



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LENTIVIRUS DE
PEQUEÑOS RUMIANTES MANTENIDOS EN REBAÑOS MIXTOS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
PRESENTA

JAZMÍN DE LA LUZ ARMENDÁRIZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. ANDRÉS DUCOING WATTY

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLAN, UNAM

CIUDAD DE MEXICO, ABRIL, 2021



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

Esta tesis se la dedico a mis padres Laura Armendáriz González y Leonel De la Luz Lara quienes me han brindado amor y apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mi hermana Laura De la Luz Armendáriz quien ha sido mi gran compañera de vida y un gran ejemplo como mujer y profesionista.

A mi sobrina Amanda Ortiz De la Luz quien es mi motor para continuar en el día a día.

A mi esposo, José Francisco Rivera Benítez por caminar conmigo brindándome cuidado, apoyo e impulsándome a cumplir mis metas personales y profesionales.

A mi abuelito Mario Armendáriz Islas quien ya no está conmigo físicamente pero ha sido la persona que más creyó en mí y por más difícil que fuese el camino siempre me motivo a continuar. Te dedico mi tesis por haberme hecho tan feliz.

A mi suegro Gerardo Rivera Aguilar porque sé que el amor que me dio siempre fue incondicional y el lazo de cariño que nos unió es único.

A mi suegra Teresa Benítez González, mis cuñados Guadalupe, Mariana y Diego y mi sobrino Braulio. Gracias por su compañía y apoyo.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma mater desde el bachillerato, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por generar en mi los conocimientos necesarios para desarrollarme como médico veterinario zootecnista, al programa de posgrado en ciencias de la producción y salud animal por mi desarrollo en el ámbito de la investigación y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico recibido durante del desarrollo del posgrado.

Agradecimiento al presupuesto otorgado por el proyecto PAPIIT IN220719.

Agradezco a mi grupo de trabajo formado por Dr. Andrés Ducoing Watty, Dr. José Francisco Rivera Benítez y al Dr Humberto Ramírez Mendoza por haber sido las primeras personas en creer y por sembrar en mí el amor y la pasión a la virología.

Agradezco también al claustro caprino Mstra. Georgina Hernández Rojas, Dra. Alicia Soberón Mobarak, Dr Aldo Alberti Bruno Navarro y Eduardo Cabrera Dominguez por permitirme y profundizarme en el campo de la producción caprina y de la enseñanza.

Agradezco al equipo del CENID-SAI INIFAP Mc Luis Gómez Núñez, Dra Catalina Tufiño Loza, MVZ Manuel Zapata Moreno y al Ing. Ricardo Barba Hernández por ser mis amigos y compañeros de trabajo.

Resumen

Los lentivirus de pequeños rumiantes son uno de los principales agentes virales que afectan a las cabras a nivel mundial. EL LvPR causa una enfermedad sistémica, crónica degenerativa e incurable. Los cuadros clínicos generalmente están relacionados con daños neurológicos, respiratorios, articulares y mastitis. En México, se ha detectado el genotipo B1 como endémico en caprinos y ovinos. En el presente estudio se realizó un muestreo dirigido para identificar el porcentaje de positividad a LVPR en unidades de producción caprina y ovina así como en unidades en donde co-habitan caprinos y ovinos de México. Se determinó que del total de cabras el 93%(518/558) y el 73% (279/382) de ovinos fueron positivos a la presencia de LVPR. Con la prueba de qPCR diferencias entre genogrupo A y B, se observó que el 1.4% de los caprinos positivos pertenece al genogrupo A y el 88% al B, con respecto a los ovinos se detectó que el 6.4% es positivo para el A y el 85% al B. A partir de un caso se aisló en cultivo celular una cepa de LVPR, la cual fue denominada SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013. El análisis filogenético mostró que la cepa SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 comparte un 92-98% de identidad de nucleótidos en el gen *gag* y un 88-98% del gen *env* con cepas americanas y asiáticas del genotipo B1 del LVPR, respectivamente. Esta cepa fue empleada para la elaboración de la poliproteína gag recombinante de LVPR. Se confirmó la circulación de los genogrupos A y B en caprinos y ovinos y que las unidades de producción en donde conviven ambas especies facilita la diseminación estos genogrupos. Los resultados de estos estudios nos permiten establecer el diseño de herramientas de diagnóstico y medidas de prevención para ambos genogrupos en estas dos especies.

Abstract

Small ruminant lentiviruses (SRLV) are one of the main viral agents of concern to goats globally. SRLV causes a systemic, chronic degenerative and incurable disease. The clinical manifestation are generally related to neurological, respiratory, joint and mastitis damage. In Mexico, the B1 genotype has been detected as endemic in goats and sheep. In the present study, a targeted sampling was carried out to identify the percentage of positivity to LVPR in goat and sheep uni-species production units and in units where goats and sheep from Mexico co-inhabit. It was determined that 93% (518/558) and 73% (279/382) of sheep were positive for the presence of LVPR. With the qPCR test differences between genogroup A and B, it is found that 1.4% of positive goats belong to genogroup A and 88% to B, with respect to sheep it was detected that 6.4% are positive for A and 85% to B. From a case, a strain of LVPR was isolated in cell culture, which was named SRLV / B1 / Goat / Mx / INIFAP-1/2013. Phylogenetic analysis showed that the SRLV / B1 / Goat / Mx / INIFAP-1/2013 strain shares 92-98% nucleotide identity in the gag gene and 88-98% of the env gene with American and Asian strains of the genotype. B1 of the LVPR, respectively. This strain was used for the production of the recombinant gag polyprotein of LVPR. The circulation of genogroups A and B in goats and sheep was confirmed and that the production units where both species co-inhabit facilitate the dissemination of these genogroups. The results of these studies allow us to establish the design of diagnostic tools and prevention measures for both genogroups in these two species.

Contenido	Página
Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Resumen	4
Abstarct	5
Lista de cuadros y Figuras	7
Abreviaturas	8
Introducción	9
Material y métodos	29
Resultados	34
Discusión y conclusión	41
Referencias	45
Anexo 1. Patente	52
Anexo 2. Artículo científico	73

Lista de cuadros y figuras

- Cuadro 1** Descripción de las cepas empleadas para el análisis filogenético de LVPR.
- Cuadro 2** Número de animales positivos para diagnóstico serológico y molecular por unidad de producción.
- Figura 1** Cronología de diferentes aislamientos de LvPR a nivel Mundial..
- Figura 2** Cronología del reconocimiento del virus de la artritis encefalitis caprina y el virus de maedi visna en México.
- Figura 3** Clasificación taxonómica de la familia *Retroviridae*.
- Figura 4** Micrografías de microscopía electrónica de los Retrovirus.
- Figura 5** Esquema de la conformación genética de la familia *Retroviridae*.
- Figura 6** Esquema de la conformación genética de los Lentivirus de pequeños ruminantes y el virus de inmunodeficiencia humana.
- Figura 7** Micrografía de los cultivos primarios infectados con lentivirus de pequeños ruminantes cepa SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 y prueba de inmunodetección.
- Figura 8** Análisis fiogenético por medio del método neighbor-joining. A) *gag* y B) *env* secuencia de aminoácidos del aislamiento SRLV/Goat/MX/INIFAP-1/2013 de México
- Figura 9** Fotografía del producto de purificación de la poliproteína *gag* y del reconocimiento específico de anticuerpos en contra de la poliproteína.

Abreviaturas

ADN: ácido Desoxirribonucleico

ADNc: cadena complementaria de ácido desoxirribonucleico

AEC: amino etil carbazol

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CPE: cultivo primario de epidimo

CPT: cultivo primario de testiculo

DAB: diaminobenzidina

EDTA: ácido

etilendiaminotetraacetico

ELISA: ensayo inmunoenzimático

Hpi: horas post infeccion

kDa: Kilo Daltones

LvPR: lentivirus de pequeños rumiantes

Pb pares de bases

PCO: línea celular de plexo coroideo ovino

PCRpf: reacción en cadena de la polimerasa en punto final

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real

RT-PCRpf: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en punto final

vAEC: virus de la artritis encefalitis caprina

vMV: virus de maedi visna

Introducción

Situación de los LvPR a nivel mundial

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) presentan una distribución mundial y causan una enfermedad multisistémica crónico degenerativa e incurable en caprinos y ovinos (Cheevers et al., 1981; Pétursson et al., 1976). De acuerdo a la clasificación actual, en este grupo de LvPR incluye a las especies de lentivirus que infectan a cabras y que anteriormente se conocían como virus de la artritis-encefalitis caprina (vAEC) y el virus de Maedi/Visna (vMV) que infecta ovinos (Shah et al., 2004).

Con respecto al vMV, este virus fue identificado por primera vez en Islandia, en 1960 por Sigurdsson *et al.*, a partir de borregos de la raza Karakul que fueron importados de Alemania, en los cuales observaron signos respiratorios y nerviosos acentuados, otorgándole el nombre de Maedi que se refiere a una condición corporal mala y Visna haciendo referencia a los signos respiratorios severos; a partir de este año comenzaron a reportar la diseminación del vMV en Europa, reportando prevalencias hasta del 85% (Sigurdsson et al., 1957). En 1988, Cutlip, *et al.*, comprueban que el vMV está circulando en EUA, sin embargo estos autores describen que los ovinos infectados en este país solo presentan signos respiratorios acentuados, por lo que deciden nombrarlo como el virus de neumonía progresiva ovina (Cutlip et al., 1988). En cuanto al vAEC, fue descrito por primera vez en 1974 por Cork *et al.*, quienes describen lesiones en sistema nervioso central, así como neumonía intersticial en cabritos menores de dos meses de edad (Cork, 1990). En 1980, Narayan y colaboradores determinan que existe la presencia de un virus similar al retrovirus ovino que está causando leucoencefalitis y artritis en cabras de EUA, empleando líneas celulares de ovino llegan a la conclusión de que este virus es específico del caprino (Narayan et al., 1980). En este mismo año Crawford *et al.* realizan el primer aislamiento del vAEC a partir

cabras adultas con artritis crónica y fue visualizado empleando microscopía electrónica (Crawford et al., 1980). A partir de ese momento, el virus fue identificado en Europa, América y África, reportando prevalencias del 5 al 90%.

Se sabía que el vMV y el vAEC pertenecen a la misma familia y género, sin embargo se consideraban específicos de caprinos y ovinos respectivamente, clasificando a los virus que afectan a ovinos dentro del grupo A y dentro del grupo B a los que afectan caprinos, no obstante, en 2004, Shah y colaboradores determinan que la alta variabilidad genética de los virus y la cohabitación entre ovinos y caprinos favorecen eventos de recombinación genética entre los genogrupos A y B originando cepas virales que se agrupan en grupos diferentes y que tienen la capacidad de producir signos clínicos en ambas especies (Shah et al., 2004). Es entonces que con base en los análisis de los genes *gag-pol*, varios investigadores sugieren la reclasificación de los LvPR en 5 genogrupos representados de la letra A a la E. En el genotipo A se han incluido 18 subtipos (A1 al A18) y el B, cuatro subtipos (B1 al B4). El genotipo E, está dividido en los subtipos E1 y E2, han sido identificados exclusivamente en caprinos que se ubican en Italia (Gendelman et al., 1986; Gjerset et al., 2007; Leroux et al., 1997; Shah et al., 2004). En la figura 1 se muestra un esquema de la cronología de los aislamientos de LVPR a nivel mundial.

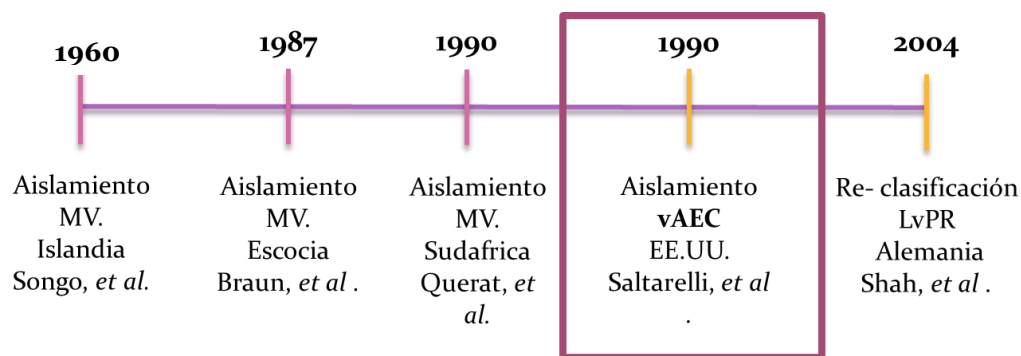


Figura 1. Cronología de diferentes aislamientos de LvPR a nivel Mundial.

Situación de LvPR en México

En México, en 1983, Nazara y colaboradores realizan un estudio de seroprevalencia del vAEC en las principales regiones caprinas de México. Este estudio fue comparativo entre cabras importadas destinadas a la producción de leche y cabras criollas cuyo objetivo era la producción de carne, como resultados obtuvieron que en el grupo de cabras importadas la seroprevalencia fue entre el 17 y 35% identificándose que el mayor porcentaje de animales seropositivos se ubican en las regiones norte y centro del país. En las cabras criollas ubicadas en la zona sur no se detectó ningún animal con seropositividad, por lo que se determina que el ingreso del virus a México se presenta principalmente por la importación de pie de cría (Nazara et al., 1985) Al identificar un incremento en los caprinos que presentaron seropositividad al vAEC, en 1994, la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación, reconoce la circulación natural del virus, asignándolo dentro del grupo 3 del acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, en el cual se indica que es una enfermedad endémica de reporte mensual obligatorio. En 1998, Leyva *et al* utilizando células de membrana sinovial, realizaron inmunohistoquímica dirigida a las proteínas p28 y a la gp135, análisis histopatológicos y microscopía electrónica, estos hallazgos confirmaron la presencia del vAEC en caprinos productores de leche, atribuyendo la presencia del virus al pie de cría importado de Estados Unidos (Leyva et al., 1998). A partir de membrana sinovial y células mononucleares de sangre periférica, en 1999 Daltabui *et al* realizaron el primer aislamiento y la estandarización de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa punto final para la identificación molecular del vAEC en México (Daltabuit et al., 1999). En 2010, Ramírez *et al*, a partir de un caprino con artritis realizaron la primera secuenciación del genoma completo de LvPR que circula de forma natural en México, empleando análisis filogenéticos

que arrojaron que esta cepa pertenece a la genogrupa B1. Además incluyeron el reporte de ovinos sin signos clínicos y con signos nerviosos que fueron positivos a la identificación de la región terminal larga (LTR) de este virus (Ramírez et al., 2011). Los resultados obtenidos en los ovinos sugieren dos hipótesis una es que al convivir caprinos y ovinos el vAEC sufrió mutaciones para lograr adaptarse a la especie ovina, o bien que los ovinos estaban siendo infectados con una cepa tipo vMV.

Con respecto al vMV, fue hasta 2016 que las autoridades reconocen que el virus está circulando de forma natural en México enlistándolo dentro del grupo 3 del Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. En este mismo año, Sánchez *et al* demuestran la presencia de LvPR por pruebas moleculares en células mononucleares de sangre periférica de ovinos adultos y en muestras de fetos confirmando la circulación natural del virus en ovinos y que estos virus tiene la capacidad de transmitirse de forma vertical(Sánchez et al., 2016). En la Figura 2 se muestra un esquema con la cronología de los antecedentes de LVPR en México.

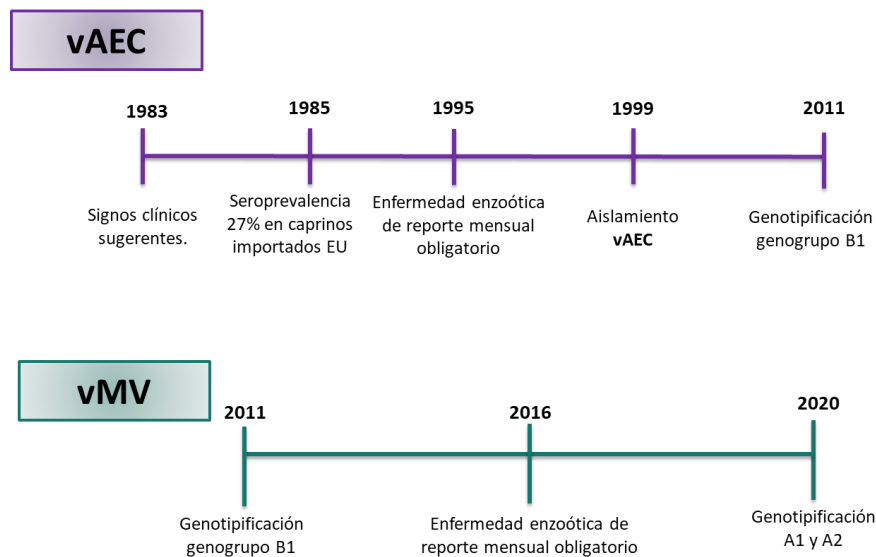


Figura 2. Cronología del reconocimiento del virus de la artritis encefalitis caprina y el virus de maedi visna en México.

Características Morfológicas de los LvPR

Los LvPR pertenecen al orden Ortervirales, familia *Retroviridae*, la cual tiene dos subfamilias. La subfamilia *Orthoretrovirinae* incluye los géneros Alpharetrovirus (virus de la leucosis aviar, virus del S sarcoma aviar, virus de la mieloblastosis aviar y el virus del sarcoma de Rous), Betaretrovirus (virus tumor mamario del ratón y jaagsiekte retrovirus ovino), Gammaretrovirus (leucemia viral felina, virus del sarcoma felino, virus de la reticuloendoteliosis aviar, retrovirus del koala), Deltaretrovirus (leucemia viral bovina y virus linfotrópico T del humano), Epsilonretrovirus (hiperplasia epidermal del Walleye y del sarcoma dermal del Walleye) y Lentivirus (virus de inmunodeficiencia humana, virus de inmunodeficiencia del simio, virus de inmunodeficiencia felina, virus de inmunodeficiencia bovina, lentivirus de pequeños rumiantes y anemia infecciosa equina). Dentro de la subfamilia *Spumaretrovirinae* solo se encuentran los géneros Bovispumavirus, Equispumavirus, Felispumavirus, Prosimiispumavirus y Simiispumavirus (Murphy et al., 2012). En la Figura 3 se muestra un esquema de la clasificación taxonómica de la familia *Retroviridae*.

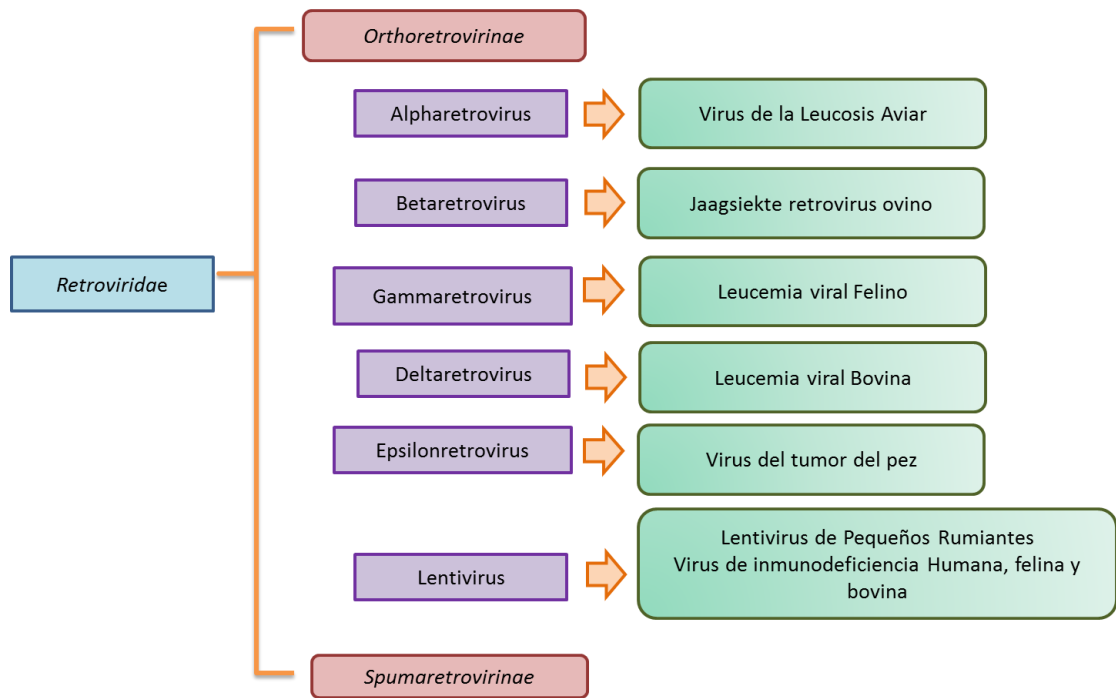


Figura 3. Clasificación taxonómica de la familia *Retroviridae*.

El virión de los retrovirus es de forma esférica, tiene un tamaño de entre 80-100 nm, es envuelto por una bicapa lipídica, formada por la membrana de la célula hospedera durante la gemación, presenta espículas de heterodímeros denominados glicoproteína de superficie (gpSU,) que es la más externa y glicoproteína transmembranal (gpTM), la cual es el tronco que une al proteína SU con la membrana viral; ambas proteínas son codificadas por el gen *env*. Posteriormente, el gen *gag* codifica una poliproteína que genera tres proteínas estructurales. proteína de matriz (MA) la cual se encuentra anclada a la membrana, la proteína de cápside (CA) que forma una estructura nuclear cónica y en su interior contiene a la nucleocápside (NC), el genoma viral está conformado por una doble subunidad de ácido ribonucleico (ARN), presenta una longitud de aproximadamente 9.1 kilobases (kb) y las enzimas virales fundamentales para su replicación que son la retrotranscriptasa inversa (RT), proteasa, dUTPasa y la

integrasa (IN), las cuales son codificadas por el gen pol. (Delgado, 2011; Fenner et al., 2014). Los Betaretrovirus presentan una nucleocápside excéntrica, mientras que los Alpharetrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus y los Spumaretrovirus la tienen de forma concéntrica y los Lentivirus presentan la nucleocápside en forma cónica.

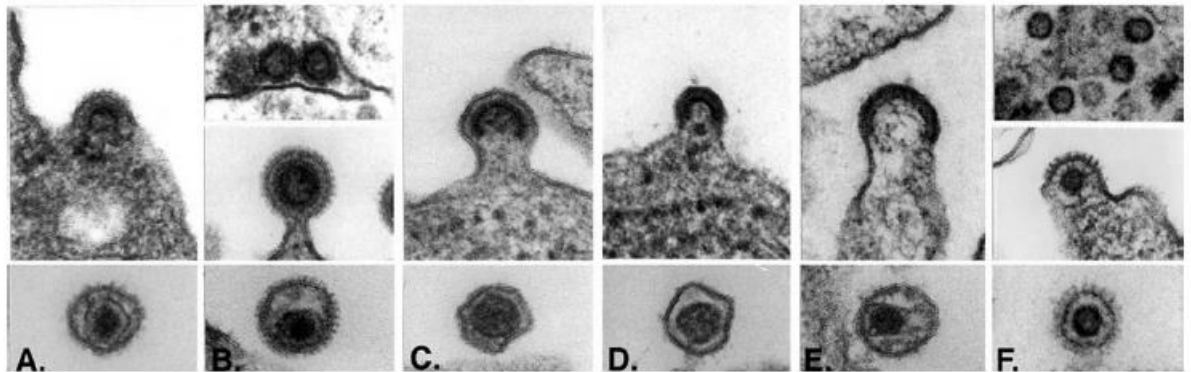


Figura 4. Micrografías de microscopía electrónica de los retrovirus. La letra A corresponde a los *Alpharetrovirus*, B *Betaretrovirus*, C *Deltaretrovirus*, D *Epsilonretrovirus*, la letra E *Lentivirus* y la letra F a los *Spumaretrovirus*. Fuente: Fauquet CM et al, 2005 *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*

Características genotípicas de los LvPR

Los retrovirus presentan tres genes principales que son el gen *gag*, *pol* y *env*, su genoma se encuentra flanqueado en ambos extremos con una región conservada que se le ha denominado región terminal larga (por sus siglas en inglés, LTR).

Además, contienen genes accesorios que son *vif*, *vpr like* y *rev*. En la figura 6, se muestran las diferencias entre géneros.

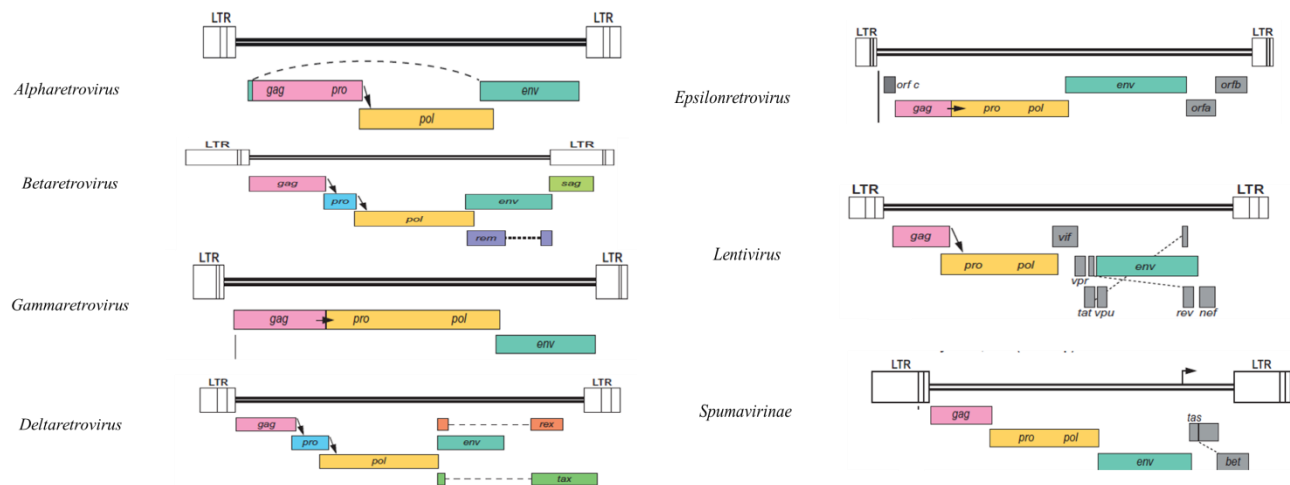


Figura 5. Esquema de la conformación genética de la familia *Retroviridae*. Adaptado de Fauquet CM *et al*, 2005 *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*

Los LvPR poseen los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, como genes accesorios tienen a *vif*, *vpr like* y *rev*. En la Figura 7 se muestra el esquema comparativo entre los LvPR y el VIH.

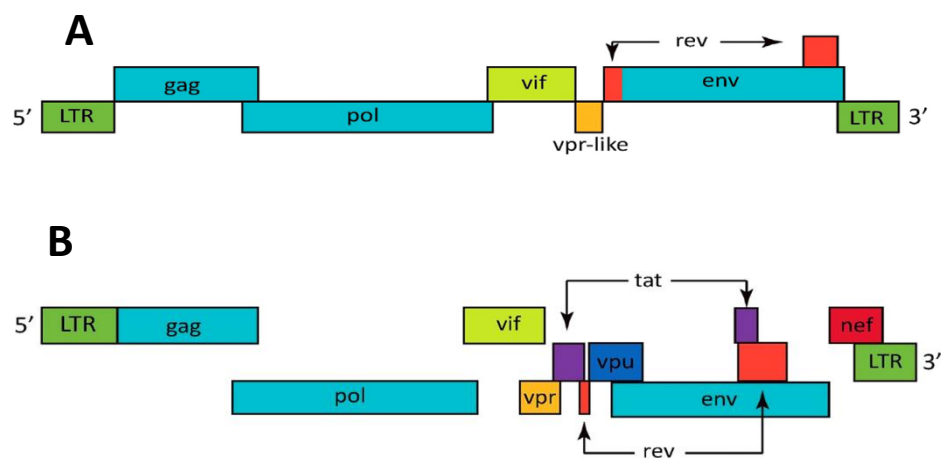


Figura 6. Esquema de la conformación genética de los Lentivirus de pequeños rumiantes (A) y el virus de inmunodeficiencia humana (B). Adaptado de: Minguijón *et al* 2015.

El gen *gag* tiene una longitud aproximada de 1326 bases (pb), codifica una poliproteína que al ser incidida por la proteasa se generan las proteínas de Matriz (p17), Cápside (p25) y Nucleocápside(p14). La proteína de matriz se encuentra anclada en el interior de la membrana, la proteína de la cápside forma una estructura nuclear cónica que en su interior resguarda un complejo proteico-ácido nucléico (dos subunidades de ARN, la nucleoproteína y la retrotranscriptasa reversa). La longitud aproximada del gen *pol* es de 3300 de bases y éste es el encargado de codificar las enzimas virales que son la retrotranscriptasa inversa (RT), la proteasa (PT) y la integrasa (IN), tienen como su principal función sobre el ciclo de replicación y la formación del provirus de los LvPR. El gen *env*, que expresa dos proteínas glicosiladas, la de superficie (SU, gp135) y la transmembranal (TM, gp), las cuales se encuentran ancladas a la membrana en forma de heterotrímeros, son altamente variables e inmunogénicas(Delgado, 2011). Los LvPR también tienen genes accesorios como *vif* que codifica una proteína cuya función es la de inhibir la acción del APOBEC 3, el cual es un factor de restricción intracelular con efecto anti viral, el gen *vpr like* cuya función es transportar al complejo de pre integración al núcleo inmediatamente después de la entrada del virus a la célula, y el gen *rev* que se une a regiones específicas del ARN viral (RRE), y su función es la de facilitar la salida de los ARN mensajeros al citoplasma para permitir la traducción y expresión de las proteínas estructurales. Las LTR son secuencias de nucleótidos no codificantes que funcionan como promotores virales y son incorporados al genoma del virus durante la retrotranscripción, presentan tres regiones que son la U3, R y U5. En la fase de provirus, se identifican las

regiones U3, R y U5, ubicadas en ambos extremos; en el extremo 5´ del ARN viral se encuentra la R y U5 y en el extremo 3´ se reconoce a la región U3 y R. Se ha descrito que la función de la región U3 es dirigir la transcripción, por lo que se identifican las partes esenciales de un promotor viral, que son el núcleo, activador y la zona moduladora, cada una de estas regiones cuenta con diferentes sitios de unión a factores de transcripción que funcionan como señales para dar comienzo a la transcripción. La región R contiene el sitio de poliadeninas y el extremo U5 contiene los sitios que señalizan la finalización de la transcripción (Naghavi et al., 1999; Pereira et al., 2000)

Ciclo de replicación de los LvPR

El virus se une al receptor celular por medio de la proteína gp135 codificada por el gen env, en el caso de los LvPR aún se desconocen los receptores celulares que participan en la unión del virus a la membrana celular. En 1993, Hullinger, *et al* confirman que para que el vAEC pueda unirse a la membrana celular es necesaria la interacción de las proteínas de superficie viral con más de una proteína ancladas a la membrana celular (Hullinger et al., 1993). Bruett, *et al* en 2000 describen que el posible receptor del virus de maedi visna es una proteína llamada condroitin sulfato proteoglicano actualmente se ha descrito que existen receptores de manosa asociados al aumento en la carga viral de animales con signos clínicos (Bruett et al., 2000, Crespo, et al, 2012), sin embargo, hasta la fecha no se han confirmado estos hallazgos. La unión al receptor celular induce cambios conformacionales en la proteína SU y en la TM que favorecen la exposición del péptido de fusión que corresponde a la región amino terminal de la proteína TM y es entonces cuando la partícula viral ingresa a la célula por medio de la fusión de la membrana viral y la celular. Una vez que el virus ingresa a la célula se libera de su envoltura y el ARN es liberado en el citosol, donde se realiza la retrotranscripción en la cual participa la enzima viral retrotranscriptasa inversa quien utiliza como molde el RNA viral para retrotranscribir y formar una doble

cadena de ADN, el cual permanece en la nucleocapside. El ADN, las enzimas virales (IN y PR) y algunas proteínas de la célula forman un complejo de preintegración, el cual será traslocado al núcleo para que la IN catalice la integración del ADN viral al cromosoma de la célula, en esta etapa se le conoce como provirus. Los factores de transcripción ubicados en la porción 5' de la RTL son las señales para que a partir del provirus se sinteticen nuevas copias de ARNviral. El ARNm es trasladado al citoplasma y los precursores de las poliproteínas Gag y Pol son dirigidos directamente a la membrana plasmática, mientras que las proteínas de envoltura se trasladan al retículo endoplásmico en donde se llevará a cabo la traducción de proteínas, posteriormente migran al aparato de Golgi en donde se incorporan carbohidratos a las estructuras proteicas de la proteína SU y la TM. Una vez concluida la glicosilación, las proteínas son enviadas a la membrana plasmática para ser integradas al virión y que éste, ya maduro, emerja de la célula por gemación (Friedrich et al., 2011; Waheed and Freed, 2010). En la figura 8 se muestra el esquema de la replicación de los LVPR

Patogenia de los LvPR

El tropismo celular de los LvPR se encuentra dirigido a los monocitos y células dendríticas. En 1986, Gendeleman et al., determinaron que la replicación del virus es mayor cuando sucede la maduración de los monocitos a macrófagos en tejidos (Gendelman et al., 1986). Otros autores han confirmado la replicación del virus en células endoteliales y células epiteliales de tracto reproductor y han identificado al virus en otros órganos como pulmón, bazo, tonsila, útero, cerebro y riñón (Lamara et al., 2002; Martínez et al., 2005; Minguijón et al., 2015).

La transmisión vertical principalmente está dada por el consumo de calostro y/o leche de hembras con la presencia del virus, se ha demostrado que durante las

primeras 48 horas, el sistema digestivo del cabrito es permeable a la absorción de macromoléculas como es el caso del ARN viral, el provirus y los anticuerpos maternos, permitiendo así el establecimiento y la replicación de LvPR (Blacklaws et al., 2004; Peterhans et al., 2004; Rowe and East, 1997). Además se ha comprobado que el virus puede ser transmitido de forma intrauterina en el 15% de los partos (Rowe et al., 1992). Con respecto a la transmisión horizontal, se ha demostrado que los LvPR pueden ser transmitidos por contacto directo entre animales, por agua, alimento e instalaciones contaminadas, así mismo, se ha reportado ampliamente que el ingreso de animales cuyo estatus sanitario se desconoce favorece el establecimiento y la diseminación del virus (Blacklaws et al., 2004).

Cuadros clínicos asociados a LvPR en caprinos y ovinos.

Se ha reportado que el periodo de incubación del virus es de entre seis meses hasta siete años, identificando que alrededor del 35% de los animales presentan signos clínicos y que el resto se puede encontrar infectado con el virus, sin que se observan signos clínicos en ellos, además se ha descrito que los signos clínicos más evidentes se observan en animales adultos (Peterhans et al., 2004; Rowe and East, 1997). Del mismo modo se ha descrito que factores estresantes como cambio de alimentación, gestación, parto y lactancia funcionan como desencadenantes para la presentación de signos clínicos (Cutlip et al., 1988; Minguijón et al., 2015).

Los signos clínicos ocasionados por LvPR se encuentran asociados al tropismo de la cepa que circula en cada sistema de producción, principalmente. Se ha descrito como principal tropismo tisular el aparato respiratorio, locomotor, glándula mamaria y nervioso, siendo el respiratorio y nervioso los que pueden conducir a la muerte del animal, mientras que el mamario y locomotor son asociados a pérdidas

económicas y productivas considerables (Sigurdsson, 1954, De Andres, et al,2005).

Los cuadros respiratorios se observan con mayor severidad en ovinos adultos de dos a seis años de edad y en caprinos de uno a seis meses de edad, se ha descrito que el tropismo celular del virus en este aparato se encuentra dirigido a neumocitos tipo I y II, macrófagos alveolares y células endoteliales. Las lesiones macroscópicas se asocian a una neumonía de tipo intersticial y los principales signos observados son disnea severa, boqueo, respiración abdominal y jadeo, con el tiempo los ovinos se postran y mueren por una insuficiencia respiratoria. Con respecto al ganado caprino, estos signos son menos acentuados y se asocian a otros agentes bacterianos (Blacklaws, 2008; Pépin et al., 1998; Pritchard and Dawson, 2007).

Los cuadros neurológicos se han descrito en ovinos de uno a cinco años de edad y en caprinos de uno a seis meses. El tropismo celular a este nivel se dirige principalmente a macrófagos intersticiales, plexo coroideo, células de la microglia y fibroblastos. Entre las principales lesiones macroscópicas destacan meningoencefalomielitis y coroiditis no purulenta. Los principales signos son incoordinación, caídas frecuentes al aumentar la cronicidad de la enfermedad los animales se postran y mueren (Narayan and Cork, 1985). En el caso de los cabritos, se observan movimientos en círculo, opistótonos, ceguera, temblores e inclinación de cabeza, posteriormente sufren parálisis bilateral y alrededor del mes de haber aparecido los signos clínicos mueren (Blacklaws, 2008; Cork, 1990).

La manifestación clínica en la glándula mamaria se presenta principalmente en caprinos adultos, aumentando la severidad de los signos clínicos en el post parto. En el caso del ovino, el signo clínico de mastitis es poco frecuente, sin embargo los hallazgos reportados se identifican en adultos (Van der Molen et al., 1985). El tropismo celular de LvPR en glándula mamaria es hacia macrófagos, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos, así como en el producto de secreción de la glándula (calostro y leche). Las lesiones macroscópicas están

asociadas a una mastitis de tipo indurativa difusa sin dolor. Esta presentación suele reducir la producción láctea y al aumentar la cronicidad de la infección se ha descrito agalactia (Blacklaws, 2008; Gregory et al., 2017; Smith and Cutlip, 1988). En aparato locomotor suele presentarse artritis, en el 70% de los caprinos infectados con este virus se presenta esta lesión, mientras que en el caso del ovino es poco frecuente. El tropismo celular en las articulaciones es dirigido a células de la membrana sinovial, macrófagos y células endoteliales. Los principales signos descritos son cojera, artritis y sinovitis, con el paso del tiempo se ha descrito anquilosis e inmovilidad total del o los miembros afectados (Blacklaws, 2008; Cutlip et al., 1985; Matthews, 2002; Pétursson et al., 1976).

Prueba de identificación del virus.

Aislamiento de LvPR

El aislamiento viral de LvPR se realiza principalmente por medio de cultivo celular el cual puede estar dispuesto en monocapa o en suspensión y es mantenido con Medio Mínimo Esencial suplementado con suero fetal bovino, suero de ternera o de caballo. En 1960, se realizó el primer aislamiento de vMV, para esto se utilizó un cultivo primario de plexo coroideo ovino y la replicación fue evidenciada con base en la observación del efecto citopático y al ser inoculado en ovinos se presentaron cuadros neurológicos (Sigurdsson et al., 1960). A partir de ese momento se han empleado diferentes cultivos primarios como los derivados de células de la microglia, monocitos, membrana sinovial, riñón ovino, células de glándula mamaria, células de la granulosa, células epiteliales del oviducto, fibroblastos caprinos, epidídimo. El efecto citopático característico ha sido la formación de sincitios de entre cinco a 30 núcleos por célula, que tardan en aparecer de entre seis días a seis meses post infección, lo cual se asocia al tipo de cepa y a la permisividad celular (Baszler et al., 1994; Celer and Němcová, 1997; Daltabuit et al., 1999; Lairmore et al., 1987; Lamara et al., 2002; Lerondelle et al., 1999).

Diagnóstico serológico de los LvPR

La serconversión en ovinos y caprinos infectados con LvPR suele presentarse hasta más de seis meses post infección, lo cual complica el diagnóstico temprano (De Andres et al., 2005). Las pruebas serológicas que se han descrito se enlistan a continuación:

Inmunodifusión en gel agar (IDGA)

Esta prueba se basa en la visualización de bandas de precipitación formadas a partir de la unión antígeno anticuerpo en un medio sólido, por lo que es únicamente cualitativa. La IDGA es una de las pruebas de referencia para la Organización Internacional de Epizootias (OIE), por lo que ha sido ampliamente distribuida y utilizada en el mundo (Cutlip et al., 1977). En el caso de LvPR, se ha implementado la obtención de antígeno a partir de sobrenadantes de cultivo de línea celular de plexo coroideo ovino y cultivos primarios de membrana sinovial. Las proteínas virales reconocidas en esta prueba son principalmente, las codificadas por el gen env (SU y TM) y por el gen gag (CA y MA) (Kwang et al., 1995). En el caso de esta prueba se ha confirmado que entre el vMV y el vAEC no existe reacción cruzada para el reconocimiento de anticuerpos (Knowles et al., 1994). Algunos autores mencionan que al compararla con otras prueba serodiagnóstico, la sensibilidad es de entre el 76.3 al 91% y su especificidad puede variar entre el 98.3 y el 100% (Celer Jr et al., 1998; Varea et al., 2001). En la actualidad, esta prueba se ha considerado como poco confiable, debido a su bajo porcentaje de sensibilidad (Reddy et al., 1993; Saman et al., 1999).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Es una prueba serológica que utiliza anticuerpos conjugados a una enzima que ante la presencia de un cromógeno emitirá color, por lo que es considerada como una prueba de tipo cualitativa y cuantitativa (De Andres et al., 2005). Existen diferentes tipos de ELISA que son clasificados según el tipo y la forma de detección que lleven a cabo. En el caso de LvPR se han estandarizado las pruebas de ELISA indirecto (ELISAI) que se basan en la detección de anticuerpos empleando un anticuerpo primario (IgG caprino u ovino) y un anticuerpo secundario con reconocimiento específico a la especie del anticuerpo primario (anti IgG de caprino u ovino), el anticuerpo secundario conjugado a una enzima, principalmente peroxidasa, que al agregar el sustrato (TMB, ABTS, etc), emitirá color que al ser leído por el espectrofotómetro será reconocida la densidad óptica de cada muestra, permitiendo la cuantificación de anticuerpos presentes en las mismas. Algunos autores mencionan porcentaje de sensibilidad entre 98.3 y el 100% y de especificidad del 70.8 al 99.3% (Clavijo and Thorsen, 1995; Cortez-Moreira et al., 2005; Heckert et al., 1992; Kwang et al., 1993; Saman et al., 1999; Varea et al., 2001). El ELISA competitivo (ELISAc) también ha sido empleado para la detección de LvPR, el fundamento de este inmunoensayo es emplear un anticuerpo primario (IgG caprino u ovino) y un anticuerpo secundario que reconozca la proteína viral empleada, el cual debe estar conjugado a una enzima que al interactuar con un sustrato emitirá color, en este tipo de ELISA el anticuerpo primario “compite” con el secundario por el reconocimiento específico del virus, pudiendo ser esta prueba cuantitativa. El porcentaje de especificidad y sensibilidad que han reportado para el ELISAc es entre el 96.4 y el 100%. Algunos autores han concluido que este tipo de prueba detecta anticuerpos de forma temprana en comparación con el ELISAI (Saman et al., 1999). Para ambos tipos de ELISA se ha empleado la sensibilización de placas con la partícula viral completa y la elaboración de proteínas recombinantes de las principales proteínas inmunogénicas del virus codificadas por el gen *env* (SU y TM) y por el gen *gag* (CA, MA y NC) (Cortez-Moreira et al., 2005; Herrmann et al., 2003; Pasick, 1998; Power et al., 1995; Rosati et al., 1994; Saman et al., 1999; Varea et al., 2001).

Inmunoelectrotransferencia (Western Blot, WB)

La Prueba de WB se basa en la detección de anticuerpos específicos que tienen la capacidad de reconocer a una proteína del virus empleando anticuerpos conjugados con una enzima que al confrontarse con un cromógeno permitirá visualizar la reacción antígeno anticuerpo. Esta reacción se realiza en una membrana de fluoruro de polivinil o nitrocelulosa. Esta prueba ha sido considerada como la mejor prueba serológica para la detección de anticuerpos en contra de LvPR, ya que logra identificar cargas bajas de anticuerpos y la infección temprana, sin embargo es altamente costosa y los resultados pueden tardar más tiempo en comparación con otras pruebas (De Andres et al., 2005; DeMartini et al., 1999; Johnson et al., 1992; Torfason et al., 1992). La sensibilidad reportada es del 100% y la especificidad del 86% y las proteínas que se han utilizado con las codificadas por el gen gag y env (Tesoro Cruz et al., 2003).

Diagnóstico molecular de LvPR

Reacción en cadena de la polimerasa y reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en punto final (PCR y RT-PCR)

La PCR es una prueba molecular de tipo cualitativo cuyo objetivo es la amplificación de un fragmento del genoma de ADN de un agente, esta prueba se realiza para identificar la presencia del provirus y la RT-PCR emplea como molde inicial un genoma ARN, el cual será retrotranscrito para formar una cadena nueva de ADN complementario (ADNc), a partir del cual se amplificará un fragmento del genoma y es utilizada para identificar a LvPR que aún no ha sido integrado al genoma de la célula huésped. Esta prueba se realiza por medio de pasos automatizados, que en general constan de una etapa de desnaturalización, alineamiento, extensión para finalmente obtener millones de copias del fragmento delimitado por los iniciadores. El producto de la PCR es evidenciado por medio de electroforesis. Esta prueba se ha realizado con iniciadores específicos para todo el

genoma viral, para amplificar fragmentos conservados del virus se ha utilizado a la LTR y el gen pol, mientras que para realizar estudios filogenéticos se emplea el gen *gag*, *pol* y *env*. La PCR es una prueba que ha sido muy utilizada para la identificación de LvPR porque permite identificar al virus aunque los animales no hayan seroconvertido (Agnarsdóttir et al., 2000; Barlough et al., 1994; Celer Jr et al., 2000; Extramiana et al., 2002)

Reacción en cadena de la polimerasa en punto final y reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción cuantitativa (qPCR y qRT-PCR)

Esta prueba molecular puede ser cuantitativa o cualitativa. Se basa en la amplificación de un fragmento igual o menor a 200 pb y la detección de fluoróforos intercalados en la amplificación y emitidos durante los ciclos de la PCR, los cuales son visualizados en un monitor en tiempo real. Estos fluoróforos pueden estar unidos en sondas específicas al genoma viral, que se encuentran marcadas con emisores de fluorescencia y con inhibidores de éstas, a este tipo de iniciadores se les llaman sondas de hidrólisis, ó bien pueden utilizarse intercalantes que se unen a cadenas dobles de forma indistinta, este intercalante puede ser Syber Green. Para que esta prueba pueda determinar cargas virales es necesario realizar una cuantificación absoluta y algunos autores han descrito que esta prueba tiene la capacidad de detectar hasta cinco copias de ADN proviral (Gudmundsson et al., 2003; Klein et al., 1999).

Justificación

En México, la infección ocasionada por los LvPR, representa un serio problema en los rebaños caprinos y es cada vez más recurrente en las principales zonas dedicadas a esta actividad. La circulación del subtipo B1 en rebaños mixtos nacionales, se considera un factor de riesgo para la transmisión inter-especie de caprino a ovino, cuando comparten lugares en común, o por la cohabitación durante tiempos prolongados. El escaso conocimiento de los genotipos de LvPR en el territorio nacional, limita el desarrollo de herramientas de diagnóstico, así como, los programas de control en caprinos y ovinos. La presente propuesta tiene como objetivo, la generación de conocimiento científico a partir de la identificación y caracterización genética de LvPR en hatos mixtos, con la finalidad de desarrollar herramientas diagnósticas a partir de aislamientos mexicanos.

Con los resultados obtenidos se pretende contribuir con el sector caprino y ovino en control o libres de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y en la ejecución de las actividades de vigilancia epidemiológica y muestreos, que corroboren la inexistencia del agente etiológico en las unidades de producción, y en caso de identificar su presencia, plantear las medidas necesarias para su control y erradicación, disminuyendo los costos por pruebas, estableciendo un diagnóstico más accesible y beneficiando directamente a los productores caprinos y ovinos.

Hipótesis

Las cepas de LvPR que circulan en sistemas mixtos de producción de caprinos y ovinos, presentan modificaciones genéticas que les permite establecerse en este tipo de unidades de producción

Objetivo general

Identificar y caracterizar molecularmente lentivirus de pequeños rumiantes que se encuentran infectando caprinos y ovinos en rebaños mixtos.

Objetivos específicos

- 1) Realizar un muestreo en rebaños caprinos y ovinos.
- 2) Estandarización de RT-PCR y PCR para diferentes genotipos de LvPR.
- 3) Aislar cepas nacionales de LvPR.
- 4) Caracterizar molecularmente los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* de aislamientos nacionales de LvPR.
- 5) Estandarizar un ensayo inmunoenzimático empleando proteínas recombinantes de LvPR.

Material y métodos

Obtención de muestras

Se realizó un muestreo longitudinal dirigido (muestreo por conveniencia de sujetos disponibles con cuadros clínicos sugerentes a la infección con LVPR, tales como signos respiratorios, artritis y/ mastitis). Se tomaron 558 muestras de ovinos y 382 de caprinos, 107 caprinos y 152 ovinos de unidades de producción en convivencia procedentes del Estado de México, Aguascalientes, Veracruz, Guanajuato y Zacatecas. A partir de unidades de producción caprina se colectaron 451 muestras de los Estados de Querétaro, Sinaloa, Ciudad de México, Estado de México, Puebla y Jalisco. Finalmente se colectaron 230 muestras de unidades de producción de ovinos del Estado de México, Morelos, Puebla, Querétaro, Hidalgo, Zacatecas y Ciudad de México. Las muestras colectadas fueron, sangre para la obtención de suero y sangre completa para la separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con Histopaque-1077 (SIGMA, USA) y fueron mantenidas a -70°C hasta su utilización.

Durante el muestreo en campo, se obtuvieron en donación dos cabras (C12 y C14) de la unidad de producción del estado de Jalisco y se enviaron al laboratorio de virología del CENID-SAI, INIFAP para ser observadas y registrar su evolución clínica. Estas dos cabras presentaron un cuadro agudo de artritis en ambos miembros anteriores. Los animales fueron mantenidos con alimentación comercial de acuerdo con su edad y condición corporal y se les suministró agua potable *ad libitum*. Este seguimiento clínico se realizó durante tres meses, en este periodo se obtuvieron muestras de sangre y durante la necropsia se colectaron órganos de tracto respiratorio, linfoide, nervioso, urinario, membrana sinovial de la articulación metatarsiana, glándula mamaria y corazón.

Diagnóstico de lentivirus de pequeños rumiantes en las unidades de producción.

Para diagnosticar la infección por LVPR se realizaron las pruebas de ELISA, PCR punto final y PCR en tiempo real (diferencial para genotipos A y B). Brevemente, los sueros fueron analizados mediante una prueba de ELISA competitiva, empleando el kit comercial RuminantLentivirus, Antibody Test Kit, cELISA (VMRD Inc. USA). El desarrollo y la validación de la prueba se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN proviral de las CMSP fue extraído con el paquete comercial DNeasy blood & tissue kit (QIAGEN, Alemania). El ADN obtenido fue analizado con una prueba PCR punto final (PCRpf) que amplifica un fragmento del LTR de 233 pb (Sánchez et al., 2016). Una submuestra se seleccionó para diferenciar entre los genotipos A y B, mediante un protocolo de PCR en tiempo real (qPCR) modificado y previamente descrito por Kuhar et al. (2013).

Aislamiento viral, prueba de inmunodetección.

Se seleccionaron muestras cabras positivas a la prueba de diagnóstico de LVPR previamente descrita, para realizar el aislamiento viral en cultivo celular. Se obtuvieron cultivos primarios de testículo (CPT) y epidídimo (CPE) de un cabrito macho de 4 meses de edad, certificado libre de SRLV (por PCR y ELISA). Se realizó un cultivo estándar de células de ambos órganos, se disecó el órgano y se sometió a disgregación celular (Lamara et al., 2013). Posterior a las 24 a 48 h de incubación los cultivos celulares alcanzaron un 80% de confluencia, y fue en este momento en el que se inocularon ya que durante esta fase se da el crecimiento de forma exponencial. Los cultivos inoculados se mantuvieron en observación, para la identificación del efecto citopático, durante 120 h post infección. La infección en los cultivos celulares fue confirmada por medio de inmunoperoxidasa indirecta. La prueba se realizó empleando un suero hiperinmune de cabra positivo a LVPR

(previamente corroborado por Western blot) y como anticuerpo secundario un anticuerpo peroxidado elaborado en conejo contra IgG de cabra. La reacción fue evidenciada utilizando el cromógeno diaminobenzidina (DAB) y se observó directamente al microscopio, La interpretación de resultados positivos se basó en la detección específica de focos de tinción en citoplasma y/o núcleo.

Secuenciación y análisis filogenéticos.

El aislamiento viral obtenido se secuenció para realizar la caracterización genética con base en LTR, de los genes *gag* y *env*. La amplificación se realizó empleando el ADN extraído del CPE en su tercer pase. Se emplearon los iniciadores reportados por Sánchez et al., 2016 para amplificar la región LTR y los reportados por Glaria et al., 2009 para los genes *env* y *gag*. Las condiciones de amplificación se ajustaron experimentalmente, cada producto se visualizó en un gel de agarosa y las bandas obtenidas se purificaron para su posterior secuenciación en ambos sentidos con el ABI Prism 3100xL Genetic Analyzer with the Big Dye® Terminator v3.1 Kit (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) en el instituto de biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos del GenBank usando la herramienta Blast del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias fueron alineadas con ClustalW. Para determinar la relación filogenética con las cepas reportadas de LVPR, se construyó un árbol filogenético usando el método de neighbor-joining (JTT model) para aumentar la confianza y dar soporte estadístico se emplearon mil bootstrap, con el paquete MEGA v. 6.0 (Tamura et al., 2013). Para el análisis de los genogrupos se emplearon los genes *gag* y *env* obtenidos de la cepa aislada, además se incluyeron 18 cepas reportadas previamente en el GenBank (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Descripción de las cepas empleadas para el análisis filogenético de LVPR.

Genotipo	Nombre de la cepa	País	No. de Acceso
A1	SA-OMVV	Sudáfrica	M34193
	EV1	Reino Unido	S51392.1
	1514	Islandia	M60610
	LV1-1	Islandia	M10608
	KV1772	Islandia	L106906
	P10LV	Portugal	AF479638
A2	85/34	EUA	AY101611
A3	697	España	HQ848062
B1	FESC-752	Mexico	HM210570
	Clements	EUA	M33677
	Gansu	China	AY900630
	Shanxi	China	GU120138
B2	OV496	España	FJ195346
B3	Volterra	Italia	JF502417
	Fonni	Italia	JF502416
C	1GA	Noruega	AF322109
E1	Roccamerano	Italia	EU293537
E2	Seui	Italia	GQ381130

Elaboración de proteína recombinante para su uso en herramientas de diagnóstico.

Los sobrenadantes del aislamiento viral se emplearon para realizar la extracción de ADN por el método de afinidad de columna de sílica empleando el paquete comercial DNeasy Blood y Tissue, QIAGEN, Alemania. El ADN obtenido se empleó para realizar la amplificación del gen gag con iniciadores previamente diseñados el amplicón fue de 1350 pb que incluye el marco de lectura abierta del gen. Las reacciones de PCR fueron separadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en un fotodocumentador. Como resultado se observó una banda del tamaño de bases aproximado, la cual fue purificada y secuenciada por el método de Sanger, los resultados de identidad confirmaron la secuencia del gen gag a partir del sobrenadante de cultivo primario de epidídimo a las 120 horas post infección.

El marco de lectura del gen gag se insertó en el vector de clonación PJET (CLONEJET PCR Cloning, Thermo Fisher, USA) por medio de choque térmico y fue crecido en la cepa bacteriana de *Escherichia coli* (TOP 10) en caldo LB. Se seleccionó una clona positiva para realizar una PCR con los iniciadores específicos, el producto de la PCR fue mezclado con el vector de expresión pET SUMO (Champion, pET SUMO. Thermo Fisher, USA) y se prepararon células competentes *E. coli* TOP10. Por medio de electroforesis en agarosa al 1% y se observó la integridad de los productos extraídos. Se realizaron dos PCR una se hizo para comprobar que se encuentra el inserto "gag" dentro del vector y la segunda se realizó para comprobar que el plásmido contiene el inserto en sentido 5 prima, por lo que se empleó como iniciador delantero que identifica al vector pET SUMO y el iniciador reverso de "gag". Se llevó a cabo también la secuenciación del producto de purificación para elaborar análisis filogenéticos y predecir el potencial inmunogénico del fragmento clonado. La selección de clonas positivas se llevó a cabo con enzimas de restricción, PCR y secuenciación. Las clonas positivas fueron inoculadas en caldo LB e inducidas con 2 milimolar de IPTG, para los ensayos de expresión.

Para comprobar la expresión efectiva por parte de las células BL21, se realizó el corrimiento electroforético vertical en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la prueba de transferencia en medio semi-seco (Western-Blot) y ambas pruebas también se emplearon para determinar si la proteína tenía la capacidad de detectar anticuerpos de cabras infectadas de forma natural.

Resultados

Prevalencia y seroprevalencia

Se obtuvieron un total de 940 muestras de sangre completa y la misma cantidad suero de caprinos y ovinos. El total de animales seropositivos por la prueba comercial de ELISAc fue de 321 (558) caprinos y 93 (382) ovinos, lo que representa el 58 y el 24% de animales positivos a la presencia de anticuerpos específicos en contra de la gp135 de LVPR y se observó que el mayor porcentaje de animales seropositivos se encontraban en una unidad de producción de convivencia de caprinos y ovinos. Mediante la prueba de PCRpf realizada a partir de las muestras de ADN previamente extraído de las CMSP, se determinó que del total de cabras el 93%(518/558) y el 73% (279/382) de ovinos fueron positivos a la presencia de LVPR; en el caso del ganado caprino la unidad de producción caprina es en donde se identificó el mayor porcentaje de animales positivos y en el sistema de producción de convivencia entre caprinos y ovinos se registró el mayor porcentaje de ovinos positivos a la detección de la región LTR de LVPR. Con la prueba de qPCR para diferenciar entre genogrupo A y B, se observó que tres cabras fueron positivas al genogrupo A, las cuales se encontraban en una unidad de producción de convivencia de ovinos y caprinos, con respecto al genogrupo B se identificaron 180 cabras positivas, de las cuales 97 se encontraban en una

unidad de producción de convivencia entre caprinos y ovinos, además se observó que siete cabras eran positivas para ambos genogrupos.

En el caso de los ovinos, 18 fueron positivos al genogrupo A, 330 al genogrupo B y 90 lo fueron para ambos genogrupos, en los tres casos se identificó un mayor número de animales positivos pertenecientes a la unidad de producción ovina. En el cuadro 2 se observan los resultados.

Cuadro 2. Número de animales positivos para diagnóstico serológico y molecular por unidad de producción.

Unidad de producción	No animales		ELISAc (gp135)		PCRpf (LTR)		qPCR					
	Caprinos	Ovinos	Caprinos	Ovinos	Caprinos	Ovinos	Caprinos*			Ovinos		
							A	B	A/B	A	B	A/B
Convivencia entre caprinos y ovinos	107	152	58	33	97	118	3	90	7	1	132	6
Unidad de producción caprina	451	NA	263	NA	421	NA	0	90	0		NA	
Unidad de producción ovina	NA	230	NA	60	NA	161		NA		17	98	84
Total	558	382	321	93	518	279	3	180	7	18	230	90

ELISAc. Ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo, PCRpf Reacción en cadena de la polimerasa en punto final qPCR reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

*El total de caprinos empleados para esta prueba fue de 205.

Aislamiento viral, prueba de inmunodetección.

Los cultivos de testículo, epidídimo y plexo coroideo se mantuvieron durante 144 horas para corroborar la ausencia de efecto citopático (Figura 9, A1,-C1), también

fueron evaluados por PCRpf para amplificar un fragmento de LTR con la metodología previamente descrita. Ninguno de los cultivos resultó positivo a la presencia del SRLV. Una vez realizada la evaluación, se prepararon cultivos que fueron inoculados a las 24 h de crecimiento. El efecto citopático se presentó a partir de las 96 h y hasta las 120 h en los tres tipos celulares (Figura 9, A2-C2). Se observó la inmunodetección en los cultivos como una marca fuerte en núcleo y ligera en citoplasma (Figura 9, A3-C3, A4-C4). El resultado fue corroborado por PCRpf para amplificación de un fragmento de LTR (datos no mostrados). El aislamiento se nombró como SRLV/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 (GenBank No. de acceso: MG996440).

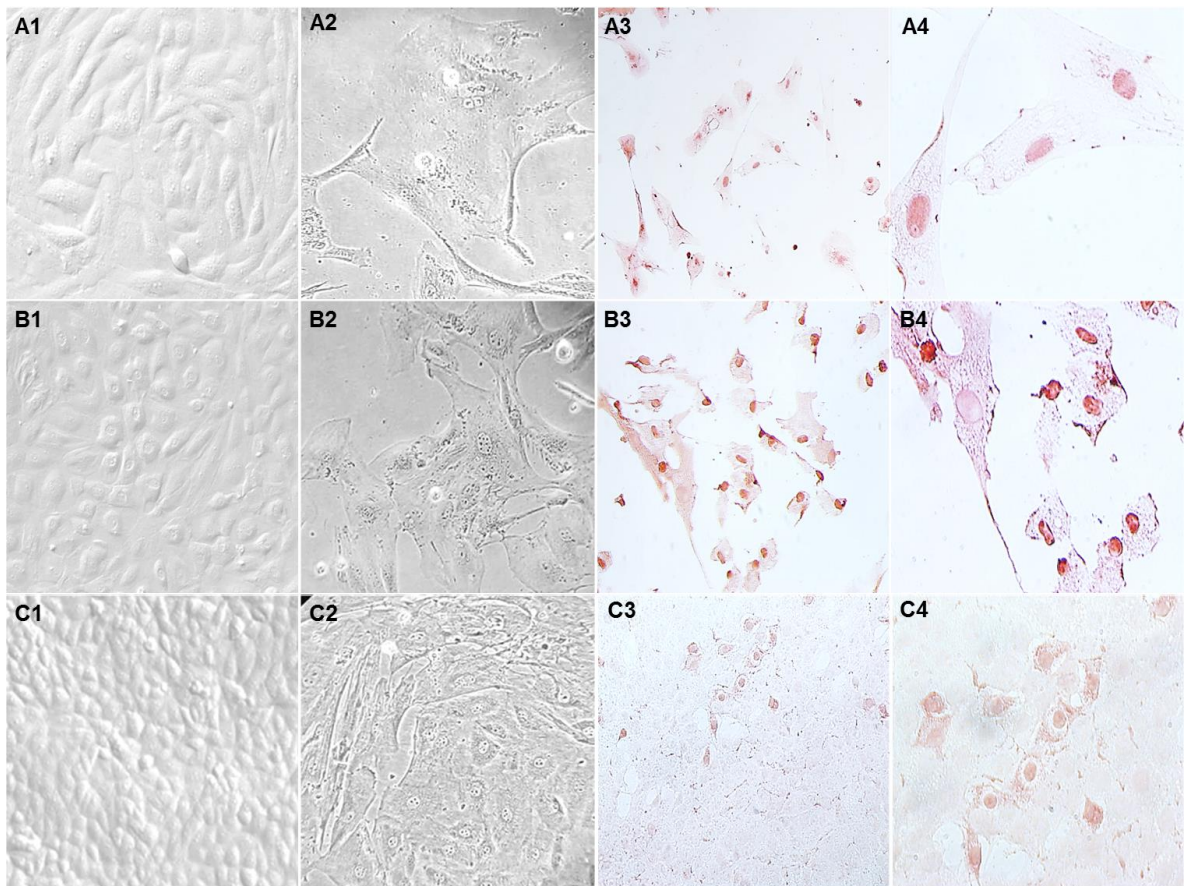


Figura 7. Micrografía de los cultivos primarios infectados con lentivirus de pequeños rumiantes cepa SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 y prueba de inmunodetección. **A1, B1 y C1)** Testigo de células sin infectar observadas con microscopio de contraste de fases, cultivo primario de epidídimo (CPE), cultivo

primario de testículo (CPT) y células de plexo coroideo ovino (PCO), respectivamente. A2) CPE infectado con LVPR y observado a las 120 h post infección. B2) CPT infectado con LVPR y observado a las 96 h post infección y C2) PCO infectado y observado a las 120 h post infección. A3-C3 y A4 a C4 prueba de inmunoperoxidasa en cultivo celular de las células CPE, CPT y PCO, respectivamente, a las 120 h post infección. A1 a C1 y A3-C3 micrográfíastomadas con un aumento de 200X. A2 a C2 y A4 a C4 con un aumento de 400X.

Caracterización genética y análisis filogenéticos de la cepa SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013.

La secuencia completa de los genes *gag* y *env* fue empleada para realizar alineamientos con 18 secuencias reportadas en el GenBank. En el análisis se realizó la reconstrucción filogenética para identificar el genotipo al que pertenecía la cepa SRLV/Goat/MX/INIFAP-1/2013, la cual se identificó como genotipo B1 (Figura 10).



Figura 8. Árbol filogenético construido con el método neighbor-joining. A) *gag* y B) *env* secuencia de nucleótidos del aislamiento SRLV/Goat/MX/INIFAP-1/2013 de México (♦), Islandia, Sudáfrica, Reino Unido, Portugal, España, Estados Unidos, Noruega y China. Las secuencias incluyen genotipos A, B, C y E de LVPR. El análisis evolutivo fue inferido empleando el programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

Elaboración de la poliproteína *gag*.

A partir del aislamiento SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 se realizó una proteína recombinante de LVPR que presentó reconocimiento de anticuerpos específicos en caprinos y ovinos infectados de forma natural en unidades de producción de México. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos de la purificación

de la poliproteína (A) y el reconocimiento específico de anticuerpos en animales infectados de forma natural.

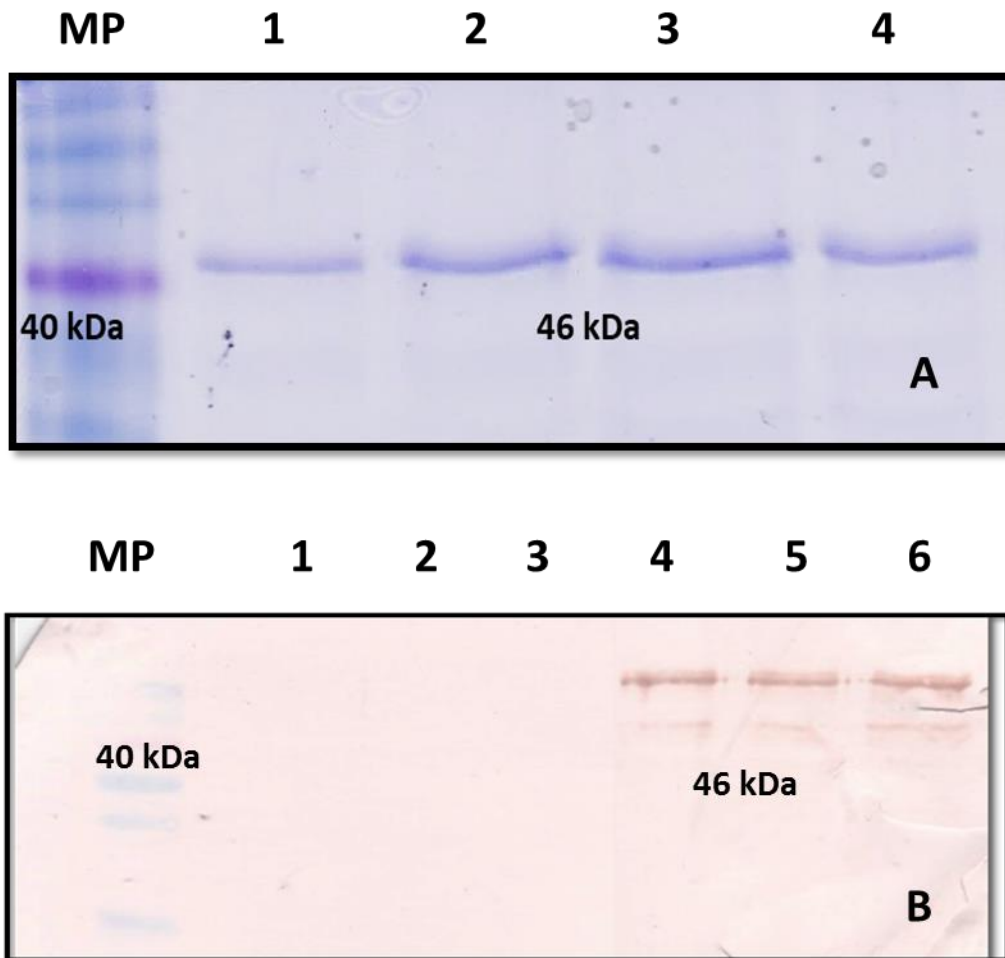


Figura 9. Fotografía del producto de purificación de la poliproteína gag y del reconocimiento específico de anticuerpos en contra de la poliproteína. En la **Figura A** se muestra el producto de purificación por cromatografía por afinidad, mostrando el corrimiento electroforético vertical en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidos con azul de Comasie. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso de proteínas, y en los carriles 2 a 5 se encuentran los productos de la purificación de la proteína Gag. En la **Figura B** se presenta cromatografía de la prueba de transferencia en medio semi-seco (Western-Blot), empleando como anticuerpo primario el suero de animales positivos y negativos a la presencia de

LvPR, esta reacción fue evidenciada con el cromógeno diaminobenzidina. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular; en los carriles 2 a 3 se encuentra el suero de cabra negativa a LVPR; y en los carriles 4 a 6 se utilizó el suero de una cabra positiva a la infección natural de LVPR.

Discusión y conclusión

En México Adams *et al.* (1984), evidenciaron la presencia de anticuerpos específicos en contra del VAEC reportando que el 5.8% de animales positivos, actualmente, las seroprevalencias reportadas son del 0.4 al 36%(Torres-Acosta *et al.*, 2003) (Mendiola *et al.* 2019). En nuestro estudio detectamos que del total de caprinos muestreados el 57% presentaron anticuerpos específicos en contra del virus. Con respecto a los LVPR en ovinos, Mendiola *et al.* (2019), describieron que el 10.5% de ovinos en convivencia con cabras presentaban anticuerpos específicos en contra de LVPR, en nuestro estudio detectamos un 24% de animales seropositivos. Para ambas especies los datos registrados en el presente trabajo son mayores a lo previamente reportado porque consideramos que los LVPR se han diseminado y mantenido en las unidades de producción caprina y ovina de nuestro país, aumentando así los porcentajes de seroprevalencia, aunado a esto De la concha *et al.*, (2013), concluyen que las pruebas de diagnóstico serológico tienen un porcentaje de sensibilidad menor al trabajar con pruebas que no se encuentran sensibilizadas con la misma cepa que con la que se dio la infección en los animales estudiados, este es el caso de México, ya que trabajos con paquetes comerciales que contienen cepas de otros países de donde son originarios y al trabajar con muestras nacionales, estas pruebas nos arrojan un gran porcentaje de animales falsos negativos.

Algunos autores como Ravazzolo *et al.* (2006) y Sánchez *et al.* (2016), consideran que para el diagnóstico de lentivirus de pequeños rumiantes es necesario realizar pruebas de diagnóstico molecular para confirmar diagnósticos serológicos previos, ya que el porcentaje de sensibilidad y especificidad es mayor en estas pruebas. En el presente trabajo, empleando pruebas de diagnóstico molecular que es la PCR se identificó un 85% del total de animales muestreados fueron positivos a la presencia de LVPR, la prevalencia en el caso de los caprinos fue del 93% y de los ovinos del 73%. Estos datos son mayores a los descritos por Mendiola *et al* (2019

), quienes describen prevalencias de hasta el 36%, por lo cual confirmamos el aumento en la seroprevalencia y prevalencia de LVPR en unidades de producción de ovinos y de caprinos, así como en donde conviven ambas especies..

Mediante una prueba de PCRtr diferencial de los genogrupos A y B de LVPR (Kuhar et al., 2013), se logró detectar en el presente estudio a tres caprinos positivos al genogrupo A, 180 al B y 7 a ambos genogrupos y en ovinos se detectaron 18, 230 y 90, respectivamente. Las unidades de producción de cohabitación caprinos y ovinos fue más prevalente al genogrupo B, las unidades de producción de ovinos lo fueron para el genogrupo A y en el caso de los tres caprinos que fueron positivos este genogrupo pertenecían a las unidades de producción en convivencia con ovinos. En 2007, Gjerset *et al* concluyen que la convivencia de ovinos y caprinos predispone a la transmisión y permanencia de del genogrupo B de LVPR y que las unidades de producción de ovinos tienen mayor circulación del genogrupo A. Con los resultados obtenidos confirmamos que en la situación de las producciones caprinas y ovinas en México, se observa la misma asociación entre la presencia de los dos genogrupos.

En México, en 1999 Daltabuit et al. (1999) Realizaron el primer aislamiento viral y en 2011 identifican que este aislamiento pertenece al genogrupo B1 de LVPR y lo asociaron a la presencia de cuadros clínicos característicos a la infección por este virus en cabras y borregos que cohabitaban en las unidades de producción (Ramírez et al., 2011) y en 2009 Mendiola et al, confirman la presencia del genotipo B en ambas especies. El aislamiento obtenido por Daltabuit et al. (1999), fue confirmado por la amplificación de una región de 249 bp del gen *gag* empleando primers específicamente diseñados para virus tipo CAEV (genotipo B) y se descartó la posibilidad de la presencia del genotipo A, debido a la nula amplificación empleando iniciadores para lentivirus ovino.

En el presente estudio, a partir del seguimiento clínico de dos cabras positivas a LVPR, se logró aislar y caracterizar una cepa viral. En estas cabras infectadas naturalmente, se presentaron cuadros de artritis y se detectó una mayor carga viral en órganos del sistema nervioso y articular. Para el aislamiento viral se emplearon cultivos primarios de testículo y epidídimo de acuerdo con lo descrito por Lamara et al. (2013), se logró identificar el efecto citopático e inmunoreactividad en los cultivos a partir de las 96 hpi. En otros estudios se han empleado cultivos primarios de membrana sinovial, células epiteliales obtenidas de leche (Mselli-Lakhal et al., 1999) y recientemente demacrófagos de bazo (Colitti et al., 2019). Con base en los estudios filogenéticos de los genes *gag* y *env*, se identificó que la cepa obtenida SRLV/Goat/Mx/INIFAP-1/2013, pertenece al genotipo B1. En el análisis realizado, empleando secuencias de referencia, se identificó un alto porcentaje de similitud con cepas de origen chino (97.93-93.15%), pero con un origen común de la cepa Clements y la cepa FESC-752 (92.06-91.83%, respectivamente), esta última reportada previamente en México (Ramírez et al., 2011).

Reina et al (2009), Lacerenza et al (2006) y Kwong et al (1995), han trabajado con la elaboración de proteínas recombinantes a partir de proteínas inmunogénicas del virus como la de cápside, matriz y nucleocápside que son codificadas por el gen *gag*, estos autores describen que estas proteínas demostraron tener una baja capacidad de reconocimiento de anticuerpos específicos en los animales infectados por el virus, con base en estos resultados, en el presente estudio se determinó que la cepa SRLV/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 funciona como una cepa prototipo para la elaboración de una proteína recombinante elaborado con la poliproteína del gen *gag* que permite el reconocimientos de anticuerpos específicos de caprinos y ovinos infectados con cepas de LVPR que circulan en México.

En conclusión, a partir del análisis de muestras de diferentes años, se logró determinar que los lentivirus de pequeños rumiantes son prevalentes y que mantiene una distribución en las principales zonas productoras de caprinos y ovinos en México. Así mismo, se logró establecer un modelo de aislamiento viral, mismo que puede ser útil en la obtención de cepas virales para estudios posteriores. Con el análisis filogenético se confirmó la circulación de los genogrupos A y B en caprinos y ovinos y que las unidades de producción en donde conviven ambas especies facilita la diseminación estos genogrupos, el conocimiento de esto nos permite establecer el diseño de herramientas de diagnóstico y medidas de prevención para ambos genogrupos en estas dos especies. La elaboración de la poliproteína recombinante gag a partir del aislamiento viral SRLV/Goat/Mx/INIFAP-1/2013, nos permite determinar que en México circulan de forma natural cepas del genogrupo B de LVPR que tienen la capacidad de generar una respuesta de anticuerpos específicos en contra del virus en ovinos y caprinos, característica de suma importancia que nos permitirá establecer pruebas de diagnóstico serológico para ambas especies.

Referencias

- Agnarsdóttir, G., Thorsteinsdóttir, H.d., Óskarsson, T., Matthíasdóttir, S.d., 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, 1901-1905.
- Barlough, J., East, N., Rowe, J.D., Derock, E., Bigornia, L., Rimstad, E., 1994. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *Journal of Virological Methods*50, 101-113.
- Baszler, T., Harwood, W., Lester, K., Davis, W., Knowles, D., 1994. Characterization of caprine microglial cells and in vitro infection with caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*70, 933-943.
- Blacklaws, B., 2008. Visna-Maedi Viruses.
- Blacklaws, B., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N., De Andrés, D., Klein, D., Harkiss, G., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*101, 199-208.
- Bruett, L., Barber, S.A., Clements, J.E., 2000. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology*271, 132-141.
- Celer Jr, V., Celer, V., Nejedla, E., Bertoni, G., Peterhans, E., Zanoni, R., 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. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*47, 203-215.
- Celer Jr, V., Celer, V., Němcová, H., Zanoni, R., Peterhans, E., 1998. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*45, 183-188.
- Celer, V., Němcová, H., 1997. Isolation and partial characterization of ovine lentivirus in Czech Republic. *Folia microbiologica*42, 395-399.
- Clavijo, A., Thorsen, J., 1995. Serologic diagnosis of caprine arthritis-encephalitis by ELISA with two recombinant proteins in a parallel testing format. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*16, 419-436.
- Cork, L. 1990. Pathology and epidemiology of lentiviral infection of goats, In: *Maedi-Visna and Related Diseases*. Springer, 119-127.
- Cortez-Moreira, M., Oelemann, W.M., Lilenbaum, W., 2005. Comparison of serological methods for the diagnostic of caprine arthritis-encephalitis (CAE) in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*36, 48-50.
- Crawford, T., Adams, D., Cheevers, W., Cork, L., 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*207, 997-999.
- Cutlip, R., Jackson, T., Laird, G., 1977. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *American journal of veterinary research*38, 1081-1084.

- Cutlip, R., Lehmkuhl, H., Wood, R., Brogden, K., 1985. Arthritis associated with ovine progressive pneumonia. *American journal of veterinary research*46, 65-68.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Schmerr, M.J.F., Brogden, K.A., 1988. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Veterinary microbiology*17, 237-250.
- Cheevers, W., Roberson, S., Klevjer-Anderson, P., Crawford, T., 1981. Characterization of caprine arthritis-encephalitis virus: a retrovirus of goats. *Archives of virology*67, 111-117.
- Daltabuit, M., 2001. Aislamiento del virus de la artritis encefalitis caprina a partir de cabras seropositivas y estandarización de una técnica de PCR para su diagnóstico. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Daltabuit, M., 2006. Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el estudio de la transmisión calostrual y horizontal del virus Maedi-Visna (VMV) en ovinos. Universidad de Zaragoza, España.
- Daltabuit, M., De la Concha-Bermejillo, A., Espinosa, L., Rubio, E.L., Setién, A.A., 1999. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Canadian journal of veterinary research*63, 212.
- De Andres, D., Klein, D., Watt, N., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B., Harkiss, G., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*107, 49-62.
- de la Federación, D.O., Norma Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995, Sistema Nacional de Vigilancia Epizootológica.
- Delgado, R., 2011. Características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*29, 58-65.
- DeMartini, J.C., Halsey, W., Boshoff, C., York, D., Howell, M.D., 1999. Comparison of a maedi-visna virus CA-TM fusion protein ELISA with other assays for detecting sheep infected with North American ovine lentivirus strains. *Veterinary immunology and immunopathology*71, 29-40.
- Extramiana, A., González, L., Cortabarría, N., García, M., Juste, R., 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Ruminant Research*44, 109-118.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press.
- Fenner, F.J., Bachmann, P.A., Gibbs, E.P.J., 2014. *Veterinary virology*. Academic Press.
- Friedrich, B.M., Dziuba, N., Li, G., Endsley, M.A., Murray, J.L., Ferguson, M.R., 2011. Host factors mediating HIV-1 replication. *Virus research*161, 101-114.
- GALVÁN, C., EFECTO DEL VIRUS DE LA ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE EN CABRAS MURCIANO-GRANADINAS. LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OVINOTECNIA Y CAPRINOTECNIA, 714.

- Gendelman, H.E., Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Kennedy, P., Ghotbi, Z., Clements, J., Stanley, J., Pezeshkpour, G., 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *Journal of virology*58, 67-74.
- Gjerset, B., Jonassen, C.M., Rimstad, E., 2007. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus research*125, 153-161.
- Gregory, L., Junior, E.H.B., Lara, M.C., Angelini, M., Araújo, W.P., Rizzo, H., Maiorka, P.C., Castro, R.S., Kiraly, A.C., Benesi, F.J., 2017. Clinical features of indurative mastitis caused by caprine arthritis encephalitis virus. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*2, 64-68.
- Gudmundsson, B., Bjarnadottir, H., Kristjansdottir, S., Jonsson, J.J., 2003. Quantitative assays for maedi-visna virus genetic sequences and mRNA's based on RT-PCR with real-time FRET measurements. *Virology*307, 135-142.
- Heckert, R.A., McNab, W.B., Richardson, S.M., Briscoe, M.R., 1992. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Canadian Journal of Veterinary Research*56, 237.
- Herrmann, L.M., Cheevers, W.P., McGuire, T.C., Adams, D.S., Hutton, M.M., Gavin, W.G., Knowles, D.P., 2003. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*10, 267-271.
- Hullinger, G., Knowles, D., McGuire, T., Cheevers, W., 1993. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology*192, 328-331.
- J.F.J. Torres-Acosta a, E.J. Gutierrez-Ruiz a, V. Butler b, A. Schmidt b,, J. Evans b, J.B.b., K. Bearmanb, T. Fordham b, T. Brownlie b,, S. Schroer c, E.C.-G., J. Lightsey b, 2003. Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small Ruminant Research* 49 207–211.
- Johnson, L., Meyer, A., Zink, M., 1992. Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by in situ hybridization, PCR, and cocultivation with susceptible cells. *Clinical immunology and immunopathology*65, 254-260.
- Klein, D., Janda, P., Steinborn, R., Müller, M., Salmons, B., Günzburg, W.H., 1999. Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*20, 291-299.
- Knowles, D., Evermann, J., Shropshire, C., VanderSchalie, J., Bradway, D., Gezon, H., Cheevers, W., 1994. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody

- to caprine arthritis-encephalitis virus. *Journal of clinical microbiology*32, 243-245.
- Kwang, J., Keen, J., Cutlip, R., Kim, H., De La Concha-Bermejillo, A., 1995. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Ruminant Research*16, 171-177.
- Kwang, J., Keen, J., Cutlip, R.C., Littledike, E.T., 1993. Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*5, 189-193.
- Lairmore, M.D., Akita, G., Russell, H., DeMartini, J.C., 1987. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with in vivo pathogenicity. *Journal of virology*61, 4038-4042.
- Lamara, A., Fieni, F., Mselli-Lakhal, L., Tainturier, D., Chebloune, Y., 2002. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV). *Virus research*87, 69-77.
- Lerondelle, C., Godet, M., Mornex, J.-F., 1999. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Veterinary research*30, 467-474.
- Leroux, C., Chastang, J., Greenland, T., Mornex, J., 1997. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of virology*142, 1125-1137.
- Leyva, G., Martínez, R., González, R., Cornejo, C., Rosales, M., Garrido, F., 1998. Identificación del virus de la artritis encefalitis caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México. *Rev Latinoam Microbiol*40, 33-38.
- Martínez Rodríguez, H.A., Ramírez Álvarez, H., Tórtora Pérez, J., Aguilar Setién, Á., Garrido Fariña, G.I., Montaraz Crespo, J.A., 2005. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Veterinaria México*36.
- Matthews, J., 2002. *Enfermedades de las cabras*. Acribia.
- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J., García-Marín, J., De Andrés, D., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary microbiology*181, 75-89.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D., 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*, Vol 10. Springer Science & Business Media.
- Naghavi, M.H., Schwartz, S., Sonnerborg, A., Vahlne, A., 1999. Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1. *AIDS research and human retroviruses*15, 1293-1303.
- Narayan, O., Clements, J.E., Strandberg, J.D., Cork, L.C., Griffin, D.E., 1980. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *Journal of General Virology*50, 69-79.

- Narayan, O., Cork, L.C., 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of infectious diseases*7, 89-98.
- Nazara, S.d.J., Trigo, F.J., Suberbie, E., Madrigal, V., 1985. Estudio serológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 98-101.
- NOM, N.O.M., 1996. 041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el20.
- Pasick, J., 1998. Use of a recombinant maedi-visna virus protein ELISA for the serologic diagnosis of lentivirus infections in small ruminants. *Canadian journal of veterinary research*62, 307.
- Pépin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J.-F., Peterhans, E., 1998. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary research*29, 341-367.
- Pereira, L.A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M.J., Deacon, N.J., 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic acids research*28, 663-668.
- Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., Eliasiewicz, M., Juste, R.A., Kraßnig, R., Lafont, J.-P., 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary research*35, 257-274.
- Pétursson, G., Nathanson, N., Georgsson, G., Panitch, H., Palsson, P., 1976. Pathogenesis of visna. I. Sequential virologic, serologic, and pathologic studies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*35, 402-412.
- Power, C., Richardson, S., Briscoe, M., Pasick, J., 1995. Evaluation of two recombinant Maedi-visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*2, 631-633.
- Pritchard, G., Dawson, M., 2007. Maedi-visna. *Diseases of sheep*3, 187-191.
- Ramírez, H., Glaria, I., de Andres, X., Martínez, H.A., Hernández, M.M., Reina, R., Iraizoz, E., Crespo, H., Berriatua, E., Vázquez, J., 2011. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *The Veterinary Journal*190, 169-172.
- Reddy, P.G., Sapp, W., Heneine, W., 1993. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*31, 3042-3043.
- Rosati, S., Kwang, J., Tolari, F., Keen, J., 1994. A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Veterinary research communications*18, 73-80.
- Rowe, J., East, N., Thurmond, M., Franti, C., Pedersen, N., 1992. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *American journal of veterinary research*53, 2386-2395.

- 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, 35-53.
- Saman, E., Van Eynde, G., Lujan, L., Extramiana, B., Harkiss, G., Tolari, F., González, L., Amorena, B., Watt, N., Badiola, J., 1999. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*6, 734-740.
- Sánchez, J.H., Martínez, H.A., García, M.M., Garrido, G., Gómez, L., Aguilar, J.A., de Andrés, D.F., Reina, R., Ramírez, H., 2016. The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology*86, 1953-1957. e1951.
- Shah, C., Böni, J., Huder, J.B., Vogt, H.-R., Mühlherr, J., Zanoni, R., Miserez, R., Lutz, H., 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, 12-26.
- Sigurdsson, B., 1954. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootological and a pathological study. *British Veterinary Journal*110, 255-270.
- Sigurdsson, B., Pálsson, P.A., Grímsson, H., 1957. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*16, 389-403.
- Sigurdsson, B., Thormar, H., Pálsson, P.A., 1960. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archiv für die gesamte Virusforschung*10, 368-381.
- Smith, M., Cutlip, R., 1988. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*193, 63-67.
- Tageldin, M.H., Johnson, E.H., Al-Busaidi, R.M., Al-Habsi, K.R., Al-Habsi, S.S., 2011. Serological evidence of caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV) infection in indigenous goats in the Sultanate of Oman. *Tropical animal health and production*, 1-3.
- 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.
- Torfason, E., Gudnadottir, M., Löve, A., 1992. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of visna-maedi. *Archives of virology*123, 47-58.
- Trigo Tavera, F.J., 1991. La artritis encefalitis caprina. *Ciencia veterinaria*5, 49-66.
- Van der Molen, E., Vecht, U., Houwers, D., 1985. A chronic indurative mastitis in sheep, associated with maedi/visna virus infection. *Veterinary Quarterly*7, 112-119.
- Varea, R., Monleon, E., Pacheco, C., Lujan, L., Bolea, R., Vargas, M., Van Eynde, G., Saman, E., Dickson, L., Harkiss, G., 2001. Early detection of maedi-

- visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 13, 301-307.
- Vazquez, N., 2008. Estudio sobre la seroprevalencia de la artritis-encefalitis caprina en sistemas lecheros intensivos en la región del altiplano mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Waheed, A.A., Freed, E.O., 2010. The role of lipids in retrovirus replication. *Viruses* 2, 1146-1180.

Anexo 1. Solicitud de Patente.

Patente: “POLIPROTEÍNA RECOMBINANTE DEL GEN “GAG” DE LOS LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES, Y METODO DE OBTENCIÓN DE LA MISMA”

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con las técnicas y principios utilizados en la Biotecnología, así como en la Medicina Veterinaria, a través de sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos que permitan la prevención, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, trastornos y lesiones en los animales, y más específicamente, está relacionada con una poliproteína recombinante del gen “gag” de los lentivirus de pequeños rumiantes, así como también está relacionada con el método para obtener la misma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) presentan una distribución mundial y causan una enfermedad multisistémica crónico degenerativa e incurable en caprinos y ovinos (Cheevers, W. *et al.*, 1981). En el grupo de LvPR se incluye a las especies de lentivirus que infectan a cabras y que anteriormente se conocían como virus de la artritis encefalitis caprina (vAEC) y el virus de Maedi/Visna (vMV) que infecta ovinos (Shah C. *et al.*, 2004).

Los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV), que incluyen al virus Visna/Maedi (VMV) y al de la artritis encefalitis caprina (CAEV), infectan ovejas y cabras distribuidas por todo el mundo causando un cuadro multisistémico que afecta articulaciones, pulmones, glándula mamaria y sistema nervioso central. Las pérdidas derivadas de la infección van desde el aumento en la tasa de reposición, a un descenso en las producciones animales o en el valor comercial del rebaño. Aunque la enfermedad causada por los SRLV es de carácter lento y generalmente afecta a pulmones y glándula mamaria en nuestro país, se han descrito brotes

epidemiológicos causantes de artritis y encefalitis en ovinos que afectan un gran número de animales, causando pérdidas directas. En la actualidad existen 5 genotipos descritos (A-E) que presentan una alta variabilidad genética y biológica. Los genotipos A y B a los que pertenecen las estirpes clásicas de VMV y CAEV respectivamente, están distribuidos mundialmente, mientras que los genotipos C y E están restringidos a zonas geográficas concretas. En ausencia de tratamientos o vacunas totalmente protectoras, las medidas de control se basan en la detección temprana de animales infectados y su posterior eliminación del rebaño. Tras la infección, los animales infectados desarrollan una respuesta de anticuerpos que, si bien no es capaz de eliminar el virus, es indicadora de la infección. Así, empleando métodos de detección serológica podemos diagnosticar la infección indirectamente. Los métodos más eficaces hasta el momento son los ELISAs basados en proteínas recombinantes y péptidos sintéticos. Sin embargo, los métodos disponibles en el comercio están diseñados teniendo en cuenta una única estirpe viral que, sumado a la alta variabilidad antigénica de los SRLV, hace que las medidas disponibles fallen a la hora de controlar todo el espectro antigénico presente. La organización genómica de los lentivirus está bastante conservada entre los miembros del género. Así, a los genes estructurales “gag”, pol y env encargados de codificar proteínas de la cápside, proteínas para la replicación del material genético e integración y las proteínas de la envoltura, respectivamente, hay que sumarles los accesorios vpr, rev y vif en el caso de los SRLV, todos ellos flanqueados por el regulador de la transcripción viral, la región LTR. En la patogénesis de las enfermedades lentivirales es esencial conocer las interacciones entre el virus y el hospedero que determinan el tropismo y el desarrollo de los síntomas. Los factores virales incluyen las proteínas de la envoltura, encargadas de unirse al receptor celular y la región LTR encargada de regular la actividad transcripcional. Los factores del hospedador son más diversos ya que pueden incluir todo el fondo genético de una raza o una población determinada capaz de restringir la replicación viral de manera efectiva. Uno de los pasos clave en el establecimiento de la infección es la superación de las barreras

de la inmunidad innata, que reconocen directamente determinantes virales e inducen la eliminación del patógeno mediante factores de restricción como APOBEC3. La caracterización genética y virológica de las estirpes implicadas en los brotes epidemiológicos de artritis y encefalitis, puede aportar hallazgos esenciales en el conocimiento de la relación entre la secuencia genética de los aislados y la capacidad para establecer la infección en un tejido determinado. Por otro lado, componentes de la inmunidad innata del hospedador capaces de inhibir la replicación viral pueden ser también determinantes del tropismo. Por todo ello en esta tesis nos planteamos los siguientes estudios: a) Aislamiento y caracterización genética de estirpes implicadas en el brote artrítico. b) Aislamiento y caracterización genética de estirpes implicadas en el brote de encefalitis. c) Caracterización de la restricción de los SRLV por APOBEC3. “*Base genética del tropismo de lentivirus de pequeños rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3*”. Universidad Pública de Navarra. CSIC-GN-UPNA - Instituto de Agrobiotecnología (IDAB). <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/18335>.

El tropismo celular de los LvPR está dirigido a la línea monocitos/macrófagos y el tisular se observa en tracto respiratorio, nervioso, glándula mamaria y articulaciones (Gendelman HE *et al.*, 1986). El agente etiológico pertenece a la familia *Retroviridae* subfamilia *Orthoretrovirinae* género *Lentivirus*.

Los LvPR están formados por los genes “*gag*”, *pol* y *env*, los cuales son traducidos en proteínas estructurales, poseen además genes reguladores *vpr-like*, *vif* y *rev*, contiene dos regiones no codificantes en ambos extremos, las cuales se denominan regiones de terminación larga (RTL) (Leroux, C. *et al.*, 1997). Con base en los genes “*gag*” y *pol* se han clasificado 5 genotipos de LvPR (A al E) (Reina R. *et al.*, 2006). En el genotipo A se han incluido 15 subtipos (A1 al A15) y el B, tres subtipos (B1 al B3) (Minguijón E. *et al.*, 2015). Los genotipos A-D han sido identificados en cabras y borregos, con excepción de los genotipos A2, 15 que solo han sido identificados en borregos, y los genotipos A7, 8, 10, 14 que sólo se han detectado en cabras (Gjerset B, *et al.*, 2007). El genotipo E, dividido en los

subtipos E1 y E2, ha sido diagnosticado exclusivamente en cabras (Grego E, *et al.*, 2014). En México, en el año 1985 se realizó el primer estudio serológico de vAEC, reportando una seroprevalencia del 27% (Nazara S. *et al.*, 1985). En 1999, a partir de muestras de membrana sinovial de cabras, se realizó el primer aislamiento del virus (Daltabuit M. *et al.*, 1999). En el año 2012, se reportó la circulación del subtipo B1 de LvPR en caprinos y ovinos (Ramírez H, *et al.*, 2011). Recientemente, en 2016 se identificó la presencia de LVPR en ovinos pelibuey (Sánchez JH. *et al.*, 2016). El diagnóstico en México aún es ineficiente, esto asociado al hecho de que se tiene una dependencia a los paquetes comerciales de otros países, los cuales tienen un alto costo y en algunos casos resultan poco eficientes para la detección de anticuerpos producidos por las cepas de circulación nacional. Es por esto que se considera de suma importancia trabajar en la elaboración de proteínas recombinantes a partir de cepas de circulación nacional que permitan establecer pruebas de diagnóstico serológico eficientes.

En el estado de la técnica se encuentran diversos documentos relacionados con la materia de la presente invención, tal es el caso de la Patente Mexicana No. 351143 B, la cual describe un péptido que se compone de una secuencia de 9 aminoácidos caracterizado porque el péptido se presenta ligada a la parte N-terminal de la proteína de superficie pIII del bacteriófago filamentoso M13 y su uso para detectar anticuerpos generados por lentivirus de pequeños rumiantes En otro aspecto de la invención también se presenta un método de serodiagnóstico para detectar anticuerpos causados por lentivirus de pequeños rumiantes con el uso de la biomolécula de presente invención, a través de pruebas de inmunoensayo como ELISA, Western Blot, inmunoprecipitación, inmunoradiación o inmunohistoquímica.

Por otro lado, la Solicitud de Patente China No. CN107447045 (A) pertenece al campo técnico de la detección de biología molecular y, en particular, se refiere a un kit de detección de patógenos para un lentivirus de un pequeño rumiante. El kit comprende: (1) un marcador genético para detectar el lentivirus del pequeño rumiante, en el que el marcador genético tiene una secuencia como se muestra en la SEQ ID No. 3 u otras secuencias, cuya consistencia de secuencia

es mayor que 80%; (2) un par de iniciadores o cebadores específicos para amplificar el marcador genético, el par de cebadores específicos comprende una secuencia de cebador río arriba como se muestra en la secuencia SEQ ID No. 1 y una secuencia de cebador río abajo como se muestra en la secuencia SEQ ID No. 2 u otras secuencias, la consistencia de cualesquiera secuencias de base de ocho nucleótidos continuas de las cuales es mayor que 80%, entre las secuencias de cebador río arriba y río abajo; y, (3) un kit para detectar el lentivirus del pequeño rumiante, en el que el kit comprende el par de cebadores específicos en (2).

Asimismo, la Solicitud de Patente China No. CN107632153 (A) pertenece al campo de la biotecnología, y se refiere concretamente a un kit de detección indirecta de ELISA para lentivirus de pequeños rumiantes. La secuencia de aminoácidos de un oligopéptido P1 está representada por la SEQ ID No. 1, y la secuencia de aminoácidos de un oligopéptido P2 está representada por la secuencia SEQ ID No. 2. Los dos oligopéptidos sintetizados se usan como antígenos para recubrir una placa ELISA capaz de adsorber específicamente los oligopéptidos, y la concentración de recubrimiento de los antígenos oligopéptidos, la concentración de suero detectado y el grado de dilución de un anticuerpo anti-cabra marcado con HRP se optimizan para establecer un método indirecto ELISA para detectar pequeños anticuerpos séricos de lentivirus de rumiante.

Por su parte, la Solicitud de Patente China No. CN106591373 (A) describe un método de preparación del subclon celular sensible Vero/Slam utilizado para mejorar la replicación de PPRV comprende los siguientes pasos: construir una secuencia de iniciador de Slam de factor de activación de señal de linfocito de cabra y un vector de expresión de lentivirus Slam; obtener un lentivirus de defecto de replicación de Slam; infectar una célula marcada como objetivo Vero con el lentivirus Slam; seleccionar y verificar el subclon de células sensibles Vero/Slam; y, verificar la susceptibilidad de la plaga del virus del rumiante PPRV. El subclon celular sensible Vero/Slam comprende un subclon celular positivo para mejorar la capacidad de replicación del PPRV, el subclon celular tiene buenas características

biológicas y estabilidad hereditaria, y el Slam expresado de forma estable por el subclon tiene un efecto de mejora evidente de la replicación del PPRV.

Como puede verse de lo anteriormente discutido, las patentes encontradas en el estado de la técnica describen poliproteínas recombinantes que se han elaborado empleando segmentos específicos que codifican alguna proteína del gen gag. Mientras que la poliproteína recombinante de la presente invención contiene las tres proteínas codificadas por el gen “gag” con la finalidad de aumentar el rango de regiones reconocidas por los anticuerpos, además de que es producida a partir de una cepa de circulación nacional permitiendo el reconocimiento específico de anticuerpos caprinos que se han enfrentado a la infección por cepas virales que circulan en México.

Por consecuencia de lo anteriormente discutido, se ha buscado una solución a los inconvenientes encontrados en el estado de la técnica a través de la elaboración de una poliproteína recombinante del gen “gag” de los lentivirus de pequeños rumiantes.

OBJETOS DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta las desventajas de la técnica anterior, es un objeto de la presente invención es proveer una poliproteína recombinante originada a partir de una cepa viral de circulación nacional, la cual contiene un gran número de epítopes que le permite ser utilizada en pruebas de diagnóstico serológico de Lentivirus de pequeños rumiantes.

Otro objeto más de la presente invención es proveer la poliproteína recombinante cuya obtención es de suma importancia para la caprinocultura, particularmente la nacional, implicando un gran avance en la elaboración de herramientas de diagnóstico serológico, ya que actualmente en México no se cuenta con estas pruebas, lo que conlleva a la alta dependencia de paquetes comerciales de diagnóstico serológico elaboradas en otros países con un alto costo y baja eficiencia, debido a que existe un alto porcentaje de animales con

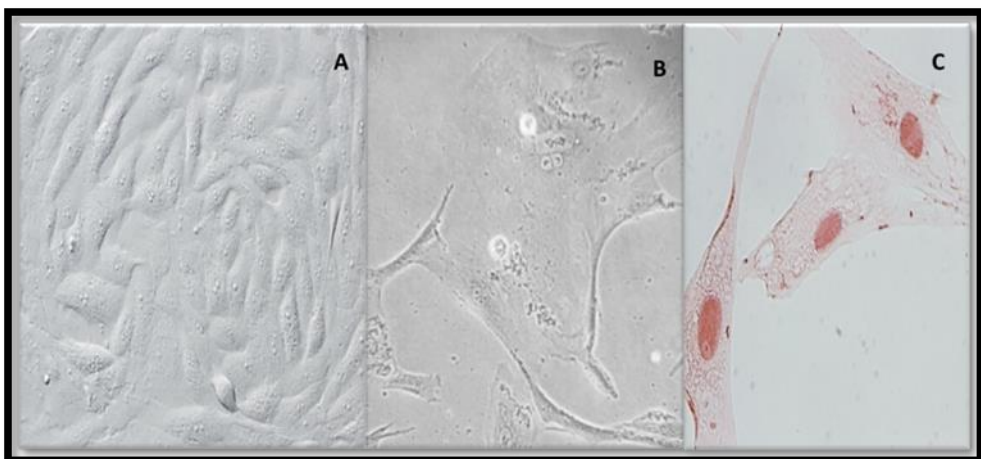
resultados falsos negativos, asociado a que el reconocimiento humoral suele ser específico a la cepa con la que se infectaron de forma natural.

Es un objeto más de la presente invención proveer un método para obtener la poliproteína recombinante.

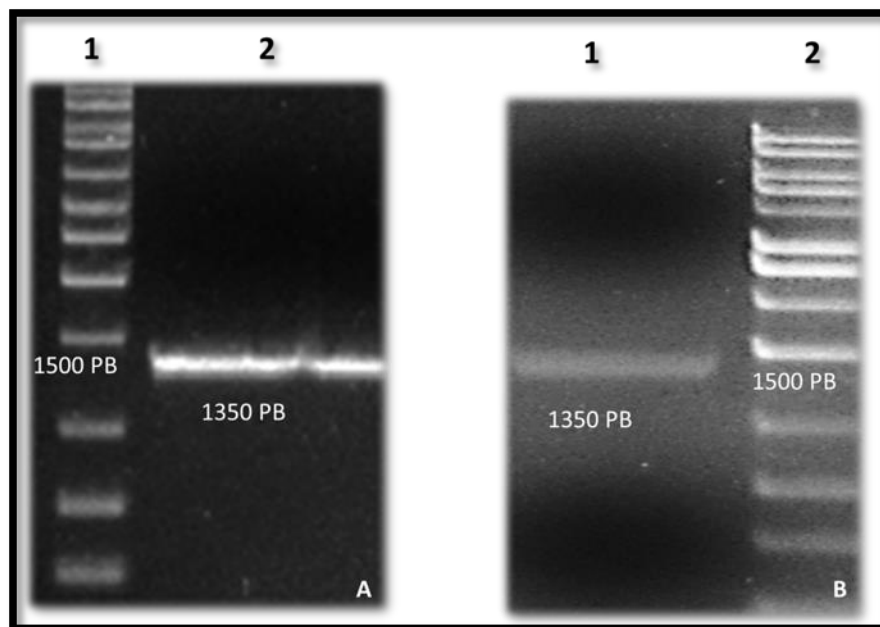
Estos y otros objetos, particularidades y ventajas de la poliproteína recombinante del gen “gag” de los lentivirus de pequeños rumiantes de la presente solicitud de patente, serán evidentes para un técnico en la materia a partir de la descripción detallada de ciertas modalidades y de las figuras que se acompañan, así como de las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INVENCÓN

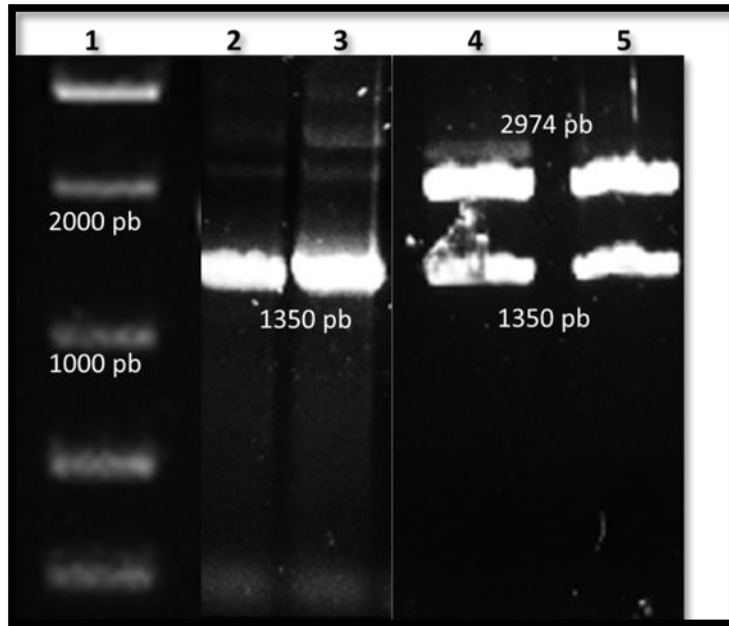
Los aspectos novedosos que se consideran característicos de la presente invención, se establecerán con particularidad en las reivindicaciones anexas. Sin embargo, la invención misma, tanto por su organización, así como por su método de operación, conjuntamente con otros objetos y ventajas de la misma, se comprenderán mejor en la siguiente descripción detallada de las modalidades de la presente invención, cuando se lea en relación con los dibujos que se acompañan, en los cuales:



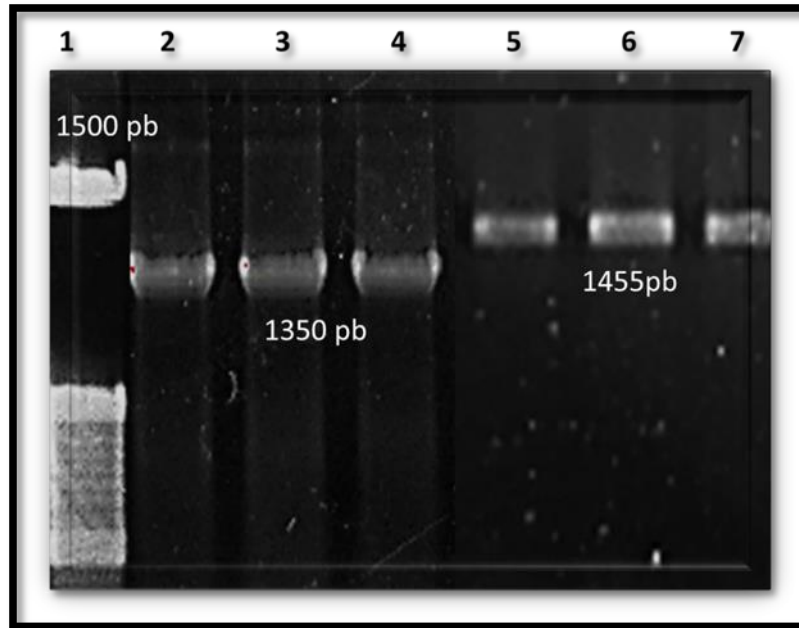
La figura 1 son micrografías de cultivo primario de epidídimo. La figura 1A es una micrografía obtenida del cultivo primario de epidídimo de cabrito sin infectar; en la figura 1B se observa la formación de un sincitio a las 120 horas post infección; y en la figura 1C es una micrografía obtenida de la prueba de inmunoperoxidasa realizada a partir de los cultivos primarios de epidídimo a las 120 horas post infección.



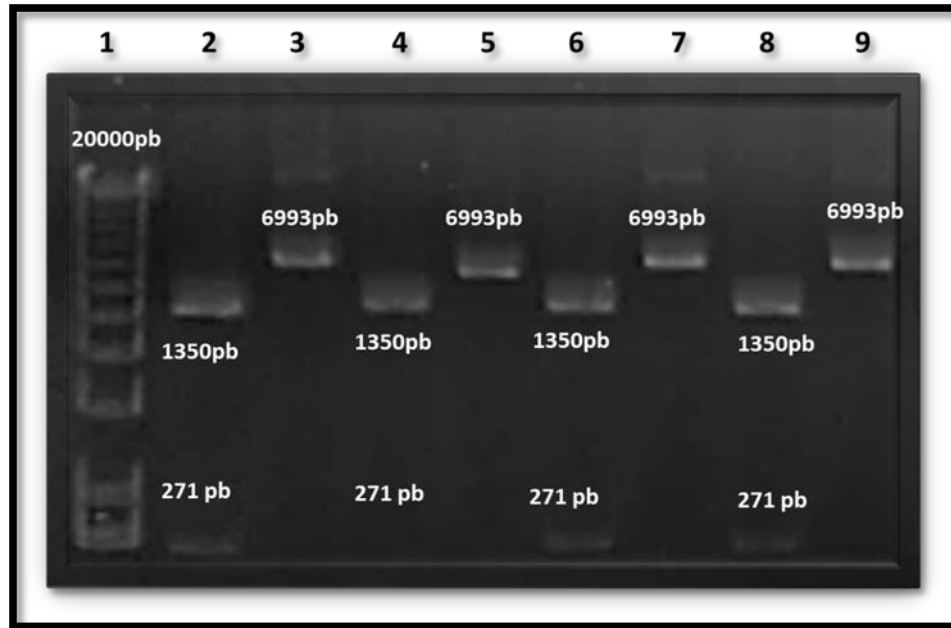
La figura 2 es una fotografía obtenida del corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% y teñido con Bromuro de Etidio. La figura 2A corresponde al corrimiento de los productos de amplificación del gen “gag” (1350pb) a partir de la muestra de sobrenadante de cultivo primario de epidídimo infectados con LvPR, en donde el carril 1 corresponde al marcador de peso de 1 kb y el carril 2 es el producto de amplificación. La figura 2B representa el corrimiento electroforético de los productos obtenidos de la purificación, en donde el carril 1 corresponde con el producto de purificación y el carril 2 corresponde al marcador de peso de 1 kb.



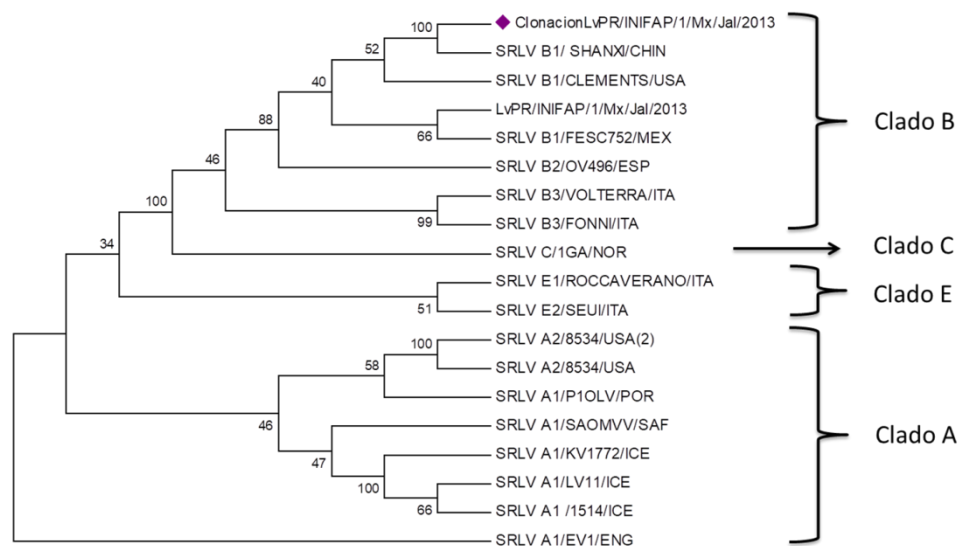
La figura 3 es una fotografía obtenida del corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% y teñido con Bromuro de Etidio. En el primer carril se observa el marcador de peso que corresponde a 1 kb; mientras que en los carriles 2 y 3 se encuentran los productos de PCR dirigido al gen “gag” (1350 pb); y, en los carriles 4 y 5 se observan los productos de digestión con la enzima BGL II, el peso más bajo corresponde al gen “gag” (1350pb) y el peso más alto al del vector (2974 pb).



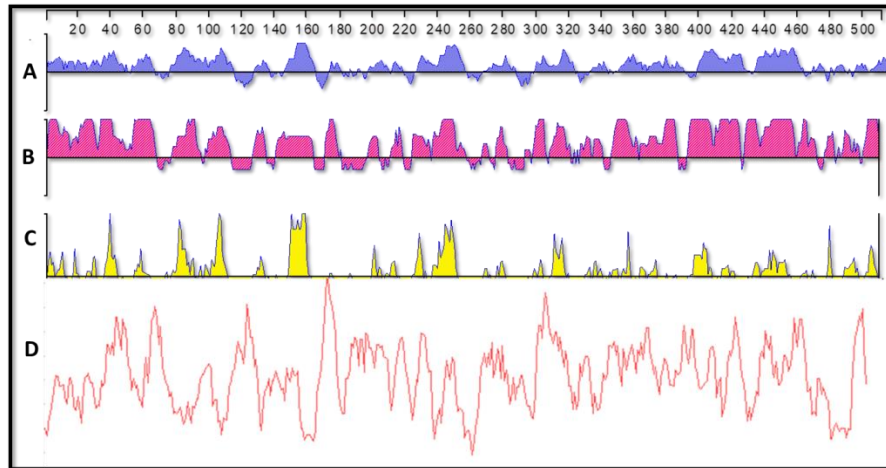
La figura 4 es una fotografía obtenida del corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% y teñido con Bromuro de etidio. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular; en los carriles 2 a 4 se muestra el producto de reacción de la prueba de PCR con los iniciadores de “gag” (1350 pb); en los carriles 5 a 7 se observa el producto de reacción de la prueba de PCR con el iniciador delantero del vector y el iniciador reverso de “gag” (1455 pb).



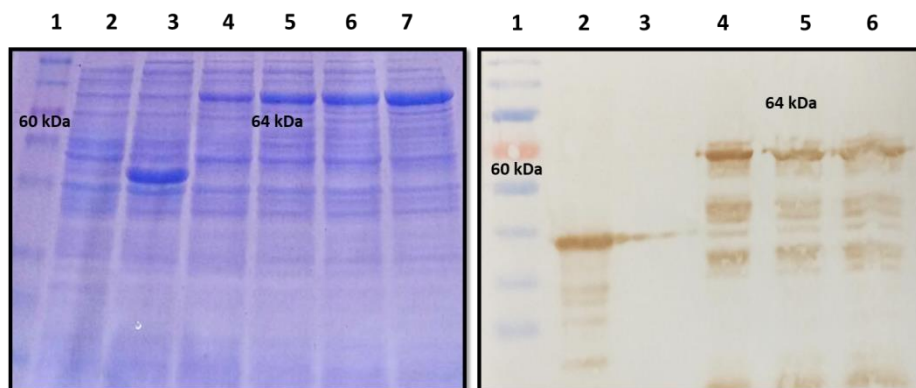
La figura 5 es una fotografía obtenida del corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% y teñido con Bromuro de etidio. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso de 1kb plus; en los carriles 2, 4, 6 y 8 se muestran las digestiones dobles con las enzimas de restricción HINDE III y BGLII (1350 pb y 271 pb); y, en los carriles 3, 5, 7 y 9 se muestra la digestión con la enzima de restricción ECOR I (6993 pb).



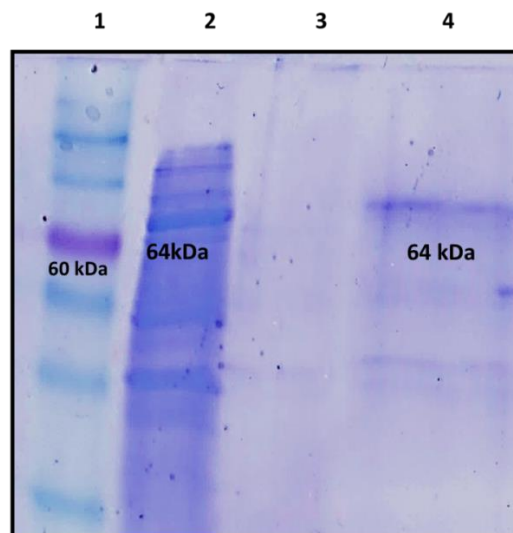
En la figura 6 se muestra la inferencia filogenética empleando el método de máxima verosimilitud con el modelo Neighbor-Joining (JTT) y realizando 1000 repeticiones.



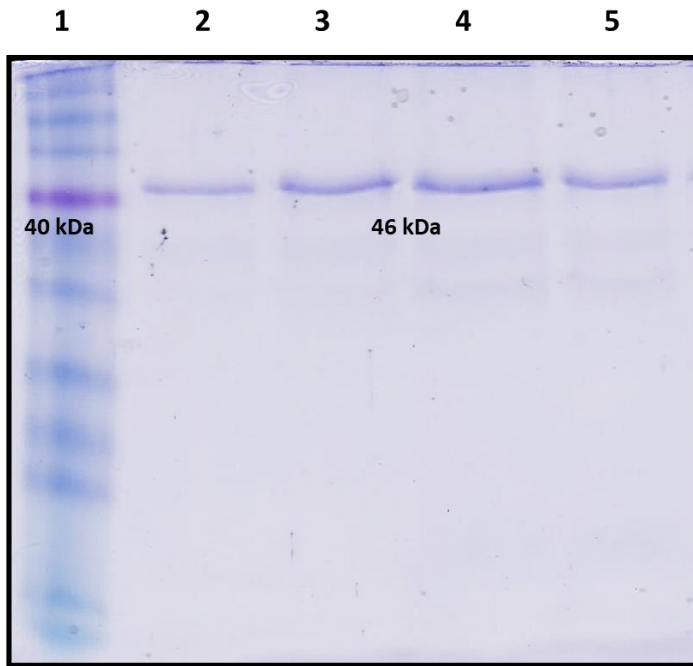
La figura 7 es un gráfico que muestra la predicción de la capacidad inmunogénica de la clonación. La figura 1A corresponde al índice de hidrofobicidad basado en el método Kyte-Doolittle; la figura 1B indica el índice antigénico basado en el método Jameson Wolf; la figura 1C representa el índice de superficialidad determinado por el método Emini; y, la figura 1D corresponde con la predicción de epítopes basado en el método Kolaskar y Tongaonkar



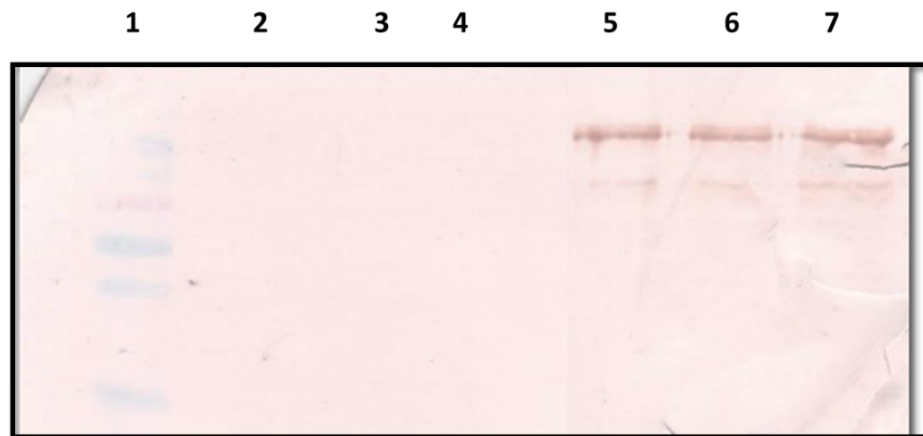
Las figuras 8A y 8B corresponden con la cromatografía de las pruebas de expresión de la proteína “gag”. En la figura 8A se observa el corrimiento electroforético vertical en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidos con azul de Comasie, en donde en el carril 1 se encuentra el marcador de peso de proteínas, en el carril 2 el control negativo, en el carril 3 el control positivo y del carril 4 al 7 se observa la proteína en un peso de 46 kDa. En la figura 8B se muestra la prueba de transferencia en medio semi-seco (Western-Blot) empleando un anticuerpo antihistidinas, esta reacción fue evidenciada con el cromógeno diaminobenzidina, en donde en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular; en el carril 2 el control positivo; en el carril 3 el control negativo y del carril 4 al 7 se observa la proteína en un peso de 46 kDa.



La figura 9 es una cromatografía que muestra la extracción de cuerpos inclusión, mostrando el corrimiento electroforético vertical en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidos con azul de Comasie. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso de proteínas; en el carril 2 el control positivo; en el carril 3 la fase soluble y en el carril 4 la fase insoluble



La figura 10 es la purificación por cromatografía por afinidad, mostrando el corrimiento electroforético vertical en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidos con azul de Comasie. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso de proteínas, y en los carriles 2 a 5 se encuentran los productos de la purificación de la proteína “gag”.



La figura 11 es una cromatografía de la prueba de transferencia en medio semi-seco (Western-Blot), empleando como anticuerpo primario el suero de

animales positivos y negativos a la presencia de LvPR, esta reacción fue evidenciada con el cromógeno diaminobenzidina. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular; en los carriles 2 a 4 se encuentra el suero de cabra negativa a LvPR; y en los carriles 5 a 7 se utilizó el suero de una cabra positiva a la infección natural de LvPR.

El resultado de esta patente fue la obtención de una proteína recombinante que se empleó para la estandarización de la prueba de diagnóstico serológico de Western Blot y como control positivo, en esta misma prueba para la confirmación de diferentes aislamientos virales en cultivo celular.

A continuación se anexan los documentos que avalan el proceso de la solicitud de esta patente ante el Instituto Mexicano de Propiedad Intelectual.

Solicitud de Patente de Invención o de Registro de Modelo de Utilidad
o de Registro de Diseño Industrial

Homoclave del formato
IMPI-00-009
Fecha de publicación del formato en el DOF
24 / 05 / 2018

Folio y Fecha de Recepción

INSTITUTO MEXICANO DE
LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisiva de Patentes

Datos generales de la solicitud
Mecanismo de selección
 Solicitud de Patente de Invención
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:
Modelo Industrial Dibujo Industrial

Solicitud: MX/a/2018/011704
Expediente: MX/a/2018/011704
Fecha: 26/SEP/2018 Hora: 11:54:00
Folio: MX/E/2018/072056 361540


Datos generales del o de los solicitante(s)

<p>Personas físicas</p> <p>CURP (opcional): Nombre(s): Primer apellido: Segundo apellido: Nacionalidad: Teléfono (lada, número, extensión): Correo electrónico (opcional):</p> <p style="text-align: right;">Continúa en anexo</p>	<p>Personas morales</p> <p>RFC (opcional): Denominación o razón social: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Nacionalidad: MEXICANA Teléfono (lada, número, extensión): (55) 56 22 63 29 AL 31 Correo electrónico (opcional):</p> <p style="text-align: right;">Continúa en anexo</p>
---	---

Domicilio del o de los solicitante(s)

Código postal: 04510
Calle: 9º PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA
(Por ejemplo: República Mexicana, Blvd. Reforma, No. 200, Ciudad de México, CDMX)
Número exterior: S/N Número interior:
Colonia: CIUDAD UNIVERSITARIA
(Por ejemplo: Jardines de la Paz, Residencial Solís, Fincas y Jardines, Sección 081)
Municipio o demarcación territorial: COYOACÁN Localidad: COYOACÁN
Entidad Federativa: CIUDAD DE MÉXICO Entre calles (opcional):
País: MEXICO Calle posterior (opcional):

Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)

CURP (opcional):
Nombre(s): HUMBERTO
Primer apellido: RAMÍREZ
Segundo apellido: MENDOZA
Nacionalidad: MEXICANA
Teléfono (lada, número, extensión): (55) 56 22 63 29
Correo electrónico (opcional): Continúa en anexo

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Domicilio del o de los inventor(es) o diseñador(es)

Código postal: 16800

Calle: (Por ejemplo: Av. México 100, Calle de los Reyes, etc.) DOS Número interior:

Número exterior: 11

Colonia: (Por ejemplo: Sanborn, Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sección, etc.) SAN MATEO XALPA

Municipio o demarcación territorial: XOCHIMILCO Localidad: XOCHIMILCO

Entidad Federativa: CIUDAD DE MÉXICO Entre calles (opcional):

País: MÉXICO Calle posterior (opcional):

Datos generales del o de los apoderado(s)

CURP (opcional): Registro General de Poderes (opcional): RGP-DDAJ-14782

Nombre(s): MARTHA RFC (opcional):

Primer apellido: FIGUEROA Teléfono (lada, número, extensión): (55) 56 22 63 29

Segundo apellido: PÉREZ Correo electrónico (opcional): marthafp@unam.mx

Continúa en anexo

Domicilio para oír y recibir notificaciones

Código postal: 04510

Calle: (Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Andrés Balmori, Calles, Carretera, etc.) EDIF. "B", PISO 3, OFIC. ADMINISTRATIVAS EXTERIORES, ZONA CULTURAL CU

Número exterior: S/N Número interior:

Colonia: (Por ejemplo: Anáhuac, Jardines del Bosque, Fraccionamiento, Sección, etc.) CIUDAD UNIVERSITARIA

Municipio o demarcación territorial: COYOACÁN Localidad: COYOACÁN

Entidad Federativa: CIUDAD DE MÉXICO Entre calles (opcional):

País: MÉXICO Calle posterior (opcional):

Datos generales de los autorizados para oír y recibir notificaciones

Nombre(s):	Primer apellido:	Segundo apellido:	CURP (opcional):
DANIEL	OJESTO	MARTÍNEZ POCAYO	

Continúa en anexo

Datos de la solicitud

Denominación o título de la invención, modelo de utilidad o diseño industrial:
POLIPROTEÍNA RECOMBINANTE DEL GEN "GAG" DE LOS LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES, Y MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LA MISMA

Fecha de divulgación previa (DD / MM / AAAA): / /

Divisional de la solicitud

No. Expediente en trámite: Figura jurídica: / /

Fecha de presentación (DD / MM / AAAA): / /

PCT

No. de solicitud internacional: Fecha de presentación internacional (DD / MM / AAAA): / /

Prioridad o prioridades reclamada(s)

País (oficina) de origen:	Fecha de presentación (DD/MM/AAA):	Número de serie:
/	/	/

Continúa en anexo

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ

Nombre y firma del solicitante o su apoderado.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los solicitantes"/
"Datos generales del o de los inventores o diseñadores"
(Use esta hoja en caso de que la solicitud sea presentada por dos o más personas físicas o morales)

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador

Datos generales del solicitante



Datos generales del inventor o diseñador

Personas físicas

CURP (opcional):
Nombre(s): JAZMÍN
Primer apellido: DE LA LUZ
Segundo apellido: ARMENDÁRIZ
Nacionalidad: MEXICANA
Teléfono (lada, número, extensión):
(55) 56 22 63 29
Correo electrónico (opcional):

Personas morales

RFC (opcional):
Denominación o razón social:

Nacionalidad:
Teléfono (lada, número, extensión):

Correo electrónico (opcional):

Domicilio del solicitante o inventor o diseñador

Código postal: 04700
Calle: RINCONADA DE LOS VOLCANES
(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Balcones de la Comarca, Capatza, Coahuila de Zaragoza)
Número exterior: EDIFICIO BULDIR
Colonia: PEDREGAL DE CARRASCO
(Por ejemplo: Asignación Juárez, Residencial Hidalgo, Francisco Arrieta, Sacoré, etc.)
Municipio o demarcación territorial: COYOACÁN
Entidad Federativa: CIUDAD DE MÉXICO
País: MÉXICO

Número interior: 004
Localidad: COYOACÁN
Entre calles (opcional):
Calle posterior (opcional):

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador

Datos generales del solicitante



Datos generales del inventor o diseñador

Personas físicas

CURP (opcional):
Nombre(s): JOSÉ FRANCISCO
Primer apellido: RIVERA
Segundo apellido: BENÍTEZ
Nacionalidad: MEXICANA
Teléfono (lada, número, extensión):
(55) 56 22 63 29
Correo electrónico (opcional):

Personas morales

RFC (opcional):
Denominación o razón social:

Nacionalidad:
Teléfono (lada, número, extensión):

Correo electrónico (opcional):

Domicilio del solicitante o inventor o diseñador

Código postal: 57300
Calle: AZUCENA
(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Balcones de la Comarca, Capatza, Coahuila de Zaragoza)
Número exterior: 46
Colonia: TAMAULIPAS
(Por ejemplo: Asignación Juárez, Residencial Hidalgo, Francisco Arrieta, Sacoré, etc.)
Municipio o demarcación territorial: NEZAHUALCÓYOTL
Entidad Federativa: ESTADO DE MÉXICO
País: MÉXICO

Número interior:
Localidad: NEZAHUALCÓYOTL
Entre calles (opcional):
Calle posterior (opcional):

Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los solicitantes"/
 "Datos generales del o de los inventores o diseñadores"
 (Use esta hoja en caso de que la solicitud sea presentada por dos o más personas físicas o morales)

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador

Datos generales del solicitante

Datos generales del inventor o diseñador

Personas físicas

CURP (opcional):
 Nombre(s): LUIS
 Primer apellido: GÓMEZ
 Segundo apellido: NÚÑEZ
 Nacionalidad: MEXICANA
 Teléfono (lada, número, extensión):
 (55) 56 22 63 29
 Correo electrónico (opcional):

Personas morales

RFC (opcional):
 Denominación o razón social:
 Nacionalidad:
 Teléfono (lada, número, extensión):
 Correo electrónico (opcional):

Domicilio del solicitante o inventor o diseñador

Código postal: 10200
 Calle: CERRADA SAN JERÓNIMO
(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Ávila Camacho, Calles, Corones, etc.)
 Número exterior: 160
 Colonia: SAN JERÓNIMO LIDICE
(Por ejemplo: Insurgentes, Juárez, Residencial Hidalgo, Encanto, Avenida Santa Fe, etc.)
 Municipio o demarcación territorial: MGDA. CONTRERAS
 Entidad Federativa: CIUDAD DE MÉXICO
 País: MEXICO

Número interior: 2

Localidad: MAGDA. CONTRERAS
 Entre calles (opcional):
 Calle posterior (opcional):

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador

Datos generales del solicitante

Datos generales del inventor o diseñador

Personas físicas

CURP (opcional):
 Nombre(s):
 Primer apellido:
 Segundo apellido:
 Nacionalidad:
 Teléfono (lada, número, extensión):
 Correo electrónico (opcional):

Personas morales

RFC (opcional):
 Denominación o razón social:
 Nacionalidad:
 Teléfono (lada, número, extensión):
 Correo electrónico (opcional):

Domicilio del solicitante o inventor o diseñador

Código postal:
 Calle:
(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Ávila Camacho, Calles, Corones, etc.)
 Número exterior:
 Colonia:
(Por ejemplo: Insurgentes, Juárez, Residencial Hidalgo, Encanto, Avenida Santa Fe, etc.)
 Municipio o demarcación territorial:
 Entidad Federativa:
 País:

Número interior:

Localidad:
 Entre calles (opcional):
 Calle posterior (opcional):

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los apoderados" /
 "Autorizados para oír y recibir notificaciones"
 Únicamente para trámites ante la Dirección Divisinal de Patentes
 (Use esta hoja para adicionar apoderados y / o autorizados para oír y recibir notificaciones)

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado



Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):
 Nombre(s): **ROCIO**
 Primer apellido: **JUÁREZ**
 Segundo apellido: **VÁZQUEZ**

Registro General de Poderes (opcional):
 RFC (opcional):
 Teléfono (lada, número, extensión): **(55) 56 22 63 29**
 Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado



Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):
 Nombre(s): **ANACLARA**
 Primer apellido: **ALVARADO**
 Segundo apellido: **DE LA CUESTA**

Registro General de Poderes (opcional):
 RFC (opcional):
 Teléfono (lada, número, extensión): **(55) 56 22 63 29**
 Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado

Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):
 Nombre(s):
 Primer apellido:
 Segundo apellido:

Registro General de Poderes (opcional):
 RFC (opcional):
 Teléfono (lada, número, extensión):
 Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado

Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):
 Nombre(s):
 Primer apellido:
 Segundo apellido:

Registro General de Poderes (opcional):
 RFC (opcional):
 Teléfono (lada, número, extensión):
 Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado

Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):
 Nombre(s):
 Primer apellido:
 Segundo apellido:

Registro General de Poderes (opcional):
 RFC (opcional):
 Teléfono (lada, número, extensión):
 Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado

Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):
 Nombre(s):
 Primer apellido:
 Segundo apellido:

Registro General de Poderes (opcional):
 RFC (opcional):
 Teléfono (lada, número, extensión):
 Correo electrónico (opcional):

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los apoderados" /
 "Autorizados para oír y recibir notificaciones"
 Únicamente para trámites ante la Dirección Divisonal de Patentes
 (Use esta hoja para adicionar apoderados y / o autorizados para oír y recibir notificaciones)

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado



Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):

Nombre(s): ROCIO

Primer apellido: JUÁREZ

Segundo apellido: VÁZQUEZ

Registro General de Poderes (opcional):

RFC (opcional):

Teléfono (lada, número, extensión): (55) 56 22 63 29

Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado



Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):

Nombre(s): ANACLARA

Primer apellido: ALVARADO

Segundo apellido: DE LA CUESTA

Registro General de Poderes (opcional):

RFC (opcional):

Teléfono (lada, número, extensión): (55) 56 22 63 29

Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado

Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):

Nombre(s):

Primer apellido:

Segundo apellido:

Registro General de Poderes (opcional):

RFC (opcional):

Teléfono (lada, número, extensión):

Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado

Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):

Nombre(s):

Primer apellido:

Segundo apellido:

Registro General de Poderes (opcional):

RFC (opcional):

Teléfono (lada, número, extensión):

Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado

Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):

Nombre(s):

Primer apellido:

Segundo apellido:

Registro General de Poderes (opcional):

RFC (opcional):

Teléfono (lada, número, extensión):

Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones

Marcar con una X sólo una opción

Datos generales del apoderado

Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones

CURP (opcional):

Nombre(s):

Primer apellido:

Segundo apellido:

Registro General de Poderes (opcional):

RFC (opcional):

Teléfono (lada, número, extensión):

Correo electrónico (opcional):



Contacto:
 Arenal # 550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México
 Teléfono: (011 (55) 53-24-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana del interior de la República sin
 costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10028.
 Correo electrónico: apipmp@impi.gob.mx

Anexo 2. Artículo científico enviado para su publicación

Prevalence, molecular detection, and pathological characterization of small ruminant lentiviruses in goats from Mexico

Jazmín De la Luz-Armendáriz^a, Andrés Ernesto Ducoing-Watty^a, Humberto Ramírez-Mendoza^b, Luis Gómez-Núñez^c, Catalina Tufiño-Loza^c, Eduardo Martín Cabrera Domínguez^a, Efrén Díaz-Aparicio^c, José Francisco Rivera-Benítez^{c*}

^aDepartamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Mexico City. Mexico

^bDepartamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Mexico City. Mexico.

^cCentro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Mexico City, Mexico.

*Corresponding author:

Laboratorio de Virología. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, km 15.5 Carretera México-Toluca, Colonia Palo Alto, C.P. 05110, Mexico City. Mexico, Phone: (+52 55) 38718700

E-mail

address

rivera.francisco@inifap.gob.mx

Abstract

Small ruminant lentiviruses (SRLVs) are one of the main viral agents affecting goats worldwide. They cause a systemic, chronic, incurable, degenerative disease. Clinical signs are generally related to neurological, respiratory, and joint damage, as well as mastitis. In Mexico, the B1 genotype has been detected as endemic in goats and sheep; however, its pathological characteristics have not yet been evaluated. In this study, sampling was performed to identify the percentage of SRLV positivity in different farms in Mexico in goats that showed clinical signs. Prevalence rates of 19.6% and 11.6% were detected through PCR and serology, respectively. Through a real-time PCR differential test, the prevalence of genotype B was identified. From a chosen case, an SRLV strain was isolated in a cell culture, which was called SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013. The strain was characterized through molecular and sequencing assays. The phylogenetic analysis revealed that the strain SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 shares 92 to 98% nucleotide identity in the *gag* gene and 88 to 98% nucleotide identity in the *env* gene with American and Asiatic strains of the B1 genotype of SRLV, respectively. Virulence of the SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 strain was analyzed during an experimental infection in 11 naive 15-day-old kids. The kids did not present clinical disease after the experimental infection. Viremia persisted throughout the entire experiment (90 days), and no seroconversion was detected with a commercial competitive ELISA test. At necropsy, macroscopic alterations were not observed, except in the lungs. The microscopic lesions in the respiratory tract consisted of moderate interstitial pneumonia, peribronchial lymphoid hyperplasia, and bronchial exudate. In the central nervous system, moderate gliosis, meningeal congestion, lymphocyte infiltration, satellitosis, and demyelination were observed. The experimental group with the largest number of microscopic lesions was the one analyzed at 60 days post infection (dpi). The virus was systemically distributed among organs; the nervous system and synovial fluid samples were those with the highest viral load, 5.07 SRLV copies/mL of total DNA (\log_{10}) and 5.25 \log_{10} , respectively. The study identified a strain with high homology to Asiatic strains that manifested low virulence in kids during early infection. Understanding the strains that circulate in the goat population will allow implementing better diagnostic methodologies to propose disease control alternatives for this emerging animal production system in Mexico.

Keywords: small ruminant lentivirus, low-virulence strain, genome characterization, pathogenesis, kids.

1. Introduction

The Lentivirus genus of the *Retroviridae* family groups 10 viral species, four of which affect ruminants (Bovine leukemia virus, Jembrana disease virus, Maedi-Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus). The Maedi-Visna virus (MVV) and the Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) are grouped within the small ruminant lentiviruses (SRLVs) (ICTV, 2019). SRLVs are distributed worldwide and cause a systemic, degenerative, and incurable disease in goats and sheep (Minjguijón et al., 2015). Cellular tropism of SRLV is directed toward macrophages and monocytes; the preferred tissue tropism corresponds to the nervous and respiratory systems, but the mammary gland and the joints of the locomotor system can also be affected (Ramírez et al., 2013). SRLVs have been classified into five genotypes (A-E) according to the sequences of the *gag* and *pol* genes (Shah et al., 2004; Reina et al., 2006; Grego et al., 2009). Fifteen subtypes have been described for genotype A (A1 to A15) and three for genotype B (B1 to B3) (Minguijón et al., 2015). Genotypes A to D have been identified in goats and sheep. Subtypes A2 and A15 have been detected exclusively in sheep, and subtypes A7, A8 A10, and A14 have been detected exclusively in goats (Shah et al., 2004; Pisoni et al., 2010). Genotype E (E1 and E2) has been identified only in goats (Grego et al., 2009). The first evidence of CAEV circulation in Mexico was from 1985, with a 27% seroprevalence (Nazara et al., 1985). In 1999, viral isolation was performed; however, the associated genotype was not determined (Daltabuit et al., 1999). In 2011, circulation of genotype B1 was identified in caprine and ovine populations (Ramírez et al., 2011). In 2016, Sánchez et al. identified this genotype in ovines of the Pelibuey breed. Genotype B, identified through amplification tests of the LTR region, is maintained in at least 10 states of Mexico, infecting goats and sheep (Mendiola et al., 2019). The clinical presentations in goats associated with SRLV infection commonly described are arthritis and mastitis in reproducing females of 2 to 7 years of age (Daltabuit et al., 1999; Ramírez et al., 2011; Mendiola et al., 2019). Other associated pathologies are pneumonia and weight loss (Daltabuit et al., 1999). In Pelibuey ovines, genotype B1 has been identified in animals without apparent clinical disease (Ramírez et al., 2013); however, in other reports, it has been associated with the presence of pneumonia in ovines (Mendiola et al., 2019). To date, no study has yet described the pathological characteristics of the strains molecularly identified as SRLV circulating in Mexico. This study aimed to detect SRLV in different regions of Mexico, isolate and characterize a strain, and assess the clinical disease during experimental infection in kids.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

All kids used during the experimental infection came from a commercial farm. Veterinary personnel performed the sampling and necropsy procedures according to the Official Mexican Norm (NOM-033-ZOO-1995). The procedures used during the experimental infection of kids corresponded to the standards of the institutional committee for the care and use of experimental animals (SICUAE, for its initials in Spanish).

2.2. Field sampling

Directed longitudinal sampling was performed on 14 goat farms of the states of Querétaro, Puebla, Jalisco, Estado de México, Aguascalientes, and Sinaloa from 2009 to 2018 (convenience sampling of available subjects with clinical signs suggesting SRLV infection). On most farms, samples were collected from goats with arthritis, mastitis or respiratory disorders. The collected samples were blood to obtain the serum and whole blood to separate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with Histopaque-1077 (SIGMA, ST. Louis, MO, USA). Table 1 depicts the characteristics of the farms and goats. During the field sampling, two goats (G12 and G14) were obtained from the Jal/2013 farm and were sent to the virology laboratory of the CENID-SAI, INIFAP, to be observed and to record their clinical evolution. These two goats presented acute arthritis in both anterior limbs. The two goats were given commercial feeding according to their age and physical condition, and water was provided *ad libitum*. The clinical follow-up was performed over three months; during this period, blood samples were obtained, and during necropsy, organs of the respiratory, lymphoid, nervous, and urinary tracts were sampled, as well as the synovial membrane of the metatarsal joint, the mammary gland, and the heart.

2.3. SRLV status of the herds

To diagnose SRLV infection, ELISA, end-point PCR, and real-time PCR (differential for genotypes A and B) were performed. Briefly, sera were analyzed through a competitive ELISA using the commercial Ruminant Lentivirus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD Inc., Pullman, WA, USA). The development and validation of the test were performed following the manufacturer's instructions. The proviral DNA of the PBMCs was extracted with the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands). PBMCs were analyzed with end-point PCR, which amplified a 232-bp fragment from the LTR (Sánchez et al., 2016). A subsample was chosen to differentiate between genotypes A and B, following modified real-time PCR protocols previously described by Kuhar et al. (2013).

2.4. Virus isolation and immunodetection

We selected samples of PCR-positive organs to isolate the virus in the cellular culture. Briefly, primary cultures were obtained from the testicles (PTCs) and the epididymis (PECs) from a 4-month-old male kid certified to be free of SRLV (PCR and ELISA). A standard culture was performed with cells of both organs; the organ was dissected and subjected to cellular disaggregation (Lamara et al., 2013). After 24 or 48 h of incubation, cultures reached 80% confluence and were inoculated during this growth stage. The inoculated cultures were maintained under observation for 120 h postinfection to identify the cytopathic effect. Infection of cellular cultures was confirmed through an indirect immunoperoxidase assay. The assay was performed with SRLV-positive hyperimmune goat serum (previously confirmed by western blot, data not shown) and using a rabbit anti-goat Ig, HRP conjugate as a secondary antibody.

2.5. Genome sequencing and phylogenetic analysis

The viral isolate was sequenced to perform genetic characterization based on the LTR, *gag* and *env* genes. Amplification was achieved with the DNA extracted from PEC in the third passage. We used the protocol reported by Sánchez et al., 2016, to amplify the LTR regions and those reported by Glaria et al., 2009, for the *env* and *gag* genes. Amplification conditions were experimentally adjusted, each product was visualized in agarose gels, and the obtained bands were purified for their ultimate sequencing in both senses in an ABI Prism 3100xL Genetic Analyzer with the BigDye® Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the *Instituto de Biología* of the *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM). The obtained sequences were compared with the NCBI GenBank database using the BLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences were aligned with ClustalW. To determine the phylogenetic relation of the SRLV strains reported, a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method (JTT model) with 1000 bootstraps using MEGA v. 6.0 software (Tamura et al., 2013). For the analysis of gene groups, the *gag* and *env* genes obtained from the isolated strain were used, as well as 18 strains previously reported in GenBank (Table 2).

2.6. Experimental infection

Twelve 15-day-old kids (Alpine French breed) were acquired to perform the experimental infection. Animals were from an SRLV-free farm (confirmed by PCR and ELISA). Kids were maintained under isolating conditions, nursed artificially, and provided water *ad libitum*. Infection was performed in 11 kids with the strain SRLV/B1/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 derived from the third PEC passage; one kid was maintained as an infection-free control. Inoculation was achieved intranasally with 2 mL from a viral suspension containing 1×10^6 copies of proviral DNA/mL.

Clinical signs and rectal temperature were recorded daily. Whole blood and serum samples were collected. The whole blood sample was processed to obtain PBMCs. Sampling was performed at days zero, five, and every 10 days postinfection (dpi). The duration of the experiment was 90 days after infection.

2.7. Necropsy and sample collection

Necropsies were performed on zero (1 kid), 20 (3), 40 (3), 60 (3), and 90 (2) dpi; during the procedures, macroscopic lesions were recorded; the lung, nervous system (choroid plexus, encephalon, cerebellum, and medulla oblongata), lymphatic system (tonsils, thymus, spleen, cervical lymph nodes) and joints and synovial fluid were collected. One section of the sampled organ was frozen in liquid nitrogen, and another was fixed in 10% buffered formaldehyde to be processed through standard histological techniques.

2.8. Histopathological evaluation

Fixed organs were embedded in paraffin, and serial 5- μ M sections were prepared. Observations were made by a certified pathologist; microscopic alterations in the lungs, nervous, lymphatic, and articular systems were analyzed. Evaluation was quantified as follows: mild (1), moderate (2), and severe (3).

2.9. Real-time PCR quantification

To quantify the proviral load in the organs of goats and kids, a standard curve was constructed for the real-time *q*PCR reported by Li et al. (2013). Briefly, a 149-bp fragment of the *gag* gene was cloned into the TOPO II TA (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) vector. After growth in selective agar, the plasmid was extracted, and serial decoupled dilutions were performed in quadruplicate. All assays were performed using a no template control (NTC) and DNA from organs of noninfected kids. The detection limit of the assay was 1×10^1 SRLV DNA copies/mL. Proviral concentration was expressed as the number of SRLV DNA copies per milliliter of the total extracted DNA from the samples in Log_{10} .

2.10. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS v. 18. An analysis of variance using the Tukey correction/adjustment procedure was used for comparisons of the mean of the proviral load in the different organs analyzed. The mean of the proviral load (between groups) was evaluated using a nonparametric test (Kruskal–Wallis). For all statistical analyses, $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Prevalence and seroprevalence

A total of 376 samples of whole blood and serum were obtained from goats that presented at least one sign of SRLV infection, recording a 21% prevalence of arthritis (Table 1). The samples were analyzed by end-point PCR for LTR identification of SRLV, and 343 samples were positive. Through ELISA, 203 goats were positive. Afterward, a subsample of 83 animals (24%) was selected to classify the genotype (A or B); of these, 73 samples corresponded to genotype B, leaving 10 samples without classification. Table 3 presents the results of the analyzed samples. In the samples from goats with clinical signs associated with SRLV infection from farms located in regions of the central area (Mexico City, Estado de México, Querétaro, and Puebla), an average of 20.1% PCR positivity was recorded, and 10% PCR positivity was recorded through serology. In the farms from western Mexico (Jalisco, Aguascalientes, and Sinaloa), positivity rates of 17.9 and 14.8% were recorded through PCR and ELISA, respectively.

3.2. Clinical monitoring

Of the two goats maintained under controlled conditions, samples of serum, PBMCs, and organs were collected. During the 3 months of clinical follow-up, no increases in clinical signs were observed. Arthritis was the only clinical sign maintained in the two animals. The viral load was higher in the organs of the nervous and respiratory systems; on average, 5.69 SRLV copies/mL of total DNA (\log_{10}) and 5.28 \log_{10} were recorded (Table 4). Seroconversion was maintained without changes, remaining positive during the whole observation period.

3.3. Viral isolation and immunodetection in cell cultures

Cultures of the testicle, epididymis, and choroid plexus were maintained for 144 h to confirm the absence of a cytopathic effect (Figure 1, A1, C1); they were also assessed through end-point PCR for LTR. None of the cultures were positive for the presence of SRLV. After this evaluation, cultures were prepared for inoculation at 24 h of growth. The cytopathic effect was observed from 96 h to 120 h in the three cellular types (Figure 1, A2-C2). Immunodetection was observed in the cultures as a strong marker in the nucleus and a slight marker in the cytoplasm (Figure 1, A3-C3, A4-C4). The result was confirmed by end-point PCR (data not shown). The isolate was named SRLV/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 (GenBank No. Access: MG996440).

3.4. Genomic characterization of the SRLV/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 strain

The complete sequence of the *gag* and *env* genes was used to align 18 sequences reported in GenBank. A phylogenetic construction was performed to identify the genotype to which the strain SRLV/Goat/MX/INIFAP-1/2013 pertains, which was identified as genotype B1 (Figure 2).

3.5. Clinical, pathological, and histopathological examinations

Kids did not develop evident clinical signs after the experimental infection. Necropsy allowed the identification of lesions in the lung, which consisted of slight and diffuse pneumonia in the apical lobes. No other alterations were detected in the other analyzed organs. The histopathological examination revealed moderate interstitial pneumonia (7/11; one kid at 20, 40 and 90 days, and 4 at 60 days), peribronchial lymphoid hyperplasia (3/11), and bronchial exudate in one case. In the central nervous system, moderate gliosis was observed in two kids at 60 dpi, meningeal congestion (at the four necropsy times), lymphocyte infiltrate, satellitosis, and demyelination (one kid).

3.6. Viral load

Viremia was detected through *q*PCR, starting at 5 dpi, with an average of 3.85 log₁₀, remaining until the end of the experiment, 90 dpi (3.71 log₁₀) (Figure 3). The highest proviral load was recorded at 90 dpi, with an average of 5.18 log₁₀ ($P < 0.05$). The mean proviral load in the analyzed organs between groups was significantly higher ($P < 0.05$) in the cerebellum (5.56 log₁₀) than in the brain (4.53 log₁₀) and synovial membrane (3.92 log₁₀). The comparison in the mean of the organ proviral load by intragroup showed that the quantification in the choroid plexus (6 log₁₀) and cerebellum (5.99 log₁₀) was significantly higher ($P < 0.05$) with respect to the brain and synovial membrane at 20 and 40 dpi, respectively. At 60 dpi, synovial fluid was the sample that presented the highest proviral load (5.71 log₁₀), which was significantly higher ($P < 0.05$) than the average recorded in the thymus (4.25 log₁₀). In all organs, proviral DNA could be detected until the last sampling (90 dpi) (Table 5). No positivity was detected in any of the samples of the control kid.

4. Discussion

SRLV is one of the main sanitary problems in goats, and the infection gives rise to a chronic disease that leads to degenerative alterations, diminishing the productive yields of the animals (Larruskain & Jugo, 2013). The virus is circulating worldwide, and very few countries are free of it or have a low incidence. In Mexico, several studies have demonstrated the circulation of SRLV. One of the possible entrance routes of SRLV in the 1980s was through the importation of goats from the USA. In 1984, the first serological evidence was reported, using the agar gel immunodiffusion assay, detecting 5.8% of positive animals imported from the USA (Adams et al., 1984). Afterward, Nazara et al. (1985) provided more evidence on the entrance of lentiviruses by the importation of goats from this same country, detecting a 27% positivity. In Guanajuato and the Estado de México, Adams et al. (1984) reported frequencies of 0.78 and 5%, respectively. Nazara et al. (1985) detected 25.6, 29, and 29.6% frequencies in the North, Central, and South regions of Mexico, respectively. In contrast, in the Yucatan Peninsula, in 2000, only a 0.4% seroprevalence was detected (Torres-Acosta et al., 2003). Recently, Mendiola et al. (2019) reported a 33.6% general seroprevalence,

positioning the states of Querétaro, Veracruz, and Guanajuato with the highest indices. In the present study, the distribution of seropositive animals over the analyzed years (2009-2018) was 11.6% (203/1743), identifying states with high seropositive rates (Sinaloa, Querétaro, and Mexico City). Seropositive goats correspond to 53.9% of animals with at least one characteristic sign of SRLV infection. Based on this information, 46% of goats with signs were not positive on the ELISA test, which can have repercussions for the control of the disease if diagnosis is based only on this serological test. In the same way, the presence of different antigenic types could affect these results, according to what was proposed by Nogarol et al., 2019. According to previous data, in this study, it was decided to perform a PCR test in parallel (Sánchez et al., 2016), identifying a 19.6% prevalence in relation to the total population. In proportion to the total number of animals with signs, 91% of positive goats were detected. This result is related to the stage of the infection and the development of clinical disease, in which the viremia stage was detected, which can last for several months (Brajon et al., 2012). In reports from Mexico, 66% positivity has been detected in goats with arthritis (Ramírez et al., 2011). In a population of 1383 goats (randomly sampled), in which only 1.8% presented clinical signs (14 arthritis and 11 mastitis), 5.4% of positive animals were found (Mendiola et al., 2019). It is important to note that to obtain a higher detection rate, it is advisable to collect samples from goats that show an associated sign, since this way the detection of positive animals by PCR can be improved (reducing the number of false-negative animals using this methodology) (Ravazzolo et al., 2006; Herrmann-Hoesing et al., 2009). Through differential real-time PCR of subtypes A and B of SRLV (Kuhar et al., 2013), 73 goats were positive for genotype B in the present study, and no sample was positive for genotype A. In Mexico, the SRLV associated with caprine arthritis encephalitis (CAE) has been detected since 1984 (Nazara et al., 1984). Later, in 1999, Daltabuit et al. (1999) performed the first viral isolation; however, this virus was not genotyped. It was not until 2011 that it was possible to genotype the SRLV in Mexico, identifying subtype B1 as the one causing the clinical signs in natural infections (Ramírez et al., 2011). Currently, genotype B has been identified (based on LTR sequences) in goats and sheep (Mendiola et al., 2019). The pathogenesis of the SRLV-genotyped strains prevalent in Mexico has not been characterized in any case. The isolate obtained by Daltabuit et al. (1999) was confirmed by the amplification of a 249-bp region of the *gag* gene using primers specifically designed for the CAEV-type virus (genotype B), and the presence of genotype A was discarded due to the null amplification when using primers for the ovine lentivirus. In the present study, from the clinical follow-up of two goats positive for SRLV, it was possible to isolate and characterize a viral strain. In these goats infected naturally, signs of arthritis were detected, and a higher viral load was identified in organs

of the nervous and articular systems. For viral isolation, primary cultures of testicles and epididymis were used according to Lamara et al. (2013), which led to the identification of the cytopathic effect and immunoreactivity of cultures at 96 h after infection. Other studies have employed primary cultures of synovial membrane, goat milk epithelial cells (Mselli-Lakhal et al., 1999), and, recently, spleen macrophages (Colitti et al., 2019). Based on the phylogenetic studies of the *gag* and *env* genes, the strain SRLV/Goat/Mx/INIFAP-1/2013 was allocated to genotype B1. In the analysis, using reference sequences, it was found that the obtained strain has a high similarity with strains of Chinese origin (97.93-93.15%), but with a common origin from the Clements strain (92%) and the FESC-752 strain (91.8%), the latter strain being previously reported in Mexico (Ramírez et al., 2011). During the experimental infection of kids, no acute signs of the disease were observed. Viremia was observed from 5 dpi until the end of the experiment (90 days). In experimental studies performed in goats, a long duration has been observed in the detection of provirus in blood, ~570 dpi (subtype A4) (Deubelbeiss et al., 2014), 249 dpi (subtype B1) (Bertolotti et al., 2012), and 240 dpi (subtype E1) (Grego et al., 2018). In the analyzed organs, the highest viral load was recorded in the nervous system, lymphoid organs (tonsil and lymph nodes) and respiratory tract throughout the entire experiment. The aforementioned indicates the tropism of the virus in kids of this age. Other studies have determined that the viral load is influenced by the genotype, inoculation route, dose, and age of the experimental animals (Rachid et al., 2013; Turchetti et al., 2013; Grego et al., 2018). Another important factor is the duration of the study. The viral load can be associated with the microscopic injuries found, which included interstitial pneumonia, gliosis, and meningeal congestion. Some SRLV strains analyzed by other authors can generate similar clinical symptoms in kids or in adult animals (Grego et al., 2018). No antibodies against gp135 were detected during the analyzed time (90 dpi). This null humoral response has been found in previous studies and could be related to latent infection (provirus) or the regulation of the immune system (Crespo et al., 2016).

5. Conclusion

The analysis of samples from different years revealed that SRLVs are prevalent and that they maintain their distribution in the main goat-producing zones of Mexico. Hence, an organized intervention is required to diminish their prevalence and the clinical and economic impacts that the disease can induce in caprine production systems. Likewise, having SRLV-free herds will allow producers to market their animals as breed stock without restrictions and minimize the risk factors for disseminating this infection. A viral isolation model could be established, which can be useful for obtaining viral strains for further studies. The phylogenetic analysis allowed us to identify that the circulating genotype in goats pertains to gene group B, which can represent an advantage for the

control or eradication of the virus in controlled populations. The results from the present study allowed us to determine that infection with the SRLV/Goat/MX/INIFAP-1/2013 strain in kids produced a mild disease but with a prolonged viremia course. Sequence analysis of the virus in blood and antibodies in serum allowed identification of the best diagnostic tool and the type of samples to be used in early and advanced stages of the infection.

Acknowledgments

We thank the goat farmers for their cooperation in supplying the samples and thank Dr. Iván Sánchez Betancourt for the opportunity to perform the experiment in the isolating units of the FMVZ, UNAM. The present study was financed by project PAPIIT [IN220719] and *Recursos Fiscales-INIFAP* [SIGI: 1115534018]. J De la Luz received a scholarship from the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT), ID **516493**.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Adams, D.S., Oliver, R.E., Ameghino, E., DeMartini, J.C., Verwoerd, D.W., Houwers, D.J., Waghela, S., Gorham, J.R., Hyllseth, B., Dawson, M. 1984. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Rec.* 115, 493-495.
2. Bertolotti, L., Reina, R., Mazzei, M., Preziuso, S., Camero, M., Carrozza, M. L., Cavalli, A., Juganaru, M., Profiti, M., De Meneghi, D., Perona, G., Renzoni, G., Tursi, M., Bertoni, G., Rosati, S. 2013. Small ruminant lentivirus genotype B and E interaction: evidences on the role of Roccaverano strain on reducing proviral load of the challenging CAEV strain. *Vet. Microbiol.* 163, 33–41.
3. Brajon, G., Mandas, D., Liciardi, M., Taccori, F., Meloni, M., Corrias, F., Montaldo, C., Coghe, F., Casciari, C., Giammarioli, M., Orrù, G. 2012. Development and Field Testing of a Real-Time PCR Assay for Caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV). *Open Virol J.* 6, 82–90.
4. Colitti, B., Coradduzza, E., Puggioni, G., Capucchio, M. T., Reina, R., Bertolotti, L., Rosati, S. 2019. A new approach for Small Ruminant Lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains. *PloS One*, 14, e0212585.

5. Crespo, H., Bertolotti, L., Proffiti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Acutis, P. L., de Andrés, D., Reina, R., Rosati, S. 2016. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Vet. Microbiol.* 192, 152–162.
6. Daltaubuit Test, M., de la Concha-Bermejillo, A., Espinosa, L. E., Loza Rubio, E., Aguilar Setién, A. 1999. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can J Vet Res.* 63, 212–215.
7. Deubelbeiss, M., Blatti-Cardinaux, L., Zahno, M. L., Zanoni, R., Vogt, H. R., Posthaus, H., Bertoni, G. 2014. Characterization of small ruminant lentivirus A4 subtype isolates and assessment of their pathogenic potential in naturally infected goats. *Virology* 11, 65.
8. Glaria, I., Reina, R., Crespo, H., de Andrés, X., Ramírez, H., Biescas, E., Pérez, M. M., Badiola, J., Luján, L., Amorena, B., de Andrés, D. 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet. Microbiol.* 138, 156–162.
9. Grego, E., Lacerenza, D., Arias, R. R., Proffiti, M., Rosati, S. 2009. Serological characterization of the new genotype E of small ruminant lentivirus in Roccaverano goat flocks. *Vet. Res. Commun.* 33, 137–140.
10. Grego, E., Reina, R., Lanfredini, S., Tursi, M., Favole, A., Proffiti, M., Lungu, M. M., Perona, G., Gay, L., Stella, M. C., DeMeneghi, D. 2018. Viral load, tissue distribution and histopathological lesions in goats naturally and experimentally infected with the Small Ruminant Lentivirus Genotype E (subtype E1 Roccaverano strain). *Res. Vet. Sci.* 118, 107–114.
11. Herrmann-Hoesing, L. M., Noh, S. M., White, S. N., Snekvik, K. R., Truscott, T., Knowles, D. P. 2009. Peripheral ovine progressive pneumonia provirus levels correlate with and predict histological tissue lesion severity in naturally infected sheep. *Clin. Vaccine Immun.* 16, 551–557.
12. King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., Carstens, E. B. (Eds.). (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9). Elsevier.
13. Kuhar, U., Barlič-Maganja, D., Grom, J. 2013. Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. *BMC Vet Res.* 9, 172.
14. 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. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 397–404.

15. Larruskain, A., Jugo, B. M. 2013. Retroviral infections in sheep and goats: small ruminant lentiviruses and host interaction. *Viruses*. 5, 2043–2061.
16. Li, Y., Zhou, F., Li, X., Wang, J., Zhao, X., Huang, J. 2013. Development of TaqMan-based qPCR method for detection of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *Arch. Virol.* 158, 2135–2141.
17. Mendiola, W., Tórtora, J. L., Martínez, H. A., García, M. M., Cuevas-Romero, S., Cerriteño, J. L., Ramírez, H. 2019. Genotyping Based on the LTR Region of Small Ruminant Lentiviruses from Naturally Infected Sheep and Goats from Mexico. *BioMed Res. Int.* 2019, 4279573.
18. Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J. J., García-Marín, J. F., de Andrés, D., Luján, L., Amorena, B., Juste, R. A. 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet Microbiol.* 181, 75–89.
19. Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Du, J., Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Balleydier, S., Mornex, J. F., Chebloune, Y. 1999. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology*. 259, 67–73.
20. Nazara, S.J., Trigo, F.J., Suberbie, E., Madrigal, V. 1985. Serologic survey of caprine arthritis encephalitis in Mexico [Estudio serológico de la artritis-encefalitis caprina en México]. *Rev. Mex. Cie. Pec.* 48, 98–101.
21. Nogarol, C., Bertolotti, L., Klevar, S., Profiti, M., Gjerset, B., Rosati, S. 2019. Serological characterization of small ruminant lentivirus: a complete tool for serotyping lentivirus infection in goat. *Small Rum Res.* 176, 42–46.
22. Pisoni, G., Bertoni, G., Manarolla, G., Vogt, H. R., Scaccabarozzi, L., Locatelli, C., Moroni, P. 2010. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology*. 407, 91–99.
23. Rachid, A., Croisé, B., Russo, P., Vignoni, M., Lacerenza, D., Rosati, S., Kuźmak, J., Valas, S. 2013. Diverse host-virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats. *J Gen Virol.* 94, 634–642.
24. Ramírez, H., Glaria, I., de Andrés, X., Martínez, H. A., Hernández, M. M., Reina, R., Iráizoz, E., Crespo, H., Berriatua, E., Vázquez, J., Amorena, B., de Andrés, D. 2011. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *Vet. J.* 190, 169–172.
25. Ramírez, H., Reina, R., Amorena, B., de Andrés, D., Martínez, H. A. 2013. Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses*. 5, 1175–1207.

26. 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, 116–127.
27. Reina, R., Mora, M. I., Glaria, I., García, I., Solano, C., Luján, L., Badiola, J. J., Contreras, A., Berriatua, E., Juste, R., Mamoun, R. Z., Rolland, M., Amorena, B., de Andrés, D. 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res.* 121, 189–198.
28. Sánchez, J. H., Martínez, H. A., García, M. M., Garrido, G., Gómez, L., Aguilar, J. A., de Andrés, D. F., Reina, R., Ramírez, H. 2016. The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology*, 86, 1953–1957.
29. Shah, C., Huder, J. B., Böni, J., Schönmann, M., Mühlherr, J., Lutz, H., Schüpbach, J. 2004. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J Virol.* 78, 7518–7522.
30. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
31. Torres-Acosta, J.F., Gutiérrez-Ruiz, E.J., Butler, V., Schmidt, A., Evans, J., Babington, J., Bearman, K., Fordham, T., Brownlie, T., Schroer, S., Cámara, E., Ligtsey, J. 2003. Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small Rumin. Res.* 49, 207–211.
- Turchetti, A. P., Paniago, J. J., da Costa, L. F., da Cruz, J. C., Braz, G. F., Gouveia, A. M., Paixão, T. A., Santos, R. L., Heinemann, M. B. 2013. Distribution of caprine arthritis encephalitis virus provirus, RNA, and antigen in the reproductive tract of one naturally and seven experimentally infected bucks. *Theriogenology*, 80, 933–939.

Mexico City, October 09, 2020

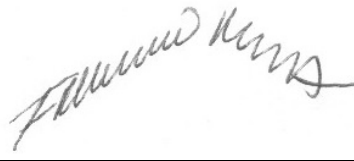
Laboratorio de Virología
Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

To: S.Y. Landau

Editor-in-Chief, Small Ruminant Research

Dear Editor,

We are sending the manuscript entitled **“Prevalence, molecular detection, and pathological characterization of small ruminant lentiviruses in goats from Mexico”** to be potentially be published as a research article at **Small Ruminant Research**. This manuscript is product of the work of Jazmín De la Luz-Armendáriz, Andrés Ernesto Ducoing-Watty, Humberto Ramírez Mendoza, Luis Gómez-Núñez, Catalina Tufiño-Loza, Eduardo Martín Cabrera Domínguez, Efrén Díaz Aparicio and José Francisco Rivera-Benítez. All of us have contributed to this work and we agree on its potential publication. We have agreed that Dr. Francisco Rivera-Benitez will act as corresponding author on our behalf regarding any subsequent processing of the paper.



Dr. José Francisco Rivera Benítez

Principal Researcher

CENID-MA, INIFAP

Mexico City, MX

Mexico City, October 09, 2020


Laboratorio de Virología
Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

To: S.Y. Landau

Editor-in-Chief, Small Ruminant Research

Dear Editor,

The authors of the manuscript entitled **“Prevalence, molecular detection, and pathological characterization of small ruminant lentiviruses in goats from Mexico”**, Jazmín De la Luz-Armendáriz, Andrés Ernesto Ducoing-Watty, Humberto Ramírez Mendoza, Luis Gómez-Núñez, Catalina Tufiño-Loza, Eduardo Martín Cabrera Domínguez, Efrén Díaz Aparicio and José Francisco Rivera-Benítez declare that they have **no conflicts of interest**.



Dr. José Francisco Rivera Benítez

Principal Researcher

CENID-MA, INIFAP

Mexico City, MX