factor es de gran importancia para la transcripción (Sargan et al., 1995; Singh et al., 1999; Lyall et al., 2000; Agnarsdóttir et al., 2000; Barros et al., 2004; Angelopoulou et al., 2006; Angelopoulou et al., 2008; Reina et al., 2008; Juganaru et al., 2010; Reina et al., 2010; Gomez-Lucia et al., 2013; Pittavino et al., 2014; Crespo et al., 2016).

La seroconversión en esta infección es variable y puede llevar tiempo en desarrollarse, lo que limita el diagnóstico serológico y facilita la transmisión. En comparación con otros retrovirus, no se presenta inmunosupresión en la infección con LVPR. Diversos estudios han demostrado que los ovinos infectados desarrollan una respuesta humoral más lenta que en las infecciones agudas con otros agentes. Los anticuerpos neutralizantes tipo específico aparecen de 2 a 5 meses post infección (*pi*) y otros neutralizantes más diversos aparecen hasta 4 años después. Se ha sugerido que la causa de esta diversidad en los anticuerpos neutralizantes se debe a las mutaciones que se forman en las poblaciones virales, aunque también se describe que es debido a la falta de reacción a ciertos epítomos conservados que son poco inmunogénicos. En el gen *env*, el menos conservado de todos, se ha identificado una región que frecuentemente tiene mutaciones no sinónimas para su beneficio inmunológico. Los anticuerpos en el suero suelen ser del subtipo IgG1, cuando existe la presencia del subtipo IgG2 es cuando se observa el desarrollo de signología clínica.

También se ha sugerido que los determinantes de neutralización de algunas cepas virales no puedan ser detectados por los anticuerpos y que la alta divergencia antigénica pueda ser otro factor que contribuye a que los anticuerpos no logren el control inmunológico (Andrésdóttir et al., 2002; Trujillo et al., 2004; Barros et al., 2005; Pisoni et al., 2007; Blacklaws, 2008; Leroux et al., 2008; Pritchard et al., 2007; Brinkhof et al., 2010; Cortez-Romero et al., 2013; Sider et al., 2013).

1.10 Clonación

La clonación génica es el proceso en el cual se introduce ADN externo (un gen o una porción de él) en una célula hospedera procarionte o eucarionte. Para lograr esto se utiliza un *vector* (una molécula pequeña de ADN) que al ligarse al ADN externo se obtiene ADN recombinante, una secuencia de ADN nueva formada por dos moléculas de ADN heterólogas. Éste es introducido a la célula hospedera formando células recombinantes, las cuales al dividirse forman células hijas idénticas llamadas clonas, logrando con esto la replicación y/o expresión del ADN externo (Chen y Janes, 2002; Wong, 2006). Uno de los objetivos de la tecnología del ADN recombinante y clonación es obtener una gran cantidad de copias de un gen particular o fragmento genómico de interés para la investigación. Por otro lado, también se ve ampliamente utilizado en la producción robusta de proteínas y/o en la manipulación de características deseables o indeseables en vegetales o animales (Valla y Lale, 2012; Chen y Janes, 2002).

1.11 Filogenia

El análisis filogenético es utilizado para estimar y describir las relaciones evolutivas entre las especies reconstruyendo la historia de su diversificación en forma de un diagrama ramificado, esto da la información para la clasificación de organismos. Así pues se utilizan los árboles filogenéticos para determinar la relación evolutiva intra o interespecies (Hillis, 1997; Hall, 2006).

2. Justificación

A partir de que los LVPR que infectan ovinos y caprinos han sido reconocidos como endémicos para México, así como a la falta de aislados virales y a la escasa información filogenética de los LVPR presentes en el país, se pone de manifiesto la necesidad de establecer sistemas reproducibles que permitan caracterizar e identificar los posibles genotipos virales. Adicionalmente, contar con controles de ADN para la realización de pruebas de PCR, técnica molecular que en conjunto con pruebas serológicas son una gran herramienta para la detección de la infección de LVPR.

3. Hipótesis

Obteniendo secuencias nucleotídicas de fragmentos de la región LTR de LVPR se determinará la presencia del genotipo B infectando pequeños rumiantes en distintas regiones del país.

4. Objetivo general

Clonar fragmentos de la región LTR de LVPR, utilizando sistemas bacterianos para determinar los genotipos prevalentes en el país.

4.1 Objetivos particulares

Realizar la selección de pequeños rumiantes infectados con LVPR de diferentes rebaños y regiones del país con base en una prueba tamiz serológica.

Estandarizar las técnicas de PCR-clonación con el uso de productos amplificados de la región LTR.

Realizar estudios filogenéticos con las secuencias nucleotídicas clonadas para identificar los genotipos prevalentes que se encuentran infectando ovinos y caprinos en diferentes regiones del país.

5. Material y métodos

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo 4, UNAM en colaboración con el Laboratorio de Epizootiología del CENID-MA, INIFAP.

5.1 Muestras

Se realizó un muestreo por conveniencia con productores cooperantes, colectando un total de muestras de sangre periférica de 1014 ovinos (O) y 1383 caprinos (C) mayores de un año, sin distinción de sexo ni raza, de distintas regiones del país (Baja California Sur (O-69/C-93); Chiapas (O-50); Durango (O-50/C-52); Estado de México (O-199/C-86); Hidalgo (O-182); Coahuila (C-114); Querétaro (C-149); Guanajuato (C-160); Sinaloa (O-71/C-324); Tlaxcala (O-160/C-93); Sonora (O-181/C-142) y Veracruz (O-52/C-170). La sangre se recolectó en tubos con heparina (VACUTAINER® UK) mediante venopunción yugular utilizando el sistema vacutainer (BD® UK); se separaron los leucocitos por medio de soluciones de lisis y centrifugación para posteriormente extraer el ADN genómico según el protocolo incluido en el kit comercial (FavorGen® Taiwan). El ADN se cuantificó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop Lite™, Thermo Scientific™ USA) y se almacenó a -75°C hasta ser utilizado.

5.2 Tamizaje serológico

Se determinó la seropositividad hacia la enfermedad en los ovinos y caprinos con un cELISA (ELISA competitiva) comercial (VMRD® USA) y a partir de los resultados se realizó la selección del grupo de estudio.

5.3 Detección molecular

Se realizó una PCR punto final que amplifica un fragmento de la región LTR (PCR-LTR) utilizando iniciadores de un trabajo previo (Rodríguez, 2017). El producto de amplificación incluye un fragmento de la región U3, R y U5 de la LTR y tiene una longitud de 291 pb. La secuencia del iniciador sentido (Fw) fue TGTTCACAGAWTWAGGRACG, mientras que la del antisentido (Rv) corresponde a TCASKGTGACAAAGCAAATGTAA. Se utilizaron bases degeneradas para poder cubrir la mayor cantidad de genotipos.

La mezcla de reacción de la PCR se presenta a continuación en el Cuadro 1.

Cuadro 1.

Concentraciones de reactivos utilizados en la PCR-LTR de LVPR.

Reactivo	Concentración	Volumen final 30 µl por reacción
Agua grado biología molecular		16.7
Buffer 10x	1x	3 µl
MgCl ₂	1.5 µM	presente en el buffer
dNTPs	280 µM	0.7 µl
Iniciador Fw	600 nM	1.8 µl
Iniciador Rv	600 nM	1.8 µl
<i>Taq</i> polimerasa	5U/ µl	1 µl
ADN molde	100 ng/µl	5 µl

Las condiciones de la PCR se presentan a continuación en el Cuadro 2.

Cuadro 2.

Condiciones de amplificación para la PCR-LTR de LVPR.

Segmentos	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	5 minutos	95
Desnaturalización	30 segundos/45 ciclos	95
Hibridación	30 segundos/45 ciclos	58
Extensión	30 segundos/45 ciclos	72
Extensión final	15 minutos	72

5.4 Integridad estructural del ADN

Se llevó a cabo una PCR que amplifica el gen SDHA (Succinato deshidrogenasa subunidad A) (PCR-SDHA), un gen constitutivo, para comprobar la integridad estructural del ADN de aquellas muestras negativas a LTR, las concentraciones de reactivos utilizados y las condiciones de la PCR-SDHA se presentan en el Cuadro 3 y 4, respectivamente. El producto esperado fue de 384 pb. Las secuencias de los iniciadores Fw y Rv son: CATGGAGGAGGACAACCTG y TGGTAGATCTTCCCATCTTC, respectivamente.

Cuadro 3.

Concentraciones de reactivos utilizados en la PCR-SDHA.

Reactivo	Concentración	Volumen final 15 µl por reacción
Agua grado biología molecular		8.4
Buffer 10x	1x	1.5 µl
MgCl ₂	1.5 µM	0.75 µl
dNTPs	280 µM	0.35 µl
Iniciador Fw	600 nM	0.75 µl
Iniciador Rv	600 nM	0.75 µl
Taq polimerasa	5U/ µl	0.5 µl
ADN molde	100 ng/µl	2 µl

Cuadro 4.
Condiciones de amplificación de la PCR-SDHA.

Segmentos	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	5 minutos	95
Desnaturalización	30 segundos/30 ciclos	95
Hibridación	30 segundos/30 ciclos	53
Extensión	30 segundos/30 ciclos	72
Extensión final	5 minutos	72

5.5 Purificación de productos de PCR

Una vez realizada la PCR-LTR las reacciones fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (10mg/ml), para su posterior visualización en un transiluminador con luz ultravioleta (UVP, USA). Cuando se observaron amplicones positivos se cortaron los productos y se purificaron a partir de gel de agarosa por medio de un kit comercial de purificación (Favorgen®, Tailandia) que utiliza el método de adsorción de membranas de sílice en columnas.

5.6 Clonación bacteriana

El protocolo de clonación se llevó a cabo con el kit comercial Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific™ USA) y se utilizaron bacterias *E. coli* termocompetentes DH-10β. El vector incluido en el kit comercial fue el plásmido pTZ57R/T, éste cuenta con un gen de selección de resistencia a ampicilina y el gen *lacZ* en el cual se inserta el producto de PCR. El esquema del plásmido pTZ57R/T se muestra en la Figura 3, la concentración de ADN del producto de PCR purificado se evaluó de forma visual, comparando la intensidad de bandas, con el marcador de pares de bases comercial CSL-MDNA-100BPH marca Cleaver Scientific Ltd®, Reino Unido, se muestra la escala en la Figura 4. Un esquema general de la técnica de clonación se presenta en la Figura 5 y en el Cuadro 5 se muestran los reactivos utilizados en la reacción de ligación.

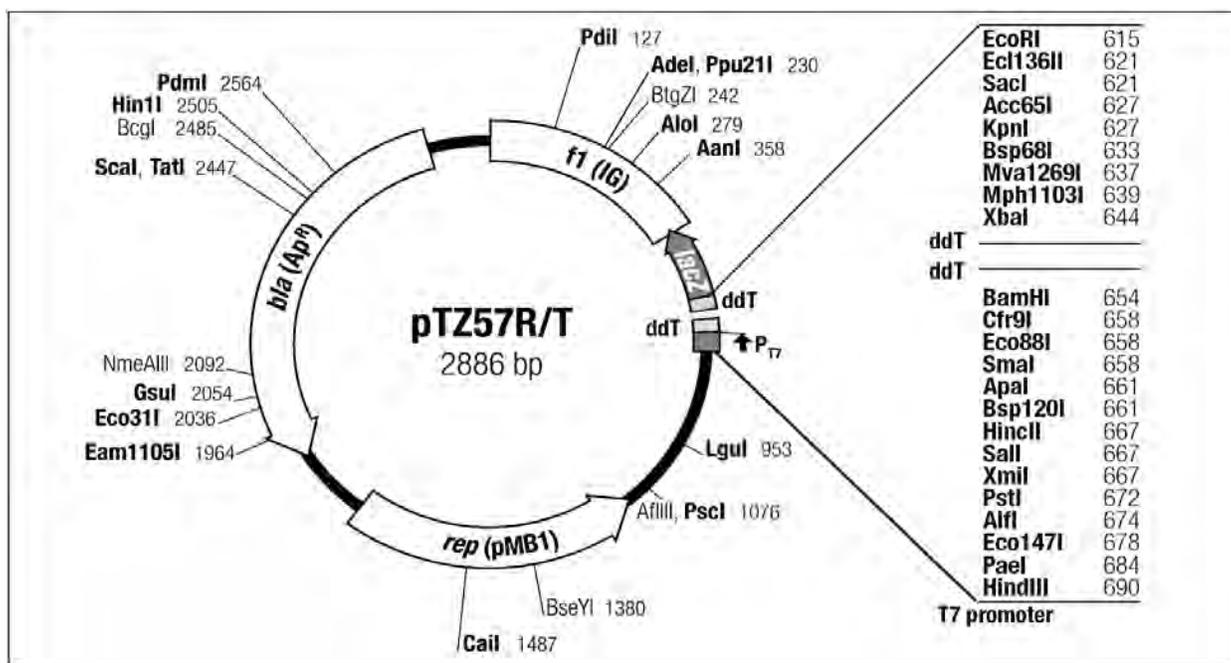


Figura 3. Esquema del plásmido pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific™ USA)

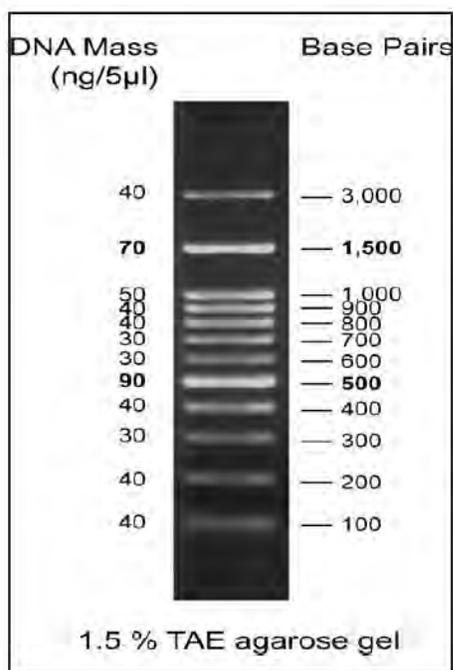


Figura 4. Escala del marcador de pares de bases. La banda de 500 pb tiene una concentración de ADN de 90 ng/5 µl (18ng/µl), así pues, un purificado de PCR con intensidad similar a la banda de 500 pb, tendrá 18ng de ADN por µl, siempre y cuando se carguen volúmenes idénticos de marcador y purificado. (Clever Scientific Ltd®, Reino Unido)

Cuadro 5.

Reactivos utilizados en la reacción de ligación. El volumen final varía entre 10 y 20 μl por la alta variabilidad de la concentración de ADN del producto de PCR purificado a utilizar en la reacción.

Reactivo	Concentración	Volumen final
Vector	55 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1-2 μl
Buffer de ligación	5x	2-4 μl
ADN Ligasa T4	5 U/ μl	1 μl
Producto de PCR	Variable	Cbp para 10-20 μl (\approx 50 $\mu\text{g}/\text{reacción}$)
Agua libre de nucleasas	-	Cbp para 10-20 μl

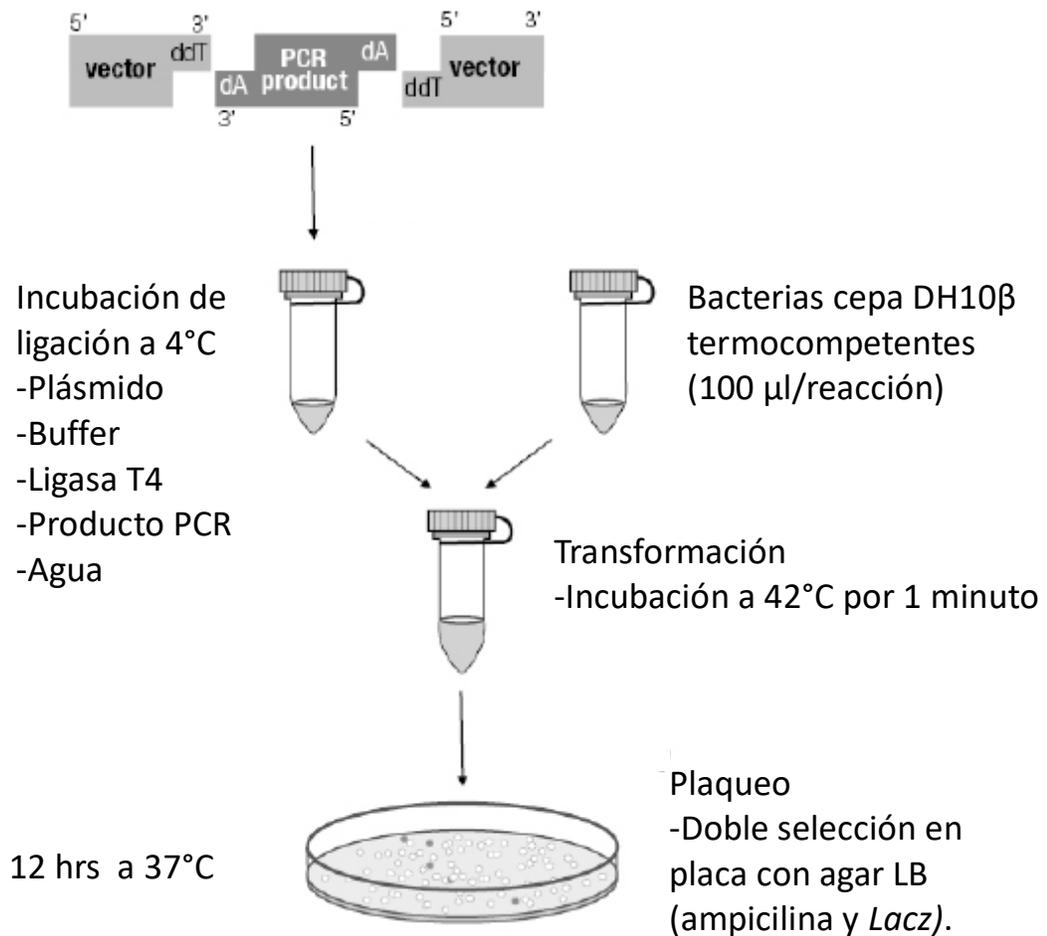


Figura 5. Resumen esquemático de la técnica de clonación. (Thermo Fisher Scientific™ USA)

Una vez realizada la transformación bacteriana, la selección fue por medio del uso de placas con agar Luria-Bertani (LB) adicionadas con ampicilina, Xgal e IPTG. Estos dos últimos elementos son parte de la evaluación cromática, las colonias bacterianas con plásmido e inserto viral serán de color blanco, aquellas colonias con plásmido pero sin inserto viral serán de color azul, debido al gen *LacZ* que permanece íntegro cuando no se realiza la inserción de ADN en el plásmido. Se seleccionaron colonias blancas positivas y fueron inoculadas en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina para dejarlas crecer en estufa orbital a 37°C, 170 rpm por 12 horas, a estas bacterias se les realizó una PCR-LTR para corroborar la presencia del producto clonado. Una vez confirmada la presencia del producto clonado, el ADN plasmídico fue extraído por medio de un kit comercial (Favorgen® Tailandia), los purificados fueron enviados a secuenciación.

5.7 Secuenciación

Los purificados plasmídicos fueron enviados a secuenciación a la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES-Iztacala, UNAM; donde se secuenció con el equipo ABI 3130x1 (Genetic analyzer con 16 capilares). La secuenciación se realizó para la cadena 5'- 3' utilizando el iniciador Fw de PCR-LTR

5.8 Filogenia

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se utilizaron para construir árboles filogenéticos con la ayuda de herramientas bioinformáticas como Bioedit© 7.2.5 y Geneious® 11.0.4 utilizando el programa MrBayes con un soporte estadístico de las ramas de 1000 bootstraps y secuencias de referencia de los genotipos A, B, C y E. De igual forma se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas en el trabajo con secuencias de referencia del genotipo B para observar e indicar los sitios de unión a factores de transcripción.

6. Resultados

6.1 Serología

Con el uso de un cELISA se lograron identificar ovinos y caprinos seropositivos a LVPR de distintos Estados del país, excepto en Chiapas y Durango. Por Estado se seleccionaron muestras para ser amplificadas por PCR-LTR (Cuadro 6)

Cuadro 6. Número de granjas muestreadas y evaluadas por cELISA por Estado de la República y por especie para la detección de anticuerpos contra LVPR, además se muestran las granjas y animales positivos por Estado y por especie.

Estado	Granjas muestreadas		Granjas positivas/ animales positivos	
	Caprinos	Ovinos	Caprinos	Ovinos
Baja California Sur	3	2	1/5	1/9
Coahuila	3		3/20	
Hidalgo		9		1/20
Estado de México	7	7	3/48	1/52
Guanajuato	27		25/96	
Querétaro	1		1/117	
Sinaloa	12		7/32	
Sonora	10	13	4/19	4/15
Tlaxcala	3		1/1	
Veracruz	2	1	2/128	1/11
Total	68	32	47/466	8/107

6.2 Detección molecular

Mediante la amplificación por PCR punto final se logró detectar material proviral de LVPR en muestras de pequeños rumiantes de distintos Estados del país (Cuadro 7 y Figura 6), las muestras fueron sometidas a purificación por medio de un kit comercial y se evaluó la concentración de ADN (Figura 7).

Cuadro 7. Muestras positivas a la PCR-LTR para la detección de ADN proviral de LVPR por Estado de la República y por especie.

Estado	Muestras positivas a PCR-LTR	
	Caprinos	Ovinos
Baja California Sur	2/5	3/9
Coahuila	10/18	
Hidalgo		2/15
Estado de México	6/15	33/40
Guanajuato	11/19	
Querétaro	14/57	
Sinaloa	6/8	
Sonora	2/2	6/6
Tlaxcala	1/1	
Veracruz	23/29	6/10
Total	75/154	50/80

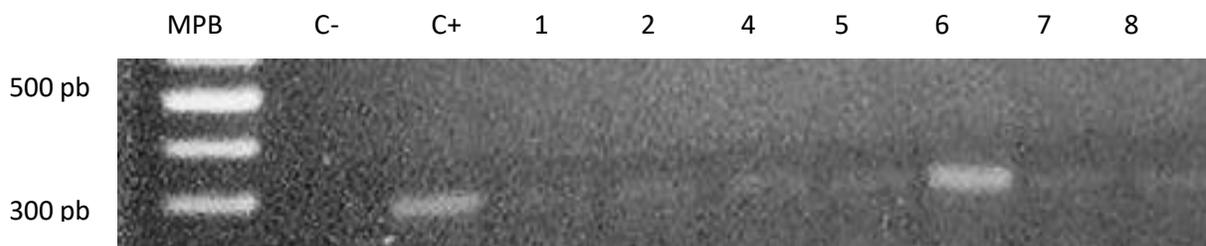


Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% con amplificados de la PCR-LTR. **MPB:** marcador de pares de bases. C-: control negativo. C+: control positivo. **1-8:** muestras de pequeños rumiantes.

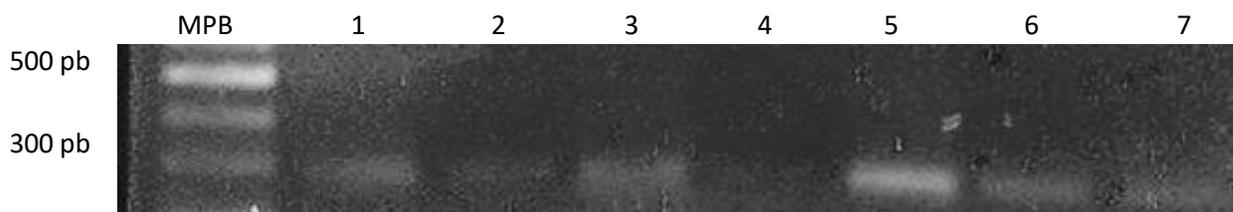


Figura 7. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% con purificados de la PCR-LTR. **MPB:** marcador de pares de bases. **1-7:** purificados de muestras de pequeños rumiantes.

La relación de resultados positivos entre el cELISA y la PCR-LTR fue de un 62.50% en ovinos y de 48.70% en caprinos. (Cuadro 8)

Cuadro 8. Se presenta el número total de muestras positivas a cELISA evaluadas por PCR-LTR y aquellas que resultaron positivas a la PCR-LTR y además la relación de positivos entre ambas pruebas expresada en porcentaje.

Especie	Positivos a cELISA	Positivos a PCR-LTR	% de concordancia
Ovinos	80	50	62.50
Caprinos	154	75	48.70

En el Cuadro 9 se muestran las muestras negativas a la PCR-LTR.

Cuadro 9. Muestras negativas a la PCR-LTR para la detección de ADN proviral por Estado de la República y especie.

Estado	Pruebas negativas a PCR	
	Caprinos	Ovinos
Baja California Sur	3/5	6/9
Coahuila	8/18	
Hidalgo		13/15
Estado de México	9/15	7/40
Guanajuato	8/19	
Querétaro	43/57	
Sinaloa	2/8	
Veracruz	6/29	4/10
Total	79/154	30/80

6.3 PCR-SDHA

Las muestras negativas a PCR-LTR se evaluaron con la PCR-SDHA, así se pudo discernir si la integridad del ADN no era la adecuada para la PCR-LTR o si en verdad la muestra era negativa (Figura 8 y Cuadro 10).

Cuadro 10. Muestras evaluadas por PCR-SDHA por Estado de la República y especie, se muestran primero aquellas positivas (verdaderas negativas) y a continuación las negativas.

Estado	Muestras evaluadas por PCR-SDHA (+/-)	
	Caprinos	Ovinos
Hidalgo		4/1
Estado de México	8/-	3/1
Querétaro	19/-	
Veracruz	2/-	4/-
Total	29/-	11/2

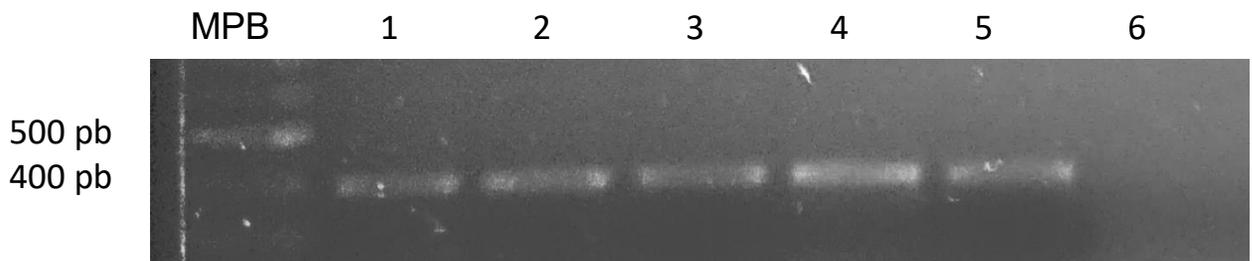


Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% con amplificadores de la PCR-SDHA. MPB, marcador de pares de bases; 1-5, muestras de pequeños rumiantes positivas; 6, muestra negativa.

6.4 Clonación

De las muestras positivas purificadas de la PCR-LTR, se eligieron al menos dos muestras por Estado del país y por especie para su clonación y ulterior secuenciación, al final se logró obtener al menos una secuencia por Estado y por especie (Cuadro 11).

Cuadro 11. Número de muestras clonadas y secuenciadas por Estado del país y por especie.

Estado	Muestras clonadas / Muestras secuenciadas	
	Caprinos	Ovinos
Baja California Sur	2/2	2/2
Coahuila	3/2	
Hidalgo		2/2
Estado de México	3/3	3/3
Guanajuato	3/1	
Querétaro	3/2	
Sinaloa	3/2	
Sonora	2/2	2/2
Tlaxcala	1/1	
Veracruz	3/2	2/2
Total	23/17	11/11

Después de la incubación de las bacterias transformadas, se discriminó entre colonias blancas y azules, eligiendo solo las colonias blancas que son las que en principio tendrían el producto de la PCR-LTR (Figura 9).

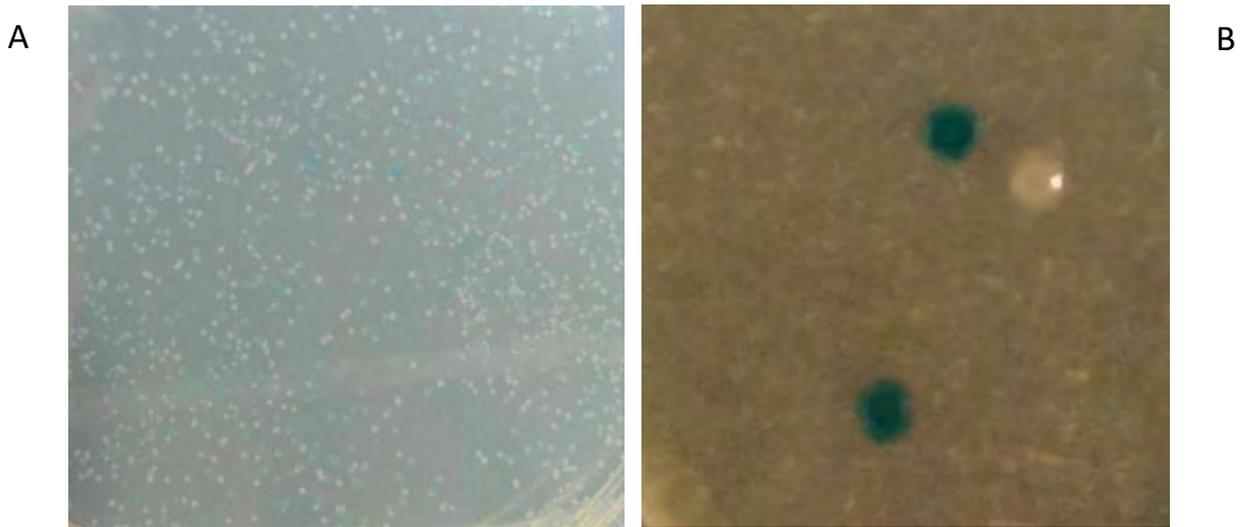


Figura 9. A. Placa de agar LB con ampicilina, Xgal e IPTG con bacterias transformadas con producto de PCR-LTR. B. Zoom de una placa con colonias blancas y azules para demostrar la clara distinción entre ambas.

Las clonas seleccionadas como positivas fueron corroboradas realizando una PCR-LTR del ADN plasmídico (Figura 10).

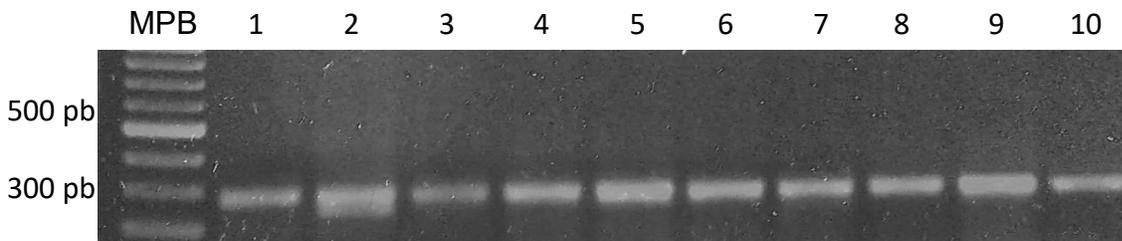


Figura 10. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% con 10 amplificados de la PCR-LTR a partir de 2 μ l de ADN plasmídico extraído con miniprep de bacterias transformadas.

6.5 Secuencias

Se lograron obtener 28 secuencias del ADN plasmídico clonado, 17 en caprinos y 11 en ovinos (Figura 11). A partir de estas secuencias se realizaron los estudios filogenéticos.



Figura 11. Mapa de México mostrando los Estados muestreados, en verde donde no se lograron muestras positivas a la PCR-LTR y en naranja donde se consiguieron secuencias de LTR de LVPR a partir de ovinos y/o caprinos. A-BCS- O&C, B-Son-O&C, C-Sin-C, D-Coah-C, E-Gua-C, F-Que-C, G-Hid-O, H-Mex-O&C, I-Tla-C, J-Ver-O&C, K-DUR, L-CHP.

6.6 Filogenia

Con las secuencias nucleotídicas obtenidas se construyó un árbol filogenético (Figura 12) incluyendo distintas secuencias de referencia. Se puede observar que todas las secuencias de este trabajo se agruparon con las secuencias de referencia del genotipo B, sobre todo con la cepa Caev-Co aislada de caprinos de E.U.A, Gansu y Shanxi de China y 496 de España. Otro grupo de secuencias del presente estudio se asociaron con la secuencia FESC derivada de un caprino de México. Es notoria la agrupación del resto de los genotipos bien delimitada, excepto por el genotipo C que se asocia con las secuencias del genotipo B3.

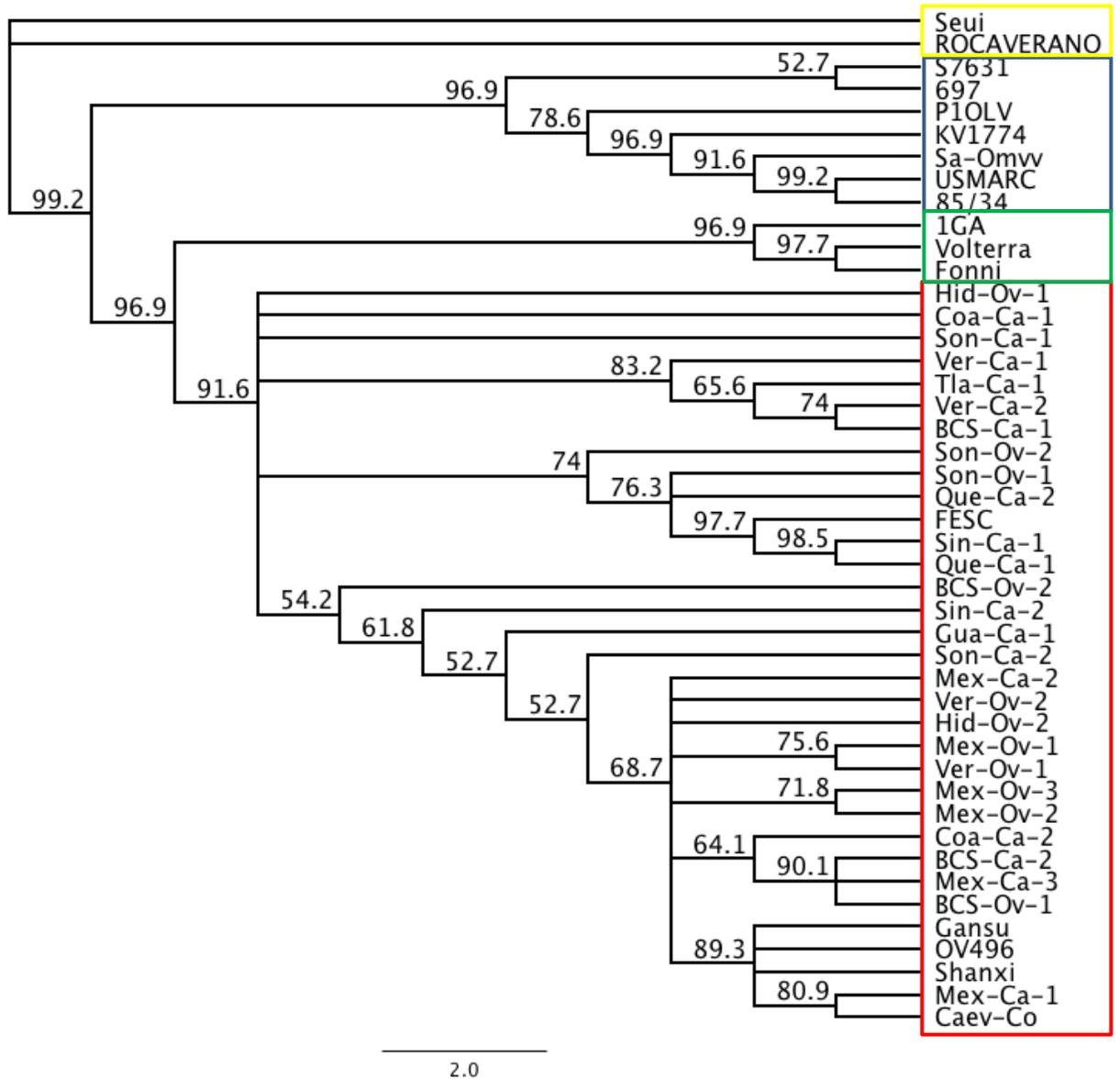


Figura 12. Árbol filogenético construido con el algoritmo MrBayes utilizado en el programa bioinformático Geneious, se muestran los valores de bootstraps significativos que soportan las ramas. Las secuencias de referencia del genotipo A se muestran en un recuadro azul, el genotipo B dentro de un recuadro rojo junto con las secuencias conseguidas por clonación del presente estudio, en verde el genotipo C y B3, y en amarillo el genotipo E representadas como outgroup. Las secuencias clonadas fueron nombradas con su origen geográfico (Estado del país), en seguida de la especie, Ca para caprino y Ov para ovino, y al final el número de la muestra por Estado.

El alineamiento demostró una gran conservación de los sitios de unión AP-4, AML (vis), caja TATA y el sitio poli A. Se pudieron encontrar cuatro sitios AP-1, en el primero se logran ver cambios de nucleótidos en la mayoría de las secuencias derivadas de este trabajo (Figuras 13a, 13b y 13c).

	AML (vis)	AP-1	AP-1	AP-4	AP-1	AP-1				
Gansu	TAACCGCA	AAGTGC	TGACAGA	TGTAACAGC	TGACACA	TCAGCTGATG	C TTGCTCA	TGC	TGACATT	GTAGCTCTGAGCT
FESCGTGCAG
Caev-CoGTGCTC
Shanxi
OV496ATA.GTG	GTAGCT.A..A
Mex-Ov-1	TTG	.AAC.GCA
Mex-Ov-2	TTG	.AAC.GCA
Mex-Ov-3	TTG	.AAC.GCA
Hid-Ov-1T	TTG	.AAC.GCGC	.A
Hid-Ov-2	TTG	.AAC.GCA
Ver-Ov-1	TTG	.AAC.GCA
Ver-Ov-2	TTG	.AAC.GCTA	.A.G
BCS-Ov-1	TTG	.AAC.GCA	.T
BCS-Ov-2T	TTG	.AAC.GCA
Son-Ov-1	C	.GTGT	G	.CGCT	.C
Son-Ov-2T	TTG	.AAC.GCC	.A
Son-Ca-1T	TTG	.AAC.GCC	.A
Son-Ca-2	TTG	.AAC.GCA	.T
Ver-Ca-1T	TTG	.AAC.GCC
Ver-Ca-2T	TTG	.AAC.GG	.C	.A.T
Mex-Ca-1TGCA.TAT.A.A
Mex-Ca-2	TTG	.AAC.GCA
Mex-Ca-3	TTG	.AAC.GCA
Que-Ca-1GTGCATA	.A
Que-Ca-2T	.GTG	.AAC.GCCC	.A
BCS-Ca-1T	TTG	.AAC.GCC
BCS-Ca-2	TTG	.AAC.GCA
Coa-Ca-1T	TTG	.AAC.GCC	.A
Coa-Ca-2	TTG	.AAC.GCA
Sin-Ca-1GTGCATA	.A
Sin-Ca-2	TTG	.AAC.GCA	.AT.T
Gua-Ca-1	TTG	.AAC.GCA	.T
Tla-Ca-1T	TTG	.AAC.GCC

Figura 13a. Alineamiento de secuencias de referencia del genotipo B y aquellas obtenidas por clonación. Se encierran en un recuadro verde el sitio de unión a factores de transcripción AML (vis), en color azul los sitios AP-1 y en color amarillo el sitio AP-4.

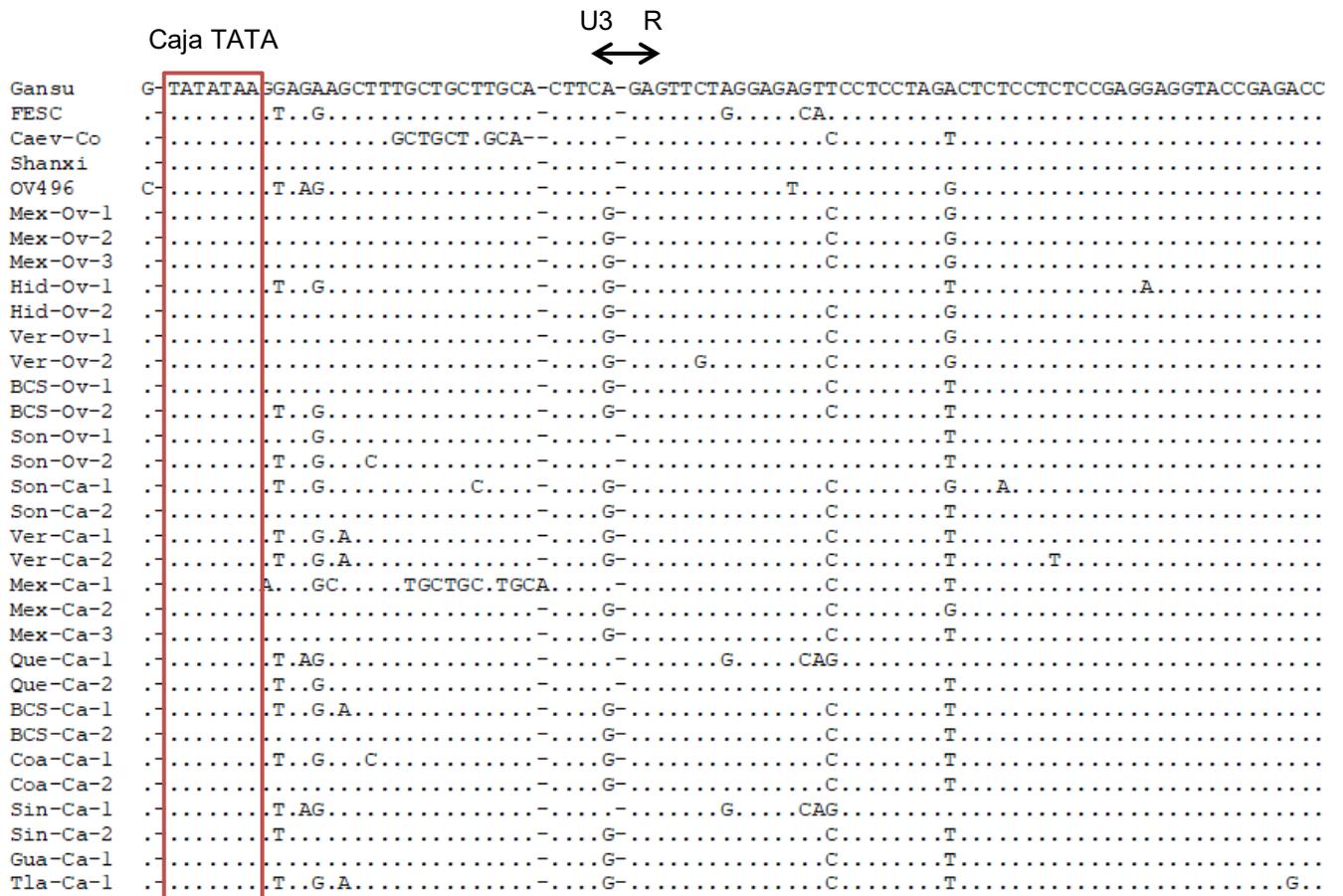


Figura 13b. Alineamiento de secuencias de referencia del genotipo B y aquellas obtenidas por clonación. Se encierra en un recuadro rojo la caja TATA y se marcan los límites de la región U3 y la región R.

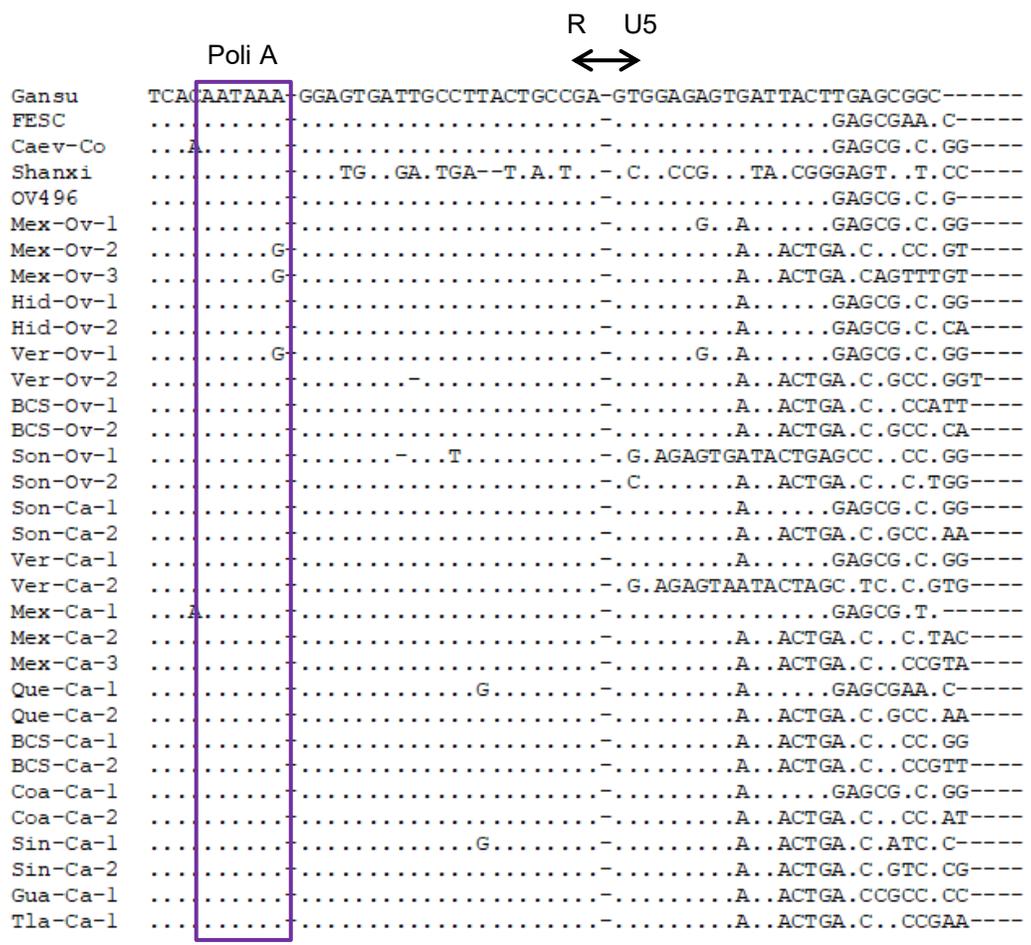


Figura 13c. Alineamiento de secuencias de referencia del genotipo B y aquellas obtenidas por clonación. Se encierra en un recuadro morado el sitio poli A y se marcan los límites de la región R con la región U5.

7 Discusión

En las secuencias del presente estudio se observó una sola copia de los sitios AML (*vis*) y AP-4, ambas altamente conservadas, y cuatro sitios AP-1, por lo que hipotéticamente las cepas virales estudiadas podrían contar con una actividad funcional en su transcripción, dicho de otra manera, estos virus cuentan con capacidad replicativa, esto se refleja en los dos únicos casos documentados con signología: una cabra de Baja California Sur con artritis y un ovino del Estado de México con neumonía.

El estudio filogenético demostró que todas las secuencias obtenidas en el trabajo se agruparon con las de referencia de los genotipos B1 y B2, en los que la secuencia CAEV-CO es la más representativa geográficamente ya que proviene de un aislado de EUA. Ramírez et al., (2011) realizaron una serie de estudios con secuencias derivadas de la LTR, *gag* y *env* de LVPR obtenidos de muestras de ovinos y caprinos del Estado de México, criados y nacidos en México e identificaron que estos animales estaban infectados con una cepa muy similar a CAEV-CO, la cual denominaron como FESC-752. Al analizar los resultados obtenidos, los hallazgos fueron muy similares, lo que indica que se siguen presentando infecciones causadas por virus americanos prevalentes en el país y que el genotipo B, antes conocido como genotipo modelo de los virus tipo AEC, también afecta a ovinos. Esta es la primera descripción de genotipos B de LVPR infectando a ovinos en varios Estados del país.

La asociación de secuencias de referencia del genotipo B3 al genotipo C puede deberse a que las secuencias con las que se realizó el árbol filogenético son demasiado cortas para poder diferenciar de manera adecuada los genotipos, para poder separarlos bien se podrían utilizar secuencias más largas de genes como *env* o *gag*.

Se pudo determinar un porcentaje del 48.70% de concordancia entre el cELISA y la PCR en caprinos y 62.50% en ovinos. La detección de anticuerpos ha sido la estrategia más utilizada para el diagnóstico de los LVPR, en un principio con el uso de IDAG y actualmente con el uso de distintos tipos de ELISA. Una ventaja del ELISA es el alto rango de muestras con las que se puede llevar a cabo la prueba (suero, plasma, semen y leche), sin embargo, estos métodos de diagnóstico se encuentran con las siguientes dificultades: el diseño de antígenos para las pruebas puede ser complicado por la alta variabilidad génica y antigénica de los LVPR y además los títulos de anticuerpos pueden oscilar después de la infección, por lo que se pueden encontrar respuestas intermitentes de anticuerpos, dando resultados fluctuantes en un mismo rebaño. Hasta ahora no se puede establecer el ELISA como una “prueba de oro” pero siendo más sensible y específica que la IDAG, sí ha sido utilizada como la prueba de elección para el diagnóstico de LVPR. La PCR, una prueba molecular que puede detectar material proviral, es capaz de dar resultados positivos en aquellos animales con seronegatividad, aunque la alta heterogeneidad del virus y la baja carga viral afectan la capacidad de detección de la prueba (se ha mencionado que en una población de un millón de leucocitos puede llegar a presentarse uno solo infectado). Utilizando regiones más conservadas como *pol* y LTR se puede aumentar la fidelidad de la prueba, inclusive Zanoni et al., (1992) mencionan que usando iniciadores ubicados en la LTR se consiguieron mejores resultados que con los de los genes *pol* y *gag* (Celler et al., 2000; Álvarez et al., 2005; de Andrés et al., 2005; Karanikolaou et al., 2005; Reina et al., 2006; Brinkhof et al., 2008; Ramírez et al., 2009; Reina et al., 2009; L’Homme et al., 2011; de Andrés et al., 2013). Así pues la concordancia entre las pruebas resultó relativamente baja por las diferencias inherentes de ambas pruebas, por otro lado, evaluando un número similar de muestras se podría comparar de manera más franca la concordancia de las pruebas entre especies.

Para un trabajo posterior sería interesante evaluar la sensibilidad y la especificidad de la PCR-LTR para determinar su capacidad de detección. Gonzales et al., (2013) mencionan que utilizando una PCR anidada se logró aumentar considerablemente la capacidad de detección de provirus. Esta variante consta de una segunda ronda de PCR cuyo producto se encuentra dentro del amplicón de la primera PCR, así pues, utilizando este tipo de PCR en un trabajo posterior podría aumentarse la capacidad de detección.

8. Conclusiones

Con la ayuda de un cELISA se pudo identificar ovinos y caprinos serológicamente infectados con LVPR y delimitar el grupo de estudio a evaluar por PCR.

Con la estandarización de la técnica de clonación utilizando sistemas bacterianos se pudieron clonar fragmentos de la región LTR de LVPR con los cuales se obtuvieron secuencias nucleotídicas calidad.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas permitieron identificar que el genotipo B está ampliamente distribuido en los rebaños de ovinos y caprinos del país.

9. Bibliografía

Agnarsdóttir, G., Thorsteinsdóttir, H., Óskarsson, T., Matthíasdóttir, S., Hafliðadóttir, B. S., Andrésón, Ó. S., & Andrésdóttir, V. (2000). The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *Journal of General Virology*, 81(8), 1901-1905.

Al Ahmad, M. A., Fieni, F., Guiguen, F., Larrat, M., Pellerin, J. L., Roux, C., & Chebloune, Y. (2006). Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. *Virology*, 353(2), 307-315.

Alvarez, V., Arranz, J., Daltabuit-Test, M., Leginagoikoa, I., Juste, R. A., Amorena, B., ... & Berriatua, E. (2005). Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. *Research in veterinary science*, 78(3), 237-243.

Alvarez, V., Daltabuit-Test, M., Arranz, J., Leginagoikoa, I., Juste, R. A., Amorena, B., ... & Berriatua, E. (2006). PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Research in veterinary science*, 80(2), 226-234.

Andrésdóttir, V., Skraban, R., Matthíasdóttir, S., Lutley, R., Agnarsdóttir, G., & Thorsteinsdóttir, H. (2002). Selection of antigenic variants in maedi-visna virus infection. *Journal of general virology*, 83(10), 2543-2551.

Angelopoulou, K., Brellou, G. D., Greenland, T., & Vlemmas, I. (2006). A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus research*, 118(1-2), 178-184.

Angelopoulou, K., Brellou, G. D., & Vlemmas, I. (2006b). Detection of maedi-visna virus in the kidneys of naturally infected sheep. *Journal of comparative pathology*, 134(4), 329-335.

Angelopoulou, K., Poutahidis, T., Brellou, G. D., Greenland, T., & Vlemmas, I. (2008). A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *The veterinary journal*, 175(3), 346-355.

Barquero, N., Domenech, A., Arjona, A., Fernández-Garayzabal, J. F., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., & Gomez-Lucia, E. (2013). Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Research in veterinary science*, 94(3), 817-819.

Barros, S. C., Ramos, F., Duarte, M., Fagulha, T., Cruz, B., & Fevereiro, M. (2004). Genomic characterization of a slow/low maedi visna virus. *Virus Genes*, 29(2), 199-210.

Barros, S. C., Andresdottir, V., & Fevereiro, M. (2005). Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Archives of virology*, 150(2), 201-213.

Blacklaws, B. A. (2012). Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(3), 259-269.

Blacklaws B. A., Visna-Maedi Viruses. En: Mahy B.W.J., van Regenmortel M.H.V., editores. Desk Encyclopedia Animal and Bacterial Virology. Oxford: Academic Press, 2008: 424-432.

Blatti-Cardinaux, L., Pisoni, G., Stoffel, M. H., Zanoni, R., Zahno, M. L., & Bertoni, G. (2016). Generation of a molecular clone of an attenuated lentivirus, a first step in understanding cytopathogenicity and virulence. *Virology*, *487*, 50-58.

Brellou, G. D., Angelopoulou, K., Poutahidis, T., & Vlemmas, I. (2007). Detection of maedi-visna virus in the liver and heart of naturally infected sheep. *Journal of comparative pathology*, *136*(1), 27-35.

Brinkhof, J. M. A., Houwers, D. J., Moll, L., Dercksen, D., & Van Maanen, C. (2010). Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Veterinary microbiology*, *142*(3-4), 193-198.

Callan, R. J., & Van Metre, D. C. (2004). Viral diseases of the ruminant nervous system. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, *20*(2), 327-362.

Campbell, R. S. F., & Robinson, W. F. (1998). The comparative pathology of the lentiviruses. *Journal of comparative pathology*, *119*(4), 333-395.

Cardinaux, L., Zahno, M. L., Deubelbeiss, M., Zanoni, R., Vogt, H. R., & Bertoni, G. (2013). Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Veterinary microbiology*, *162*(2-4), 572-581.

Celer, V., Nejedla, E., Bertoni, G., Peterhans, E., & Zanoni, R. G. (2000). The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of czech Maedi-Visna Isolates Based on gag Gene Sequences. *Zoonoses and public health*, *47*(3), 203-215.

Chen, B. Y., & Janes, H. W. (Eds.). (2002). *PCR cloning protocols* (Vol. 192). Springer Science & Business Media.

Cork, L. C., Hadlow, W. J., Crawford, T. B., Gorham, J. R., & Piper, R. C. (1974). Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *Journal of infectious diseases*, *129*(2), 134-141.

Cortez-Romero, C., Pellerin, J. L., Ali-Al-Ahmad, M. Z., Chebloune, Y., Gallegos-Sánchez, J., Lamara, A., ... & Fieni, F. (2013). The risk of small ruminant lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: State-of-the-art review. *Theriogenology*, *79*(1), 1-9.

Crawford, T., Adams, D. S., Cheevers, W. P., & Cork, L. C. (1980). Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, *207*(4434), 997-999.

Crespo, H., Bertolotti, L., Proffitti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Acutis, P. L., ... & Rosati, S. (2016). Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Veterinary microbiology*, *192*, 152-162.

De la Concha-Bermejillo, A., Espinosa, L. E., Rubio, E. L., & Setien, A. A. (1999). Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Canadian journal of veterinary research*, *63*(3), 212.

De Andres, D., Klein, D., Watt, N. J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B. A., & Harkiss, G. D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*, *107*(1-2), 49-62.

De Andrés, X., Ramírez, H., Bertolotti, L., San Román, B., Glaria, I., Crespo, H., ... & Perez, M. (2013). An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Veterinary immunology and immunopathology*, *152*(3-4), 277-288.

Denner, J. (2007). Transspecies transmissions of retroviruses: new cases. *Virology*, 369(2), 229-233.

De Regge, N., & Cay, B. (2013). Development, validation and evaluation of added diagnostic value of a q(RT)-PCR for the detection of genotype A strains of small ruminant lentiviruses. *Journal of virological methods*, 194(1-2), 250-257.

Fras, M., Leboeuf, A., Labrie, F. M., Laurin, M. A., Sohal, J. S., & L'Homme, Y. (2013). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats. *Infection, genetics and evolution*, 19, 97-104.

Glaria, I., Reina, R., Ramírez, H., De Andrés, X., Crespo, H., Jauregui, P., Salazar, E., Luján, L., Pérez, M., Benavides, J., Pérez, V., Polledo, L., García-Marín, J., Riezu, J., Borrás, F., Amorena, B., de Andrés, D. (2012). Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 137-146.

Gómez-Lucia, E., Rowe, J., Collar, C., & Murphy, B. (2013). Diversity of caprine arthritis–encephalitis virus promoters isolated from goat milk and passaged in vitro. *The veterinary journal*, 196(3), 431-438.

Gonzales, J. C. V., Domingo, C. Y. J., Abes, N. S., Gutiérrez, C. A., Villanueva, M. A., & Mingala, C. N. (2013). Concordance of competitive enzyme linked immunosorbent assay and nested-polymerase chain reaction in the detection of caprine arthritis-encephalitis virus. *Small ruminant research*, 115(1), 134-139.

Guðmundsdóttir, E. Þ. (2010). *Cell tropism of maedi-visna virus* (Tesis Doctoral). Universidad de Islandia.

Hall, B. G., & Barlow, M. (2006). Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. *Annals of epidemiology*, 16(3), 157-169.

Hasegawa, M. Y., de Souza, M. D. C. C., Lara, H., Lobos, E. M. C. V., Gaeta, N. C., Hayashi, M., ... & Gregory, L. (2017). An experimental study on the vertical transmission of caprine arthritis-encephalitis virus from naturally infected females to their offspring. *Small ruminant research*, 149, 23-27.

Hess, J. L., Small, J. A., & Clements, J. E. (1989). Sequences in the visna virus long terminal repeat that control transcriptional activity and respond to viral trans-activation: involvement of AP-1 sites in basal activity and trans-activation. *Journal of virology*, 63(7), 3001-3015.

Hillis DM. (1997). Phylogenetic analysis. *Current biology*, 7, 129-131.

Institute for International Cooperation in Animal Biologics (IICAB). (2015), Small Ruminant Lentiviruses: Maedi-Visna & Caprine Arthritis and Encephalitis. Center for food security & public health. 1-8.

Juganaru, M., Reina, R., Grego, E., Profiti, M., & Rosati, S. (2010). LTR promoter activity of SRLV genotype E, strain Roccaverano. *Veterinary research communications*, 34(1), 47-51.

Karanikolaou, K., Angelopoulou, K., Papanastasopoulou, M., Koumpati-Artopiou, M., Papadopoulos, O., & Koptopoulos, G. (2005). Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small ruminant research*, 58(2), 181-187.

Konishi, M., Nagura, Y., Takei, N., Fujita, M., Hayashi, K., Tsukioka, M., Yamamoto, T., Kameyama, K., Sentsui, H., Murakami, K. (2011). Combined

eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. *Small ruminant research*, 99(1), 65-71.

Lamara, A., Fieni, F., Chatagnon, G., Larrat, M., Dubreil, L., & Chebloune, Y. (2013). Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 36(4), 397-404.

Leginagoikoa, I., Minguíjon, E., Berriatua, E., & Juste, R. A. (2009). Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *Journal of virological methods*, 156(1-2), 145-149.

Leroux, C., & Mornex, J. F. (2008). Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small ruminant research*, 76(1), 68-76.

Leyva, G. V. H., Martínez, R. H. A., González, R. G., Cornejo, C. M. A., Rosales, M. E., & Garrido, F. G. (1998). Identificación del virus de la artritis encefalitis caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México. *Revista latinoamericana de microbiología*, 40, 33-38.

L'Homme, Y., Ouardani, M., Lévesque, V., Bertoni, G., Simard, C., & Pisoni, G. (2011). Molecular characterization and phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses isolated from Canadian sheep and goats. *Virology journal*, 8(1), 271.

Luján, L., Gómez, N., & Bolea, R. (2001). Cuadro clínico y lesional. *Ovis*, (72), 41-57.

Lyll, J. W., Solanky, N., & Tiley, L. S. (2000). Restricted species tropism of maedi–visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *Journal of general virology*, 81(12), 2919-2927.

Martínez, R.H.A., Lazcano, R.M.A., Ramírez, A.H., Sánchez G.J.H., Díaz A.E. (2011). Detección de anticuerpos en machos a Lentivirus de Pequeños Rumiantes (Estudio preliminar). XXVI Reunión Nacional Sobre Caprinocultura. Querétaro, Querétaro, México.

Martins, G. R., Marinho, R. C., Bezerra Junior, R. Q., Alves, A. D. O., Câmara, L., Albuquerque-Pinto, L. C., & Teixeira, M. F. D. S. (2017). Goat umbilical cord cells are permissive to small ruminant lentivirus infection in vitro. *Brazilian journal of microbiology*, 48(1), 125-131.

Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., ... & Luján, L. (2015). Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary microbiology*, 181(1-2), 75-89.

Molina, R. M., Trigo, F. J., & Cutlip, R. C. (1986). Estudio serológico de la neumonía progresiva ovina en México. *Veterinaria México*, 17, 269-273.

Murphy, B., Jasmer, D. P., White, S. N., & Knowles, D. (2007). Localization of a TNF-activated transcription site and interactions with the gamma activated site within the CAEV U3 70 base pair repeat. *Virology*, 364(1), 196-207.

Murphy, B., McElliott, V., Vapniarsky, N., Oliver, A., & Rowe, J. (2010). Tissue tropism and promoter sequence variation in caprine arthritis encephalitis virus infected goats. *Virus research*, 151(2), 177-184.

Murphy, B., Hillman, C., Castillo, D., Vapniarsky, N., & Rowe, J. (2012). The presence or absence of the gamma-activated site determines IFN gamma-mediated transcriptional activation in CAEV promoters cloned from the mammary

gland and joint synovium of a single CAEV-infected goat. *Virus research*, 163(2), 537-545.

Oskarsson, T., Hreggvidsdóttir, H. S., Agnarsdóttir, G., Matthíasdóttir, S., Ogmundsdóttir, M. H., Jónsson, S. R., ... & Andrésdóttir, V. (2007). Duplicated sequence motif in the long terminal repeat of maedi-visna virus extends cell tropism and is associated with neurovirulence. *Journal of virology*, 81(8), 4052-4057.

Pedersen, F. S., & Duch, M. (2011). Retroviral Replication, *Encyclopedia of Life Sciences*.

Peletto, S., Bertuzzi, S., Campanella, C., Modesto, P., Maniaci, M. G., Bellino, C., ... & Acutis, P. L. (2011). Evaluation of internal reference genes for quantitative expression analysis by real-time PCR in ovine whole blood. *International journal of molecular sciences*, 12(11), 7732-7747.

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

Pérez, S.A., Martínez, R.H., Ramírez, A.H. Identificación de anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos carneros por las técnicas de ELISA y Western blot. (2003). *Memorias del XII Congreso Nacional de Producción Ovina*. Tulancingo, Hidalgo. México.

Peterson, K., Brinkhof, J., Houwers, D. J., Colenbrander, B., & Gadella, B. M. (2008). Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, 69(4), 433-442.

Peterson, K., Koets, A., Rutten, V. P. M. G., Colenbrander, B., & Houwers, D. J. (2006). Flowcytometric assessment of circulating peripheral blood monocytes in small ruminants. *Small ruminant research*, 65(1), 136-141.

Pisoni, G., Moroni, P., Turin, L., & Bertoni, G. (2007). Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology*, 369(1), 119-130.

Pittavino, M., Ferreri, L., Giacobini, M., Bertolotti, L., Rosati, S., & Venturino, E. (2014). A CAEV epidemiological model for goat breeding. *Applied mathematics and computation*, 227, 156-163.

Ponti, W., Paape, M., Bronzo, V., Pisoni, G., Pollera, C., & Moroni, P. (2008). Phenotypic alteration of blood and milk leukocytes in goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Small ruminant research*, 78(1), 176-180.

Pritchard G.C., McConnell I. Maedi-visna. (2007). Diseases of Sheep. Blackwell Publishing, 217-223.

Prezioso, S., Renzoni, G., Allen, T. E., Taccini, E., Rossi, G., DeMartini, J. C., & Braca, G. (2004). Colostral transmission of maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Veterinary microbiology*, 104(3-4), 157-164.

Ramírez, C., Trigo, F.J. (1983). Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la Neumonía Progresiva Ovina en México. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria. Facultad de medicina, UNAM. Ciudad universitaria, 553-555. SARH-UNAM. México.

Ramírez, H., San Román, B., Glaria, I., Reina, R., Hernandez, M. M., de Andres, X., ... & Grandas, A. (2009). Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology*, 72(8), 1085-1096.

Ramírez, H., Reina, R., Amorena, B., Andrés, D. D., & Martínez, H. A. (2013). Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses*, 5(4), 1175-1207.

Ravazzolo, A. P., Nenci, C., Vogt, H. R., Waldvogel, A., Obexer-Ruff, G., Peterhans, E., & Bertoni, G. (2006). Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*, 350(1), 116-127.

Reina, R., Mora, M. I., Glaria, I., García, I., Solano, C., Lujan, L., ... & Mamoun, R. Z. (2006). Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus research*, 121(2), 189-198.

Reina, R., Grego, E., Bertolotti, L., De Meneghi, D., & Rosati, S. (2009). Genome analysis of small-ruminant lentivirus genotype E: a caprine lentivirus with natural deletions of the dUTPase subunit, vpr-like accessory gene, and 70-base-pair repeat of the U3 region. *Journal of virology*, 83(2), 1152-1155.

Reina, R., Berriatua, E., Luján, L., Juste, R., Sánchez, A., de Andrés, D., & Amorena, B. (2009). Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *The veterinary journal*, 182(1), 31-37.

Reina, R., Bertolotti, L., Dei Giudici, S., Puggioni, G., Ponti, N., Profiti, M., ... & Rosati, S. (2010). Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Veterinary microbiology*, 144(1-2), 24-31.

Rodríguez, M. C., 2017. Detección de Lentivirus de pequeños ruminantes en rebaños mixtos de ovinos y caprinos por serología y PCR (Tesis de licenciatura). UNAM. Cuautitlán Izcalli. Estado de México

Rowe, J. D., & East, N. E. (1997). Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary clinics: food animal practice*, 13(1), 35-53.

Sánchez, J. H., Martínez, H. A., García, M. M., Garrido, G., Gómez, L., Aguilar, J. A., ... & Ramírez, H. (2016). The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology*, 86(8), 1953-1957.

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

Santry, L. A., de Jong, J., Gold, A. C., Walsh, S. R., Menzies, P. I., & Wootton, S. K. (2013). Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario, Canada. *Virus research*, 175(1), 30-44.

Sargan, D. R., Sutton, K. A., Bennet, I. D., McConnell, I., & Harkiss, G. D. (1995). Sequence and repeat structure variants in the long terminal repeat of maedi-visna virus EV1. *Virology*, 208(1), 343-348.

Sider, L. H., Heaton, M. P., Chitko-McKown, C. G., Harhay, G. P., Smith, T. P., Leymaster, K. A., ... & Clawson, M. L. (2013). Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. *Veterinary research*, 44(1), 64.

Singh, D. K., Chebloune, Y., Mselli-Lakhal, L., Karr, B. M., & Narayan, O. (1999). Ovine lentivirus-infected macrophages mediate productive infection in cell types

that are not susceptible to infection with cell-free virus. *Journal of general virology*, 80(6), 1437-1444.

Shah, C., Böni, J., Huder, J. B., Vogt, H. R., Mühlherr, J., Zanoni, R., ... & Schüpbach, J. (2004). Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, 319(1), 12-26.

Stonos, N., Wootton, S. K., Quinton, M., & Karrow, N. (2013). Seroprevalence of small ruminant lentivirus infection in Ontario goat herds. *Small ruminant research*, 114(2), 284-288.

Sutton, K. A., Lin, C. T., Harkiss, G. D., Mcconnell, I., & Sargan, D. R. (1997). Regulation of the long terminal repeat in visna virus by a transcription factor related to the AML/PEBP2/CBF superfamily. *Virology*, 229(1), 240-250.

Suzuki, D. T., & Griffiths, A. J. (1976). *An introduction to genetic analysis*. WH Freeman and Company.

Tesoro Cruz, E., Hernández González, R., Martínez Rodríguez, A., Ramírez Álvarez, H., Trujillo Ortega, M. E., Kretschmer Schmid, R., & Aguilar Setién, Á. (2003). Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelectrotransferencia. *Veterinaria México*, 34(2).

Tórtora, J., (2008). Enfermedades reemergentes para el rebaño ovino mexicano. *La revista del borrego*, 53.

Torres-Acosta, J. F. J., Gutiérrez-Ruiz, E. J., Butler, V., Schmidt, A., Evans, J., Babington, J., ... & Cámara-G, E. (2003). Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small ruminant research*, 49(2), 207-211.

Trigo, T. F. (1991). La artritis-encefalitis caprina. *Cienc Vet.* 5: 49, 63.

Trujillo, J. D., Hötzel, K. J., Snekvik, K. R., & Cheevers, W. P. (2004). Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. *Virology*, 325(1), 129-136.

Tu, P. A., Shiu, J. S., Lee, S. H., Pang, V. F., Wang, D. C., & Wang, P. H. (2017). Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *Journal of virological methods*, 243, 98-104.

Urcastegi, A. (2007). Ovinos mexicanos sacrificados en Colombia. *Acontecer ovino-caprino*, 8(35), 52-54.

Valla, S., & Lale, R. (Eds.). (2014). *DNA cloning and assembly methods*. Humana Press.

Villet, S., Bouzar, B. A., Morin, T., Verdier, G., Legras, C., & Chebloune, Y. (2003). Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. *Journal of virology*, 77(17), 9632-9638.

Wong, D. W. (2006). *The ABCs of gene cloning*. Springer.

Zanoni, R. G., Nauta, I. M., Kuhnert, P., Pauli, U., Pohl, B., & Peterhans, E. (1992). Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Veterinary microbiology*, 33(1-4), 341-351.