



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la
Salud Animal

**Detección de un fragmento del gen NS1 del virus de lengua azul en
ovinos**

Tesis:

Que para optar por el grado de Maestro en Ciencias de la Producción y de
la Salud Animal

Presenta:

LUIS ADRIAN YÁÑEZ GARZA

TUTOR PRINCIPAL

ELIZABETH LOZA RUBIO- INIFAP

COMITÉ TUTOR:

EDITH ROJAS ANAYA- INIFAP

ROSA ELENA SARMIENTO SILVA- FMVZ

Ciudad de México, Mayo, 2019



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.

Persiguiendo el sueño de un niño, encontré a la niña de mis sueños.

-Bienvenida a mi mundo, Ariadne Tonali.

Porque yo no podría ser, si alguien no me hubiera imaginado.

-Gracias, Dios.

Y resulta ser que nunca me había detenido a pensar en la razón por la que me habían imaginado... Y llegaste tú.

-Nos merecemos, Tania.

Si tan sólo este éxito representa una pizca del amor que me has dado, habrá valido todo esfuerzo.

-Esto es por ti, mamá.

Este es un paso más en mi intento de estar a la altura de mi más grande héroe. Nunca olvidaré el rostro de mi padre.

-Esto es por ti, papá.

Me pregunto de que serviría el camino bajo el haz sin sus risas, su compañía, y los días y noches que nos brinda para compartir nuestro más ferviente deseo de ser testigos de nuestra historia.

Esto es por ustedes, mi manada: Avatar, Ram y Roy.

Agradecimientos.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio, por su guía y ejemplo como mediadora entre un mar de científicos, por su ejemplo para las buenas relaciones en esta línea de trabajo y por abrirme las puertas de su laboratorio para andar este camino.

A la Dra. Edith Rojas Anaya, por su oído atento, su enfoque y determinación en todo el desarrollo de este proyecto. Te agradezco infinitamente tu participación y tus enseñanzas, sin ti, esto no sería una Maestría.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, por sus sabios consejos, su dirección y apoyo en los momentos más cruciales y por haber sembrado esta semilla durante mi trayecto en la especialidad.

A la MVZ Esp. María Grisel Anaya Santillán, por siempre tener la puerta abierta para mí, por creer en mí, por ser una excelente jefa y permitirme demostrar más allá de mis más profundas expectativas, todo lo que puedo ser. Muchas gracias, mamá pantera.

Al CONACYT, por fomentar e impulsar un camino que de otra manera no se podría haber desarrollado y otorgarme la oportunidad de servir a mi gremio, mi universidad y mi nación a través de la ciencia.

El gesto cruel de la boca de Gmork se acentuó. Atreyu titubeó una décima de segundo y luego susurró:

—¡Dime el secreto! ¿Qué seré allí?

Otra vez tardó Gmork mucho tiempo en responder. Su respiración era ahora ronca y estertorosa. Sin embargo, de pronto se incorporó, de forma que quedó apoyado en las zarpas delanteras y Atreyú tuvo que mirarlo. Sólo entonces se dio cuenta de todo su tamaño y todo su horror. Cuando el hombre-lobo habló de nuevo, su voz sonó áspera.

—¿Has visto la Nada, hijito?

—Sí, muchas veces.

—¿Qué te parece?

—Como si uno estuviera ciego.

—Bueno... pues cuando entráis en ella se apodera de vosotros, quiero decir la Nada. Sois como una enfermedad contagiosa que hace ciegos a los hombres, de forma que no pueden distinguir ya entre apariencia y realidad. ¿Sabéis cómo os llaman allí?

—No —susurró Atreyu.

—¡Mentiras! —ladró Gmork.

Atreyu sacudió la cabeza. Sus labios se habían quedado exangües.

—¿Cómo puede ser eso?

Gmork se ensañó al ver el espanto de Atreyu. La conversación lo animaba visiblemente. Tras una pequeña pausa siguió diciendo:

—¿Me preguntas qué serás allí? ¿Y qué eres aquí? ¿Qué sois los seres de Fantasia? ¡Sueños, invenciones del reino de la poesía, personajes de una Historia Interminable! ¿Crees que eres real, hijito? Bueno, aquí, en tu mundo, lo eres. Pero, si atraviesas la Nada, no existirás ya. Habrás quedado desfigurado. Estarás en otro mundo. Allí no tenéis ningún parecido con vosotros mismos. Lleváis la ilusión y la ofuscación al mundo de los hombres. ¿Sabes, hijito, lo que pasará con todos los habitantes de la Ciudad de los Espectros que han saltado a la Nada?

—No —tartamudeó Atreyu.

—Se convertirán en desvaríos de la mente humana, imágenes del miedo cuando, en realidad, no hay nada que temer, deseos de cosas que enferman a los hombres, imágenes de la desesperación donde no hay razón para desesperar...

—¿Todos seremos así? —preguntó Atreyu espantado.

—No —replicó Gmork—, hay muchas clases de locura y ofuscación; según lo que sois aquí, hermosos o feos, tontos o listos, seréis allí mentiras hermosas o feas, tontas o inteligentes.

—Y yo —quiso saber Atreyu—, ¿qué seré yo?

Gmork sonrió irónicamente.

—Eso no te lo digo, hijito. Ya lo verás. O, mejor, no lo verás, porque ya no serás tú.

Atreyu calló, mirando al hombre-lobo con ojos muy abiertos.

Gmork continuó:

—Por eso los seres humanos odian y temen a Fantasia y a todo lo que procede de aquí. La quieren aniquilar. Y no saben que, precisamente así, aumentarán la oleada de mentiras que cae ininterrumpidamente en su mundo... esa corriente de seres desfigurados que tienen que llevar allí una existencia ficticia de cadáveres vivientes y envenenan el alma de los hombres con su olor a podrido. Los hombres no lo saben. ¿No es gracioso?

—¿Y no hay nadie —preguntó Atreyu en voz baja— que no nos odie ni nos tema?

—Yo, al menos, no conozco a nadie —dijo Gmork—, y tampoco es de extrañar, porque vosotros mismos tenéis que resignaros allí a hacer creer a los hombres que Fantasia no existe.

—¿Que no existe Fantasia? —repitió Atreyu desconcertado.

—Claro, hijito —respondió Gmork—, eso es precisamente lo más importante. ¿No puedes imaginártelo? Sólo si creen que no existe Fantasia no se les ocurrirá visitaros. Y de eso depende todo, porque únicamente cuando no os conocen en vuestro verdadero aspecto puede hacerse con ellos cualquier cosa.

—Hacer con ellos... ¿qué?

—Todo lo que se quiere. Se tiene poder sobre ellos. Y nada da un poder mayor sobre los hombres que las mentiras. Porque esos hombres, hijito, viven de ideas. Y éstas se pueden dirigir. Ese poder es el único que cuenta. Por eso yo también he estado al lado del poder y lo he servido, para poder participar de él... aunque de una forma distinta que tú y tus iguales.

—¡Yo no quiero participar de él! —balbuceó Atreyu.

—Calma, pequeño necio —gruñó el hombre-lobo—. En cuanto te llegue el turno de saltar a la Nada, serás también un servidor del poder, desfigurado y sin voluntad. Quién sabe para qué les servirás. Quizá, con tu ayuda, harán que los hombres compren lo que no necesitan, odien lo que no conocen, creen lo que los hace sumisos o duden de lo que podría salvarlos. Con vosotros, pequeños fantasiosos, se harán grandes negocios en el mundo de los hombres, se declararán guerras, se fundarán imperios mundiales...

Gmork contempló al muchacho un rato con los ojos semicerrados, y luego añadió:

—También hay una multitud de pobres zoquetes, los cuales, naturalmente, se consideran a sí mismos muy inteligentes y creen estar al servicio de la verdad, que nada hacen con más celo que intentar disuadir hasta a los niños de que existe Fantasia. Quizá tú les seas útil precisamente a ellos.

Atreyu conservó la cabeza baja.

Ahora sabía por qué no venían ya seres humanos a Fantasia y por qué no vendrían nunca para dar nuevos nombres a la Emperatriz Infantil. Cuanto más se extendiera la aniquilación de Fantasia, tanto mayor sería el raudal de mentiras en el mundo de los hombres y, precisamente por ello, cada segundo disminuía la posibilidad de que viniera aún un ser humano. Era un círculo vicioso del que no había escapatoria. Atreyu lo sabía ahora.

Y había otro que lo sabía también: Bastián Baltasar Bux. Comprendía ahora que no sólo Fantasia estaba enferma, sino también el mundo de los seres humanos. Una cosa tenía que ver con la otra. En realidad, siempre lo había sentido así, sin poder explicarse por qué. Nunca había querido aceptar que la vida fuera tan gris e indiferente, tan sin secretos ni maravillas como pretendían las personas que decían: ¡la vida es así!

Pero ahora sabía también que tenía que ir a Fantasia para sanar otra vez a ambos mundos.

Y el que ningún hombre conociera el camino se debía precisamente a las mentiras e ideas falsas que llegaban a su mundo como consecuencia de la destrucción de Fantasia, dejándolo a uno ciego.

Con espanto y vergüenza, Bastián pensó en sus propias mentiras. Las historias inventadas que contaba no eran mentiras. Eran otra cosa. Pero en algunas ocasiones había mentido de forma totalmente consciente y deliberada... A veces por miedo, a veces para conseguir algo que quería tener sin falta, a veces también sólo para darse importancia. ¿Qué criaturas de Fantasia había aniquilado, desfigurado y maltratado con ello? Intentó imaginarse cómo podía haber sido antes su verdadera figura... pero no pudo. Quizá, precisamente, porque había mentido.

En cualquier caso, una cosa era segura: también él había contribuido a que las cosas fueran tan mal en Fantasia. Y quería hacer algo por arreglarlas. Le debía eso a Atreyu, que estaba dispuesto a cualquier cosa sólo para buscarlo. No podía ni quería defraudarlo. ¡Tenía que encontrar el camino!

El reloj de la torre dio las ocho.

Michael Ende, La Historia Interminable.

(Fragmento).

Resumen.

Los *Orbivirus* son un género de virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*. Poseen un genoma segmentado de ARN de doble cadena. La enfermedad de la lengua azul (LA) (Blue tongue en inglés), es una enfermedad viral transmitida por vectores del género *Culicoides* spp., que afecta a rumiantes salvajes y domésticos. Esta enfermedad puede cursar como una infección subclínica inaparente para el animal o tener un resultado fatal. Esto depende del serotipo del virus y de la raza/edad del hospedero infectado. Sus signos clínicos incluyen: fiebre, edema facial, coronitis, hemorragia y ulceración bucal. La situación de esta enfermedad en México cuenta con pocas y dispersas notificaciones. Además, es parte del diagnóstico diferencial necesario para la Fiebre Aftosa, la cual es una enfermedad erradicada del país y de alta importancia económica. El objetivo de este trabajo fue detectar un fragmento del gen NS1 del VLA en 194 muestras de sangre de ovinos, recolectadas durante los años de 2016-2017, provenientes de los estados de Coahuila, Tamaulipas, Morelos, y Chiapas. Para ello, se estandarizó la técnica de PCR anidada (PCRa), de acuerdo con las indicaciones de la Organización Internacional de Salud Animal (OIE). La extracción del ARN se realizó a partir de sangre completa utilizando el método con Trizol. Posteriormente se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) usando hexámeros al azar. Con el ADNc se llevó a cabo la PCR anidada, como se describe en el Manual de la OIE, que indica un producto de amplificación de 101 pares de bases (pb). Como control positivo se utilizó un gen sintético NS1, que dadas sus características es inocuo y puede trabajarse en cualquier laboratorio nivel 2. Los resultados obtenidos usando la PCRa revelaron la presencia de un fragmento del gen NS1 en 28 ovinos (14.43%) provenientes de los estados de Tamaulipas (6), Coahuila (2) y Chiapas (20).

Palabras claves: Lengua Azul, VLA, PCR, NS1.

Abstract.

Orbiviruses are a viral genre that belongs to the *Reoviridae* family. They are conformed by a segmented double stranded RNA. Blue tongue disease (BT) is a viral disease that is transmitted by *Culicoides* spp vectors, it affects wild and domestic ruminants. This disease could develop as a subclinical disease or reach a fatal result. It depends on the viral serotype and age/breed of the infected host. Clinical signs include: Fever, facial edema, coronitis, hemorrhage and oral ulceration. In Mexico, the situation and reports on this disease are rare and disperse and is a crucial cross-diagnosis with mouth and foot disease, which it's eradicated from this country and has high economic importance. This work's objective was to detect BTV's NS1 gene in 194 sheep blood samples, acquired during 2016-2017, from several states of the Republic: Coahuila, Tamaulipas, Morelos and Chiapas. We standardized the conditions suggested by the World Organisation of Animal Health (OIE) for a nested PCR targeting an NS1 gene fragment. RNA extraction was attained from whole blood using a Trizol method and complementary DNA (DNAC) was obtained using random hexamers. The nPCR was established as described in OIE's terrestrial manual using this DNAC, expecting it's 101 base pairs (bp) amplification. As a positive control we design an NS1 synthetic gene which its innocuous and can be managed at safety level 2 laboratory. The results reveal the presence of this BTV NS1 fragment in 28 sheep (14.43%) and the results per location are: 6 positive sheep in Tamaulipas, 2 in Coahuila and 20 in Chiapas.

Keywords: Blue tongue, BTV, PCR, NS1.

Índice

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	11
Historia y epidemiología	12
Características del vector y su ciclo patogénico	15
Rango de hospederos	18
Biología molecular del virus	19
Infección	22
Patogenia	26
Signos clínicos	27
Diagnóstico	29
Justificación	36
Objetivo general	37
Materiales y métodos	38
Resultados	42
Discusión	45
Conclusión	47
Perspectivas	47
Bibliografía	48

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Principales especies de vectores <i>Culicoides</i> para el virus de lengua azul, en diferentes regiones geográficas	17
Cuadro 2. Duración de la viremia y técnicas recomendadas de diagnóstico	18
Figura 1. Estructura y proteínas de importancia en VLA.	20
Figura 2. Árbol filogenético comparativo del segmento 2 de 24 serotipos de BTV.	21
Cuadro 3. Segmentos del genoma de VLA, proteínas que codifican y sus funciones reportadas.	25
Figura 3. Ciclo de replicación de VLA.	26
Cuadro 4. Pruebas analíticas para el diagnóstico de lengua azul y su propósito.	35
Cuadro 5. Muestras obtenidas de cada estado evaluado	38
Cuadro 6. Distribución de las muestras obtenidas por sexo.	38
Cuadro 7. Distribución de las muestras obtenidas por raza.	38
Cuadro 8. Iniciadores para la identificación del gen NS1 de VLA.	40
Figura 4. PCR del gen constitutivo GAPDH Ovino.	42
Figura 5. Gradiente PCR anidada NS1 BTV.	43
Figura 6. Resultados de PCR NS1 para ovinos Tamaulipas 2017.	43
Cuadro 9. Resultados de PCRa para detectar el fragmento del gen NS1 del virus de la lengua azul.	43

Cuadro 10. Resultados por sexo de positivos a PCRa para detectar el fragmento del gen NS1 del virus de la lengua azul.	44
Cuadro 11. Resultados por raza de positivos a PCRa para detectar el fragmento del gen NS1 del virus de la lengua azul.	44

INTRODUCCIÓN.

Los *Orbivirus* son un género de virus pertenecientes a la subfamilia *Sedoreovirinae* de la familia *Reoviridae*. Su característica principal es la de poseer un genoma conformado por ARN de doble cadena dividido en 10 segmentos. Los tres géneros más relevantes de esta familia están representados por el virus de enfermedad epizootica hemorrágica (VEEH), el virus de enfermedad africana del caballo (VEAC) y el virus de lengua azul (VLA). (Fenner, 2011)

La lengua azul (LA), (bluetongue (BT) por sus siglas en inglés), es una enfermedad viral infecciosa, transmitida por vectores del género *Culicoides*, que afecta a rumiantes salvajes y domésticos.

Esta es una enfermedad que puede cursar como una infección subclínica inaparente para el hospedero o tener un resultado fatal, esto dependerá de la cepa/serotipo del virus y de la raza/edad del hospedero infectado.

Los hospederos más susceptibles son los animales viejos, las ovejas de lana fina y el venado cola blanca. (OIE, 2015).

Los signos clínicos generalmente incluyen:

- Fiebre
- Edema Facial
- Coronitis
- Hemorragia y ulceración bucal

El VLA ésta presente en la mayoría del territorio estadounidense incluyendo los estados fronterizos y tiene amplia distribución de los serotipos 2, 10, 11, 13, 17. Se tienen registros de identificación desde 1999 que muestran evidencia de 10 serotipos no endémicos a los Estados Unidos de América (1, 3, 5, 6, 9, 12, 14, 19, 22, 24). (Ruder et al, 2015).

El primer reporte confirmado de la presencia serológica de VLA en Cuba fue publicado en 2011, con un 99.7% de seropositividad entre las muestras analizadas

en el estudio y se relacionó a serotipos y vectores característicos de la región del caribe (Martínez et al, 2011), que podrían estar presentes en el territorio mexicano.

La situación de esta enfermedad en México cuenta con pocos y dispersos reportes (Vilchis C., 1989, Allende R., 1989, Hernández de Anda J., 1994, Lozano-Rendón JA., 2015) y es de alta importancia ya que forma parte del diagnóstico diferencial necesario para Fiebre Aftosa, la cual es una enfermedad erradicada del país y de alta importancia económica.

México es un importador de ganado ovino proveniente de Nueva Zelanda y Australia. Aunque Nueva Zelanda está declarado como país libre de VLA y mantienen un programa de monitoreo anual para la enfermedad desde 1991. (Ryan et al., 2015) Australia tiene identificados los serotipos 1, 3, 9, 15, 16, 20, 21 y 23 desde 1986 desde que iniciaron su programa de monitoreo y obtuvieron evidencia de presencia del serotipo 7 en 2007 y del serotipo 2 en 2008 (Melville, Weir, 2015).

1. HISTORIA Y EPIDEMIOLOGÍA.

El primer registro de la enfermedad data del siglo XVIII en África. En 1903 Theliey identifica al agente como un virus filtrable y para 1933 se realiza el primer diagnóstico en bovinos y se le da el nombre de pseudo fiebre aftosa. Otras sinonimias para la enfermedad fueron fiebre catarral malarial (Hutcheon, 1893), fiebre catarral maligna epizootica y seerbeck (sin traducción al español). Se le dio el nombre de blue tongue (BT) por la observación de este signo en ovinos de África.

Su distribución geográfica hasta 1940 se consideraba endémica en África entre las latitudes 40°N y 35°S, al diseminarse en China, EUA y Canadá expandió este rango hasta la latitud 50°N (Sperlova et al, 2011).

La primera epidemia registrada fuera de África fue en Chipre en 1943, y entre los años de 1943 y 1944 fue diagnosticada por primera vez en Israel. El primer reporte en Texas, EUA data de 1948.

Entre 1956 y 1957 se desató una epidemia en la península ibérica la cual se expandió a Medio Oriente, Asia y países del sur de Europa. (Maclachlan, 2011)

Los primeros registros en Australia datan de 1977 y en América del Sur en la década de 1980.

Su presentación se califica como estacional (primavera-otoño). La literatura reporta evidencia de la enfermedad en: Papua, Tailandia, China, Japón, India, Grecia, España, Italia, Córcega, Portugal, Bulgaria, Centro América y México (Melville, Weir, 2015).

2.1 Epidemiología de 1998 a la fecha.

En Europa del sur se han registrado pequeños brotes en países mediterráneos y de ahí comenzó la diseminación a zonas libres al norte de los Alpes con asociación al cambio climático. (Saegerman et al., 2008)

Los brotes de relevancia y diseminación se registran de la siguiente manera:

En 1998, se reportan los primeros brotes en Grecia. En 1999, la enfermedad se expandió a Turquía, Bulgaria, Serbia, Montenegro, Kosovo y Macedonia. Para el 2000, se registraron brotes en Cerdeña, Sicilia, Italia, Córcega, Menorca y Mallorca. En el 2001 en Croacia y 2002 en Bosnia y Albania. A partir de estos eventos los serotipos 1, 2, 4, 9 y 16 se consideran endémicos.

En Europa del norte, se desató una epidemia en el 2006, involucrando los países de Holanda, Bélgica, Alemania y norte de Francia. Esta fue causada por el serotipo 8, el cual nunca había sido reportado en estos países antes del 2006 y se consideraba común en Kenia, Nigeria, Sudán, Sudáfrica e India. A finales del 2006 este virus se expandió a Luxemburgo. Una de las cualidades más relevantes de esta epidemia fue su capacidad de sobrevivir al invierno y volver a presentarse en los mismos países en el 2007 y extendiéndose a Gran Bretaña, Suiza, Dinamarca y la República Checa. (Sperlova et al, 2011)

En el 2008, existieron brotes causados por VLA serotipo 8 en Hungría, Austria y Suecia y para el 2009 comienza a aparecer en Noruega. Este serotipo, se considera con una alta virulencia para rumiantes y camélidos, y tiene una mayor capacidad de atravesar la barrera placentaria, se le considera responsable del brote más dañino causado por un solo serotipo. (Toussaint et al., 2006)

En el 2008, también se registra la aparición de BTV-6 y BTV-11 en Holanda, Alemania y Bélgica a causa del uso de una vacuna atenuada que tuvo la capacidad de revertir a su estado virulento.

En Suiza es aislado del virus de Toggenburg, que después se identificaría como el serotipo 25 del virus de la LA (Sperlova et al, 2011); mientras que, en Kuwait en 2010, aparece el serotipo 26. (Maan et al, 2011)

En Israel, los serotipos 2, 4, 6, 10 y 16 se consideran enzoóticos, posteriormente en 2006 se identificaron por primera vez a los serotipos 8, 15 y 24. (Maclachlan et al, 2010).

En Australia, para 1986 los serotipos enzoóticos se consideraban: 1, 3, 9, 15, 16, 20, 21 y 23, en 2007 se agregaron a esta lista los serotipos 2 y 7. (Lorna et al, 2015)

En Estados Unidos de América para el año de 1999, se consideran enzoóticos los serotipos: 2, 10, 11, 13 y 17. Con el paso de los años se introducen al territorio los serotipos: 1, 3, 5, 6, 9, 12, 14, 19, 22 y 24 (Schmidtman et al., 2011, Ruder et al, 2015).

En muchas partes del mundo, la infección tiene una frecuencia estacional entre los meses de marzo a octubre. El VLA no provoca infecciones persistentes en los rumiantes y su supervivencia en el medio está asociada a factores asociados con el vector. Se considera que los sistemas epidemiológicos (episistemas) delimitados por especies del vector y sus antecedentes naturales determinan la distribución mundial del VLA. Observaciones recientes en Europa y EUA indican que las cepas del VLA pueden pasar de unos episistemas a otros y adaptarse a distintas especies de vectores quiromónidos, familia de dípteros que se reconocen por su parecido a los mosquitos, pero se diferencian en características como, piezas bucales pequeñas, alas sin escamas y la mayoría de los machos cuentan con antenas plumosas. (OIE, 2015).

Dados los efectos negativos en la economía pecuaria, las dificultades en su control y erradicación, el movimiento de estos *Orbivirus* en rumiantes debe ser declarado ante la Organización de Salud Animal (OIE) en todos sus países miembros.

La pérdida económica en 1996 en los Estados Unidos de América se calcula alrededor de los 3 billones de dólares. De manera directa por el número de abortos, muertes y baja de peso que conlleva a una disminución en la producción de leche y la ganancia de peso vivo para la comercialización de la carne. Y de manera indirecta, por las restricciones de exportación que incluye al ganado, semen y sueros para producción de biológicos (Ruder et al, 2015).

Por sus características estructurales y el efecto que podría tener en la producción de un país esta enfermedad está calificada como arma biológica (OIE, 2015).

2. CARACTERÍSTICAS DEL VECTOR Y SU CICLO PATOGENICO.

Los mosquitos de algunas especies del género *Culicoides* (el insecto hospedador) transmiten el virus de la lengua azul entre los rumiantes susceptibles, y resultan infectados al alimentarse de animales con viremia (el hospedador vertebrado). Por lo que la diseminación de esta enfermedad está estrechamente ligada a las condiciones climáticas para el desarrollo de estos vectores, gracias a los cambios antropocéntricos, el calentamiento global y las condiciones favorables del viento que pueden diseminar a estos vectores a regiones en donde no se encontraban originalmente (OIE, 2015).

El género *Culicoides* representa entre 1300-1400 especies de las cuales solo 30 califican como vectores para el VLA (Meiswinkel, 2007).

Se requiere de un umbral de infección para que el virus pase del lumen a las células mesenteronales del intestino medio (Estas células son el equivalente invertebrado a las células mesenteriales).

Para la infección puede resultar tan eficiente el alimentarse una vez de un individuo con altos títulos de virus, cómo el alimentarse varias veces de un individuo con títulos bajos, esto se calcula con la tasa de susceptibilidad oral (que representa el porcentaje de vectores capaces de ser infectados) y la tasa de infección (porcentaje de insectos infectados).

Una vez que el vector se infecta, queda así de por vida, el pico de transmisión del virus va de los 6 a 14 días post infección, pero esto puede variar según la temperatura ambiental, no existe transmisión vertical del jején a sus huevecillos y una sola mordida contiene la carga viral suficiente para infectar a una oveja.

La replicación máxima se puede alcanzar entre uno y cinco días post infección, pero esto es variable según la especie del vector y la temperatura ambiental. El virus sale del mesenterón y se disemina a otros órganos, su transporte es desconocido. El VLA tiene capacidad de replicarse en glándulas salivales (Tabachnick, 1996).

La capacidad vectorial de un jején puede variar según el serotipo con el que sea infectado. Por ejemplo, *C. variipenis*, presenta mayor título viral de serotipos 11 y 13 que aquellos que se infectan con serotipos 2, 10 y 17. Este efecto también puede variar entre colonias: *C. variipenis* en Texas alcanzan títulos mayores de VLA-13 mientras que los de Idaho alcanzan títulos más altos de VLA-11. (Wittmann E.J. et al, 2002)

Los vectores *Culicoides* son más activos una hora antes del atardecer y una hora después del amanecer, su ciclo completo de vida tiene una duración entre 2-6 semanas y su vida como adulto de 10 a 20 días, pero bajo algunas condiciones se puede preservar durante 90 días. Las hembras comen entre 3 y 4 veces al día, cada 4 días. Se clasifican en dos grupos principales: exofágicos y endofágicos, de acuerdo con sus preferencias, los exofágicos se alimentan solo en exteriores y los endofágicos ingresan al interior de edificios para alimentarse y normalmente lo hacen por otro medio, como la coprofagia (Sperlova et al., 2011, Tabachnick et al. 2004).

En el cuadro 1 se resumen algunas de las características de los miembros del género *Culicoides* que han sido identificados como vectores para la enfermedad de la lengua azul.

Cuadro 1. Principales especies de vectores *Culicoides* para el virus de lengua azul, en diferentes regiones geográficas. (Borkent et al, 2000. Sperlova et al, 2011).

Especie	Alimentación	Ubicación	Características
<i>C. dewulfi</i>	Endofágico	Holanda	Resistente a temperaturas frías
<i>C. obsoletus</i>	Endofágico	Centro y norte de Europa	Asociado a la epidemia de BTV-8
<i>C. imicola</i>	Exofágico	África, Sur Asia, Portugal, España, Grecia, Chipre, Corcéga, Italia, Israel, Turquía, Yemen	El más disperso en el viejo mundo
<i>C. pulicaris</i>	Exofágico	Norte de Europa	ND
<i>C. chiopterus</i>	Endofágico	Holanda	ND
<i>C. punctatus</i>	Exofágico	Norte de Europa	ND
<i>C. sonorensis</i>	Exofágico	Norteamérica	Principal vector en América. Presente en México.
<i>C. insignis</i>	Exofágico	Suramérica	Presente en México
<i>C. pusillus</i>	Exofágico	Suramérica	Presente en México
<i>C. variipenis</i>	Exofágico	Norteamérica	Presente en México
<i>C. brevitarsis</i>	Exofágico	Australia	ND
<i>C. fluvus</i>	Exofágico	Australia	ND
<i>C. wadai</i>	Exofágico	Australia	ND
<i>C. actoni</i>	Exofágico	Australia	ND

*ND: Características no descritas

3.1 Otros vectores.

Las garrapatas como el *Melophagus ovinus* y algunos mosquitos se consideran como vectores mecánicos que no participan activamente en la epidemiología de la enfermedad. Sin embargo, garrapatas como el *Ornithodoros savignyi* e *Ixodes hexagonus* han sido capaces de replicar el virus hasta por 26 y 21 días respectivamente. (Bouwknegt et al, 2010)

Estas tres especies se encuentran en el territorio nacional, *I. hexagonus* se reporta en Coahuila (Guzmán-Cornejo et al., 2010) *M. ovinus* está distribuida ampliamente en territorio nacional y *O. savignyi* se reporta al sur de nuestro país, desde Oaxaca hasta Mérida (Abdel-Shafy et al, 2016).

3. RANGO DE HOSPEDEROS.

Se considera hospedero competente a todos los rumiantes: borregos, muflones, venado (cola blanca, axis, fallow, sika, red y roe), bovinos (aunque su presentación es asintomática a excepción del BTV-8), wapití, antílopes y berrendos. (Rivera et al., 1987; Henrich et al., 2007; Meyer et al., 2009)

En el cuadro 2 se muestra la duración de la viremia y el tiempo de diagnóstico en bovinos y ovinos.

Cuadro 2. Duración de la viremia y técnicas recomendadas de diagnóstico (Bonneau, K.R. et al, 2002)

Especie	Viremia	Aislamiento	RT-PCR
Bovino	50-60 días	7-49 días	5-150 días
Ovino	3-20 días	5-11 días	3-122 días

También se tiene registro de su presencia en camélidos, elefantes, ibis y yaks en cautiverio. En algunos carnívoros: perros (por vacunas infectadas con BTV), lince en cautiverio. Mientras que en África, se ha encontrado evidencia serológica, asociada probablemente al consumo de órganos infectados en león, cheetah, perro salvaje, chacal, hiena y gineta. (Alexander et al., 1994), y en EUA se ha encontrado la misma evidencia en oso negro, puma y perro. (Howerth et al., 1995).

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS.

El VLA pertenece a la familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreovirinae* y al género *Orbivirus*. Son virus desnudos y esféricos (55-80nm de diámetro). Los viriones se componen de tres cápsides concéntricas, todas de simetría icosaédrica (la estructura de la cápside externa varía entre géneros).

La cápside externa de los *Orbivirus* se compone de dos proteínas, VP2 (el antígeno de neutralización más importante y el que determina la especificidad de serotipo) y VP5. Posteriormente se encuentra una superficie compuesta por 260 trímeros de la proteína VP7, que es un determinante importante de la especificidad del serogrupo y el componente que contiene los epítomos que se utilizan en los inmunoensayos por competencia (OIE, 2015). La VP7 está unida a 120 proteínas denominadas VP3 que rodean al complejo de transcripción conformado por las proteínas VP1, VP4 y VP6 y el material genético viral (figura 1) (Forzán, 2007).

El genoma está compuesto por ARN de doble cadena (ARNdc) y se encuentra dividido en 10 segmentos y tiene una longitud de 18kpb. Los segmentos son monocistrónicos (es decir, codifican para una sola proteína) a excepción de los genes 9 y 10. El segmento 9 codifica para la proteína VP6, involucrada en la replicación y transcripción viral, y para la recién descubierta proteína NS4, la cual está involucrada en la evasión de la respuesta inmune, ya que inhibe la producción de IFN. El segmento 10 contiene un marco de lectura en la cadena positiva, pero con dos codones de inicio funcionales cerca del extremo 5', sin embargo, no se ha identificado la función de la proteína que produce. (King et al, 2012)

Estos segmentos codifican para siete proteínas estructurales (VP1-VP7) y cinco (posiblemente seis) proteínas no estructurales (NS1-NS4, NS3A). (Mertens et al, 2009)

Los segmentos forman diferentes bandas al ser sometidos a electroforesis lo cual puede ser útil para la identificación de las diferentes especies de *Orbivirus* (22 especies reconocidas en el género). (Fenner, 2011)

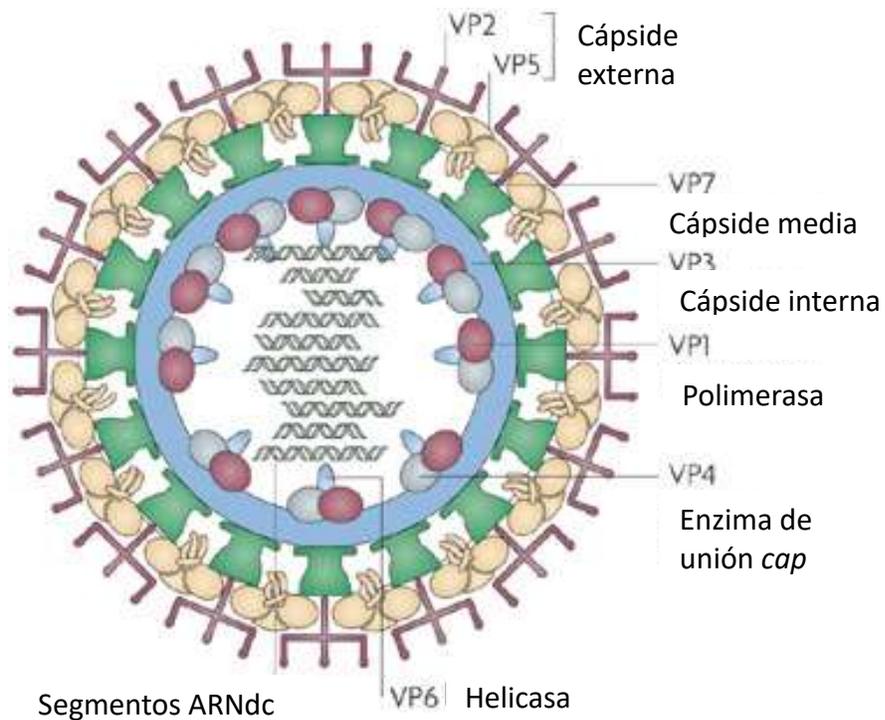


Figura 1: Estructura y proteínas de importancia en VLA. (Nature Reviews Microbiology, 2005.)

5.1 Serotipos.

Existen 26 serotipos diferentes para el VLA cuya identidad se determina por la interacción entre las proteínas de la capa externa (primordialmente VP2) y anticuerpos neutralizantes producidos en hospederos vertebrados. Los análisis de secuenciación del genoma de VLA confirman que VP2/Seg-2 son las secuencias/proteínas más variables y separan los aislados en 24 grupos (figura 2) que reflejan de manera precisa los serotipos virales. (Fenner, 2011, Coetzee et al., 2012)

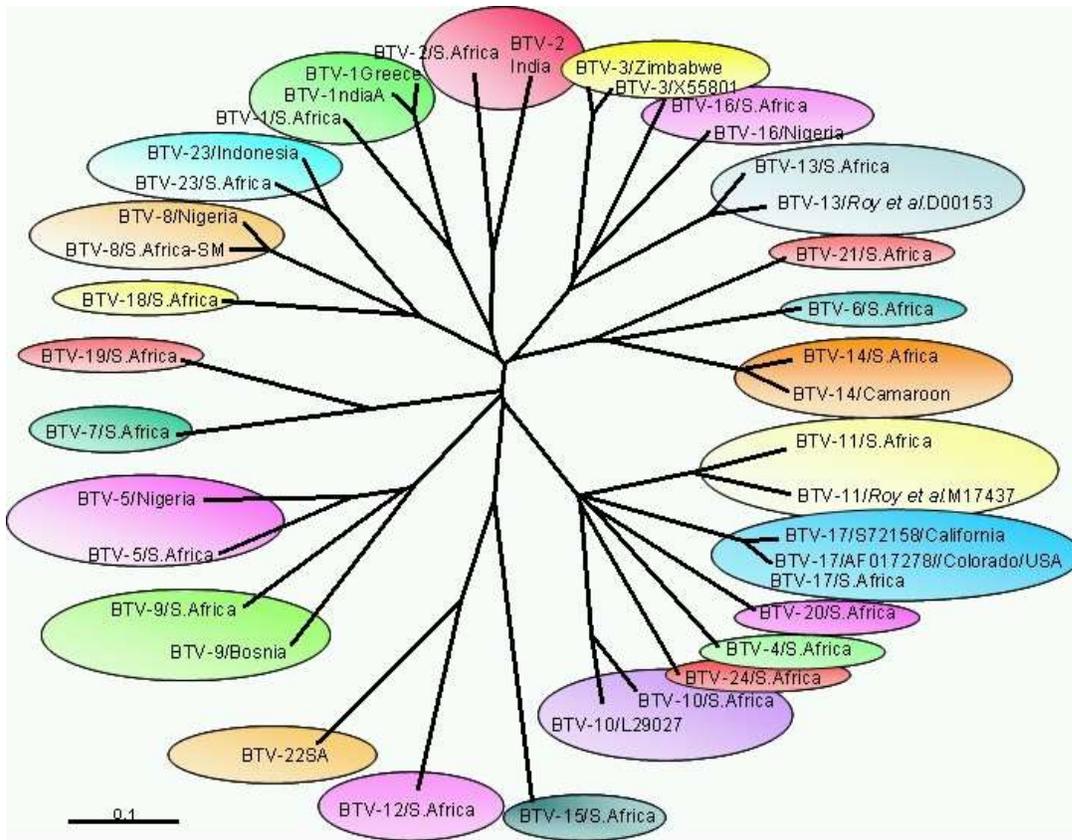


Figura 2. Árbol filogenético comparativo del segmento 2 de 24 serotipos de BTV. (Maan, Samuel and Mertens, 2003)

Estudios de las variantes en algunas mutantes que eluden la neutralización antigénica demuestran que la proteína VP5/Seg-6 puede influir en la especificidad de las reacciones, aunque en menor proporción que las proteínas VP2 (Maan et al., 2016). La co-circulación de diferentes serotipos, dada la naturaleza segmentada del genoma, provee la oportunidad para la infección del mismo animal e incluso de la misma célula con el potencial de generar virus recombinantes (Kumar et al. 2013).

5.2 Topotipos.

Las proteínas estructurales (VP1, VP3, VP4, VP6 Y VP7) así como las proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS3a Y NS4) son conservadas entre serotipos de VLA (tabla 3), sin embargo, el análisis molecular ha permitido identificar variaciones entre los segmentos del genoma para agrupar los aislados en diferentes grupos geográficos. Así, se han separado los aislados en el topotipo Este (Asia del Este,

India, China y Australia) y el topotipo Oeste (África, Norte y Sur de América) (Maan et al., 2016).

6. INFECCIÓN.

6.1 Entrada.

Aunque aún hay muchos interrogantes en cuanto a la vía entrada del virus, lo que se conoce es que el VLA se adhiere a la superficie celular utilizando la proteína VP2 e ingresa a la misma por endocitosis mediada por clatrina, las interacciones entre el virus y su receptor en la célula hospedera han sido pobremente estudiados en todos los *Orbivirus*, las proteínas VP2 y VP5 están involucradas en la unión a células vertebradas. (Forzan et al., 2004) El primer contacto con la superficie celular es a través de receptores glicoproteicos. En contraste, la unión a células de vectores Culicoides se da por la participación de la proteína VP7. (Drolet et al, 2015), esta interacción produce un endosoma en donde la liberación del virus es dependiente de pH. La disminución en el pH desintegra la proteína VP2 y activa la función de la proteína VP5, la cual permeabiliza la membrana del endosoma y libera el núcleo al citoplasma, en este punto las proteínas VP2 y VP5 ya no son detectables (figura 3) (Maclachlan et al., 2009).

El proceso infeccioso continua con la activación de la polimerasa dependiente de ARN viral (VP1), la helicasa y NTPasa (VP6) y la proteína VP4 que se encarga de adicionar la porción caperuza a cada ARNm viral (estos mensajeros carecen de porción poliadenilada). Las proteínas VP3 y VP7, proteínas estructurales de la cápside interna, liberan estos mensajeros al citoplasma celular a través de poros, y son enviados a los ribosomas del hospedero para la síntesis de sus proteínas (figura 3) (Mertens et al., 2009).

6.2 Replicación del ARN de doble cadena.

El ARN en sentido negativo sirve de molde para la formación de la cadena positiva.

Mientras que usando la hebra positiva se realiza la negativa, pero se desconoce la fase del ensamblaje en donde ocurre esto.

No se sabe si el ARN de doble cadena es sintetizado en su totalidad al mismo tiempo, o si se sintetizan los segmentos de manera consecutiva.

La proteína VP1 ha mostrado actividad de replicasa, inicia y elonga la cadena negativa de ARN, esto se ha evidenciado “*in vitro*”, aunque estudios realizados con VP1 recombinante pierde esta capacidad, por lo que se piensa que requiere de otras proteínas para su actividad dentro de la cápside interna viral (Patel, 2014).

6.3 Ensamblaje de la cápside interna.

Se inicia cuando la proteína VP3 forma decámeros para el ensamblaje con VP7 en dominios de dimerización. Las proteínas VP1 y VP4 interaccionan con este decámero de VP3, estos se encargan de iniciar el ensamblaje de la capa icosaédrica externa y de reclutar al ARN viral, y los complejos de VP6 antes de que la cápside interna de VP3 complete su formación.

La proteína NS2 facilita el ensamblaje atrayendo proteínas y ARN viral. Esto se realiza dentro de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos formados por esta proteína. Estos cuerpos de inclusión tienden a formarse muy cerca del núcleo celular, conforme la infección progresa, aumentan de número y tamaño. La proteína NS2 tiene función como fosfoproteína de unión al ARN de una cadena viral y tiene regiones específicas de unión a los 10 fragmentos de ARN de doble cadena, es por esto, por lo que se sabe que el ARN viral es sintetizado dentro de estos cuerpos de inclusión. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual sólo una copia de cada segmento es unida al virus (figura 3) (Roy, 2015).

La proteína NS4 se expresa en las etapas de infección temprana y tiene acción en el nucléolo celular. Esta proteína no es requerida para la replicación viral, su función es la de interferir con los elementos antivirales de la célula hospedadora (inhibidor de interferón). En estudios donde se suprime la producción de esta proteína, silenciando el segmento 9 viral, la célula hospedadora produce mayor cantidad de Interferón. (Ratinier et al, 2016)

Una vez sintetizada la cápside interna, esta es liberada de los cuerpos de inclusión de regreso al citoplasma por una desfosforilación de la proteína NS2 (Mohr, 2014).

6.4 Ensamblaje de la cápside externa.

Se realiza de nuevo en el citoplasma celular, en donde VP2 y VP5 se unen al núcleo, al unirse, detiene la transcripción y se completa la partícula viral.

La unión de VP2 al núcleo viral esta mediada por filamentos de vimentina (Mohr, 2014).

6.5 Salida.

El virus puede salir por gemación de la membrana celular, con lo cual adquiere una envoltura momentánea (Hyatt et al., 1989), el virus secuestra el Complejo Ordenador de Tráfico de endosomas (ESCRT) y se apodera de la exocitosis, como si se tratara de un virus envuelto. Algunas otras partículas virales pueden salir por interrupciones en la membrana y esto puede suceder sin alterar la viabilidad celular (Bhattacharya et al., 2010).

La proteína NS3 interactúa con la cadena ligera de calpactina del complejo celular de anexina II (mecanismo involucrado en eventos de membrana) y también con la proteína TSG101 que también está involucrada en la liberación de virus envueltos. Estos efectos se encuentran relacionados con la replicación en el vector ya que en ellos la liberación del virus siempre es no-lítica. Por tanto, la proteína NS3 no es necesaria para la salida de las partículas virales de la célula animal hospedadora.

La proteína NS1 aún no tiene sus funciones completamente descritas y se presume que puede formar y tomar control de sistemas de microtúbulos e interviene en la unión virus-célula en el momento de la salida de las partículas virales y ocasiona lisis celular (figura 3) (Feenstra et al., 2014).

La segmentación del genoma viral permite la recombinación entre serotipos y cepas permitiendo el cambio evolutivo en el virus (Mellor et al, 2009). Hay pocos estudios que evidencien la recombinación entre serotipos y es necesaria la secuenciación del genoma completo de diferentes aislados para su análisis filogenético. En India se han realizado un par de estudios que ponen en evidencia la recombinación de los serotipos 16 y 21 (Shafiq et al., 2013). Y hay evidencias de recombinación en el serotipo 16 entre los topotipos oriental y europeo (Kumar et al., 2013).

Cuadro 3. Segmentos del genoma de VLA, proteínas que codifican y sus funciones reportadas.

Segmento	Tamaño* (pb)	Proteína	Tamaño (aa)	Funciones	Referencia
1	3954	VP1	1302	Polimerasa dependiente de ARN viral.	Urakawa et al., 1989 Mertens et al., 2009
2	2926	VP2	956	Hemaglutinina, Determinante de serotipo, desencadena inmunidad humoral.	OIE, 2015 Hassan, 1999.
3	2770	VP3	901	Proteína de ensamblaje de cápside interna.	OIE, 2015
4	1981	VP4	644	Transcripción y replicación, enzima caperuza.	Mertens et al., 2009
5	1769	NS1	552	Parcialmente desconocida, involucrada en morfogénesis viral, lisis, formación de microtúbulos.	Mertens et al., 2009 Boyce et al., 2010
6	1638	VP5	526	Interacciona con membrana de endosoma, genera respuesta humoral débil.	OIE, 2015
7	1156	VP7	349	Especificidad de serotipos, detección en la mayoría de ELISA.	OIE, 2015, Drolet et al., 2015
8	1124	NS2	357	Cuerpos de inclusión y reclutamiento de ARNm para replicación.	Mertens et al., 2009
9	1046	VP6	329	Helicasa.	King et al., 2012
9		NS4	77-79	Antagonista de interferón.	Ratinier et al., 2016
10	822	NS3	229	Viroporina,	Mertens et al., 2009
10		NS3a	226	participación en la liberación del virus especialmente en célula del vector.	

*Tamaño de la secuencia con base en los reportes de secuenciación de VLA-10.

Otros medios de infección de esta enfermedad son por iatrogenia (por inseminación artificial, ya que el semen de los rumiantes puede contener al virus en la fase virémica), transportación de animales infectados y vacunas.

La infección trasplacentaria se ha documentado en bovinos, ovinos, venados y perros. Y sólo de manera experimental se ha logrado replicar el virus después de la ingesta de calostro o por consumo de la placenta, pero estos resultados no han sido repetidos. (Sperlova et al., 2011)

8. SIGNOS CLÍNICOS.

8.1. Ovinos.

En esta especie puede haber presentación aguda, crónica o subclínica. Su periodo de incubación es de 4 a 8 días. Los primeros signos son fiebre, apatía y taquipnea, hiperemia de belfos y narinas. Pasando a una salivación excesiva, descarga nasal que se vuelve mucopurulenta y deja costras alrededor de las narinas. Aparece edema submandibular, de lengua y belfos, algunas veces extendido hasta las orejas.

Se ulcera la mucosa oral y aparecen petequias en la conjuntiva. La lengua cianótica, característica por la que se nombró a la enfermedad, es en realidad un hallazgo raro. En algunos casos se puede presentar, disnea, diarrea hemorrágica y vómito que puede causar neumonía por aspiración (Fenner, 2011).

Los animales con enfermedad clínica severa pueden morir, desarrollar enfermedad crónica con pérdida de peso o recuperarse completamente. Erasmus en 1975 notó que algunos individuos con signos de recuperación podían colapsar y morir súbitamente.

Al final de la fase pirética, cuando la enfermedad se califica como crónica, se presenta, coronitis, laminitis y paresia, necrosis muscular y arqueamiento de la espalda, asociados a estos signos; torticolis, dermatitis y pérdida de lana. La recuperación en estos individuos es prolongada (Maclachlan et al., 2009).

La infección durante la gestación ocasiona, aborto, momificación, crías débiles con deformaciones congénitas (hidrocefalia, quistes cerebrales, displasia de retina, entre otras). Y no hay individuos persistentemente infectados. (Sperlova et al, 2011, Zientara et al., 2015).

8.2. *Caprinos.*

Rara vez se infectan y/o no presentan signos clínicos, en caso de presentarlos son mucho menos severos que en ovinos.

En la epidemia de 2006 (VLA-8) en Holanda, las cabras tuvieron baja drástica en la producción de leche, aumento de temperatura, edema de belfos y cara, eritema en la ubre y lesiones hemorrágicas subcutánea (Kawther, Wahid, 2015).

8.3. *Bovinos.*

La enfermedad clínica es rara a excepción de infecciones por BTV-8, la signología se le considera una reacción de hipersensibilidad mediada por IgE. (Vercauteren et al., 2008)

En etapas tempranas hay fiebre, apatía, depresión, erosión y necrosis de mucosa oral y nasal. Descarga nasal, salivación excesiva, conjuntivitis, paresia, dermatitis, hiperemia. Pezones inflamados con piel quebradiza y por tanto una baja en la producción de leche (Barratt-Boyes et al., 1994).

8.4. *Venados.*

En esta especie la signología es mucho más aguda, en la fase temprana de la gestación ocurre muerte y reabsorción del embrión, aborto o crías débiles y deformes. Si la hembra sobrevive a la infección y sobre pasa del día 60 al 130 de gestación, la cría nace con serias alteraciones neurológicas (hidrocefalia). Si la infección se da semanas antes de parir, la cría nace débil y con una encefalitis moderada.

En venado cola blanca este cuadro es muy similar a la enfermedad epizootica hemorrágica en donde el desenlace fatal es producido por coagulación intravascular

diseminada. Hemorragias en todo el cuerpo, hinchazón de cabeza y cuello con descarga nasal y diarrea sanguinolentas. (Sperlova et al., 2011).

8.5. *Otras especies.*

Existe fuerte evidencia de que VLA es capaz de infectar y matar carnívoros incluyendo perros domésticos. (Kathleen, 1994)

Sin embargo, la participación de estos animales en la epidemiología de la enfermedad no ha sido bien estudiada actualmente. Recientemente, dos linceas eurasiáticas, que compartían jaula en un zoológico de Bélgica, murieron manifestando signos característicos y hallazgos a la necropsia consistentes con la infección por VLA. Los linceas habían sido alimentados con fetos abortados de una infección de VLA y se pudo aislar el virus del pulmón de uno de estos animales (Maclachlan et al., 2011).

La infección y muerte subsecuente de perros domésticos en EE.UU. como resultado de una vacuna de distemper canino contaminada con VLA, también ha sido reportada. Dos perros fueron vacunados durante la gestación y ambos abortaron y murieron con signos de falla cardíaca y distrés respiratorio. Este caso particular es alarmante, dado que el VLA fue capaz de replicar en una línea celular canina sin ocasionar efecto citopático, lo que puede sugerir que, en situaciones similares, VLA puede ejercer una infección silenciosa en líneas celulares empleadas para la producción de vacunas (Oura et al., 2011, Bumbarov et al., 2016).

9. DIAGNÓSTICO.

La identificación tradicional del virus de lengua azul implica su aislamiento y replicación en huevos embrionados de pollo, células de *Culicoides* denominadas células KC o CuVa (McHolland & Mecham, 2003; Wechsler et al., 1989), cultivos de tejido o inoculación en rumiantes susceptibles, y la posterior aplicación de pruebas específicas para establecer el serogrupo y el serotipo. La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) ha permitido una amplificación rápida del ADNc del VLA en muestras clínicas. La PCR en tiempo real

ha permitido el desarrollo de pruebas incluso más rápidas y sensibles, y se han validado y publicado los procedimientos. Estos procedimientos pueden potenciar las técnicas de la virología clásica, proporcionando información sobre el serogrupo, el serotipo y el topotipo viral (Maan et al., 2016).

9.1 Aislamiento

9.1.1 Aislamiento en huevos embrionados de pollo.

Con la finalidad de aislar el virus, se colecta sangre de animales con sospecha de viremia y se separan las células sanguíneas. Las células lavadas tres veces se vuelven a suspender en PBS o en cloruro sódico isotónico y se guardan a 4°C. También puede prepararse una suspensión de tejido y mosquitos y guardarse como se describe previamente.

Para el aislamiento del virus en casos mortales, se prefiere la toma de muestra del bazo y nódulos linfáticos. Las suspensiones tisulares se pueden utilizar como se describe más adelante para las células de la sangre.

La inoculación en el embrión requiere práctica ya que se realiza por vía intravenosa. Se deben utilizar embriones de 9-12 días de edad. Cualquier muerte embrionaria ocurrida en las primeras 24 horas post inoculación se considera inespecífica.

Con frecuencia, los embriones infectados pueden presentar un aspecto hemorrágico. Al séptimo día se separan los embriones muertos y se sacrifican los vivos. Los embriones completos se homogeneizan, después de eliminar sus cabezas y los restos se eliminan por centrifugación. El virus se puede identificar directamente en el sobrenadante o después de su amplificación en cultivo celular (OIE, 2015).

9.1.2 Aislamiento en cultivo celular.

El aislamiento de los virus se puede intentar en cultivos celulares susceptibles al virus de la lengua azul, como las células L de ratón, las de riñón de hámster neonato (BHK-21), las de riñón de mono verde africano (Vero) o el clon C6/36 de *Aedes albopictus* (AA). También se ha llevado a cabo un aislamiento del virus exitoso en

células derivadas de *Culicoides sonorensis* libres del VLA (KC) y virus *Culicoides* (CuVa) (McHolland & Mecham, 2003; Wechsler et al., 1989). En caso de utilizar células AA, KC o CuVa normalmente se realizan pases adicionales por líneas celulares de mamíferos, como células BHK-21 o Vero. En las células AA o CuVa no se observa necesariamente un efecto citopático (ECP), pero este es visible en células de mamíferos. Puede detectarse VLA aislado tras cada pase por cultivo celular mediante detección de antígeno o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Wechsler, 1988).

9.2 Pruebas serológicas.

Las respuestas serológicas aparecen a los 7–14 días posteriores a la infección por VLA y, por lo general, son duraderas. Se recomienda un análisis inmunoenzimático basado en anticuerpos monoclonales para detectar específicamente anticuerpos anti-VLA (serogrupo). Los procedimientos para identificar y cuantificar anticuerpos contra serotipos del VLA son más complejos, y suelen basarse en pruebas de neutralización (OIE,2015).

9.2.1 Clasificación del virus en serotipos.

Las cepas de *Orbivirus* aisladas se suelen agrupar serológicamente según su reacción frente a antiseros estándar específicos que detectan proteínas, como la VP7, que se conservan dentro de cada serogrupo. La reacción cruzada entre los miembros de los serogrupos de VLA y la Enfermedad Epizootica Hemorrágica (EHE) plantea la posibilidad de que una cepa del vEHE pueda confundirse con VLA, debido a una reacción de inmunofluorescencia débil con un antisuero policlonal anti-VLA. Los anticuerpos policlonales o monoclonales que se emplean para seroagrupar cepas del VLA deben caracterizarse adecuadamente para el propósito en cuestión. Existe una importante variación de la VP7 dentro del VLA, así como relación antigénica entre otros *Orbivirus* estrechamente relacionados, como el vEHE, que influirá en la unión de anticuerpos en varios formatos analíticos (IFA, ELISA, AGID). Por esta razón, se puede usar un anticuerpo monoclonal (MAb) específico del serogrupo de la LA. Varios laboratorios han generado tales reactivos específicos de serogrupo (OIE,2015).

Los métodos más utilizados para la identificación de los virus a nivel de serogrupo son los siguientes:

I) Inmunofluorescencia

Se infectan monocapas de células BHK o Vero en cultivos laminares (portaobjetos de vidrio) con un virus adaptado al cultivo de tejido. Después de 24–48 horas a 37°C, o después de la aparición de un efecto citopático (ECP) incipiente: Las células infectadas se fijan, se dejan secar y el antígeno viral se detecta utilizando un antisuero anti-VLA o anticuerpos monoclonales específicos contra el VLA y los procedimientos estándar para la inmunofluorescencia.

II) Análisis inmunoenzimático de captura de antígeno

Se puede detectar directamente el antígeno viral en medios de cultivo, en insectos infectados y en sangre de oveja. En esta técnica, las proteínas derivadas del virus se capturan por el anticuerpo adsorbido a una placa de ELISA y los materiales unidos se detectan usando un segundo anticuerpo. El anticuerpo de captura puede ser policlonal o un MAb específico de serogrupo (Afshar et al., 1992).

9.2.2 Serotipificación por neutralización del virus.

Las pruebas de neutralización son específicas de tipo para los serotipos de VLA que se han aislado en cultivo actualmente reconocidos y pueden utilizarse para serotipificar una cepa de virus aislada o modificarse para determinar la especificidad de los anticuerpos en los sueros. En el caso de una cepa no tipificada, la localización regional característica de los serotipos de VLA puede eliminar, por lo general, la necesidad de realizar la neutralización con antisueros contra todos los serotipos aislados, en particular cuando los serotipos endémicos se conocen bien.

Existe una serie de métodos disponibles, que se basan en el cultivo celular, para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-VLA. Las líneas celulares más utilizadas son BHK, Vero y L929. Se ha descrito que los antisueros específicos de serotipo contra VLA generados en cobayos y conejos presentan menos reacción cruzada que los obtenidos en ganado bovino u ovino. Es importante incluir controles del antisuero. Los tres métodos más utilizados son:

I) Reducción de placas (cuantitativa).

El virus que se va a serotipificar se diluye hasta que contenga aproximadamente 100 unidades formadoras de placas (UFP) y se incuba sin suero (control) o con diluciones seriadas de antisueros individuales estándar de una serie de serotipos de VLA. Se añaden las mezclas de virus/antisuero a las monocapas celulares.

II) Inhibición de placas (cualitativa).

Las pruebas se realizan en placas Petri que contienen monocapas celulares confluentes que se infectan con aproximadamente 5×10^4 UFP de virus estándar y de virus no tipificado. Las monocapas se cubren con agarosa. En discos individuales de papel filtro se depositan antisueros estándar anti-VLA, que se colocan sobre la superficie de agarosa.

III) Neutralización en microtitulación.

En una placa de microtitulación con pocillos de fondo plano se depositan aproximadamente 100 DICT50 (dosis infectivas en un 50% de los cultivos de tejidos) del virus estándar y del virus no tipificado en un volumen de 50 μ l por pocillo, y se mezclan con el mismo volumen de antisuero estándar diluido de forma seriada con medio de cultivo de tejidos. Se depositan aproximadamente 10^4 células por pocillo en un volumen de 100 μ l y, después de incubar durante 4–6 días, se leen los resultados de la prueba utilizando un microscopio invertido. Los pocillos se analizan respecto al grado de ECP observado. Los pocillos que contengan solo células o células y antisuero no deberían mostrar ECP. Por el contrario, los pocillos con células y virus deberían mostrar un ECP del 75–100% (OIE.2015).

9.3 Métodos moleculares.

9.3.1 PCR con transcripción inversa en punto final.

Las técnicas de RT-PCR aportan una identificación rápida del ácido nucleico vírico del VLA en la sangre y otros tejidos de los animales infectados. Es importante destacar que el diagnóstico basado en la RT-PCR debe interpretarse con cuidado porque la RT-PCR detecta ácido nucleico específico de virus una vez el que virus

ya no es viable y capaz de crear una nueva infección ni en insectos ni en hospedadores mamíferos. Por lo tanto, un resultado positivo en la RT-PCR no necesariamente indica la presencia del virus infeccioso (Maclachlan et al., 1994).

Existen diferentes versiones de RT-PCR que pueden emplearse para detectar el VLA específicamente para determinar el serogrupo de los *Orbivirus* y para determinar el serotipo del VLA. Estos enfoques moleculares son mucho más rápidos que los métodos virológicos e inmunológicos tradicionales, que pueden tardar hasta cuatro semanas en suministrar información sobre serogrupos y serotipos.

Actualmente existen ensayos dirigidos principalmente para las proteínas VP1, NS1, NS2, VP6 y NS3. Ninguna de estas proteínas tiene relación con la serotipificación del virus, y son fuertemente conservadas entre serotipos de VLA, algunas, como el caso de NS3 tiene mayor grado de conservación entre *Orbivirus*. Y, por tanto, estos ensayos carecen de potencial para clasificar los aislados (Maan S. et al, 2016).

Con la finalidad de obtener una clasificación molecular compatible con la serotipificación los ensayos deben de estar dirigidos al segmento 2 de VLA que codifica para la proteína VP2 y se han publicado protocolos específicos para los 26 serotipos de VLA (Wilson et al, 2015).

Para el presente trabajo se seleccionó la PCR anidada que tiene como blanco de amplificación el genoma NS1, usa oligonucleótidos diseñados por Katz et al. (1993), siendo un ensayo que se ha utilizado con éxito durante más de 20 años y permite detectar los serotipos 1 a 24 y el 26 (el serotipo 25 no se ha analizado) en varias especies. La prueba anidada puede resultar ventajosa para laboratorios en los que no se disponga de instalaciones para PCR en tiempo real (Yin et al., 2008, OIE, 2015).

El cuadro 4 contiene el resumen de herramientas diagnósticas sugeridas por la OIE, para diversos fines al tratar con esta enfermedad.

Cuadro 4. Pruebas analíticas para el diagnóstico de lengua azul y su propósito. (OIE,2015)

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección - vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
qRT-PCR	-	+++	-	+++	++	-
RT-PCR	-	+++	-	+++	++	-
Aislamiento	-	+++	-	+++	-	-
Detección de la respuesta inmunitaria						
C-ELISA (específico de serogrupo)	++	+++	++	-	++	++
VN (específico de serotipo)	++	+++	++	-	++	++
AGID	+	-	+	-	+	+
CF	+	-	+	-	+	+

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; - = no adecuado para este propósito.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables. RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; C-ELISA = enzimoimmunoanálisis de competición; VN = neutralización vírica; AGID = inmunodifusión en gel de agar; CF = prueba de fijación del complemento.

10. JUSTIFICACIÓN.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y el *“Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos”* posiciona a la enfermedad de lengua azul como una enfermedad de declaración obligatoria hasta el 2017, por lo que el diagnóstico de la misma es relevante y forma parte de un diagnóstico diferencial importante para enfermedades como la Fiebre Aftosa y la Estomatitis Vesicular.

El VLA es considerado en México como una enfermedad emergente; sin embargo, existen publicaciones donde se han identificado anticuerpos contra este virus. Debido a que en los bovinos la infección causada por el VLA es inaparente su diagnóstico es complicado. Por otra parte, los animales más susceptibles son los ovinos y los venados cola blanca. Estos últimos son una especie silvestre que puede moverse libremente en la frontera entre México y los Estados Unidos, en donde el virus es endémico, por lo que se podría importar la enfermedad a los rumiantes en nuestra frontera, principalmente a través de mosquitos culicoides, que son los vectores.

11. OBJETIVO GENERAL.

Detectar el gen NS1 del virus de lengua azul en muestras de sangre de ovinos de los estados de Morelos, Coahuila, Chiapas y Tamaulipas, mediante una PCR anidada, utilizando un protocolo descrito por la OIE.

11.1 Objetivos particulares

1. Extraer el ARN total a partir de muestras de sangre de bovino y ovino de los estados a evaluar para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a ser utilizado como plantilla en la PCR.
2. Determinar la presencia del gen NS1 del virus de lengua azul por PCR anidada en las muestras de sangre de bovinos y ovinos.
3. Comparación de las secuencias de nucleótidos del gen NS1 del VLA en muestras positivas a la PCR con secuencias disponibles en la base de datos del Gene Bank.

12. MATERIALES Y MÉTODOS.

12.1 Material biológico.

Se realizó un muestreo por conveniencia de 194 muestras de sangre de ovinos clínicamente sanos. Las muestras se obtuvieron durante el verano del 2016 y 2017, de los estados de Morelos (43), Tamaulipas (30), Chiapas (91) y Coahuila (30) (cuadro 5). El muestreo fue mayoritariamente de hembras reproductoras de entre uno y cinco años (cuadro 6). Las razas involucradas en este estudio son cruza conocidas como biotipo Chiapas (Chiapas), Suffolk/Dorper (Morelos y Coahuila), mientras que en Tamaulipas el rebaño se componía de Suffolk, Pelibuey y cruza de Saint Croix/Dorper (cuadro 7). Las muestras fueron identificadas con un código según la unidad de producción de la que provinieron.

Cuadro 5. Muestras obtenidas de cada estado evaluado.

Especie	Chiapas	Tamaulipas	Morelos	Coahuila	Total
Ovino	91	30	43	30	194

Cuadro 6. Distribución de las muestras obtenidas por sexo.

Estado	Sexo	No. Muestras
Chiapas	Macho	2
	Hembra	89
Tamaulipas	Macho	0
	Hembra	30
Morelos	Macho	0
	Hembra	43
Coahuila	Macho	0
	Hembra	30

Cuadro 7. Distribución de las muestras obtenidas por raza.

Estado	Raza	No. muestras
Chiapas	Chiapas	30
Tamaulipas	Pelibuey	12
	Saint Croix/Dorper	11
	Suffolk	7
Morelos	Suffolk/Dorper	43
Coahuila	Suffolk/Dorper	30

12.2 Extracción de ARN.

Para la extracción se utilizó un método de extracción orgánica con Trizol LS® Reagent (Ambion, USA) y cloroformo, siguiendo un procedimiento establecido por el Laboratorio de Biotecnología de INIFAP. El ARN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, USA) y posteriormente se almacenó a -70°C hasta su uso.

12.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc).

Se realizó la síntesis de la primera cadena de ADNc utilizando Random Primers (Thermoscientific, USA) tomando como molde el ARN extraído. Se utilizó el Kit MMLRT (Invitrogen, USA) para sintetizar la primera cadena de ADNc, siguiendo el protocolo establecido en el laboratorio y utilizando las siguientes condiciones: para el master mix 1: 1µL Random Hexamer Primer (Thermo Scientific, USA), con una concentración de 0.2µg/µL, 1µL de dNTPs y 5µL de agua tratada con DEPC libre de nucleasas (Invitrogen, USA), más 5µL de templado (ARN extraído). Cada reacción se incubó a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, las reacciones se incubaron en hielo 2 minutos seguido de un mezclado en vórtex y centrifugación.

Para el master mix 2, se utilizaron 4µL de 5x First Strand Buffer (Invitrogen), 2µL del reactivo DTT 0.1M (Invitrogen), 1 µL de Ribolock RNasa Inhibitor (Thermo Scientific) con una concentración de 40U/µL y finalmente se agregó 1 µL de la enzima MMLV Retrotranscriptase (Invitrogen, USA). La reacción anterior se incubó a 37°C en baño María con agitación constante, durante 50 minutos. La reacción se detuvo con una incubación final a 70°C por 15 minutos. Los ADNc obtenidos se almacenaron a -20°C.

12.1. PCR.

Para corroborar la integridad del material genético de los ADNc se estandarizó una PCR para el gen constitutivo GAPDH ovino siguiendo el protocolo publicado por González-Arto M et al, 2016. Para el desarrollo de la PCR anidada (PCRa) se realizaron pools a partir de los ADNc obtenidos. Inicialmente, se realizaron pools de cinco muestras cada uno, conteniendo 5µl de cada ADNc individual, por cada estado

evaluado a fin de agilizar el protocolo. Los pools que resultaron positivos fueron sometidos posteriormente de manera individual, para la identificación de los individuos positivos.

Cómo control positivo se utilizó un gen sintético que incluye 354pb del gen NS1 tomando como base una secuencia del BTV-11 reportada en el GeneBank con número de acceso: KM580467. Dentro de la secuencia es posible amplificar 101 pb con los iniciadores descritos (cuadro 8) en el protocolo de la OIE (OIE, 2015). El gen sintético se encuentra insertado en el plásmido pUC57 (GeneScript, USA). El plásmido fue replicado en bacterias *E. coli* DH5 α (Invitrogen, USA) y purificado con el kit Qiagen plasmid midi kit (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para su uso en la PCR, el plásmido fue ajustado a una concentración de 100 ng/ μ L.

El gen NS1 fue identificado utilizando el Kit iProof HF Master Mix (Bio-Rad, USA) con las siguientes condiciones: se mezclaron 5 μ L del reactivo 2xiProof HF Master mix (BIO-RAD, USA), 0.5 μ L de cada oligonucleótido, 1 μ L de DMSO como estabilizador y 1 μ L de agua libre de nucleasas.

Cuadro 8. Iniciadores para la identificación del gen NS1 de VLA.

Prueba	Nombre	Tamaño del producto	Secuencia
PCR NS1	BTV-F	274pb	5' - CTT CTC TAG TTG GCA ACC ACC - 3'
	BTV-R		5' - AGG CCA GAC TGT TTC CCG AT - 3'
PCRa NS1	nBTV-F	101pb	5' - GCA GCA TTT TGA GAG AGC GA - 3'
	nBTV-R		5' - CCC GAT CAT ACA TTG CTT CCT - 3'
GAPDH ovino	GAPDH-F	496pb	5' -CAA GGT CAT CCA TGA CCA CTT TG-3'
	GAPDH-R		5' -GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3'

La primera ronda de la PCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler (Bio-Rad, USA) con el siguiente programa de ciclado para la primera PCR: 95°C durante 2 min por un ciclo, 95°C durante 30s, 57.5°C durante 30s y 72°C durante un minuto por 35 ciclos, finalmente 1 ciclo a 72°C durante 5 min. Para la PCRa, se utilizó el siguiente ciclado: 95°C durante 15 min. por 1 ciclo, 94°C durante 45s, 62°C durante 45s y 72°C durante 1 min. por 28 ciclos, terminando con un ciclo de 10 min. a 72°C.

Posteriormente los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando un buffer de carga 6x (Thermo Scientific, USA) y el marcador de peso molecular Gene Ruler 50pb (Thermo Scientific, USA) durante 35 minutos a 100V. El gel se tiñó con GelRed (Biotium, USA) y se observó en un fotodocumentador GelDoc XR.

12.5 Secuenciación.

Se eligieron al azar 19 muestras positivas a la PCRa para ser purificadas utilizando el kit QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, USA) para ser enviados a secuenciación. Para lo anterior, se preparó una reacción en un volumen final de 50µl y se visualizó en un gel de agarosa al 2% para después ser purificada. La secuenciación se realizó en el Instituto de biotecnología de la UNAM.

13. RESULTADOS.

Se procesaron un total de 194 muestras de sangre de ovino, organizadas como se describió en el cuadro 5 de la sección de materiales y métodos. Las muestras fueron utilizadas cuando se demostró una adecuada concentración y calidad de material genético a la lectura de espectrofotometría. Para asegurar la calidad del material genético de las muestras negativas se implementó un control interno usando un gen constitutivo específico de ovino, notificado por González-Arto et al (2015), en donde evaluaron varios genes constitutivos, como la actina, el AANAT, HIOMT y el GAPDH, resultando este último el mejor, por lo que se eligió para este estudio (figura 4).

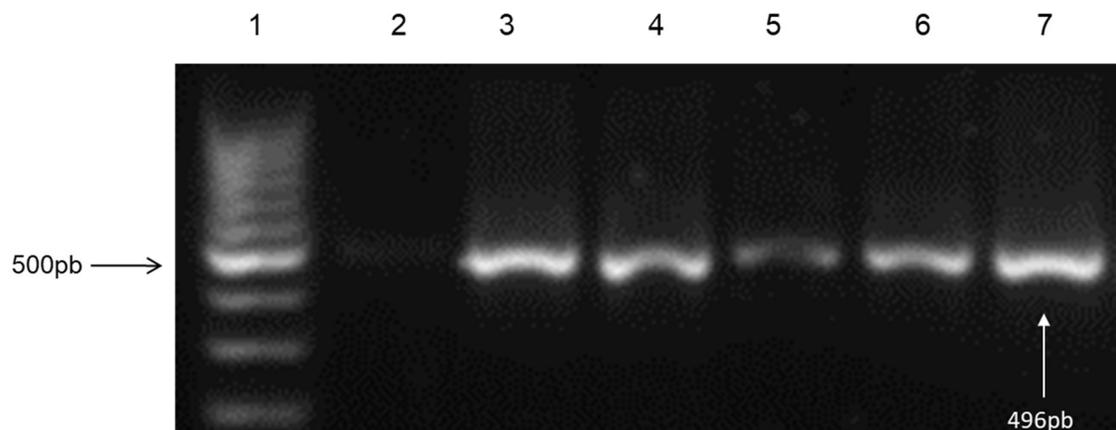


Figura 4. PCR del gen constitutivo GAPDH Ovino. Carril 1: Marcador de peso molecular 50pb, Carril 2-7: Muestras de ovino

Por otra parte, en la figura 5 se observan productos de amplificación del gen NS1 de VLA posterior a la estandarización de las condiciones en el laboratorio.

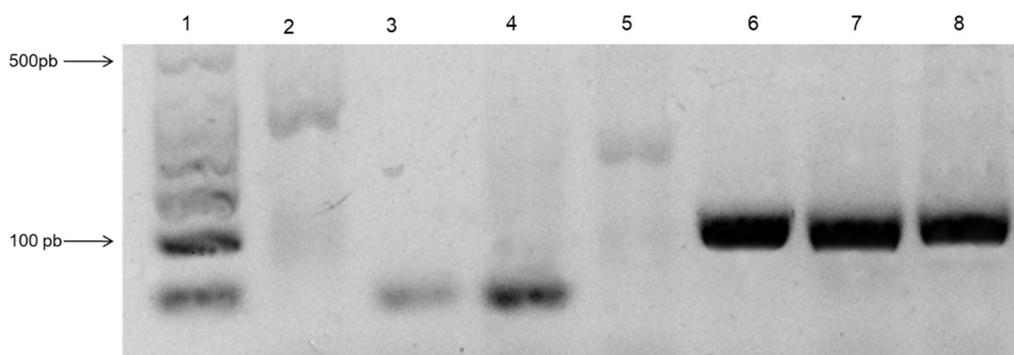


Figura 5. Gradiente de PCR anidada que amplifica el gen NS1 VLA. Carril 1: Marcador de peso molecular Gene ruler 50 bp (Thermoscientific, USA). Carril 2: Control negativo de reacción. Carril 3-8: Gradiente de temperaturas (50.8°C- 59.5°C) Se seleccionó el resultado del carril 6 como temperatura para el procesamiento de las muestras.

En la figura 6 se muestran resultados de algunas de las muestras en las cuales se amplificó el fragmento de 101pb del gen NS1 del VLA en ovinos. Posteriormente, en el cuadro 9 se hace el resumen general de los individuos positivos encontrados en cada estado del país y se desglosan en el cuadro 10 separados por sexo (macho/hembra) y en el cuadro 11, separados por las razas manejadas en cada explotación (Chiapas, Pelibuey, Saint croix, Dorper, y Suffolk).

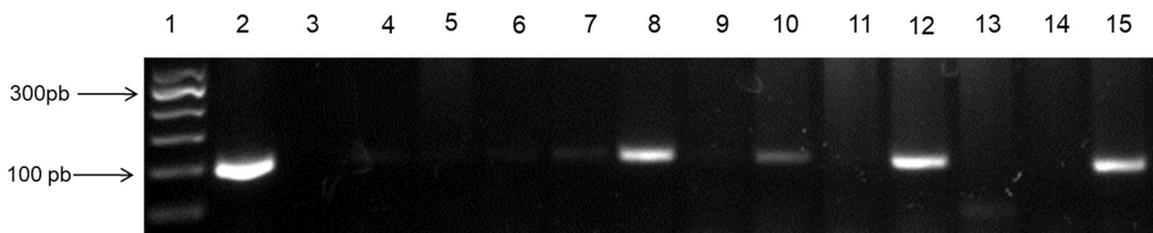


Figura 6. Resultados de PCRa del gen NS1 de VLA en ovinos. Tamaulipas 2017. 1: Marcador de peso molecular 50 bp. 2: Control positivo. 3: Control negativo de reacción. **Carril 4-15: Muestras de ovinos de Tamaulipas 2017.**

Cuadro 9. Resultados positivos de PCRa para detectar el fragmento del gen NS1 del virus de la lengua azul.

Especie	Chiapas	Tamaulipas	Morelos	Coahuila	Total
Ovino	20/91	6/30	0/43	2/30	28/194

Cuadro 10. Resultados por sexo de positivos a PCRa para detectar el fragmento del gen NS1 del virus de la lengua azul.

Estado	Sexo	No. muestras
Chiapas	Macho	2/2
	Hembra	18/89
Tamaulipas	Macho	0
	Hembra	6/30
Morelos	Macho	0
	Hembra	0/43
Coahuila	Macho	0
	Hembra	2/30

Cuadro 11. Resultados por raza de positivos a PCRa para detectar el fragmento del gen NS1 del virus de la lengua azul.

Estado	Raza	No. Muestras
Chiapas	Chiapas	20/30
Tamaulipas	Pelibuey	1/12
	Saint Croix/Dorper	3/11
	Suffolk	2/7
Morelos	Suffolk/Dorper	0/43
Coahuila	Suffolk/Dorper	2/30

Secuenciación.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados con la herramienta BLAST del NCBI, encontrando identidad con secuencias reportadas en el GeneBank con fragmentos de NS1 desde 89% ($p= 1e-12$) a 98% ($p= 4e-13$), correspondientes a los serotipos 10, 11 y 12.

14. DISCUSIÓN.

En este trabajo se logró la amplificación de un fragmento del gen NS1 de VLA, tomando como base un protocolo sugerido por la OIE, en muestras de ovinos en los estados de Coahuila, Chiapas y Tamaulipas. Las muestras se eligieron principalmente, por la afinidad del ambiente para favorecer la presencia del vector y a la probabilidad de transmisión por individuos de fauna silvestre (venados y berrendos) que se trasladan libremente por la frontera norte del país y pueden participar en el ciclo de transmisión de este agente causal. Sin embargo, dado a que este gen es altamente conservado entre los diferentes serotipos del VLA y que el tamaño de amplificación fue de 101 pb , por lo que no fue posible realizar inferencias filogenéticas más profundas, dado que al editar las secuencias sólo quedaron 80 nt de longitud; sin embargo, sí pudo determinarse que éstas tienen homología con los serotipos 10, 11 y 12. Como se ha mencionado previamente, este virus es un agente infeccioso considerado hasta el momento exótico en nuestro país; sin embargo, existen diversas notificaciones que datan a partir de 1981, año en el que Moorhead y Moreno (1981) realizaron un estudio para determinar la presencia de anticuerpos precipitantes en ovinos (187) y bovinos (267) sacrificados en el rastro de Ferrería encontrando 8.5% de seropositividad en ovinos y 3.48% en bovinos. En 1983 Suzan y colaboradores realizan un estudio para identificar anticuerpos de Lengua Azul junto con otras enfermedades de los bovinos (Herpesvirus-1, Paraenfermedad-3, Rotavirus, DVB, Adenovirus7 y Leucemia bovina). Estos hallazgos fueron corroborados con los trabajos de Vilchis et al (1986), quienes utilizaron la técnica de inmunodifusión en agar para evidenciar un 27.4% de seropositividad en el total de individuos (200) muestreados para su estudio. Los estados más relevantes fueron Quintana Roo con 70% y Puebla con un 75% de sueros positivos. Simultáneamente Stott y colaboradores (1989) reportaron tres estudios independientes con duración de un año, para definir la prevalencia de VLA en diversos estados de la República Mexicana a partir de sueros ovinos, en estos estudios se detectó una seropositividad de 6%, 35% y 60%, respectivamente, demostrando que el virus se encontraba en circulación entre el ganado mexicano muestreado. En 1994, Hernández J. y

colaboradores publicaron la seropositividad (hasta 69%) en bovinos y becerros (400 y 200 respectivamente) de los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz.

Recientemente, Lozano y colaboradores (2015), notificaron por primera vez la evidencia molecular del genoma del virus identificando la presencia del fragmento NS3 en vectores *Culicoides* en el estado de Nuevo León.

Por otro lado, en este estudio, se encontró un fragmento del gen que codifica la proteína NS1 de VLA en 28 de 194 individuos, lo cual representa un 14.4% en los estados muestreados. El mayor número de ovinos positivos se localizaron en el estado de Chiapas y correspondían a la raza biotipo Chiapas, que es un animal nativo de dicho estado. No se identificó una predisposición por sexo o raza, esto puede deberse a que se realizó un muestreo por conveniencia, aunque en todos los casos se obtuvieron un mínimo de 30 animales y esto es suficiente para aplicar el teorema Central del Límite. Aunado a ello, el muestreo se realizó en explotaciones intensivas durante el verano, lo cual confiere un escenario ideal para relacionarlo con la presencia de los vectores. Así mismo, los estados seleccionados presentan un clima idóneo para el desarrollo del vector y cuentan con un número importante de cabezas de ganado ovino, Coahuila con 110,699, Chiapas con 323,030, Tamaulipas con 251,692 y Morelos con 56,799, según reporta el SIAP de SAGARPA para el 2016 (www.gob.mx/siap). Estos animales son para abasto local y no son de exportación, aunque algunos pies de cría suelen ser importados de Australia, lugar donde el VLA es endémico; lo anterior podría hipotetizar la posible importación del VLA a los rebaños nacionales.

Al trabajar con una enfermedad exótica en el país fue de suma importancia tomar todas las medidas de seguridad pertinentes, es por ello, que el principal reto fue tener un control positivo, por lo que se diseñó un gen NS1 sintético. Los genes sintéticos vienen contenidos en un plásmido y son inocuos, ya que no hay riesgo de infecciones. Contiene solo la secuencia de un gen o un fragmento del mismo, lo cual evita el uso de controles provenientes de agentes infecciosos o de vacunas, que en el caso de lengua azul la mayoría son de virus activo atenuado y no son

posibles de adquirir en el país. En este estudio era imposible usar algunas de los dos, al tratarse de una enfermedad reportada aun como exótica.

15. CONCLUSIÓN.

En esta investigación se detectó un fragmento del gen NS1 del virus de lengua azul en muestras de sangre de ovinos de los estados de Morelos, Coahuila, Chiapas y Tamaulipas, mediante una PCR anidada, utilizando un protocolo descrito por la OIE. Con lo cual, se sientan las bases para una prueba tamiz. Asimismo, se posee un gen sintético que puede ser usado sin riesgo en investigaciones posteriores en laboratorios BS-2, o bien en caso de requerirlo las autoridades competentes.

16. PERSPECTIVAS.

Es necesario ampliar las áreas de muestreo a lo largo de ambas fronteras, para conocer un panorama más amplio en cuanto a la posible prevalencia de esta enfermedad, así como muestrear venados, que son hospederos importantes del virus.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abdel-Shafy S, Gabr HSM, Abdullah HHAM et al. Detection of microorganisms in the saliva and midgut smears of different tick species (Acari: Ixodoidea) in Egypt. *Parasitol Res* 2016; 115: 3033.
2. ACUERDO mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos. Agosto, 2016.
3. Afshar A, Eaton B, Wright P, Pearson, J, et al. Competitive ELISA for serodiagnosis of bluetongue: Evaluation of group specific monoclonal antibodies and expressed VP7 antigen. *J Vet Diagn Invest.* 1992; 4:231–237.
4. Allende R. Identificación de anticuerpos de lengua azul por la técnica de inmunodifusión en gel de agar. *Boletín del centro panamericano de fiebre aftosa* 1989; No. 55.
5. Barratt-Boyes SM, Maclachlan NJ. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Veterinary Microbiology.* 1994; 40: 361-371
6. Bhattacharya B, Roy P. Role of lipids on entry and exit of bluetongue virus, a complex nonenveloped virus. *Viruses.* 2010; 2: 1218–1235.
7. Bonneau KR, DeMaula CD, Mullens BA, MacLachlan NJ. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. 2002; Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam.
8. Borkent A, Spinelli GR. Catalog of the New World biting midges south of the United States of America (Diptera: Ceratopogonidae). Associated Publishers, 2000. 26-43.
9. Bouwknecht C, van Rijn PA, Schipper JJA, et al. Potential role of thicks as vector of bluetongue virus. *Exp Appl Acarol* (2010) 52:183–192.
10. Boyce M, Celma CC, Roy P. Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Virology.* 2012; 9: 178.
11. Bumbarov V, Golender N, Erster O, Khinich Y. Detection and isolation of Bluetongue virus from commercial vaccine batches. *Vaccine.* 2016; 34: 3317–3323.

12. Coetzee P, Van Vuuren M, Stokstad M, Myrmel M, et al. Bluetongue virus genetic and phenotypic diversity: Towards identifying the molecular determinants that influence virulence and transmission potential. *Vet Microbiol.* 2012; 161:1–12.
13. Drolet S, Rijn P, Howerth E, Beer M, Mertens P. A review of knowledge gaps and tools for *Orbivirus* research. *Vector-borne and zoonotic diseases.* 2015; 15: 339-347.
14. Erasmus B.J. The control of bluetongue in an enzootic situation. *Aust. Vet. J.,* 1975. 51, 209–210.
15. Feenstra F, Van Gennip RG, Maris-Veldhuis M, Verheij E. Bluetongue virus without NS3/NS3a expression is not virulent and protects against virulent BT challenge. *J Gen Virol.* 2014; 95: 2019–2029.
16. Forzán M, Marsh M, Roy P. Bluetongue Virus Entry into Cells. *Journal of virology.* 2007; 81: 4819–4827.
17. Forzan M, Wirblich C, Roy P. A capsid protein of nonenveloped bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101:2100–2105.
18. Gay C. *Orbiviruses: A Gap Analysis.* *Vector-borne and zoonotic diseases.* 2015; 15: 333-334.
19. González-Arto M, Hamilton dos S T.R, Gallego M, Gaspar-Torrubia E, Aguilar D, Serrano-Blesa E, Abecia J.A, Péres-Pé R, Muiño-Blanco R, Cebrián-Pérez J.A, Casao A. Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *American Society of Andrology and European Academy of Andrology,* 2016; 4:163-171.
20. Guzmán-Cornejo C, Robbins RG. El género *Ixodes* (Acari: Ixodidae) en México: claves de identificación para adultos, diagnosis, huéspedes y distribución. *Rev Mex Biodiv* 2010; vol.81 no.2 México.
21. Hassan SS, Roy P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: Role in cell entry. *J Virol.* 1999; 73:9832–9842.

22. Hernández J, Salman M, Ralch T, Pujol C, Mason J, Greiner E. Aspectos epidemiológicos y endomológicos de la enfermedad de lengua azul en ganado bovino. *Vet Mex* 1994; 25: 227-230.
23. Hutcheon D. Malarial catarrhal fever of sheep in South Africa. *Veterinary Journal and Annals of Comparative Pathology*, 1893; Vol 37, Issue 11: 330-334.
24. Hyatt AD, Eaton BT, Brookes SM. The release of bluetongue virus from infected cells and their superinfection by progeny virus. *Virology*. 1989; 173:21–34.
25. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Enfermedades causadas por el serogrupo de la enfermedad hemorrágica epizootica. 2008:1-5.
26. Kathleen A, Alexander N, Maclachlan J, Kat P, House C, O'brien S, Lerche W, Sawyer M, Frank L, Holekamp K, Smale L, Mcnutf W, Laurenson K, Andbennie M, Osburn I. Evidence of natural blue tongue virus infection among African carnivores. *Am J Trop Med JIsg*,1994; 51: 568-576.
27. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. San Diego. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press. 2012; 466-483.
28. Kumar P, Minakshi P, Ranjan K, Dalal R, Prasad G. Evidence of reassortment between eastern and western topotype strains of bluetongue virus serotype 16 (BTV–16) from India. *Adv Anim Vet Sci* 2013; 1: (4S): XXXXX.
29. Lozano-Rendón J A, Contreras-Balderas A J, Fernández-Salas I, Zarate-Ramos J, Avalos-Ramírez R. Molecular detection of bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in captured *Culicoides* spp. in the northeastern regions of Mexico. *Afr J Microbiol Res* 2016; 9: 2218-2224.
30. Maan S, Maan NS, Belaganahalli MN, MPotgieter AC, Kumar V, Batra K, et al. Development and Evaluation of Real Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Bluetongue Virus. *PLoS ONE* 2016; 11(9).

31. Maan S, Maan NS, Nomikou K, Batten C, Antony F, Belaganahalli MN, Samy AM, Reda AA, Al-Rashid SA, El Batel M, Oura CA, Mertens PP. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(5):886-9.
32. MacLachlan N, Dubovi E. *Fenner's veterinary virology.* London; Boston: Academic. 2011.
33. MacLachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G. The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *J Comp Path* 2009; 141: 1-16.
34. MacLachlan NJ, Henderson C, Schwartz-Cornil I, Zientara S. The immune response of ruminant livestock to bluetongue virus: From type I interferon to antibody. *Virus Res.* 2014;182: 71–77.
35. MacLachlan NJ, Nunamaker RA, Katz JB, Sawyer MM. Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis.* *Arch Virol.* 1994; 136:1–8.
36. MacLachlan NJ. Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. *Preventive Veterinary Medicine.* 2011; 102: 107– 111.
37. Martínez N, Alfonso A, Barrera M. Primer reporte de bovinos seroreactores al virus lengua azul en cuba. *Rev Salud Anim* 2011; 33 (2): 131-133.
38. Matsuo E, Roy P. Bluetongue Virus VP6 Acts Early in the Replication Cycle and Can Form the Basis of Chimeric Virus Formation. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 2009, p. 8842–8848.
39. Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Schmahl G. Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitol Res* 2008; 103:79–86.
40. Meiswinkel R, van Rijn P, Leijts P, Goffredo M. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec* 2007; 161:564–565.
41. Melville L, Weir R, Hunt N, Davis S, Walsh S. Forty years continuous monitoring for bluetongue virus at an Australian site of high arbovirus activity. What have we achieved? *Veterinaria Italiana* 2015; 51 (4), 263-267.

42. Mertens PPC, Ross-Smith N, Diprose J, Attoui H. The structure of bluetongue virus core and proteins 2009; 101-134. Academic Press, London, UK.
43. Mohr BP, Roy P. Bluetongue Virus capsid assembly and maturation. *Viruses*. 2014; 6: 3250-3270.
44. Moorhead J.R, Moreno CH. Estudio de la presencia de anticuerpos precipitantes contra el virus de la Lengua Azul en ovinos y bovinos sacrificados en el Rastro de Ferrería de la Ciudad de México, D. F. 1981. Tesis FMVZ-UNAM.
45. NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. 2010.
46. OIE. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2018. Septiembre 2016. Recuperado de: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>
47. OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2014. Capítulo 2.1.3. Bluetongue. Infection with bluetongue virus.
48. Oura CAL, El Harrak M. Midge transmitted bluetongue in domestic dogs. *Epidemiol Infect* 2011; 139: 1396–1400.
49. Patel A, Roy P. The molecular biology of Bluetongue virus replication. *Virus Res*. 2014; 182:5-20.
50. Ratnien M, Shaw AE, Barry G. Bluetongue virus NS4 protein is an interferon antagonist and a determinant of virus virulence. *J Virol* 2016.
51. Roy P. Bluetongue virus proteins and particles and their role in virus entry, assembly and release. *Adv Virus Res* 2015; 64:69–123.
52. Ruder MG, Lysyk TJ, Stallknecht DE, Foil LD, Johnson DJ, Chase CC, Dargatz DA, Gibbs PJ. Transmission and Epidemiology of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in North America: Current Perspectives, Research Gaps, and Future Directions. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 2015, 15:349-364.

53. Ryan TJ, Frampton ER, Motha MXJ. Arbovirus and arbovirus vector surveillance in New Zealand. *Surveillance* 1991; 18(5), 24–26. Update 2015.
54. Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS. Bluetongue epidemiology in the European Union *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 539–544.
55. Schmidtman ET, Herrero MV, Green AL, Dargatz DA, Rodriguez JM, Walton TE. Distribution of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Nebraska, South Dakota, and North Dakota: clarifying the epidemiology of bluetongue disease in the northern Great Plains region of the United States. *J Med Entomol* 2011; 48:634-643.
56. Shafiq M, Minakshi P, Bhateja A, Ranjan K, Prasad G. Evidence of genetic reassortment between Indian isolate of bluetongue virus serotype 21 (BTV–21) and bluetongue virus serotype 16 (BTV–16). *Virus Res* 2013; 173: 336–343.
57. SIAP. Producción por estado. 2016. Recuperado de: http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/apecnal.jsp?id=5
58. Sperlova A, Zendulkova D. Bluetongue: a review. *Veterinari Medicina*. 2011; 56: 430–452.
59. Stott J, Osburn B, Blanchard M, Obeso, R. Serologic and virologic evidence of bluetongue virus infection in cattle and sheep in Mexico. *American Journal of Veterinary*. 1989; 50:335-40.
60. Suzan VM, Misao O, Romero EA, Yosuke M. Prevalence of bovine Herpesvirus-1, Paraenfluenza-3, bovine Rotavirus, bovine Viral Diarrhea, bovine Adenovirus7, bovine Leukemia virus and Bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn J Veto Res* 1983; 31: 125-132.
61. Tabachnick W. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet Ital* 2004; 40: 145-150.
62. Tabachnick WJ. *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. *Annu Rev Entomol* 1996; 41:23-43.
63. Toussaint J-F, Vandenbussche F, Mast J. Bluetongue in northern Europe. *Veterinary Record*. 2006; 159: 327.

64. Urakawa T, Ritter DG, Roy P. Expression of largest RNA segment and synthesis of vp1 protein of bluetongue virus in insect cells by recombinant baculovirus: Association of vp1 protein with RNA polymerase activity. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:7395–7401.
65. Van Gennip RGP, van de Water SGP, van Rijn PA. Bluetongue Virus Nonstructural Protein NS3/NS3a Is Not Essential for Virus Replication. *PLoS ONE* 2014; 9(1).
66. Vercauteren G, Miry C, Vandebussche F, Ducatelle R. Bluetongue virus serotype 8-associated congenital hydranencephaly in calves. *Transbound Emerg Dis.*2008; 55:293–298.
67. Vilchis C, Gay J, Batalla D. Determinación de anticuerpos contra el virus de lengua azul en ovinos por la técnica de inmunodifusión. *Tec. Pec. Méx.* 1986; 51: 116-121.
68. Wechsler SJ, McHolland LE. Susceptibilities of 14 cell lines to bluetongue virus infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2324–2327.
69. Wilson W, Daniels P, Ostlund E, Johnson D, Oberst R, Hairgrove T, Mediger J, McIntosh M. Diagnostic Tools for Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease. *Viruses Applicable to North American Veterinary Diagnosticians. Vector-borne and zoonotic diseases.* 2015; 15: 364-373.
70. Wittmann EJ, Mellor PS, Baylis M. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. Blackwell Scientific 2002; Oxford, UK.
71. Wu J, Li J, Mao X, Wang W, Cheng Z, Zhou Z, Zhou X, Tao X. Viroplasm Protein P9-1 of *Rice Black-Streaked Dwarf Virus* Preferentially Binds to Single-Stranded RNA in Its Octamer Form, and the Central Interior Structure Formed by This Octamer Constitutes the Major RNA Binding Site. *J Virol* 2013; 87: 12885–12899.
72. Yin H, Zhang G, Zhang H, Zhang J. A Pair of Novel Primers for Universal Detection of the NS1 gene from various Bluetongue Virus serotypes. *Virologica sinica* 2008; 23:68-72.

73. Zientara S, Ponsart C. Viral emergence and consequences for reproductive performance in ruminants: two recent examples (bluetongue and Schmallenberg viruses). *Reproduction, Fertility and Development* 2015; 27: 63–71.