



**Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Buenos Aires**



**IIACS Salta (INTA) IABIMO (INTA-Conicet)  
IdAB (CSIC-Gobierno de Navarra)**

*Trabajo para optar por el título de doctor de la Universidad de Buenos Aires*

**“IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS  
DE ARTRITIS Y ENCEFALITIS CAPRINA EN LA PROVINCIA DE  
SALTA”**

**Tesista: Vet. Msc. Ana Mariela Dodero  
Directora: Dra. Andrea Verónica Peralta  
Codirector: Dr. Ramsés Reina Arias**

**20 DE JUNIO DE 2023**

**UBA INTA CONICET CSIC**



## DEDICATORIA

A Julen Ernesto, lo mejor que me dio la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis ha sido un gran esfuerzo personal, que solo pudo ser llevado a cabo por y gracias a mucha gente.

Es por ello que es justo y necesario agradecer...

.-Para comenzar al INTA, que me dio la oportunidad de iniciarme y continuar desarrollándome en el fascinante mundo de la ciencia, pero también a las decisiones políticas que apostaron e invirtieron en ciencia y tecnología.

.-A los subsidios ICOOP y EMHE que a través del CSIC financiaron los viajes y estancias en España y Argentina del grupo de trabajo. También al pueblo argentino, que financió la realización de este ensayo a través de fondos INTA y de los proyectos Valles Templados (PRET 1232102), Valles Áridos (PRET 1232101), Chaco Norte (PRET 1232207) y PNSA 11150-54-55, que permitieron la obtención de todo el material biológico utilizado.

.-A Andrea Peralta, que es más que mi directora de tesis. Una colega con la que empezamos a trabajar cuando yo era una loca desconocida que a 1600 km de distancia le hacía propuestas y le enviaba muestras biológicas sin tener un centavo para aportar. La que se subió conmigo a este barco y proyecto sabiendo que íbamos a tener facilitadas algunas cosas imposibles para nosotras, pero que de todas formas la tarea que nos esperaba iba a ser cuasi titánica. Gracias por tu inmensa calidad humana, por seguir siempre sosteniendo el timón a pesar de todas las marejadas que surgieron. La mejor directora que puede tener.

.-A mis compañeros de Área, con lo que siempre nos complementamos y tantas manos me dieron. Al Tano que siempre estuvo al pie del cañón cada vez que llegamos con una barbaridad de muestras a procesar. A Juan, siempre dispuesto a algún ensayo de resultados promisorios. A Lean y los mas nuevecitos, permanentemente dispuestos a pinchotear una cabra express. Sin olvidarme del imprescindible, Víctor Suarez, que fue quién me recibió en Salta y estuvo apoyándome, ayudándome y animándome en cada una de las propuestas y ensayos presentados, como el que terminó en tesis doctoral. También tengo que agradecerle al Dr. Radrizani que me recordase, que ninguna sumatoria de negaciones puede con mi voluntad y ganas de hacer cosas.

.-A mi codirector de tesis Ramsés Reina y al CSIC, por brindarme las herramientas que no podríamos haber obtenido de otra forma para la realización de esta tesis y por mostrarme formas diferentes de trabajar y de ver la vida.

.-A Marcela Martínez y a los chicos del tambo de la EEA Salta, José y Emilio Alfaro. Por permitirme trabajar con los animales, compartir datos, desordenarles la vida cotidiana y darle trabajo extra que han realizado de maravilla. Un verdadero placer trabajar con ustedes.

.-Al Laboratorio Calier que nos donó el desinfectante Despadac, utilizado en esta tesis.

.-A Gloria Payo, que jubilada y en grupo de riesgo se atrevió a venirse a mi casa en plena pandemia para ayudarme con el análisis estadístico.

.-A Eva Cafrune por su apoyo, gestión y calidad humana.

.-A Osvaldo Zabal por todo su impecable trabajo y dedicación en el área de cultivos celulares.

.-A Javier Schapiro por estar siempre dispuesto y facilitarme los corderos para pellizcar.

.-A Marcelo Berreta por salvarme el fragmento con sílica gel, también a Irma Fuxan y Maxi Ortiz.

.-A mi familia de sangre, especialmente a mis padres que me hicieron quien soy y me apoyaron en todo lo que pudieron, muchas veces sin estar de acuerdo con mis decisiones.

.-También mi familia salteña: a todo mi amado clan de Aires (Néstor, Flor, Rodrigo, Paulet, Facu, Cristina, prole... y más) que si los nombro a todos necesito una página extra, a Bibi Urzagasti y Ramiro Moreno que me hicieron parte de su familia como yo de la mía.

.-A mis amigos de la vida, “la familia por elección”, los que siempre están para darme una mano o un sacudón cuando corresponde. A los que les invado la casa y los uso de pensión cuando están o no están y siempre me miman con o sin “Porote”. Perdonen que no pueda escribir los nombres de todos.

.-A mis compañeras del IdAB que tanta mesada y varias cosas más compartimos.

.-A mis colegas Laurene, Erku, Henar, Amaia, Carmen, Sara.

.-A mi Lorito La Fuente, por hacerme la vida más fácil y llevadera.

.-A Alexandra Elbakyan con su proyecto Sci Hub, gracias por desarancelar el conocimiento.

.-A Sergio Cortéz, que, aunque no puedas leer estas líneas sabes más que nadie todo lo que te agradezco desde muestreos, asados y tantas otras cosas que ni siquiera las podría poner en este apartado pero que recordaré el resto de mi vida. Se te extraña.

.-A David Trapote, que, sin su apoyo incondicional, su insistencia y su inmensa humanidad, no hubiera sido capaz de seguir adelante con todo. El mejor compañero de vida que pueda tener.

.-Y por sobre todas las cosas, gracias a esa lucecita que me regaló la vida en medio de esta tesis, que hoy se llama Julen Ernesto y que me hace levantar todas las mañanas y luchar por un mundo mejor y más justo para todos.

# ÍNDICE

**Dedicatoria ii**

**Agradecimientos iii**

**Lista de Abreviaturas xi**

**1. Resumen 1**

**2. Introducción 3**

2.1 Historia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes 3

2.2 Importancia en la producción animal 6

2.3 Estructura de los SRLV 8

**Figura 1:** Virión de lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV). 8

2.3.1 Genoma de los SRLV 9

2.3.2 Genes estructurales 9

2.3.3 Genes regulatorios 10

**Figura 2:** Estructura genómica de los SRLV. 11

2.4 Ciclo de infección 11

2.4.1 Entrada a la célula 11

2.4.2 Retro transcripción (RT) 11

2.4.3 Integración 12

2.4.4 Transcripción y expresión de proteínas virales 12

2.4.5 Ensamblaje y salida 12

**Figura 3:** Ciclo viral de SRLV. 13

2.4.6 Maduración 13

2.5 Mecanismos patogénicos de los SRLV 13

2.5.1 Viremia inicial 14

2.5.2 Seroconversión 14

2.5.3 Latencia 14

**Figura 4:** Estrategia del “Caballo de Troya” del virus VMV. 15

2.5.4 Signología y formas clínicas 15

**Figura 5:** Patología articular. 16

<b>Figura 6:</b>	Patología afectando las bolsas del ligamento nuczal de un animal.	16
<b>Figura 7:</b>	Lesiones macroscópicas de la articulación tarsal de animales.	17
<b>Figura 8:</b>	Fotografía con microscopio óptico común de un cuadro articular (hematoxilina/eosina 100x).	17
<b>Figura 9:</b>	Imágenes de mastitis intersticiales en animales con CAEV.	18
2.5.5	Muerte	20
2.6	Vías de transmisión	20
2.6.1	Transmisión horizontal	21
2.6.2	Transmisión vertical	22
2.7	Tropismo del virus	23
2.8	Clasificación	25
<b>Figura 10:</b>	Genotipos y subtipos de SRLV y especie de rumiante de la que fue aislado.	26
2.9	Relaciones filogenéticas	26
2.10	Diagnóstico	27
2.10.1	Métodos serológicos	27
<b>Figura 11:</b>	Fotografía de una IDGA.	28
<b>Figura 12:</b>	ELISA indirecto.	30
2.10.2	Diagnóstico clínico	31
2.10.3	Diagnóstico viral	32
<b>Figura 13:</b>	Microscopía electrónica de SRLV.	33
2.11	Control de SRLV	36
2.11.1	Vacunas y tratamiento	36
2.11.2	Medidas de control	37
<b>3.</b>	<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>40</b>
3.1	Hipótesis:	40
3.2	Objetivos:	40

3.2.1	Objetivo General	40
3.2.2	Objetivos Específicos	40
<b>4.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>41</b>
4.1	Animales	41
4.2	Características de las explotaciones y particularidades	42
4.3	Toma de muestras y conservación	43
4.3.1	Sangre periférica:	43
4.3.2	Líquido articular	44
4.3.3	Leucocitos para cultivo <i>in vitro</i>	44
4.3.4	Tejido dérmico:	44
4.3.5	Muestras para histopatología	45
4.4	Remisión de muestras	45
4.5	Caracterización molecular de cepas	45
4.5.1	Extracción de ADN	45
4.5.2	PCRs utilizadas	46
4.5.3	Clonación y análisis de secuencias	47
4.5.4	Desarrollo y puesta a punto de PCRs para el diagnóstico de SRLV	48
	<b>Figura 14:</b> Lugar de reconocimiento de los cebadores.	48
4.6	Cribado serológico	49
4.6.1	ELISAs indirectos comerciales	49
4.6.2	Prueba de péptidos sintéticos para la detección de cepas argentinas	49
4.6.3	Clonado y expresión de la proteína p25 de SRLV salteños	50
4.7	Aplicación de medidas de manejo para SRLV	53
4.8	Desarrollo y caracterización de cultivos primarios	55
4.9	Aislamiento de SRLV	56
4.10	Análisis estadístico	57
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	<b>60</b>
5.1	Estado inicial del Hato 17138	60
5.1.1	Forma Articular:	60
	<b>Figura 15:</b> Afección carpal unilateral izquierda en un animal joven.	61

<b>Figura 16:</b> Afección tarsal y de las bolsas nucales.	62
<b>Figura 17:</b> Artritis carpales.	62
<b>Figura 18:</b> Histopatología de un caso clínico.	63
<b>Figura 19:</b> Animales con mal estado general producto de la patología clínica.	63
5.1.2 Forma Mamaria	64
<b>Figura 20:</b> Animal con mastitis y secado temprano del hato 17138.	64
5.1.3 Forma Nerviosa	64
5.1.4 Forma Pulmonar	64
5.2 Cribado serológico	64
5.2.1 ELISAs comerciales	65
5.2.2 Péptidos sintéticos	66
5.3 Caracterización molecular de las cepas	67
5.3.1 PCR utilizadas	67
<b>Figura 21:</b> Gel de la nPCR.	68
<b>Figura 22:</b> Gel de la PCR OSLO-POL-R2	68
5.3.2 Secuenciación y análisis de las secuencias	68
<b>Figura 23:</b> Alineamiento de las secuencias salteñas.	69
<b>Figura 24:</b> Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la nPCR (fragmento de 800pb).	71
<b>Figura 25:</b> Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de <i>Fw227/Rv700</i> y <i>nG2/500</i> (fragmentos de 500pb).	73
<b>Figura 26:</b> Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la <i>nG2/M3</i> y <i>M3</i> (fragmento de 300pb).	75
5.3.3 Desarrollo y puesta a punto de PCR para el diagnóstico de SRLV	76
<b>Figura 27:</b> Gel de la PCR M3.	76
<b>Figura 28:</b> Gel de la PCR <i>nG27M3</i> .	77

<b>Figura 29:</b> Gel de la PCR <i>Fw191/Rv738</i>	77
<b>Figura 30:</b> Gel de la PCR <i>Fw227/Rv700</i> .	77
<b>Figura 31:</b> : Gel de la PCR <i>nG2/500</i> .	78
5.3.4 Resultados moleculares de los hatos	78
5.3.5 Proteína p25	79
<b>Figura 32:</b> Gel de la PCR p25B1.	79
<b>Figura 33:</b> <i>WB</i> de proteínas totales de clones <i>E. coli BI21 pLys</i> .	80
<b>Figura 34:</b> <i>SDS-PAGE</i> con cantidades crecientes de seroalbúmina bovina.	80
<b>Figura 35:</b> <i>WB</i> de p25.	81
<b>Figura 36:</b> Resultados del ELISA a partir de la p25 recombinante.	82
<b>Figura 37:</b> Resultados del ELISA a partir de la p25 recombinante.	83
5.4 Desarrollo y caracterización de cultivos primarios	83
<b>Figura 38:</b> Monocapas Eca, Eov y Aca.	85
5.5 Aislamiento de SRLV	86
<b>Figura 39:</b> Efecto citopático sobre células Aca, Eca y Eov.	86
<b>Figura 40:</b> Gel de agarosa de la nPCR a partir de las células Aca en cultivo.	87
5.6 Ensayo de aplicación de medidas de manejo para el control de los SRLV	88
5.7 Análisis socioeconómico y productivo	89
5.7.1 Distribución geográfica de los hatos	89
<b>Figura 41:</b> Mapa de distribución de los hatos.	90
5.7.2 Caracterización de los hatos	91
5.7.3 Sistemas de producción en las diferentes ecorregiones	91
5.7.4 Representaciones gráficas de variables cuantitativas	95
<b>Figura 42:</b> Seroprevalencia según tipo de establecimiento.	95

<b>Figura 43:</b> Seroprevalencia según ecorregión, método de cría y tipo de establecimiento.	96
<b>Figura 44:</b> Seroprevalencia según tipo de ordeño, método de cría y tipo de establecimiento en rangos.	96
5.7.5 Análisis de asociación de factores de riesgo	97
<b>6. Discusión</b>	<b>101</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>123</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>124</b>
<b>9. Anexo I</b>	<b>157</b>
9.1 Protocolos	157
9.1.1 Perfiles térmicos y condiciones de PCR	157
9.2 Figuras	160
<b>Figura 1:</b> Alineamiento completo del fragmento de la nPCR	163
<b>Figura 2:</b> Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la nPCR (fragmento de 800pb).	164
<b>Figura 3:</b> Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de <i>Fw227/Rv700</i> y <i>nG2/500</i> (fragmento de 500pb).	165
<b>Figura 4:</b> Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de <i>nG2/M3</i> y <i>M3</i> (fragmento de 300 pb).	166
9.3 Tablas	167
9.3.1 Encuesta socioeconómica, productiva y sanitaria	167
9.3.2 Tabla 1: Matriz de entre todas las cepas argentinas y los subtipos B1.	174
9.3.3 Tabla 2: Tipo de producción de los establecimientos utilizados en esta tesis.	175
9.3.4 Tabla 3: Manejo alimentario y sanitario de los establecimientos utilizados en esta tesis	176
9.3.5 Tabla 4: Estadísticos descriptivos de las unidades productivas utilizadas en esta tesis.	177

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Aditivos
AAT	<i>Alpha antitripsin 1</i>
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AC	Antes de Cristo
Aca	Cultivo primario de células articulares caprinas
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AGP	<i>Alpha 1 glycoprotein</i>
Anti-His	Anti histidina
APO	Adenomatosis pulmonar ovina
APOBEC3	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3</i>
APS	<i>Amoniun persulfate</i>
ARN	Ácido ribo nucléico
ARNm	Ácido ribo nucléico mensajero
ARNasaH	Enzima que hidroliza ARN
ATB	Antibiótico
ATM	Antimicótico
BCIP	Bromo chloro indolyl phosphate
BIV	<i>Bovine immunodeficiency virus</i>
Bov	Bovino
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CA	Proteína de la cápside (SRLV)
NC	Proteína de la nucleocápside (SRLV)
CAEV	<i>Caprine arthritis-encephalitis virus</i>
CAE	<i>Caprine arthritis-encephalitis</i> (enfermedad)
CFT	Complement <i>fixation test</i>
CG	Células gigantes
Chi <sup>2</sup>	Chi Cuadrado
cm	Centímetro
cM	Centimorgan
CMT	<i>California mastitis test</i>
COM	Establecimiento lechero comercial (Tambo comercial)
Cp	Ceruloplasmina
CRP	<i>C reactive protein</i>
CS	Chaco salteño
c.s.p	Cantidad suficiente para
CV	Coeficiente de variación
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DE	Desvío estándar
Eca	Cultivo primario epitelial caprino
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEA Salta	Estación Experimental Agropecuaria Salta (INTA)
EIAV	<i>Equine infectious anemia virus</i>
Eov	Cultivo primario epitelial ovino

ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ENV	Glicoroteínas de la envoltura (SRLV)
FA	Fosfatasa alcalina
FAM	Establecimiento familiar
FAM C	Establecimiento familiar capitalizado
FAMACHA	<i>Faffa Malan chart index</i>
Fb	Fibrinógeno
FCIP	<i>Fluorescent cell immunoperoxidase</i>
FIV	<i>Feline immunodeficiency virus</i>
FT	Factor de transcripción
g	Gramos
GAG	Proteínas antigénicas grupo específicas (SRLV)
GC	Cría en guachera colectiva
GLM	<i>General linear model</i>
GSM	<i>Goat synovial membrane</i>
GSM-T	<i>T-immortalized goat synovial membrane</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
Hp	<i>Haptoglobin</i>
HPX	Hemopexina
h	Horas
IC	Intervalo de confianza
IDGA	Inmunodifusión en gel de agar
IHQ	Inmunohistoquímica
IJAACS	Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido
IABIMO	Instituto de Agro Biotecnología y Biología Molecular
IATF	Inseminación artificial a tiempo fijo
IdAB	Instituto de Agro Biotecnología
IFN	Interferón
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
IN	Integrasa (SRLV)
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISH	<i>In situ hybridation</i>
IV	Instituto de Virología
K	Índice de kappa
kg	Kilogramo
KDa	Kilo Dalton
LA	Líquido articular
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Molar
MA	Proteína de la matriz (SRLV)
MAGyP	Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MERCOSUR	Mercado Común del Sur
mA	Miliamper
MEM-D	Medio Eagle modificado de Dulbecco

Mili Q	Agua ultra pura obtenida por ósmosis reversa
mg	Miligramo
Minagri	Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación argentino
ml	Mililitro
mM	Mili Molar
MV	Maedi Visna (Enfermedad)
VMV	Virus Maedi Visna
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mm	Milímetro
μ	Micra
μl	Microlitro
N	Tamaño muestral
NC	Proteína de la nucleocápside
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NOA	Noroeste argentino
OD	<i>Optical density</i>
OIE Animal)	Oficina Internacional de Epizootias (Organización Mundial de Sanidad)
OR	<i>Odds Ratios</i>
ORFV/Orf	<i>Parapoxvirus ovis</i>
OSF	<i>Ovine skin fibroblasts</i>
pb	Pares de bases
PBL	Peripheral blood leukocytes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PCRn	<i>Polimerase chain reaction nested</i>
PFA	Proteínas de la fase aguda
PIC	<i>Preintegration complex</i>
<i>PMEA</i>	<i>9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenin</i>
PR	Preoteasa (SRLV)
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>
QA	Valles y quebradas áridas
RBC	<i>Red blood cells</i>
RIA	Radioinmunoensayo
RIPA	Radioinmunoprecipitación
RL	Regresión logística
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Transcriptasa inversa (SRLV)
RT-PCR	<i>Reverse transcription-PCR</i>
S	Sincitios
SAA	<i>Serum amilodeim A</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>

SFB	Suero fetal bovino
SL	Solución salina
SLS	Lauril sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
Sobr. LA	Sobrenadante del cultivo de líquido articular
Sobr. MO	Sobrenadante del cultivo de monocitos
SRLV	<i>Small ruminant lentivirus</i>
SRB	Síndrome respiratorio Bovino
STE	Sodio-Tris-EDTA
SU	Glicoproteína de superficie (SRLV)
Ta	Temperatura de <i>annealing</i>
TAE	Tris- acetato- EDTA
TBE	Tris-Bórico-EDTA
TD	Tampón de dilución
TE	Tris-EDTA
TIGEF	<i>T-antigen immortalized goat epithelium fibroblasts</i>
TIGMEC	<i>T-antigen immortalized goat milk epithelial cells</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TM	Glicoproteína de transmembrana (SRLV)
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
Tf	Transferrina
TRAD	Método de cria tradicional
TTR	Transtiretina
Tris	Hidroximetil aminometano
U	Unidades
UI	Unidades internacionales
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
V	Voltio
VT	Valles templados
W	<i>Watt</i>
WB	<i>Western Blotting</i>
WBC	<i>White blood cells buffer</i>

## 1. RESUMEN

Los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (SRLVs) están presentes en todo el mundo y se ha descrito su presencia en la provincia de Buenos Aires en 2017, sin embargo, se desconoce la extensión de la infección y su importancia en la provincia de Salta. El objetivo del trabajo fue identificar, aislar y caracterizar molecularmente los SRLVs presentes en la provincia de Salta para detectar las estirpes circulantes y desarrollar métodos diagnósticos con los que diseñar planes de control. Se muestrearon 927 animales adultos de 32 hatos distribuidos en tres ecorregiones, Chaco Salteño (CS), Valles y Quebradas Áridas (QA) y Valles Templados (VT), acompañados por una encuesta socioeconómica y productiva de cada lugar. Uno de los establecimientos se utilizó como rebaño experimental para la toma de muestras biológicas, práctica de medidas de manejo y seguimiento clínico de un caso testigo. Se cribaron los hatos con ELISAs indirectos comerciales y se realizaron pruebas de concordancia entre ellos. La seroprevalencia general fue de 8,26% y por ecorregiones fue de 9,17% en CS, 6,48% en QA y 11,35% en VT. Se obtuvieron secuencias de la región *gag* que permitieron la caracterización molecular de las cepas como subtipo B1, el desarrollo de PCRs diagnósticas específicas y la expresión y purificación de la proteína recombinante vírica p25, seguida de la realización de los primeros pasos en la evaluación de su uso potencial en un ELISA indirecto. Se produjeron y caracterizaron cultivos primarios de origen ovino y caprino y se desafiaron con inóculos virales obteniéndose efectos citopáticos, sin éxito a la hora de aislar estirpes virales infectivas. A partir de los datos de la encuesta, se realizó un análisis de factores de riesgo para la presencia de la infección, hallando un riesgo mayor si el hato no realiza desparasitaciones o emplea ordeño mecánico y crianza en guachera colectiva. Finalmente, se propuso un protocolo de manejo para el control de los SRLVs basado en la identificación temprana de los animales infectados y elección de los indemnes para la reposición.

Los resultados reflejan la presencia de SRLV en la provincia de Salta probablemente derivada de la importación de animales; la importancia de la actividad ganadera en la zona estudiada; y la necesidad de elaborar planes de vigilancia específicos para su control, evitando así la diseminación de la infección.

## SUMMARY

Small Ruminant Lentiviruses (SRLV) are present worldwide and recently described in Buenos Aires province in 2017, however extension and infection importance in the Salta province is unknown. The aim of the study was to identify, isolate and molecularly characterize the SRLVs present in the Salta province in order to detect the circulating strains and develop diagnostic methods to be applied in control programs. About 927 adult animals were sampled from 32 herds distributed in three ecoregions, Chaco Salteño (CS), Valles y Quebradas áridas (VA) and Valles Templados (VT), together with a socio-economic and productive survey at each site. One of the farms was used as an experimental herd for biological sampling, practice of management measures and clinical follow-up of a control case. Herds were screened with commercial indirect ELISAs and concordance tests were performed. The overall seroprevalence was 8.26% and by ecoregion: 9.17% in CS, 6.48% in VA and 11.35% in VT. Sequences were obtained from the *gag* region, which allowed the molecular characterization of the strains as a B1 subtype, the development of specific diagnostic PCRs, and the expression and purification of the viral recombinant protein p25, followed by the first steps in the evaluation of its potential use in an indirect ELISA. Primary sheep and goat cultures were produced, characterised and challenged with viral inocula obtaining clear cytopathic effects, but unsuccessful in isolating infective strains. Based on the survey data, risk factor analyses for the presence of the infection were carried out, being more risky if the herd is not dewormed, mechanically milked or collectively bred. Finally, a management protocol was proposed for the control of SRLVs based on the early identification of infected animals and the selection of uninfected animals for restocking.

The results reflect the presence of SRLVs in the Salta province, probably derived from animal importations; the importance of livestock activity in the area studied; and the need to develop specific surveillance plans for SRLV control, thus avoiding the spread of the infection.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Historia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes

Los *lentivirus de los pequeños rumiantes* (SRLV), pertenecen a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*. Comparten su taxón con los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), anemia infecciosa equina (EIAV), inmunodeficiencia felina (FIV), inmunodeficiencia de los simios (SIV) y la inmunodeficiencia bovina (BIV).

Los SRLV forman un grupo con dos integrantes, el virus Maedi Visna (VMV) y el Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (CAEV), tomando su nombre de los animales y cuadros clínicos observados inicialmente (da Cruz et al. 2013). Sin embargo, hoy sabemos que ambos virus presentan importantes semejanzas filogenéticas y se transmiten naturalmente entre ovejas y cabras (Shah et al. 2004b), por ello son considerados miembros de un mismo grupo.

Los primeros reportes compatibles con la enfermedad datan de 1862 en ovinos Texel (Loman 1862), esta raza holandesa sería fuente de diseminación de la virosis a otras regiones. En 1915 la enfermedad fue descrita como un problema respiratorio crónico en ovejas de Sudáfrica, para luego ser reportado en Montana, Estados Unidos, en 1923 y 15 años más tarde en Islandia donde la patología finalmente fue atribuida a estos lentivirus (Sigurdsson et al. 1952). El origen de la enfermedad en el país nórdico, de donde proviene su nombre más conocido Maedi Visna (Maedi, disnea o respiración fatigosa y Visna, desgaste en islandés), parece remontarse a 1933. La importación de 20 carneros Karakul provenientes de Halle, Alemania, con la intención de realizar mejoras genéticas en la lana introdujo sus valiosos genes y tres enfermedades más: la paratuberculosis, el Maedi Visna (MV) y la adenomatosis pulmonar ovina (APO). La vacunación de la reposición mantuvo a raya a la paratuberculosis y la APO fue controlada en los siguientes años, a través del sacrificio total de los rebaños en los que aparecían animales afectados y de su sustitución por ovinos de zonas no afectadas; permitiendo identificar una enfermedad respiratoria (maedi) y otra nerviosa (visna) causadas por un nuevo agente etiológico. Con la misma metodología de sacrificio completo del rebaño afectado y repoblación con animales sanos se controlaron en 1965 ambas enfermedades (Maedi y Visna) antes de saber que eran producidas por un solo virus. Las pérdidas fueron muy cuantiosas, el número de animales muertos por la enfermedad y de animales sacrificados sobrepasó con creces los 800.000 (Luján et al. 1989). Se les debe a las investigaciones en Islandia de Sigurdsson y colaboradores (Sigurdsson et al. 1957; Sigurdsson 1954; Sigurdsson and Pálsson 1958), la primera clasificación de enfermedades de curso lento. El período de latencia puede variar desde varios meses hasta años, mientras el agente etiológico se propaga silenciosamente dentro del animal y contagia a otros, antes de causar

manifestaciones evidentes de enfermedad, que también es de curso prolongado y con desenlace fatal. Estos largos periodos de incubación fueron comparados por el autor con otras enfermedades que ingresaron con los carneros Karakul, la APO, la paratuberculosis y también el *scrapie* (Sigurdsson 1958; Sigurdsson 1956; Sigurdsson 1954; Sigurdsson 1952). El VMV fue aislado por primera vez en ovinos del brote islandés en 1960 (Sigurdsson et al. 1960), mientras que los primeros reportes en caprinos de Artritis y Encefalitis Caprina (CAE) son los descritos por la estadounidense Cork (Cork et al. 1974). El virus fue aislado por Narayan (Narayan et al. 1980) y también por Crawford (Crawford et al. 1980) en 1980. Otras investigaciones fueron reportando la presencia de la enfermedad en Suiza (Stunzi et al. 1964), Alemania (Stavrou et al. 1969), Japón (Nakagawa et al. 1971), Australia (O'Sullivan et al. 1978), Suecia (Sundquist 1981), Nueva Zelandia (Oliver et al. 1982), Gran Bretaña (Dawson et al. 1983), Canadá, Francia, Noruega, Kenia, México, Perú (Adams et al. 1984) y España (Badiola et al. 1983). Los estudios moleculares posteriores reclasificaron los SRLV en cuatro genotipos principales: el genotipo A (agrupa los aislados VMV), el genotipo B (agrupa los aislados clásicos de CAEV), y los genotipos C y E tan solo descritos en Noruega e Italia, respectivamente.

La presencia de SRLV es prácticamente mundial, a partir de estas primeras descripciones en Islandia y EEUU se han descrito animales seropositivos en todo el mundo. Si bien la mayoría de estudios se han centrado en Europa, estudios recientes ponen de manifiesto la presencia de la infección con estirpes mundialmente distribuidas (genotipos A y B) o geográficamente restringidas (genotipos C y E), en regiones poco exploradas hasta el momento como Asia, África (Carrozza et al. 2023) y sobre todo Sudamérica.

En Sudamérica, la situación epidemiológica no es clara, mientras que países como Paraguay, Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia figuran como libres de la enfermedad, la circulación viral es reconocida a nivel del Mercado Común del Sur (MERCOSUR) con la Resolución MERCOSUR N° 597/2014, publicada en el Boletín Oficial por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación argentino (Minagri), dado que es obligatorio realizar la determinación de SRLV en los animales para exportación o en los donadores de gametas reproductivas (Minagri 2014). La ausencia de notificaciones en algunos países podría ser consecuencia de la falta de una búsqueda activa de la enfermedad en planes de vigilancia, cribados serológicos, o reglamentación sobre la importación y movimiento de animales (OIE 2009a; 2009b; OIE 2005a; 2005b). Existe una clara discrepancia entre los datos epidemiológicos reportados en estudios de investigación y los declarados por los diferentes países a la OIE (de Miguel et al. 2021).

De los países limítrofes con la Argentina, Bolivia, en su reporte 2014 para la OIE, califica a CAE y MV como "Enfermedad nunca reportada" (Vargas Terán et al. 2014), aunque este país en 1996 declaró en la sección web de la OIE (sección HANDISTATUS II/ Incidencia de la

enfermedad por país): “Enfermedad presente con datos cuantitativos, pero el número de focos es desconocido”, no volviendo proporcionar datos de la circulación viral (OIE 2020a; OIE 2020b; OIE 2005a; OIE 2005b). Al igual que Bolivia, Paraguay en su reporte sanitario de 2009 declara: “Enfermedad nunca señalada” no sujeta a declaración obligatoria ni con la implicación de un sistema de vigilancia epidemiológica (Thiermann and González 2009). Como en el caso anterior, en la página web de la OIE, sección HANDISTATUS II/ Incidencia de enfermedad por país, se registran en 2007 y en 2009 “Enfermedad presente sin datos cuantitativos” y “Enfermedad limitada a una o más zonas” respectivamente, para a partir de ese momento enunciar: “Ausencia de la enfermedad” hasta la fecha (OIE 2020a; OIE 2020b; OIE 2005a; OIE 2005b).

La República Oriental del Uruguay en su reporte sanitario de 2014 para la OIE declaró CAE como: “Enfermedad presente”, en el listado de enfermedades de declaración obligatoria y sujeta a vigilancia epidemiológica. Mientras que para Maedi Visna, su estatus fue de: “nunca señalada” con declaración obligatoria (Hutter et al. 2014). Los focos declarados en HANDISTATUS II/Incidencia de la enfermedad por país de CAE discurren a partir del año 2011 y se continúan detectando hasta el momento (OIE 2020a; OIE 2020b; OIE 2005a; OIE 2005b).

Por su parte, Chile a través de la su Servicio Agrícola Ganadero del Ministerio de Agricultura (SAG) declaró ante la OIE la presencia de CAE desde el año 2001 y de Maedi Visna desde el año 2000 (SAG 2017) aunque Shuljak (Shuljak 2006) indica que las declaraciones de la presencia de Maedi Visna ante la OIE comienzan el 1988, presentando brotes intermitentes desde entonces. Las lentivirosis en este país son de declaración obligatoria, poseen un sistema de vigilancia epidemiológica e incluso cuentan con la certificación de establecimiento libre, con adhesión voluntaria desde 2013 (Ariztia Reyes 2013; Gómez Meza 2016). Es Urcelay quien realiza la primera referencia serológica sobre la circulación viral en Chile en 1993 (Urcelay et al. 1993), y para el año 2004 Chacón y Naranjo publican en el boletín oficial la erradicación de la enfermedad en dos regiones del país trasandino (Chacón and Naranjo 2004).

El Estado Federativo de Brasil, reconoce la existencia y circulación viral de SRLV desde 1996, con intermitencia de casos reportados (de Boer et al. 1978; Houwers and Nauta 1989; Minguijón et al. 2015; Pérez et al. 2013; Schipper et al. 1985) y al igual que Chile, posee un sistema nacional tendiente al control y erradicación de la enfermedad dependiente del Ministerio de Agricultura Pecuaria y Abastecimiento. Además, diferentes estados realizan sus propios programas de control (DEFESA 2001; Giovanna Coelho 2014; MAPA 2017). Brasil es el país sudamericano que más estudios y publicaciones ha realizado sobre esta virosis. Los primeros casos ocurrieron en caprinos de *Rio Grande do Sul* en 1986, luego en ovinos en 1997. Su confirmación por aislamiento se dio recién en la década de los 90 primero en

caprinos por Hötzel y en ovinos por Milczewski (Hötzel et al. 1993; Milczewski et al. 1997). Los primeros datos moleculares fueron aportados por Marchesin y luego por Castro (Castro et al. 1999; Marchesin et al. 1998). Ya en el año 2001 existían evidencias de la distribución viral en al menos 13 estados, circulando el subtipo B1 (Castro et al. 1999; Hasegawa et al. 2016; Ravazzolo et al. 2001).

La República Argentina reconoce la presencia de casos de MV a partir del año 2001 y de CAE a partir del año 2005 (OIE 2005a, 2005b, 2009a, 2009b). El primer caso nacional se detectó serológicamente en 2001 en un tambo ovino en la provincia de Río Negro (Robles et al. 2003), a partir de ese momento comenzó un cribado provincial a cargo del Servicio nacional de Seguridad Agroalimentaria (SENASA) y se comunicó el hallazgo a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). En ese relevamiento, se obtuvo un 5,37% de establecimientos ovinos y el 11% de establecimientos caprinos con serología positiva para SRLV (Trezeguet et al. 2008) y a partir de entonces se han detectado serológicamente en numerosas provincias (Trezeguet et al. 2017; Trezeguet et al. 2013; Trezeguet et al. 2010), sumado a casos clínicos como el que describe Bedotti en la provincia de La Pampa (Bedotti et al. 2007). Tras las denuncias de brotes en la provincia de San Luis (Rossanigo et al. 2016), Salta (Dodero et al. 2016b) y Buenos Aires (Panei et al. 2017; Robles and Martinez 2017), el Minagri comunica en el Boletín Oficial, Resolución 528/2016, medidas tendientes al control de reproductores caprinos y sobre la circulación y venta de los mismos dentro del país (Minagri 2016). En 2017 se logra el primer aislamiento viral de cepas bonaerenses y la publicación de las primeras secuencias de SRLV argentinos (Panei et al. 2017).

## **2.2 Importancia en la producción animal**

La lenta progresión de esta enfermedad y su largo periodo de latencia hace que muchas veces no sea evidenciada hasta que la infección está ampliamente distribuida dentro del rebaño. Además, se calcula que aproximadamente el 35% de los animales infectados dentro de un rebaño presentan manifestaciones clínicas de la enfermedad (Rowe and East 1997), esto señala la necesidad de contar con métodos de detección de animales infectados ya que el diagnóstico clínico es muchas veces tardío. El movimiento y comercialización de animales se ve afectado directamente por esta virosis y su posibilidad de diagnóstico ya que no solo es una enfermedad de declaración obligatoria para la OIE (OIE 2021a) sino que nacionalmente y para muchos países, implica una certificación de seronegatividad para el movimiento y transporte de reproductores (Minagri 2016; Minagri 2014; OIE 2021b; OIE 2009b; OIE 2005a; OIE 2005b).

Los casos de afección respiratoria (Maedi seco o disnea seca) son los más descritos en ovinos (Hamza and Özkan 2017; Luján et al. 2019; Sigurdsson 1958; Sigurdsson et al. 1952),

mientras que las mastitis merman directamente la producción lechera, los casos de encefalitis en cabritos de 2 a 6 meses (Sigurdsson 1954) son los que causan una parálisis progresiva que lleva a la muerte. El efecto general de la virosis no es catastróficamente visible, ya que no suele producir ni síntomas claros, en el corto plazo, ni muchas muertes directas de animales. Pero se ha demostrado el descenso progresivo en la productividad con sus consecuentes pérdidas económicas debido a la presencia de infecciones subclínicas y por, sobre todo un alto número de animales eliminados prematuramente y el consiguiente incremento del porcentaje de reemplazo. Existen estudios realizados en cabras Murciano Granadinas que muestran un descenso en la producción láctea del 9% (Martinez Navalón et al. 2002) sin alteraciones en la calidad de la leche y otros, que consideran un 15% de reducción con alteraciones cualitativas y menores contenidos de grasa (Martínez-Navalón et al. 2013; Ryan et al. 1993), dato importante dado que la mayor parte de la leche de estos animales está destinada a la producción de quesos (Suarez et al. 2017b; Suarez et al. 2015). En ovinos lecheros se ha detectado una reducción en la producción media anual entre el 3% y el 6,71% (Echeverría et al. 2020; Juste et al. 2020). Mientras que el contenido de grasa puede ser 2% menor (Christodoulopoulos 2005) o mayor según otros (Echeverría et al. 2020; Martínez-Navalón et al. 2013). La cantidad de células somáticas en leche puede incrementarse hasta el 60% (Echeverría et al. 2020; Leitner et al. 2008; Martínez-Navalón et al. 2013).

Las pérdidas productivas varían con el tipo de producción y sistema utilizado, siendo las explotaciones intensivas más fácilmente afectadas debido al contacto estrecho/cercano entre animales en la estabulación, los encierres y el sistema de parideras. Esto incrementaría el contagio y por consiguiente las pérdidas productivas (Leginagoikoa et al. 2009; Leginagoikoa et al. 2006b). Un estudio de riesgo realizado por la Universidad de Illinois, señala que los animales seropositivos tienen 3,5 veces más posibilidad de desarrollar mastitis subclínicas detectables con test de California para mastitis (CMT), mayor riesgo de mastitis clínicas y crónicas, mientras que influyen negativamente sobre la siguiente generación, incrementando el riesgo de mortalidad predestete, disminuyendo el número de crías por madre, las ganancias de peso de los corderos y, por tanto, el peso al destete o incrementando su tiempo de terminación (Echeverría et al. 2020; Keen et al. 1996).

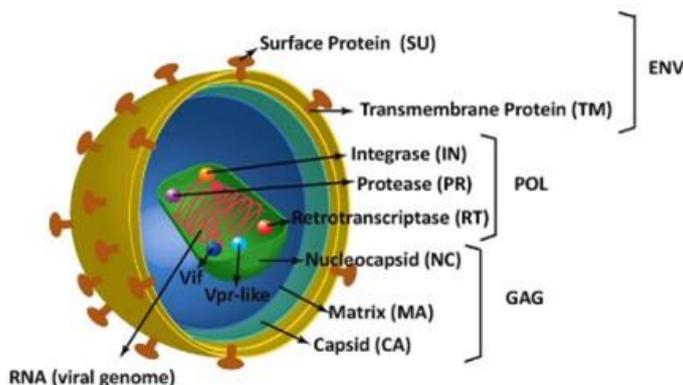
Sin embargo, algunos estudios no detectan diferencias productivas en animales infectados (Arsenault et al. 2003; Nalbert et al. 2019; Snowden et al. 1990).

El empleo de test diagnósticos parcialmente evaluados, con valores de sensibilidad y especificidad desconocidos en la población en estudio podría explicar en parte el fallo a la hora de cuantificar el impacto de la infección, como se ha descrito recientemente (Echeverría et al. 2020).

La mortalidad producida por la enfermedad se ve incrementada cuando se asocia a mala nutrición, parasitosis o se aúna con enfermedades oportunistas y con otras afecciones como por ejemplo la APO (Sigurdsson 1958; Sigurdsson et al. 1957; Sigurdsson et al. 1952). Estas son situaciones típicas de las economías de subsistencia presentes en el Noroeste argentino, donde el ganado ovicaprino cobra vital importancia para el mantenimiento y desarrollo de las zonas rurales, siendo muchas veces la fuente proteica utilizada por las familias y casi su única herramienta de comercialización (Suarez et al. 2017b; Suarez et al. 2017a; Suarez et al. 2015).

### 2.3 Estructura de los SRLV

Según los estudios de microscopia electrónica, la partícula vírica es esférica y mide entre 65 -120 nm de diámetro. Su cápside (CA) es troncocónica recubierta por una matriz proteica (MA), la cual a su vez se ve recubierta por una envoltura, derivada de la célula hospedadora, que posee una glicoproteína de transmembrana de origen viral con dos subunidades proteicas, una externa, gp135 o SU y otra que se inserta en la membrana, gp46 o TM. Su centro electro denso, mide entre 15 y 40 nm (Takemoto et al. 1971; Thormar 1961a), y se corresponde con la nucleocápside (NC) en el interior de la cápside. La NC tiene una estructura cónica y contiene en su interior sus dos moléculas idénticas de ARN de unos 8-10Kb, junto con la proteasa viral, la integrasa y la transcriptasa inversa (RT) entre otras proteínas (Lin and Thormar 1970; Pépin et al. 1998). Como puede verse en la Figura 1.



(Minguijón et al. 2015)

**Figura 1:** Virión de lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV).

Se muestran sus principales componentes, entre ellos las dos cadenas de ARN de sentido positivo, las proteínas estructurales de la nucleocápside, NC; cápside, CA y matriz, MA; (proteasa, PR, retro transcriptasa, RT e integrasa, IN) y las glicoproteínas de superficie, SU y transmembrana, TM distribuidas en la envoltura lipídica de origen celular.

### 2.3.1 Genoma de los SRLV

El genoma viral consistente en dos cadenas idénticas de ARN de hebra sencilla de polaridad positiva, contiene los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* y los genes regulatorios *vpr-like*, *vif* y *rev*, y una región terminal repetitiva no codificante (LTRs) (Pépin et al. 1998) (Figura 2).

### 2.3.2 Genes estructurales

El gen *gag* (*Group specific AntiGen*) codifica una poliproteína precursora Pr55 que es digerida por una proteasa viral dando como resultado tres proteínas específicas:

- p14 (NC): proteína de la nucleocápside que engloba el ARN.
- p17 (MA): proteína matriz que une la cápside y la envoltura.
- p25 (CA): proteína de la cápside que forma el núcleo/core hidrofóbico que contiene la NC.

Es un gen relativamente conservado en el caso de los lentivirus. La proteína p25 (CA) produce una gran respuesta inmunológica humoral, y por ello, se ha utilizado como base para desarrollar pruebas diagnósticas y estudios filogenéticos (Gomez-Lucia et al. 2018; Pépin et al. 1998).

El gen *pol* (*Polymerase*) contiene la información necesaria para la síntesis de:

- Transcriptasa inversa (RT): permite la retro transcripción del ARN vírico en ADN. Además, posee actividad ARNasaH.
- Proteasa (PR): actúa sobre los precursores proteicos virales digiriendo de forma específica la poliproteína Pr55.
- Endonucleasa / integrasa (IN): permite la integración del ADN vírico en el genoma de la célula hospedadora.
- *UTPasa*: Hidroliza dUTP en dUMP y pirofosfato. Su actividad reduce la relación dUTP/TTP. Esto facilitaría la síntesis de ADN vírico en células con niveles bajos de desoxinucleótidos trifosfato y permitiría la replicación del virus en células que no se dividen como macrófagos o neuronas.

El gen *env* (*Envelope*) codifica la glicoproteína gp160 y una proteasa celular la escinde en:

- gp135 (SU): glicoproteína de superficie, con forma de pomo y que sobresale marcadamente de la partícula vírica.
- gp46 (TM) glucoproteína transmembrana, que ancla gp135 (SU) a la envoltura (Gomez-Lucia et al. 2018; Pépin et al. 1998).

Las proteínas codificadas por el gen *env* inducen la formación de anticuerpos neutralizantes e intervienen en el reconocimiento del receptor celular responsable de la infección (Clavijo and Thorsen 1995). La proteína ENV expresada en la membrana de las células infectadas,

media la fusión de dicha célula con una célula vecina no infectada, permitiendo la formación de sincitios y la infección de la última (Sánchez et al. 2002).

### **2.3.3 Genes regulatorios**

El gen *Vpr-like* (*viral protein R*): Anteriormente denominado *tat* (transactivador de la transcripción) en SRLV por su analogía posicional con el HIV, codifica una proteína no esencial de 15KDa más parecida a VPR de HIV y de ahí su nueva denominación (Villet et al. 2003). Es una proteína con un papel importante en la formación del complejo de preintegración viral en el núcleo (PIC, *Preintegration complex*). Facilita la replicación viral en células que no se dividen, como los macrófagos; induce el bloqueo del ciclo celular en la fase G2 y la apoptosis en células en proliferación que puede llevar a desórdenes en varios órganos (Hayman et al. 1993; Vellutini et al. 1994; Villet et al. 2003) y a disfunciones del sistema inmunitario (Villet et al. 2003).

El gen *vif* (*Viral Infectivity Factor*) codifica una proteína reguladora de 29KDa, gracias a la cual se excluye a la proteína celular APOBEC3, que es capaz de inhibir el ciclo viral (Gomez-Lucia et al. 2018). También protege el genoma viral de las nucleasas celulares durante la retro transcripción (Kristbjörnsdóttir et al. 2004).

El gen *rev* (*Regulator of Virion protein expression*) codifica una proteína de 19kDa que está implicada en el *splicing* (corte y empalme) que ocurre en la maduración de los ARNm virales y en el transporte y protección de los mismos en el citoplasma. Para ello, posee señales que le permiten atravesar la membrana nuclear y ejercer su acción reguladora mediante unión a RRE (*Rev Responsible Element*) situado en el gen *env*. Esta proteína es esencial para la replicación viral (Gomez-Lucia et al. 2018; Pépin et al. 1998; Saltarelli et al. 1990; Tiley et al. 1991).

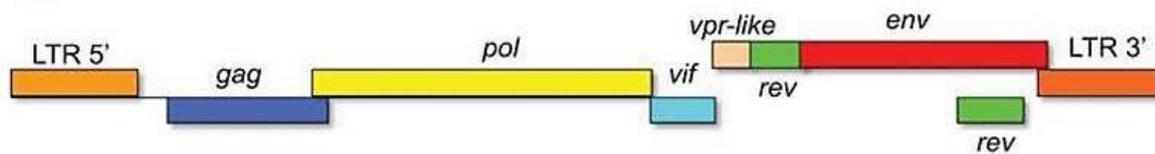
### **LTR**

LTR (*Long Terminal Repeats*), estas secuencias no codifican proteínas y actúan como reguladoras de la actividad transcripcional. La extensión varía entre cepas, siendo su longitud entre 300 y 500pb. Son lugares de unión para factores de transcripción regulando las fases latentes y productivas. Se encuentra duplicada a ambos extremos del genoma cuando éste se encuentra integrado en el genoma celular y está dividida en tres regiones U3, R y U5.

U3 es el extremo 5' del provirus y contiene la zona *enhancer*, río arriba de la caja TATA.

R contiene la señal para la poliadenilación del ARNm y la presenta una zona repetida se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad (Angelopoulou et al. 2006).

U5 es la primera secuencia que se retro transcribe y constituye el extremo 3' del provirus.



(Gomez-Lucia et al. 2018)

**Figura 2:** Estructura genómica de los SRLV.

Esquema de la distribución génica en el genoma proviral de los SRLV (LTRs, *gag*, *pol*, *vif*, *vpr-like*, *rev* y *env*) y sus marcos de lectura.

## 2.4 Ciclo de infección

El ciclo de los SRLV, como el de otros lentivirus, consta de siete fases: entrada en la célula hospedadora, retro transcripción de ARN a ADN, su integración en el genoma de la célula hospedadora, la expresión de las proteínas virales, su ensamblaje como virión, la maduración de las partículas virales y finalmente la salida de la célula.

### 2.4.1 Entrada a la célula

Cuando la partícula vírica entra en contacto con una célula susceptible, se produce un anclaje de la gp135 (SU) con receptores celulares, no caracterizados por completo hasta el momento (Lyall et al. 2000), como podría serlo el receptor de la manosa (Crespo et al. 2012), produciéndose la fusión entre la membrana celular y la envoltura vírica.

### 2.4.2 Retro transcripción (RT)

Hay autores que postulan que la RT puede comenzar aún antes que el virus penetre en la célula (Abbink and Berkhout 2007; Trono 1992) y observaciones preliminares indican que ocurre así en SRLV (Dr. Glaria, comunicación personal), mientras que otros investigadores postulan que tras la adsorción a la célula hospedadora y antes que la nucleocápside se desarme ya comenzaría la RT dentro de la cápside (Fassati and Goff 2001; Nermut and Fassati 2003). No se sabe exactamente si la RT finaliza antes que la CA se desarme o luego, en el propio citosol (Menéndez-Arias et al. 2017; Ryu 2017).

La retro transcriptasa vírica comete muchos errores en la síntesis del cADN ya que no posee sistemas de corrección (Menéndez-Arias et al. 2017), esto da lugar a mutaciones, que algunas veces, pueden resultar ventajosas para el virus. La enzima también posee actividad ribonucleasa (ARNasa H) que degrada el ARN viral durante la síntesis de la segunda hebra de ADN antes de ser liberado en el interior celular.

### **2.4.3 Integración**

La doble cadena de ADN es transportada al núcleo mediante la red de microtúbulos. Se forma el complejo de preintegración (PIC) (Ryu 2017). El ADN viral con ayuda de las proteínas del PIC, atraviesa la membrana nuclear asistido por otro grupo de proteínas, las del complejo del poro nuclear (NPC) que median el anclaje y paso por la membrana nuclear (Figura 3). Durante este transporte se produce la desencapsidación (Poletti and Mavilio 2018).

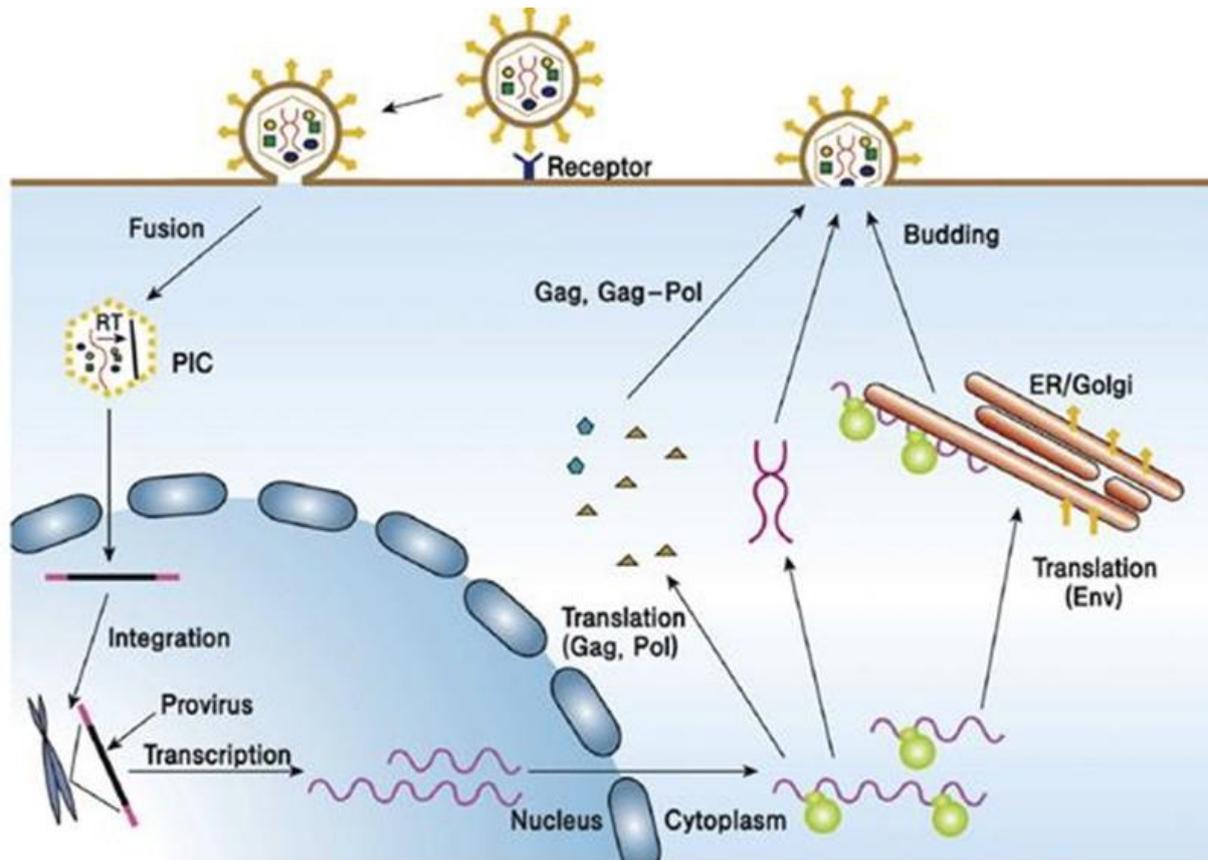
En el núcleo, el genoma viral es integrado en el cromosoma del hospedador por medio de la integrasa (Clements and Zink 1996; Ganser-Pornillos and Pornillos 2019). Y así, recibe el nombre de provirus. Es muy estable transmitiéndose a las células hijas como un carácter más (Farnet and Bushman 1997; Schröder et al. 2002).

### **2.4.4 Transcripción y expresión de proteínas virales**

El ADN viral integrado en el núcleo celular puede permanecer latente por periodos indeterminados. El inicio de la transcripción del genoma viral se produce por la interacción del complejo factores de transcripción AP y la ARN polimerasa II celular (Behre et al. 1999; Clements and Zink 1996; Ryu 2017) promueve entonces la síntesis del ARN genómico viral y también sus ARNm (Rampersad and Tennant 2018; Ryu 2017). Las proteínas virales GAG y POL se expresan como poliproteínas que sufren modificaciones postraduccionales para producir las formas maduras (Ryu 2017), mientras que la proteína ENV es enviada al retículo endoplásmico y traslocada al lumen de dicha organela, donde se glicosila y luego sigue su camino hacia la membrana celular (Mselli-Lakhal et al. 1999).

### **2.4.5 Ensamblaje y salida**

Las glicoproteínas SU y TM se encuentran ancladas en la membrana celular. Las proteínas de *gag* y *pol* reconocen la señal de empaquetado (*packaging signal*  $\psi$ ) en la hebra dimérica del ARN viral mediante la NC, y así poder dirigirse a la zona de la membrana celular marcada por las glicoproteínas SU y TM. De esa forma se van asociando a la membrana, rodeando el ARN y formando la partícula viral hasta producir su gemación (Ryu 2017; Turner and Summers 1999) (Figura 3).



(Ryu 2017)

**Figura 3:** Ciclo viral de SRLV.

El retrovirus entra en la célula a través de la fusión mediada por receptor/es. La retro transcripción (RT) se produce en el citoplasma durante la entrada formando la doble hebra de ADN viral y acoplándose las proteínas que forman el complejo preintegración (PIC). El PIC ingresa al núcleo por un poro y el ADN viral se inserta en el genoma para convertirse en "provirus". Se transcriben dos tipos de ARN virales: genómicos y subgenómicos. La traducción de las proteínas ENV (SU y TM) se inicia en el citosol, para continuar en el retículo endoplásmico, modificarse en el aparato de Golgi y luego son dirigidas a la membrana plasmática. Las proteínas GAG reconocen y empaquetan dos moléculas de ARN genómico. Los capsómeros se reúnen en la membrana plasmática a la vez que se realiza la gemación.

### 2.4.6 Maduración

Las proteínas de *gag* y *pol* terminan de formarse y separarse en todos sus fragmentos por las proteasas viral y celular respectivamente, luego se producen los cambios conformacionales de plegamiento y el virus adopta su estructura típica (Ryu 2017).

## 2.5 Mecanismos patogénicos de los SRLV

Los SRLV causan una infección de carácter lento y persistente gracias a la existencia de diferentes mecanismos para escapar a la respuesta inmune del rumiante, que desarrollará sintomatología clínica con el paso de los años, finalmente llevando a la muerte del animal (Begara et al. 1996; Clements and Zink 1996; Pépin et al. 1998).

La infección puede dividirse en seis etapas:

### **2.5.1 Viremia inicial**

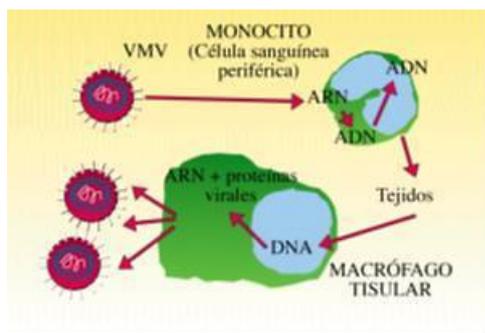
El virus ingresa al organismo y circula brevemente en sangre hasta llegar a sus células diana (Amorena et al. 2001). Los destinos principales son fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos, células dendríticas) (Narayan et al. 1982), aunque se ha aislado o detectado en los tejidos donde produce lesiones como membrana sinovial, plexo coroideo, neumocitos, células bronquiales, encéfalo, mama u otros como intestino, tiroides, células de la granulosa u oviductales (Bolea et al. 2006; Carrozza et al. 2003; Lamara et al. 2002b; Lamara et al. 2001; Ryan et al. 2000; Staskus et al. 1991; Zink et al. 1990). El virus integrado en los monocitos es capaz de replicarse en los tejidos, una vez éstos maduran a macrófagos. Al exponer éstos sus antígenos, generan la cascada inflamatoria, la activación de los linfocitos T y B, provocando una respuesta inmune vigorosa que restringe la replicación viral a niveles indetectables pero que es incapaz de eliminar al ahora provirus (Amorena et al. 2001).

### **2.5.2 Seroconversión**

La respuesta inmune inicial produce gran cantidad de anticuerpos que tardan en aparecer entre una semana y 6 meses. Estos anticuerpos son detectables y nos sirven para el diagnóstico, pero nada logran con el provirus integrado en el genoma celular. Además, la amplia variabilidad genética y, por tanto, antigénica que presentan los SRLV, hace que el reconocimiento de los anticuerpos y, por tanto, su efectividad sea débil. Los títulos de anticuerpos fluctúan durante la vida del animal y existen momentos en que pueden no ser detectados (Amorena et al. 2001; Blacklaws et al. 1995; Johnson et al. 1992).

### **2.5.3 Latencia**

Paralelamente a la seroconversión hay una disminución en la circulación viral que estaría dada por la integración de virus al genoma de los monocitos. El tiempo que pasa un animal en fase de latencia no está del todo aclarada, pero depende de una compleja interacción de factores de transcripción víricos y celulares, de la cepa infectante y el factor más determinante de dicha fase es la carga genética individual del animal (Amorena et al. 2001). En estos momentos el virus utiliza a los monocitos circulantes como “caballo de Troya” (Peluso et al. 1985) para llegar a diferentes regiones donde se replica luego de su diferenciación a macrófagos (Amorena et al. 2001; Blacklaws et al. 1995; Johnson et al. 1992; Pépin et al. 1998) (Figura 4).



(Amorena et al. 2001)

**Figura 4:** Estrategia del “Caballo de Troya” del virus Maedi Visna (VMV).

El monocito sanguíneo lleva integrado el ADN vírico y, al alojarse en los tejidos y madurar a macrófago tisular, el virus se replica utilizando los recursos celulares.

#### **2.5.4 Signología y formas clínicas**

Los primeros signos pasan desapercibidos manifestándose una pérdida de peso que puede ser debida al dolor producido por la artritis o a la intolerancia al ejercicio por la afección respiratoria.

Los signos suelen aparecer en animales mayores de 2 años a excepción del cuadro nervioso que puede presentarse en cabritos y corderos entre 2 y 4 meses (Benavides et al. 2009; Benavides et al. 2007; Cork et al. 1974; Pépin et al. 1998). El porcentaje de animales que manifiestan cualquiera de las formas clínicas varía según el tropismo de la cepa vírica, la raza del animal, la carga genética individual, la edad, la ruta inicial de la exposición, la existencia de infecciones secundarias, el manejo y la carga viral en un órgano dado (De La Concha-Bermejillo et al. 1996).

La infección lentiviral puede tener cuatro formas clínicas clásicas en rumiantes: articular, mamaria, pulmonar y nerviosa, que en caprinos se dan en este mismo orden de frecuencia (Crawford and Adams 1981; Minguijón et al. 2015; Rowe and East 1997). Mientras que en ovinos el orden decreciente de las frecuencias clínicas son pulmonar, mamaria, nerviosa y en ocasiones articular (Ramírez et al. 2013). Cabe destacar que es común encontrar animales en los que confluyan más de una manifestación clínica a la vez siendo frecuentes la combinación de afección pulmonar y articular o articular y mamaria (Luján et al. 2019; Minguijón et al. 2015).

##### **2.5.4.1. Forma articular**

Esta manifestación clínica es la típica de cepas aisladas en caprinos, pero también se ha detectado en ovinos e incluso se citan hallazgos histopatológicos que cursan con enfermedad articular subclínica en ovinos (Luján et al. 2001; Pérez et al. 2015). Los animales presentan claudicaciones o rengueras, dificultad en la marcha o simplemente se rehúsan a deambular. Los casos más severos presentan una tumoración que inicialmente es caliente para luego transformarse en fría y dura, que lleva a contracturas y pérdida de la movilidad.

Las articulaciones carpales son las más afectadas identificándose en animales “rodilludos” (Figura 5), seguida de la tarsal y con menores frecuencias pueden verse afectadas las interfalángicas y coxofemorales. Es muy llamativo el caso de la afectación de la articulación atlanto-occipital (Figura 6) que suele ir asociada a una bursitis e inflamación del ligamento nucal muy evidente a simple vista (Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015).



(Rossanigo et al. 2016)

**Figura 5:** Patología articular.

Pueden verse diferentes animales un hato con la típica patología en la articulación tarsal, bilateral en la mayoría de los casos. También puede apreciarse el mal estado general que se produce, mala condición corporal, pelo hirsuto.



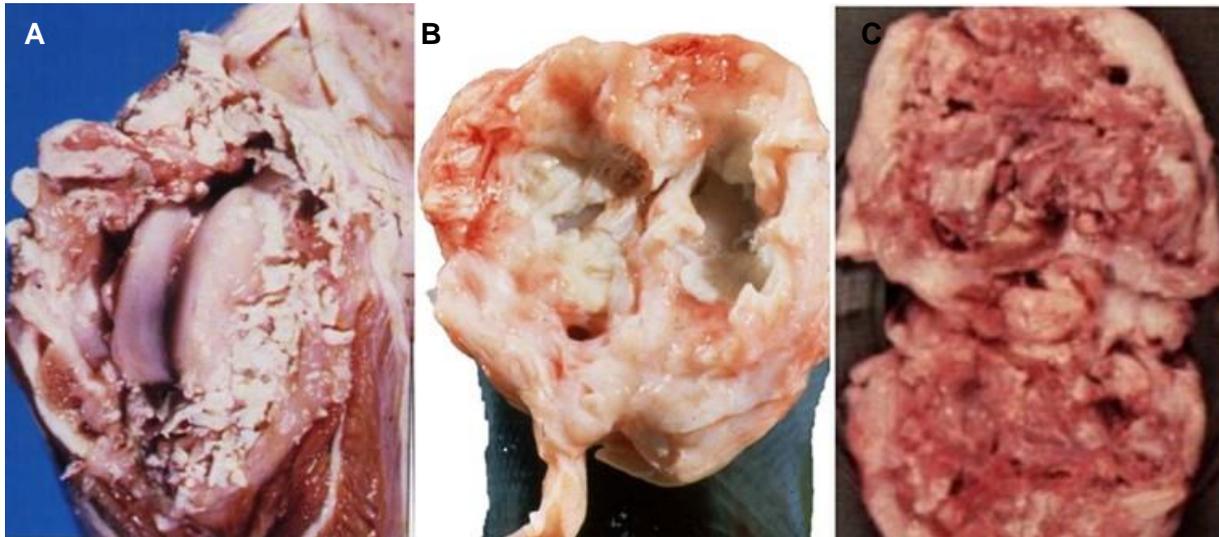
(Wilkinson 1997)

**Figura 6:** Patología afectando las bolsas del ligamento nucal de un animal.

Pueden verse las bolsas sinoviales que protruyen a simple vista por debajo de la piel.

Macroscópicamente se caracteriza por una sinovitis proliferativa crónica con fibrosis de la cápsula articular, engrosamiento, con erosión y destrucción del cartílago y exposición del hueso subcondral (Figura 7). El líquido articular suele presentarse turbio (Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015). La evolución suele ir de una artritis serosa que se transforma en

proliferativa y en los casos más graves puede apreciarse incluso necrosis caseosa (Luján et al. 2019; Luján et al. 2001).

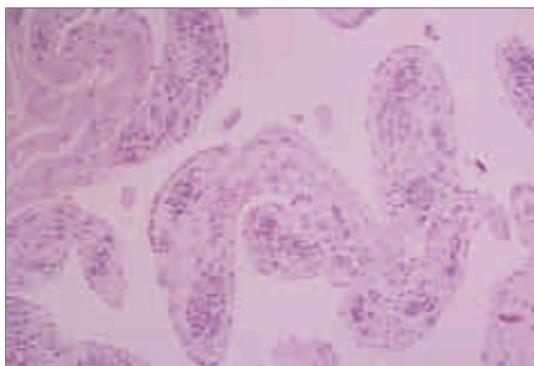


(Wilkinson 1997)

**Figura 7:** Lesiones macroscópicas de la articulación tarsal de animales.

A, se aprecia la presencia de necrosis caseosa. En B y C puede verse la proliferación de tejido conectivo que rodea la capsula articular y en C la estructuración del tejido en panal de abejas.

La histopatología se caracteriza por la proliferación de la membrana sinovial y una severa infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos subsinoviales y perivascuales (Figura 8). Pueden aparecer fibrina y depósitos de inmunoglobulina en la membrana sinovial, pudiendo evolucionar hacia una degeneración del cartílago articular, mineralización de la cápsula articular y su reemplazo por crecimiento periostial (Cheevers and McGuire 1988; Crawford et al. 1980; Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015; Narayan and Clements 1989).



(Luján et al. 2001)

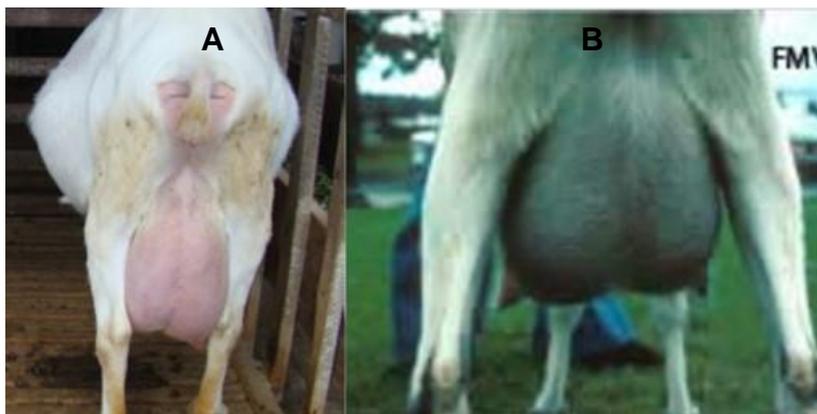
**Figura 8:** Fotografía con microscopio óptico común de un cuadro articular (hematoxilina/eosina 100x). Articulación carpal de una oveja afectada por SRLV. Obsérvese la sinovitis proliferativa y la infiltración de células redondas (principalmente linfocitos) alrededor de vasos subsinoviales.

#### 2.5.4.2. Forma mamaria

Es una afección que puede pasar desapercibida y genera pérdidas en animales subclínicos (Minguijón et al. 2015). Esta forma se presenta como una mastitis indurativa crónica indolora, de carácter difuso y bilateral, juntamente con tumefacción de los linfonódulos retro mamarios, solo apreciable durante el periodo de lactancia, mediante palpación.

Actualmente es reconocida como una forma clínica importante en el contagio eficiente de los recién nacidos. En ocasiones el descenso en la producción se evidencia por la presencia de crías débiles y con baja ganancia de peso, existen casos de secado postparto en animales infectados, que se da más frecuentemente en hembras primíparas (Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015).

A simple vista, no se observan cambios macroscópicos evidentes, si bien los cambios son importantes. La consistencia de la glándula puede ser de firme a tersa y a veces muy endurecida (Figura 9). En la sección presentan un aspecto no glandular, siendo uniforme la superficie. Se observa la tumefacción de los linfonódulos.



(Wilkinson 1997)

**Figura 9:** Imágenes de mastitis intersticiales en animales con CAEV.

A simple vista no se aprecian anomalías, pero las glándulas se encuentran endurecidas al tacto, por fibrosis del intersticio. B, la glándula presenta una deformación que eleva levemente un medio mamario sobre el otro, también presenta un leve incremento de la temperatura del medio mamario.

Las lesiones histológicas son de una mastitis intersticial crónica con infiltración linfocitaria e hiperplasia de folículos linfoides. Los acinos mamarios presentan una destacada infiltración linfocitaria que se sitúa alrededor del epitelio glandular. Esto provoca la descamación y acaba eliminando y reemplazando al acino. La lesión se repite en el conducto galactóforo, pero se encuentra ausente en el tejido conjuntivo. Los folículos linfoides peri ductales hacen protrusión hacia la luz ductal y producen hiperplasia, vacuolización, necrosis y descamación del epitelio ductal cercano. Un hallazgo destacado es la marcada fibrosis del intersticio del estroma mamario, lo que colabora en la induración mamaria, la estenosis y obliteración ductal (Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015).

#### **2.5.4.3. Forma pulmonar**

Se presenta en adultos y, al igual que el resto de formas, suele darse de manera lenta, progresiva y desapercibida. En caprinos suele ser un hallazgo casual mientras que en ovinos se describe el famoso cuadro de Maedi o disnea seca, con intolerancia al ejercicio que evoluciona con aumento de la frecuencia respiratoria, respiración abdominal con posiciones ortopneicas tales como hiperextensión del cuello, dilatación de ollares y respiración con la boca abierta pudiendo llegar a desarrollar disnea en reposo. El sensorio del animal no se ve alterado, no hay hipertermia ni corrimiento nasal, a menos que exista contaminación bacteriana (Luján et al. 2001).

Macroscópicamente existe un aumento del peso y volumen visceral que impide el colapso del órgano al abrir la cavidad torácica. Existe un puntillado característico difuso de color gris en el tejido subpleural (Christodouloupoulos 2006; Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015). Los bordes pulmonares se redondean y su textura es poco elástica. Los linfonódulos del pulmón están homogéneamente tumefactos y es muy habitual que los linfonódulos mediastínicos caudales sobresalgan del borde pulmonar (Luján et al. 2001).

#### **2.5.4.4. Forma nerviosa**

Es la típica forma descrita en la epidemia ovina islandesa de los años 30-40 (Sigurdsson et al. 1957). Desde entonces no se la considera una presentación habitual, aunque puede acompañar a la afección respiratoria (Minguijón et al. 2015). Se cree que hay una predisposición genética en las razas ovinas lecheras (Georgsson 1990a). Sin embargo, este tipo de ovejas poseen generalmente un manejo intensivo con confinamiento, donde la infección tiene mayor facilidad de propagación. Por otro lado, las cepas virales aisladas de este tipo de forma clínica pertenecen en su totalidad al genotipo A, asociando este genotipo con el síndrome nervioso (Glaría et al. 2012). Si bien en ovinos se han descrito casos en corderos entre 4 y 6 meses (Benavides et al. 2007), lo usual es que se desarrolle en animales adultos (Leginagoikoa et al. 2006a). Por el contrario, la afección nerviosa en caprinos se da en animales menores a un año (Toma et al. 1990). En ambas especies esta presentación clínica está asociada a rebaños generalmente muy infectados con prevalencias entre el 60 y 95% (Benavides et al., 2007; Leginagoikoa et al., 2006b; Toma et al., 1990).

Los primeros signos asemejan a una renguera, progresando a ataxia y paresia del tren posterior pudiendo ser uni o bilateral, progresando hasta la parálisis completa, con un animal que se mantiene alerta (Benavides et al. 2007; Cork et al. 1974; Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015). En adultos, la duración de los síntomas se prolonga durante meses (de seis meses a un año), observándose un adelgazamiento progresivo que en ocasiones llega a la caquexia (Luján et al. 2001).

Macroscópicamente, el cerebro y la médula espinal parecen normales. En raras ocasiones, las leptomeninges sobre el cerebro y la médula espinal pueden mostrar zonas que no son translúcidas, sino grisáceas y aparentemente engrosadas. Existen casos exclusivamente medulares (Luján et al, 2001). El plexo coroideo muestra en ocasiones, engrosamientos granulares con lesiones muy extensas. La materia blanca del cerebro, el tronco cerebral y el cerebelo pueden aparecer reblandecidos con presencia de malacia y mostrar una decoloración grisácea. En algunos casos se observan placas grisáceas relativamente bien delimitadas en las columnas blancas de la médula espinal (Georgsson 1990a; Luján et al. 2001).

A nivel histológico se define como una encefalomiелitis no purulenta desmielinizante, aunque hay casos de miелitis exclusivas. En ocasiones se observa la aparición de miелitis no purulentas en los medulares espinales, dorsales como laterales o ventrales, llegando a la sustancia gris en casos severos. Las lesiones comienzan con infiltrados inflamatorios subependimarios, constituidos por linfocitos, monocitos y algunos macrófagos, así como focos de gliosis y formación de manguitos perivasculares. La acumulación de macrófagos puede llegar a formar verdaderos granulomas (Luján et al, 2001). La intensidad, gravedad y extensión de estos focos inflamatorios progresan y comienza a observarse desmielinización y malacia. En los plexos coroideos puede observarse con frecuencia la formación de folículos linfoides (Georgsson 1990b; Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015; Sigurdsson et al. 1957).

### **2.5.5 Muerte**

La muerte del animal no es el episodio más común y se produce en un periodo variable que suele ser mayor a su vida productiva, en general, luego de los 6 meses desde la aparición de los signos, a excepción de los cuadros encefálicos que se dan en animales de entre 2 y 4 meses de edad, que tienen un desarrollo de menos de un mes con desenlace fatal (Amorena et al. 2001). La mortalidad es elevada en regiones donde la enfermedad es nueva y es baja cuando la enfermedad es endémica y su prevalencia alta (Benavides et al. 2009; Benavides et al. 2007; Brinkhof 2009; Cutlip et al. 1986; Luján et al. 2001).

### **2.6 Vías de transmisión**

El contagio de la infección puede darse por la transmisión horizontal, la más común (entre animales que cohabitan) y la transmisión vertical (entre madres y crías hasta el nacimiento) es extremadamente baja.

### **2.6.1 Transmisión horizontal**

La transmisión por vía horizontal puede suceder de forma directa a través de la ruta oronasal, lactógena por ingestión de calostro y/o leche, por vía venérea y también por vía indirecta a través de fómites.

La vía lactógena, por consumo de calostro y leche, es una importante vía de infección para el recién nacido. Como la mastitis es frecuente en los animales infectados, la transmisión se ve favorecida por el reclutamiento de células mononucleares infectadas hacia las glándulas mamarias (Carrozza et al. 2003). También las células epiteliales de la glándula son diana del virus (Bolea et al. 2006; Lerondelle et al. 1999), habiéndose demostrado la presencia de virus tanto en células como en la leche (Adams et al. 1983; Blacklaws et al. 2004; Ravazzolo et al. 2006) y de este modo, la cría puede ser infectada con su primera toma de calostro (Álvarez et al. 2006; Álvarez et al. 2005). La replicación del virus se produce tras la activación de estas células epiteliales que se favorece por factores del hospedador de tipo hormonal como ocurre tras el parto o en la lactación (Lerondelle and Ouzrout 1990). Sumado a todo esto, la elevada permeabilidad del intestino de los neonatos facilita la entrada del virus a través de la ingestión de calostro infectado (Cortez-Romero et al. 2013; Gomez-Lucia et al. 2018; Pépin et al. 1998). En un estudio realizado por Álvarez (Álvarez et al. 2005), en ovinos lecheros del País Vasco en régimen semintensivo con una presión de infección media, se demostró que un 16% de corderos de madres seropositivas se infectan de forma natural, tras ingerir calostro de la madre (Álvarez et al. 2006).

La ruta oronasal es una vía de transmisión por contacto directo con material infectado. Las gotas que forman aerosoles producidos al respirar o al toser junto con el fluido pulmonar expulsado, que va acompañado de monocitos y macrófagos alveolares infectados por el virus, parecen ser una fuente de infección (Dawson et al. 1985; Houwers 1990; Luján et al. 1994). También el contacto directo con las secreciones nasales, que se ve facilitado con la estabulación o el confinamiento de los animales, así como en ferias o exposiciones tiene un papel importante en el contagio. Se ha descrito que una separación de 2 metros entre animales es suficiente para evitar el contagio de SRLV (Adams et al. 1983). Un ejemplo fundamental de esta vía fue el caso islandés, en el que los encierros de los animales durante las estaciones frías fue la principal causa de la difusión de la enfermedad (Houwers 1990). Las coinfecciones con otros virus o bacterias pulmonares contribuyen a la diseminación de SRLV vía exudados respiratorios (Torsteinsdóttir et al. 2003).

La transmisión venérea se considera una vía de infección (Ali Al Ahmad et al. 2008; Peterhans et al. 2004) aunque su importancia epidemiológica aún no ha sido demostrada. Además, se ha detectado SRLV en células intersticiales y epiteliales del epidídimo en animales infectados con SRLV y *Brucella ovis*. Se considera que la epididimitis que produce la bacteria podría facilitar la eliminación del virus a través del semen al igual que lo hacen las mastitis con el

fluido mamario (De La Concha-Bermejillo et al. 1996; Preziuso et al. 2003; Ridler et al. 2014). Las células epididimarias son diana de la infección como las testiculares, vesiculares y las de los conductos deferentes (Fieni et al. 2017a; Lamara et al. 2013). Otros autores denuncian la presencia intermitente de ADN proviral en semen y tejidos del tracto genital masculino de ovinos y caprinos infectados de forma natural (Ali Al Ahmad et al. 2008; Peterson et al. 2008; Ramírez et al. 2009). Los machos juegan un doble rol en el contagio, porque pueden contagiar vía venérea a las hembras, pero su papel más importante es el contagio directo por vía oronasal. Cabe destacar que los machos suelen circular por varios rebaños a modo de préstamo (Suarez et al. 2017b; Suarez et al. 2015) e incluso utilizarse como donantes de semen para inseminación artificial, un punto a tener en cuenta para su control (Ali Al Ahmad et al. 2008; Blacklaws et al. 2004).

El contagio indirecto debe ser considerado, ya que las células blancas de un animal positivo podrían contagiar a otro (Ruiz et al. 2018), esto permitiría el contagio iatrogénico, por fómites como por ejemplo el uso de jeringas, agujas, pipetas, material para el descorne, etc. La utilización de máquinas de ordeño y elementos para el uso intramamarios compartidos también son fuentes de transmisión (Blacklaws et al. 2004). La transferencia embrionaria es inocua siempre que sea a través de la recuperación de embriones que permanecen dentro de la zona pelúcida que los protege y utilizando el protocolo propuesto por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Fieni et al. 2017b). El contagio medioambiental a través de las pasturas es poco eficiente, bastando con un vacío sanitario de 2 semanas para evitar la propagación en animales sanos (Blacklaws et al. 2004).

### **2.6.2 Transmisión vertical**

La transmisión materno-fetal ha sido poco documentada epidemiológicamente (Blacklaws et al. 2004). Se ha descrito la detección de ADN proviral en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) en un 5 al 11% de neonatos en muestras tomadas antes de que éstos ingirieran calostro (Álvarez et al. 2006; Brodie et al. 1994; Rowe and East 1997), mientras que Sánchez (Sánchez et al. 2016) muestra que es posible detectar molecularmente el virus en fetos de madres positivas obtenidos en matadero a diferentes edades gestacionales. Por otro lado, Cutlip (Cutlip et al. 1982) da evidencias experimentales que infecciones anteriores a los 60 días de gestación producen abortos o reabsorción embrionaria. Hasta el momento se ha demostrado que las células germinales masculinas y femeninas no transmiten el virus (Cortez-Romero et al. 2006; Fieni et al. 2017a; Lamara et al. 2013), mientras que las células de la granulosa y de la teca permiten la replicación viral, al igual que las células epididimarias (Ali Al Ahmad et al. 2008; Peterson et al. 2008; Ramírez et al. 2009) y las de las glándulas anexas (De La Concha-Bermejillo et al. 1996), lo que facilita la presencia del virus en el eyaculado de machos positivos. Sin embargo, no está demostrada la forma exacta en la que el virus es

capaz de infectar a la generación siguiente siendo un evento posterior a la pérdida de la zona pelúcida del embrión que impediría la infección del ovocito por la ausencia de algún tipo de receptor indispensable para el ingreso del virus (Cortez-Romero et al. 2013; Cortez-Romero et al. 2006; Fieni et al. 2017b; Vainas et al. 2006).

## **2.7 Tropismo del virus**

Los SRLV infectan principalmente a la línea monocito-macrófago a través de la cual se diseminan por el organismo por la ya mencionada estrategia del “caballo de Troya” (Peluso et al. 1985) y llegan a otros tejidos donde pueden replicarse (Amorena et al. 2001; Blacklaws et al. 1995; Johnson et al. 1992; Narayan et al. 1982). El virus se disemina por el sistema linfático siendo la médula ósea (Gendelman et al. 1985; Pinczowski et al. 2017) uno de sus posibles reservorios junto a las células dendríticas y epiteliales de diferentes órganos (Lerondelle et al. 1999; Narayan et al. 1982). Este tropismo viral depende de interacciones específicas, que ocurren a varios niveles, entre el virus y su hospedador.

Tropismo de especie: la mayoría de los virus tienen una especificidad de especie a la que parasitan, esta situación parecía ser real en las lentivirosis, a tal punto, que las primeras investigaciones versaban sobre dos virus diferentes VMV y CAEV (Cork et al. 1974; De La Concha-Bermejillo 1997; Loman 1862; Sigurdsson et al. 1952). Sin embargo, los estudios realizados a través del tiempo han demostrado que los SRLV pueden afectar indistintamente a ovinos y caprinos (Leroux et al. 2010; Minguijón et al. 2015; Olech et al. 2018; Pisoni et al. 2007b; Ramírez et al. 2013; Shah et al. 2004a) e incluso poseen la capacidad de infectar especies de rumiantes silvestres (da Cruz et al. 2013). La transgresión de la barrera de especie sugiere la superación de los sistemas de control del hospedador. El ingreso del virus a la célula hospedadora está mediado por el reconocimiento por parte de algún tipo de receptor y la proteína ENV viral. Se ha descrito la interacción de los SRLV con receptores ovinos y caprinos (Hötzel and Cheevers 2002) y se ha propuesto que la falta de reconocimiento de estos receptores en células humanas, es lo que impide la penetración de la cepa de SRLV EV1 a las mismas (Mselli-Lakhal et al. 2000). También el receptor de la manosa está implicado en el reconocimiento e incorporación del virus en las células del hospedador (Crespo et al. 2012), aunque ciertos tipos celulares, que no lo expresan son también susceptibles a la infección, por lo que no se trataría de un receptor exclusivo.

El tropismo a nivel tisular: Al existir diferentes presentaciones de la enfermedad, se han propuesto modelos de tropismo tisular u orgánico (Ramírez et al. 2012). En estudios realizados en casos crónicos por lentivirus se ha encontrado que las variantes virales pueden formar quasiespecies llegando a compartimentalizarse en órganos. Estas diferencias serían en gran parte debidas a la presión selectiva realizada por las características genéticas de cada individuo, como efecto fundador, típicamente estudiado en pacientes con HIV. Así, cuando el

flujo de genes entre las subpoblaciones es muy restringido, cada una de ellas puede ser genéticamente distinta llamándose a esto compartimentalización, descrita como una micro evolución o la coexistencia de varios genotipos relacionados filogenéticamente (Ramírez et al. 2013). Trabajos que versan sobre la compartimentalización en HIV muestran la existencia de una alta variabilidad nucleotídica en la región *env*. La zona que determina el tropismo celular y contribuye a la eficiencia en la replicación, es la fracción hipervariable V3 y se relaciona con la adsorción de estirpes macrófago-trópicas (Korber et al. 1994). En SRLV la región hipervariable estructural y funcionalmente análoga a V3 del HIV es la región V4 de *env*. Durante las fases iniciales de la infección, los SRLV pueden sufrir variaciones en la región V4, dando lugar a diferentes subpoblaciones virales y así colonizar diferentes órganos como pulmón, glándula mamaria, cerebro y articulaciones (Ramírez et al. 2013). Es así como los genotipos A que han provocado las formas nerviosas mostraron una compartimentalización en el sistema nervioso central (SNC) y otros órganos tales como pulmones o glándula mamaria. Inferencias a partir de un enfoque bayesiano sugieren que los provirus de macrófagos alveolares y PBMC representan los ancestros comunes más probables en el animal (Ramírez et al. 2012).

Tropismo celular: Como ya se ha mencionado, el virus tiene como células diana a la línea monocito/macrófago y células dendríticas, todas ellas células presentadoras de antígenos, (CPAs). Los SRLV son capaces de integrarse en el genoma de estas células mononucleares, pero la replicación no es productiva hasta que éstas no se diferencian o maduran a macrófagos (Ramírez et al. 2013). Durante este cambio morfo-biológico se activan factores de transcripción que interactúan con la región promotora localizada en el LTR viral. Estos activan la transcripción del provirus dando así una infección productiva (Narayan et al. 1983). Los macrófagos son las células más eficientes para la realización de aislamientos de SRLV, ya que suelen producir los mayores títulos virales (Dahlberg et al. 1981). Sin embargo, este linaje se corresponde con células terminales y, por tanto, no se replican en cultivo *in vitro*. Además, no suelen evidenciar efecto citopático a pesar de la alta tasa de replicación viral. Debido a ello se suelen utilizar células de tipo fibroblasto como las del plexo coroideo (Andrésdóttir et al. 1998), de piel (Chebloune et al. 1996), de membrana sinovial (Barros et al. 2005) y su correspondiente línea GSM-T (*Goat sinovial membrane cells T-immortalized*) (Rolland et al. 2004). Todos estos tipos celulares se han considerado permisivos a la replicación viral y muestran el típico efecto citopático de formación de sincitios (Crawford et al., 1980; Dawson et al., 1983), que son células gigantes multinucleadas (Sigurdsson et al. 1960). Sin embargo, recientemente se ha determinado que no todas las estirpes son capaces de replicar en estos tipos celulares que actuarían *in vitro* como filtro, siendo, por lo tanto, necesario otro enfoque a la hora de caracterizar estirpes asociadas a una zona geográfica o brote concreto (Colitti et al. 2019).

## 2.8 Clasificación

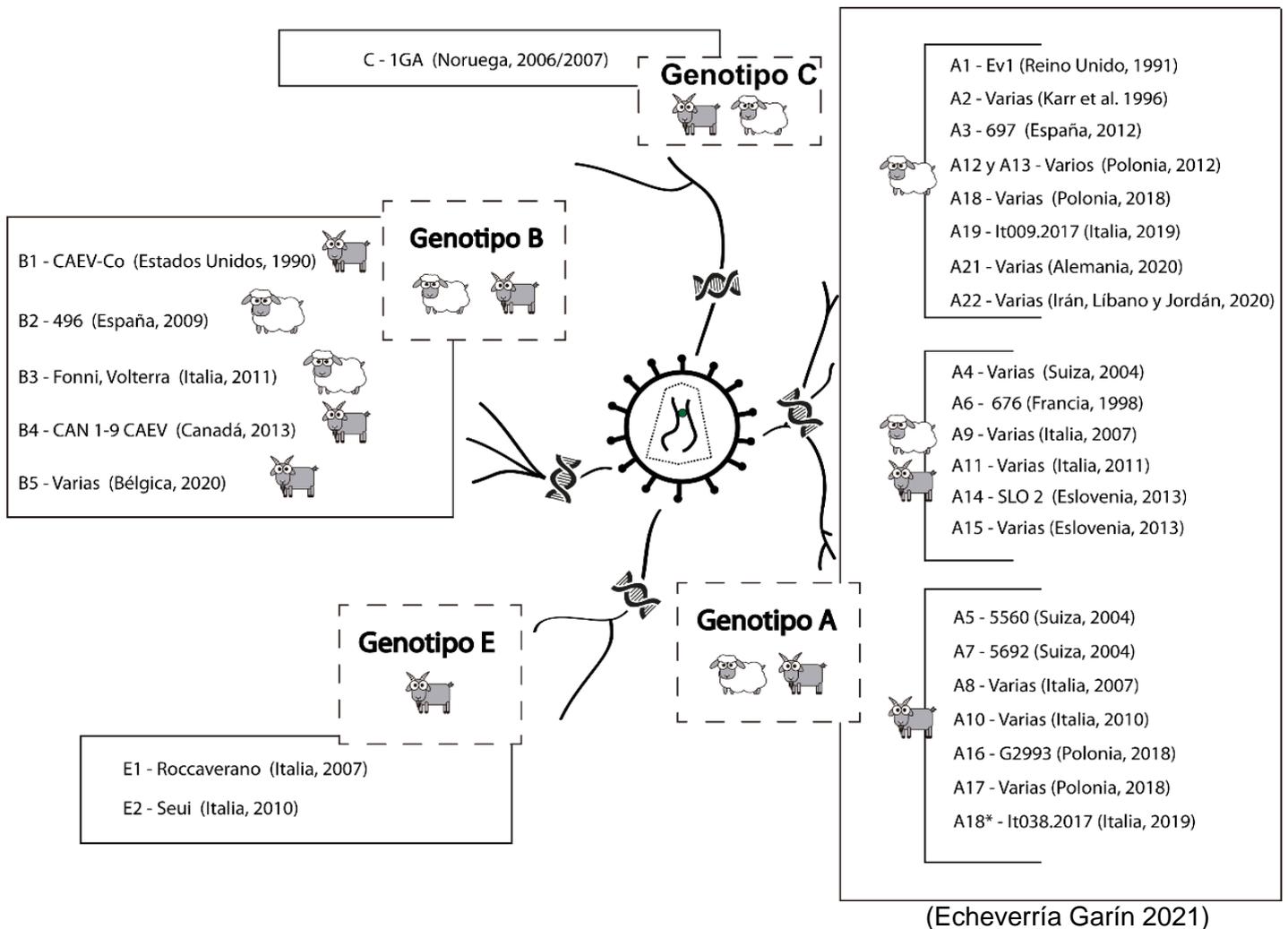
La alta variabilidad genética de los SRLV es el resultado de factores tales como los procesos de recombinación, la acción de proteínas del hospedador como APOBEC3, la baja fidelidad de copia de su enzima RT, la ausencia de mecanismos de reparación durante la replicación, entre otros. Esto permite un alto grado de mutagénesis y una gran divergencia que provoca la formación de diferentes cepas y quasiespecies (Andrésdóttir 2003; Bieniasz 2004; Pasick 1998; Pisoni et al. 2007a; Santry et al. 2013).

En 1984 la clasificación de los SRLV constaba de dos categorías según su biología y bioquímica (Quérat et al. 1984). El tipo I estaba compuesto por virus de secuencias más parecidas al VMV, líticos y de alta patogenicidad que producen anticuerpos neutralizantes (Narayan et al. 1978). El tipo II engloba los de mayor homología con CAEV y una baja patogenicidad *in vivo* (Chebloune et al. 1996; Zink and Johnson 1994). La evidencia de una continuidad genética entre estos virus ovinos y caprinos aislados en diferentes regiones no fue sencilla de explicar. Tuvo que demostrarse la ruptura de la barrera interespecie o la infección interespecífica, gracias a la genética molecular. La presencia de infecciones mixtas en campo y la identificación de subtipos afectando a las dos especies fue necesaria para que esto fuese aceptado (Leroux et al. 1997b; Pisoni et al. 2007b; Shah et al. 2004b). Pero fue Zanoni quien propusiera la denominación de lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) (Zanoni et al. 1992; Zanoni et al. 1991).

Investigaciones posteriores fueron dejando en claro la alta variabilidad genética de los SRLV y por ello en 2004, basados en secuencias de los genes *gag* y/o *pol*, Shah y colaboradores establecen una nueva clasificación a través de un análisis filogenético. Basándose en los criterios aplicados en el campo del HIV, plantean 4 genotipos de A a D, con una diferencia nucleotídica del 25 al 37% con respecto a esos genes. Dentro de los genotipos existen subtipos que se diferencian en al menos 15% de la secuencia de nucleótidos (Shah et al. 2004a).

En la actualidad existen un gran número de subtipos A, que van desde el 1 al 27 (Michiels et al. 2020; Molaee et al. 2020; Olech et al. 2022; Olech et al. 2018) y para el caso del B, del subtipo 1 al 5. Los genotipos A y B están ampliamente distribuidos y se los postula como pandémicos, mientras que el C y el E solo han sido identificados en regiones geográficas específicas (Carrozza et al. 2018; Gjerset et al. 2007; Gjerset et al. 2006; Grego et al. 2007; Michiels et al. 2020; Reina et al. 2009b; Shah et al. 2004a). El tipo C fue aislado en ovinos y caprinos de Noruega (Gjerset et al. 2007; Gjerset et al. 2006), mientras que el D, tipificado con el gen *pol*, se halló en España y Suiza, aunque nuevos estudios filogenéticos que incluyen el gen *gag* sugieren que sería un subtipo de A con divergencias en el gen *pol* (Molaee et al. 2020; Ramírez et al. 2013; Ritchie and Hosie 2010; Shah et al. 2004a). Los subtipos E1-2 se encuentran presentes en el norte de Italia y Cerdeña, respectivamente y es el único genotipo

descrito hasta el momento que tan solo infecta una de las especies, la caprina. Algunos genotipos han sido aislados únicamente en una especie animal, pero se cree que son hechos casuales que tienden a confluír afectando indistintamente a ovinos y caprinos (Grego et al. 2007; Ramírez et al. 2013; Reina et al. 2009b).



**Figura 10:** Genotipos y subtipos de SRLV y especie de rumiante de la que fue aislado.

Se puede observar que los genotipos A, B y D pueden darse en ambas especies animales mientras que hasta el momento el genotipo E se ha encontrado únicamente en caprinos. Cabe destacar la presencia de una gran cantidad de subtipos A tipificados hasta el momento.

## 2.9 Relaciones filogenéticas

Los lentivirus tienen una larga historia y han evolucionado junto con sus hospedadores mamíferos (Gifford 2012; Takeuchi et al. 2015; Yamada et al. 2016; Zhang et al. 2012). Existen retrovirus endógenos (VRE), generados al insertarse en la línea germinal de un hospedador infectado que no poseen ciclo replicativo (García-Etxebarria et al. 2014) y que se utilizan como relojes moleculares. El estudio de Chessa y otros (Chessa et al. 2009), examinó

filogenéticamente la historia de la domesticación de las ovejas a partir de la huella de la integración de los retrovirus en su genoma, definiendo dos oleadas de domesticación provenientes del Creciente Fértil, incluidas partes de Irán, Iraq, Turquía, Siria y Jordania, aproximadamente 10.000 a 8.000 años antes de cristo (AC) (Chessa et al. 2009; Zeder 2008; Zeder 1999).

Los estudios filogenéticos de los genomas virales completos indica que en los pequeños rumiantes domésticos circulan por lo menos cinco genotipos principales de SRLV (A, B, B3, C y E) (Bertolotti et al. 2011; Leroux et al. 2010; Shah et al. 2004a). Los genotipos A y B están extendidos por todo el mundo debido a la comercialización del ganado (Bertolotti et al. 2011; Giammarioli et al. 2011; Molaei et al. 2020; Reina et al. 2009b; Shah et al. 2004a; Shah et al. 2004b) y engloban los VMV y CAEV, respectivamente (Minguijón et al. 2015). Por el contrario, los genotipos divergentes B3, C y E parecen tener distribuciones geográficas relativamente restringidas (Molaei et al. 2020).

La Figura 10 muestra la especie animal en la que fueron encontrados los subtipos.

## **2.10 Diagnóstico**

Si bien por medio de la necropsia y el examen histopatológico es posible realizar un diagnóstico, la naturaleza lenta de esta infección implica una larga espera, y solo casos avanzados permiten un diagnóstico certero de la infección. La inmunidad humoral debida a los SRLV ha sido bien estudiada. Los anticuerpos neutralizantes producidos son de lenta aparición o poseen poca afinidad y sus títulos suelen ser relativamente bajos. Además, se encontró que la propagación del virus no puede ser detenida completamente por los anticuerpos, porque un pequeño número de virus libres pueden propagarse de célula a célula. A pesar de la respuesta inmunitaria presente, el virus no es expulsado, y el hospedador actuará como un portador de por vida (Pal and Chakravarty 2020). La presencia del virus y los anticuerpos durante toda la vida del animal permiten el empleo de pruebas inmunológicas para detectar anticuerpos frente al virus y a la detección directa del mismo o de sus secuencias genéticas.

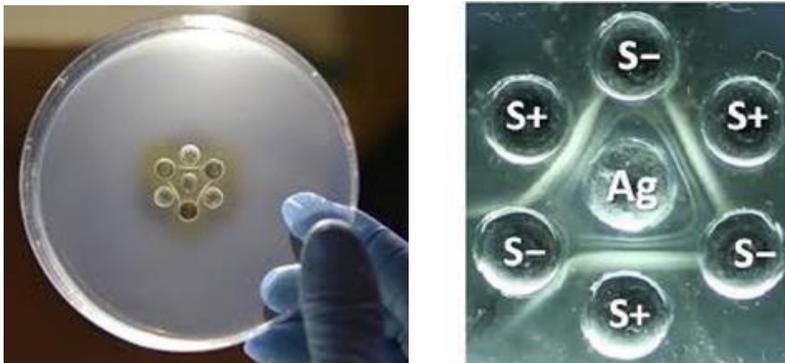
### **2.10.1 Métodos serológicos**

El virus induce una respuesta inmunológica con la producción de anticuerpos por parte del animal, esta seroconversión, si bien no lo logra neutralizar, es específica y permite identificar a los individuos infectados. La presencia de anticuerpos en el suero de los animales infectados suele ser de por vida, debido a la baja pero constante exposición de antígenos virales al sistema inmunológico. Existen varias técnicas para detectar estos anticuerpos y por tanto diagnosticar indirectamente la infección lentiviral. A continuación, se describirán las existentes, sus ventajas, desventajas, inconvenientes y serán evaluadas según su

sensibilidad (menor porcentaje de falsos negativos) y especificidad (menor porcentaje de falsos positivos).

### 2.10.1.1. IDGA

La inmunodifusión en gel de agar (IDGA), se basa en la detección de anticuerpos frente a antígenos específicos que se enfrentan difundiendo en una placa de agar gel, formando en su punto de encuentro una línea visible de precipitación. La IDGA para el diagnóstico de los SRLV fue aplicada por primera vez por Terpstra (Terpstra and De Boer 1973) y mejorado por Cutlip en 1977 (Cutlip et al. 1977). Utiliza como antígeno el virus completo concentrado procedente de sobrenadantes de cultivos celulares desnaturalizado con detergentes (de Andrés et al. 2005). Detecta anticuerpos frente a la proteína de la superficie SU (gp135), NC (p14) y de la cápside CA (p25). Se considera una técnica altamente específica (>98%) pero con una sensibilidad limitada del 91% (de Andrés et al. 2005). La IDGA está vinculada a la interpretación subjetiva del operario ya que puede arrojar diferentes resultados según la persona que realice la lectura. Otra desventaja de este test es que se necesitan al menos 24 horas para ver los resultados (Figura 11).



(<https://www.visavet.es/>)

**Figura 11:** Fotografía de una IDGA.

En la placa de Petri se observan 7 pocillos, el centro se corresponde al antígeno (Ag) y con 4 sueros incógnitos y dos controles positivo y negativo. En la parte derecha se muestra un ejemplo con tres sueros negativos (S -), tres positivos (S +) que presentan la línea de precipitación.

### **2.10.1.2. ELISAs**

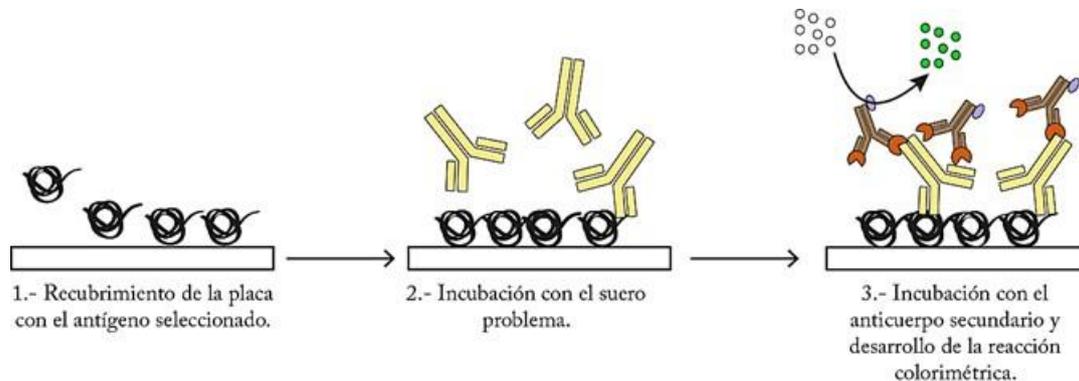
La técnica más utilizada para el diagnóstico de los SRLV es un método ELISA indirecto, que detecta anticuerpos específicos circulantes que se adhieren a su epítopo adherido a una superficie sólida, luego se agregan anticuerpos secundarios marcados con una enzima, que reconocen los anticuerpos primarios presentes en el suero y que, al añadir el sustrato para la enzima, generan una reacción coloreada que se puede medir por espectrofotometría (Figura 12) (Houwens et al. 1982; Voller and Bidwell 1976). Actualmente se considera el test serológico más sensible, es totalmente objetivo y permite procesar un gran volumen de muestras (de Andrés et al. 2005), muy útil en programas de erradicación.

Los cálculos de sensibilidad y especificidad de los ELISAs se han realizado por comparación con otras técnicas serológicas como el Radioinmunoensayo (RIA), IDGA, *Western Blotting* (WB), *Fluorescent cell immunoperoxidase (FCIP)*, radio inmunoprecipitación (RIPA), CFT (test de fijación de complemento) y otros ELISAs, así como también la comparación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la histopatología que son técnicas de detección directa (de Andrés et al. 2005; Schalie et al. 1994; Simard and Briscoe 1990; Zanoni et al. 1994). Para alcanzar las tecnologías actuales se dieron varias generaciones, en relación a las características de los conjugados y antígenos utilizados.

La primera generación de ELISAs utilizaba como antígeno el virus completo procedente de sobrenadantes de cultivos virales altamente purificados (al igual que la IDGA), y como anticuerpo secundario, sueros policlonales. Este tipo de test es muy sensible, pero su principal problema es la aparición de falsos positivos al coexistir proteínas celulares copurificadas con las virales. El inconveniente disminuía diluyendo la muestra, pero al mismo tiempo, lo hacía su sensibilidad incrementando los falsos negativos. La segunda generación de ELISAs, utilizó antígenos recombinantes producidos en *Escherichia coli* y empleando un conjugado monoclonal. Se emplearon como antígenos las proteínas CA (p25) y TM (gp46). La tercera generación incluye oligopéptidos sintéticos de gran pureza estructural, mejorando la especificidad, pero disminuyendo la sensibilidad, por lo que se le asocian proteínas recombinantes del core vírico para así igualar la sensibilidad lograda con los ELISAs de virus completo (de Andrés et al. 2005).

Sin embargo, existen test de ELISA capaces de detectar con alta sensibilidad y especificidad un genotipo específico de SRLV y poseer una baja sensibilidad para otros. La reactividad cruzada de los anticuerpos permite cierta plasticidad de las pruebas serológicas con respecto a las de biología molecular que son más restrictivas (de Andrés et al. 2005; Zanoni et al. 1996). El SENASA, en su manual de técnicas diagnósticas para SRLV, indica el ELISA indirecto como única técnica para la detección de animales infectados (Dillon et al. 2015a). En Argentina, las opciones comerciales de test de ELISA indirectos se restringen a *Maedi/CAEV*

*Total Ab screening test (Chekit) y MVV/CAEV p25 Ab Verification de Idexx* que son los utilizados por dicha institución, pero han sido retirados recientemente del mercado. El primer test contiene un virus completo, la cepa B1 de (ZZV1050) donada por Houwers (Zanoni et al. 1989), mientras que el segundo incluye como antígenos un péptido de la proteína de transmembrana (TM) del gen *env* y la proteína recombinante p25 de la misma cepa.



Echevarría Garin, I 15/09/2021

**Figura 12:** ELISA indirecto.

Los antígenos fijados al fondo del pocillo, se enfrentan con el suero incógnito, se adiciona un anticuerpo secundario ligado a una enzima que en caso de reconocer al anticuerpo primario permanecerá en el pocillo y será coloreado con el sustrato específico y dará una reacción colorimétrica visible que se medirá en un equipo específico.

### 2.10.1.3. WB y RIA

Estas metodologías son de alta especificidad y sensibilidad, por ello suelen utilizarse como test confirmatorios. Como son más dificultosas de realizar o insumen mayor cantidad de tiempo o dinero se utilizan como test confirmatorios luego de un cribado por IDGA o ELISA (de Andrés et al. 2005). El WB es una técnica utilizada para identificar proteínas específicas. Utiliza tres elementos, la separación por tamaño generalmente realizada en gel de poliacrilamida, la transferencia a un soporte sólido y el marcado de la proteína objetivo utilizando un anticuerpo primario (que en este caso es el del suero problema) (Mahmood and Yang 2012) arrojando una sensibilidad mayor a los test de ELISA (Brodie et al. 1993; Houwers and Nauta 1989; Zanoni et al. 1989).

El Radioinmunoanálisis (RIA) mide las radiaciones nucleares y permite cuantificar sustancias en concentraciones sumamente pequeñas como anticuerpos o antígenos virales libres. Se basa en la acción competitiva de un antígeno (Ag) por un anticuerpo (Ac). Un Ac puede encontrarse fijo en soporte y enfrentarse a una mezcla de Ag marcado con radiactividad (Ag\*) de concentración conocida y Ag problema (sin marcar). En otra versión de la técnica, se fija el Ag y se enfrenta a una mezcla de Ac\*/Ac. En ambos casos, la mezcla de productos marcados y sin marcar, competirá por el sitio de unión, cuanto menos agente marcado se una,

emitirá cada vez menos radiactividad que es medida por un contador. A través de una curva de calibración prediseñada, pueden identificarse las muestras positivas presentes (Lezama Carrasco 2018; Resino 2011). No es una técnica de uso rutinario. Se reserva únicamente para comparación, validación o investigación (de Andrés et al. 2005; Peterhans et al. 2004; Reina et al. 2009a; Stowring et al. 1979).

#### **2.10.1.4. Seroconversión intermitente**

La respuesta humoral típicamente describe una curva similar a la de  $X^2$  (Chi cuadrado) con un pico seguido por una meseta con una lenta declinación, manteniendo niveles séricos relativamente estables. Aunque existen investigaciones que hablan de una intermitencia en el título de anticuerpos (de Andrés et al. 2005). La fluctuación en el título de anticuerpos puede tener diferentes causas relacionadas con la interacción entre el virus (gran variabilidad en cepas de campo) y el hospedador (componente genético huésped asociado a mecanismos inmunológicos de restricción). También existen diferencias entre infecciones naturales y experimentales, se ha observado que las infecciones artificiales producen un título alto de anticuerpos mientras que las infecciones naturales son menos consistentes (de Andrés et al. 2005). Estos cambios pueden responder a reactivaciones de la infección o a diferencias en las dosis de virus asumidas por los animales. También existe la posibilidad de que la estirpe infectante, en un área o animal determinados, sea lo suficientemente diferente de la estirpe de referencia, con la que se ha preparado el antígeno del test, como para dar lugar a anticuerpos que reconozcan epitopes heterólogos (Torfason et al. 1992). La magnitud de la intermitencia tampoco se encuentra clara, pudiendo ser expresada entre el 10 y el 20% de los animales (de Andrés et al. 2005) con variaciones importantes dependiendo de la proteína antigénica considerada, los antígenos homólogos se reconocen antes que los heterólogos (Lacerenza et al. 2006), y el método que se utilice para su detección. Los anticuerpos pueden ser evidentes en animales con enfermedad subclínica e indetectables en otros con enfermedad evidente (de Andrés et al. 2013; Brinkhof and Van Maanen 2007). Sea como sea, la pérdida de anticuerpos representa un factor de confusión en los intentos de diagnosticar y erradicar la infección por SRLV (de Andrés et al. 2005).

Muchos estudios versan sobre las comparaciones de los resultados en métodos comerciales, principalmente ELISAs, la efectividad de los mismos radica en los genotipos utilizados como base de sus antígenos y su afinidad con el o los que se encuentren circulando en la región que se los utilice (Grego et al. 2005; Lacerenza et al. 2006).

#### **2.10.2 Diagnóstico clínico**

Si bien los signos clínicos (que ya fueron descritos en el apartado 2.5.4 [Signología y formas clínicas](#)) que producen los SRLV no son patognomónicos de la enfermedad, su aparición,

evolución y mantenimiento en los rebaños pueden llevarnos a sospechar de su presencia. No debemos olvidar que son de gran importancia informativa a la hora de realizar la necropsia en el animal y tomar muestras para el examen histopatológico, virológico, serológico y molecular. Sin embargo, el porcentaje de animales infectados que desarrollan la signología clínica es bajo. Estas alteraciones pueden ser coexistentes o no en un mismo rebaño y evolucionan lenta y persistentemente afectando la producción animal (Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015; Narayan and Clements 1989).

Es difícil llegar a un diagnóstico clínico de la enfermedad, debido a la ausencia de síntomas evidentes en animales infectados o bien por el solapamiento que puede existir con otros patógenos. Por ello, es que para cada cuadro clínico debe hacerse un diagnóstico diferencial frente a otros agentes etiológicos. El cuadro pulmonar debe distinguirse de afecciones tales como la adenomatosis pulmonar, infecciones parasitarias del pulmón, linfadenitis caseosa y de otras. En los casos con síntomas neurológicos debe tenerse en cuenta scrapie, listeriosis, rabia, encefalomiелitis ovina, infecciones parasitarias del SNC y lesiones que ocupan espacios del SNC (Dillon et al. 2015b). Las artritis conllevan la diferenciación de patologías traumáticas y micoplasmosis principalmente (Baird and Shipley 2021), mientras que las mastitis más frecuentes en rumiantes menores, son bacterianas, producidas mayoritariamente por *Staphylococcus* (Bergonier et al. 2003). Por todo este abanico de posibilidades patogénicas causantes de lesiones similares es que se han desarrollado métodos para el diagnóstico precoz y directo del virus.

### **2.10.3 Diagnóstico viral**

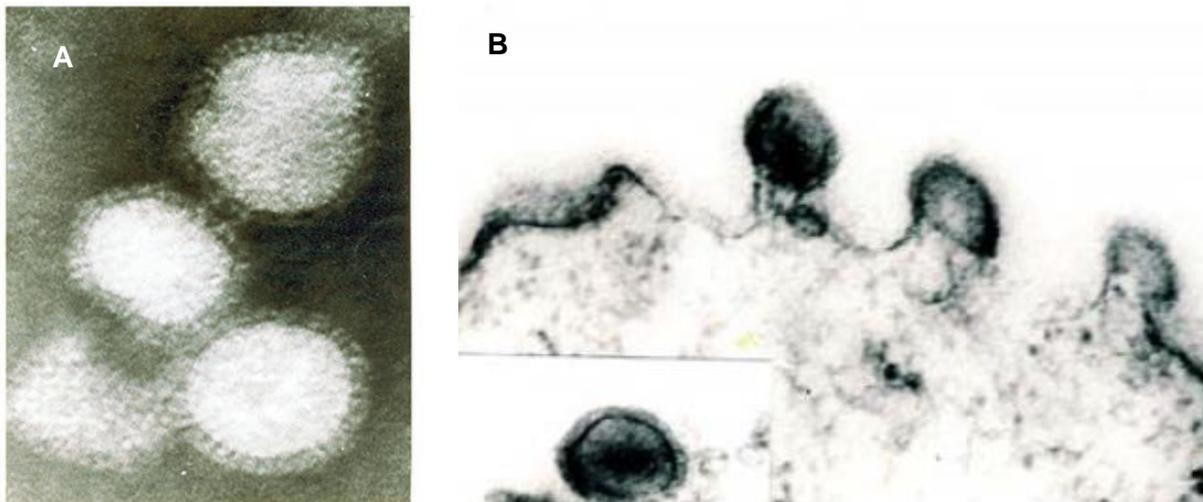
#### **2.10.3.1. Aislamiento**

Se basa en el cultivo de células permisivas a la infección como lo son los cultivos primarios ovicaprinos de plexo coroideo (Sigurdsson et al. 1960), fibroblastos (Lee et al. 1994; Ryan et al. 2000), membrana sinovial (Narayan et al. 1980), neumocitos (Sigurdardóttir and Thormar 1964), epiteliales mamarias (Bolea et al. 2006), células de la granulosa y teca (Lamara et al. 2002b; Lamara et al. 2001) junto con muestras sospechosas de contener SRLV. También se utilizan monocitos de sangre periférica, que se diferencian *in vitro* a macrófagos, donde el virus replica eficientemente, para luego evidenciar la presencia viral en células susceptibles capaces de mostrar efecto citopático evidente, como cultivos primarios, GSM u OSF (*ovine skin fibroblasts*) (Singh et al. 1999). Otras células permisivas son las líneas celulares *T-immortalized goat synovial membrane (GSM-T)* (Rolland et al. 2004), *monocytes ovine cell line (MOCL)* (Olivier et al. 2001), *T-antigen immortalized goat embryonic fibroblasts (TIGEF)* (da Silva Teixeira et al. 1997), *T-antigen immortalized goat milk epithelial cells (TIGMEC)* (Mselli-Lakhal et al. 2001), entre otras. El efecto citopático que el virus produce en la mayoría

de las células es la formación de sincitios, células gigantes multinucleadas, producto de la fusión de membranas, mientras que paralelamente se produce la lisis y muerte de muchas otras. Lamentablemente, este enfoque puede fracasar potencialmente en la detección de nuevos genotipos (es decir, un aislamiento infructuoso o un efecto citopático poco claro) debido a la capacidad limitada de algunas cepas de baja patogenicidad para adaptarse a los fibroblastos, por lo que técnicas como PCR para determinar la carga viral o la cuantificación de la actividad de retrotranscriptasa sirven para evidenciar la presencia del virus en los cultivos (Colitti et al. 2019).

### 2.10.3.2. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica ha permitido conocer las características morfológicas del virus (Coward et al. 1970; Takemoto et al. 1971; Thormar 2013; Thormar 1961a; Thormar and Cruickshank 1965) y determinar partes esenciales de su ciclo y naturaleza, pero no es un método utilizado para el diagnóstico de rutina. La técnica es laboriosa y poco asequible (Figura 13).



(Thormar 2013)

**Figura 13:** Microscopía electrónica de SRLV.

A: Una imagen de microscopía electrónica de transmisión de las partículas del VMV, de unos 80 nm de diámetro, que muestra una envoltura exterior cubierta de espículas. Tinción negativa. B: Virus brotando de la membrana celular. La imagen muestra un cuerpo esférico de doble pared libre de la misma sección, con un centro electro denso.

El virus se replica en muy baja tasa y no da lugar a un alto número de partículas virales libres, por lo que existen otras técnicas que utilizan la microscopía electrónica, capaces de develar con mayor sensibilidad su presencia. La microscopía inmunoelectrónica, puede de detectar antígenos virales libres y expresados en la membrana de las células infectadas (Carter et al. 2005).

### **2.10.3.3. Inmunohistoquímica (IHQ)**

Para determinar la causalidad directa de las lesiones en un determinado tejido u órgano se han desarrollado métodos de detección directos capaces de evidenciar la presencia de antígenos virales. La inmunohistoquímica (IHQ) utiliza anticuerpos específicos mono o policlonales en cortes histológicos, extensiones o cito centrifugas. Mediante IHQ, se ha demostrado la presencia de virus en lesiones encefálicas de ovejas infectadas por inoculación intracerebral con SRLV (Georgsson 1990a). Con esta técnica se ha detectado infección en macrófagos, células de formadoras de mielina, plexo coroideo (Sanna et al. 1999), células de la granulosa (Lamara et al. 2001), neumocitos, fibroblastos, células endoteliales (Carrozza et al. 2003) y células de la glándula mamaria entre otras (Bolea et al. 2006).

### **2.10.3.4. PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación de fragmentos específicos de ADN utilizando oligonucleótidos sintéticos (cebadores o *primers*) complementarios a la secuencia diana específica, con la ayuda de la enzima ADN polimerasa procedente de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), nucleótidos trifosfatos y una serie de ciclos a diferentes temperaturas y tiempos que permite generar un número exponencial de copias del fragmento de ADN suficientes para poder ser visualizadas en geles de agarosa (Mullis and Faloona 1987).

Los primeros diseños aplicados a los SRLV fueron los de Sonigo (Sonigo et al. 1985) y Zanoni (Zanoni et al. 1992). La mayor parte de las PCR diseñadas amplifican zonas específicas de las regiones *gag*, *env*, *pol* y LTR. Los moldes más utilizados son ADN genómico que proviene de leucocitos de sangre periférica (PBL), PBMC, células epiteliales mamarias, de cultivos primarios o líneas celulares e incluso tejidos (Ali Al Ahmad et al. 2008; Bolea et al. 2006; Leroux et al. 1997a; Ney Rômulo de Oliveira et al. 2009). Sin embargo, el virus se encuentra circulando en un porcentaje bajo de los monocitos sanguíneos, que a su vez representan tan solo el 1% de las células blancas sanguíneas (Amorena et al. 2001; Narayan et al. 1993; Narayan et al. 1983). Para superar este factor limitante, se generaron nuevas técnicas que incrementaron su sensibilidad, como son las PCR anidadas (PCRn) (Barlough et al. 1994; Karr et al. 1996), que constan de dos ciclos de amplificación consecutivos con dos juegos de cebadores, y en las que el producto del primer ciclo es molde del siguiente. Luego surgieron nuevos tipos de PCR, como la PCR semianidada (PCRsn) (Leroux et al. 1997a), la PCR *in situ* que combina la PCR con una hibridación *in situ* (ver más adelante) para la detección de secuencias virales en muestras de tejido. Para remediar los posibles desemparejamientos entre los cebadores y las secuencias de las cepas infectantes, se propuso la utilización de PCRs con cebadores degenerados (Eltahir et al. 2006).

La retrotranscripción-PCR (RT-PCR) que utiliza un paso previo de transformación del molde de ARN a ADN (Pépin et al. 1998) permite detectar virus libre no integrado en el genoma de las células o transcripción de los genes virales. También se han desarrollado PCR cuantitativas (qPCR) o “PCR tiempo real” (*Real time PCR*) para la detección de SRLV (Giammarioli et al. 2011; Olech et al. 2014; De Regge and Cay 2013). Éstas pueden determinar la cantidad inicial de copias de provirus presentes en el molde utilizado. Según se ha demostrado, son más rápidas y disminuyen el riesgo de contaminación con producto amplificado (Brajon et al. 2012; Niesters 2002). Dentro de este tipo de PCR se encuentra el kit comercial EXOone Maedi Visna-CAEV” de Laboratorio Exopol (Exopol). También se han desarrollado métodos de amplificación isotérmica como LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) (Balbin et al. 2014; Huang et al. 2012) o el método en *dipstick RPA-LFD* (recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick) (Tu et al. 2017).

El hecho de poder utilizar secuencias de ADN específicas y genomas completamente secuenciados, proporciona una herramienta versátil fácilmente adaptable al diagnóstico de tipos y subtipos específicos circulantes, aunque requiere un laboratorio más equipado para su utilización (Glaria et al. 2012; Grego et al. 2007; Olech et al. 2018; Olech et al. 2012; Shah et al. 2004a).

#### **2.10.3.5. Hibridación in situ (ISH)**

Esta técnica permite la visualización de ADN o ARN viral en preparaciones celulares o cortes de tejidos que estén infectados. La técnica se basa en la hibridación de una sonda oligonucleotídica específica marcada radiactivamente, con fluorocromos o conjugada para su revelado enzimático (Gendelman et al. 1985; Preziuso et al. 2004; Roy et al. 1992). La modificación de la técnica de Watt (Watt et al. 1990) permitió realizar la fijación para la IHQ e ISH al mismo tiempo, simplificando muchos pasos en su elaboración (Roy et al. 1992). Esta técnica ha permitido evidenciar la presencia de provirus e incluso de ARN viral en células de individuos que no han seroconvertido. Algunos de los tipos celulares que han sido analizados con ISH son: macrófagos, células de la mielina y del plexo coroideo (Sanna et al. 1999), células endoteliales, fibroblastos, adipocitos, neumocitos, epitelio y acinos mamarios (Bolea et al. 2006; Carrozza et al. 2003), entre otros. Esta metodología permite hacer relaciones causales, al igual que la IHQ y la PCR *in situ*, entre el virus y una patología, demostrando la presencia del mismo en el lugar específico. Sin embargo, debido a su complejidad, lentitud y costo, es utilizada únicamente en experimentación.

### **2.10.3.6. Detección de proteínas de fase aguda**

Las proteínas de la fase aguda (PFA) son unas de las primeras líneas de defensa de un organismo. Son un grupo heterogéneo de proteínas y polipéptidos cuya concentración sérica puede indicar la presencia de infecciones agudas o crónicas (Tecles et al. 2001). Se dividen en PFA positivas (+), que aumentan en la inflamación: amiloide sérico A (SAA), haptoglobina (Hp), ceruloplasmina (Cp), fibrinógeno (Fb), proteína C reactiva (CRP), anti tripsina alfa-1 (AAT), hemopexina (Hpx), proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP) y la glicoproteína alfa-1-ácida (AGP), que se utiliza en medicina humana como marcador bioquímico en patologías como el cáncer de mama, enfermedades hepáticas, renales, inflamatorias e infecciones víricas y bacterianas (Xu and Venge 2000); también se utiliza en medicina veterinaria como indicador de bienestar animal (Sierra 2019; Tadich 2011) y en el diagnóstico del Síndrome respiratorio bovino (SRB) (Pérez Villalobos 2016). Las PFA negativas (-) son las que disminuyen durante la inflamación: albúmina, transferrina (Tf) y transtiretina (TTR) (Ildoate et al. 2015; Iliev and Georgieva 2018; Tothova et al. 2014).

El trabajo de Czopowicz (Czopowicz et al. 2017), quien trabajó con la variación de estas proteínas en relación a los SRLV, ha sido poco esclarecedor, ya que es imposible relacionar sus niveles séricos con la presencia de SRLVs. En dicho estudio se muestran diferencias entre animales seropositivos sintomáticos en comparación con los seropositivos asintomáticos y seronegativos. Los sintomáticos tuvieron niveles más altos de SAA (5 veces mayor) y Hp (2 veces) pero no reportan diferencias entre seronegativos y seropositivos asintomáticos. Al observar un nivel más bajo de estas proteínas en cabras sin sintomatología, concluyen que la diferencia se debe a la presencia de inflamación y no al virus. El mismo grupo en 2018 (Reczyńska et al. 2018), encontró un nivel elevado de SAA en el suero de cabras infectadas con y sin signos clínicos de CAEV, así como una disminución de los niveles de SAA y Cp en la leche de esos animales. Estos resultados sugieren que SAA y Cp podrían ser de utilidad para ayudar en el diagnóstico temprano si se realizara un análisis en suero y leche en paralelo para diagnosticar SRLV en animales asintomáticos.

## **2.11 Control de SRLV**

### **2.11.1 Vacunas y tratamiento**

Si bien en la actualidad no existen vacunas disponibles para esta virosis, muchos han sido los intentos para su producción. La inmunización con virus atenuados o inactivados, (Cutlip et al. 1987; McGuire et al. 1986; Pearson et al. 1989) logra inducir anticuerpos, pero no una protección efectiva contra el virus. Se ha utilizado un clon no patogénico de VMV (LV1-1KS1) con el que se consiguió una disminución de la carga viral y un retraso en la aparición de la sintomatología, pero no se previno la enfermedad (Pétursson et al. 2005). La atenuación

natural, presente en los subtipos del genotipo E, carentes de dUTPasa, es capaz de dar lugar a una respuesta humoral y linfoproliferativa específica de genotipo, siendo la respuesta citotóxica más promiscua garantizando protección parcial en los animales inmunizados y su descendencia (Juganaru et al. 2011). También se han desarrollado vacunas ADN (González et al. 2005) basadas en el gen *env* e interferón gamma (*ifn- $\gamma$* ) inoculados vía mucosa vaginal mediante una pistola de genes. Se consiguió una protección transitoria basada en la disminución de la carga proviral. La inoculación de plásmidos conteniendo *gag* o *env*, o una mezcla de ellos, vehiculizados por nebulizador en partículas de polietilimina (Reina et al. 2008) y luego un refuerzo con un virus *Vaccinia ankara* recombinante portando la misma construcción génica, con o sin la presencia de *ifn- $\gamma$* , redujo la carga proviral y la intensidad de las lesiones presentes en los animales. Además, la inclusión de moléculas coestimuladoras de la familia B7 (CD80 y CD86) en el inóculo vacunal mejoró tanto la inducción de respuesta inmunitaria como la protección parcial (de Andrés et al. 2009).

Ninguna de las vacunas o estrategias vacunales probadas hasta el momento han superado la etapa de experimentación, demostrando la gran dificultad para la generación de una respuesta inmunitaria satisfactoria, que proteja a los animales de la enfermedad induciendo inmunidad esterilizante. Dejando las puertas abiertas a nuevas investigaciones sobre el tema y poniendo más énfasis aún en las estrategias de prevención, detección de portadores y segregación de los animales infectados.

No existe un tratamiento específico para SRLVs. La terapia de sostén tendiente a mejorar el estado clínico puede ser útil en animales individuales, pero no puede detener el progreso de la enfermedad (Trezeguet et al. 2015). Se ha propuesto el uso de fármacos, tales como 9-(2-fosfonilmetoxietil) adenina (*PMEA*), análogo del fosfato nucleósido y potente inhibidor de la transcriptasa reversa, que inhibe la replicación *in vitro* del virus y experimentalmente demostró la disminución de la carga viral y la sintomatología clínica en infecciones experimentales en animales tratados con esta droga (Thormar et al. 1998; Thormar et al. 1995). Al igual que la utilización del interferón *Tau* (Juste et al. 2000; Juste et al. 1996) y otras drogas antirretrovirales, pero hasta el momento no existen tratamientos efectivos o asequibles en cuanto al costo-beneficio, que permita su utilización en pequeños rumiantes.

### **2.11.2 Medidas de control**

Al tratarse de una enfermedad lentiviral con la presencia de un virus estable integrado en el genoma, el animal infectado será portador de por vida y posible fuente de contagio a otros, de manera continua (Clements and Zink 1996). Con lo cual, todas las medidas de control apuntan a la detección temprana de individuos infectados y a su eliminación consiguiendo la prevención del contagio y de la propagación de la infección.

En Islandia, en el momento de hacer irrupción la enfermedad y, por no contar con métodos de diagnóstico fiables en los años 40, se llevó a cabo el sacrificio completo de todo rebaño en que hubiera algún animal enfermo, vacío sanitario y posterior reposición con animales provenientes de áreas no afectadas. Esta metodología fue eficiente, pero presenta un elevado costo económico y requiere la certeza de estar incorporando animales libres de la enfermedad, hecho que fue facilitado en dicha isla debido a la existencia de una barrera geográfica (glaciar) que impedía el tránsito de animales y por tanto del virus, a ambos lados de la misma (Pétursson 1994).

Los métodos de control evolucionaron a la detección de los animales seropositivos, su segregación y sacrificio con la sustitución por individuos seronegativos acreditados. Este sistema puede llevarse a cabo si la prevalencia de la enfermedad es baja y existen recursos económicos suficientes por parte de los productores o de los organismos de control involucrados (Blacklaws et al. 2004; Chacón and Naranjo 2004).

Una tercera alternativa es la de separar físicamente a los animales infectados (de Boer et al. 1978; Houwers and Nauta 1989; Schipper et al. 1985) de los seronegativos realizando un manejo en paralelo de dos rebaños (Minguijón et al. 2015) y realizar controles cada cierto tiempo para incluir a los nuevos infectados en su grupo correspondiente (Konishi et al. 2011). Hacer las reposiciones solo con animales seronegativos y alimentar a los cabritos o corderos con calostro y leche de seronegativos o debidamente sanitizada (Adams et al. 1983; Blacklaws et al. 2004; Konishi et al. 2011; Krebs et al. 1999; Luján et al. 2001; Minguijón et al. 2015; Piret et al. 2005; de Sousa et al. 2019).

La pasteurización del calostro se realiza a 56°C por 30 min, ya que a esa temperatura se inactiva al virus sin afectar la funcionalidad de las inmunoglobulinas. Por otro lado, en el caso de la leche, ésta se puede pasteurizar a más temperatura debido a que no hace falta proteger la funcionalidad de las inmunoglobulinas; pudiendo utilizarse la forma tradicional de pasteurización (60-63°C durante 30 min), la forma “de alta” (75°C durante 15 seg), o incluso llevarse a punto de ebullición y dejarse enfriar. Tanto para la administración de calostro o leche puede utilizarse la opción de suministrar el fluido de otra especie (libre de SRLV si son pequeños rumiantes) o proporcionar el sustituto lácteo comúnmente usado en el tambo bovino comercial (Álvarez et al. 2005; Houwers et al. 1983; Leitner et al. 2010; Rowe and East 1997). Como la enfermedad lentiviral puede transmitirse por sangre y fluidos, es importante la toma de medidas en todo lo que tenga que ver con intervenciones humanas como despezñado, descornes, cirugías, vacunaciones, utilizando material descartable o debidamente sanitizado. Deben tomarse medidas higiénicas sobre corrales de parto y equipamiento de uso común como esquiladoras, tijeras de esquila o la maquina ordeñadora (Brajon et al. 2012; Fieni et al. 2003; Fieni et al. 2002; Rowe and East 1997).

Existen propuestas en la detección y control, como las de Brinkhof (Brinkhof et al. 2010a; Brinkhof 2009; Brinkhof and Maanen 2010; Houwers 1990; Sihvonen et al. 2000) que combinan el poder de la serodetección y de la PCR para el diagnóstico precoz, reduciendo los tiempos de espera entre la infección y la serodetección y evitando el período de confusión producido por la interferencia de anticuerpos maternos del calostro en los cabritos y corderos, que según Czopowicz pueden permanecer hasta los 6 meses de edad (Czopowicz et al. 2018).

Las estrategias de control actuales implican un diagnóstico certero que distinga entre animales infectados y libres del virus. Es en este punto donde surgen mayores problemas debidos a la gran variabilidad que existe entre las cepas víricas y en la respuesta inmunitaria de los animales (Menéndez-Arias et al. 2017). Esperar que un solo *kit* serológico o una única PCR sea capaz de detectar cualquier estirpe, tratándose de un SRLV, parecería casi una utopía. Es por eso que es importante generar información sobre las estirpes circulantes de manera periódica y no restringirse a una sola metodología o *kit* durante tiempos muy prolongados.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

En Argentina, se ha detectado la presencia de lentivirus en ovinos y caprinos (lentivirus de pequeños rumiantes, SRLV) en diferentes provincias a partir de estudios serológicos desde el año 2001. La provincia de Salta cuenta con más de medio millón de animales susceptibles a esta infección y actualmente no se conoce la incidencia de la enfermedad ni el potencial impacto socio-económico que puede suponer, por lo que existe la necesidad de desarrollar una metodología adecuada que permita el aislamiento y la caracterización molecular de las cepas circulantes. Esta información podrá emplearse para la toma de decisiones en cuanto a los métodos diagnósticos más adecuados para el control de la infección. Además, se han detectado cuadros clínicos que podrían ser causados por la infección en rebaños caprinos.

#### **3.1 Hipótesis:**

Los SRLV están presentes en la provincia de Salta causando artritis incluso en animales jóvenes dificultando así la viabilidad de las explotaciones.

#### **3.2 Objetivos:**

##### **3.2.1 Objetivo General**

Identificar, aislar y caracterizar molecularmente los SRLV presentes en la provincia de Salta para diseñar nuevos métodos diagnósticos basados en PCR capaces de detectar específicamente los SRLV circulantes.

##### **3.2.2 Objetivos Específicos**

- i. Establecer un cultivo primario de células que permita optimizar el aislamiento del virus.
- ii. Aislar en cultivo celular estirpes de SRLV procedentes de casos artríticos.
- iii. Tipificar molecularmente los virus SRLV circulantes en la zona de estudio.
- iv. Desarrollar una técnica de PCR de tiempo final para el diagnóstico de la virosis adaptada a la realidad argentina.
- v. Caracterizar socioeconómico y productivamente a los hatos utilizados en el estudio de forma que permita relacionar la epidemiología viral con la realidad campesina de la zona.
- vi. Proponer y desarrollar metodologías de manejo para el saneamiento de la enfermedad.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Animales

En la provincia de Salta se realizó la toma de muestras de un total de 787 animales, en su mayoría caprinos adultos entre 2 y 6 años de las cruzas lecheras y carniceras que se distribuyen en la zona, procedentes de 30 explotaciones. Se trabajó con dos establecimientos extra provinciales, de los cuales se tenían sospechas de la presencia del virus. Ellos fueron los hatos número 16180-81, con 52 animales muestreados en la provincia de Catamarca, y el hato 16345 con 88 muestras de la provincia de Jujuy. Haciendo un total de 32 hatos y 927 animales. La toma de muestras de las tres ecorregiones se llevó a cabo solo en los lugares en los que se pudo mantener las condiciones de tiempo, cuidado y cadenas de frío que permitiesen su utilización en el presente estudio. Si esto no podía ser asegurado o la muestra no llegaba en condiciones, el hato era rechazado y no formaba parte del estudio.

El número de animales muestreados por hato fue típicamente de 20, a excepción de los hatos con menos de 20 animales en los que se muestreó la totalidad. Los hatos con más de 300 animales se muestrearon entre 50 y 90 animales, según disponibilidad.

Adicionalmente, se contó con una majada experimental, la explotación 17138 correspondiente al tambo de la Estación Experimental Agropecuaria Salta (EEA Salta), que disponía al inicio del plan de esta tesis con 73 caprinos de raza Saanen, compuesto de 61 hembras, 4 machos y 8 cabrillas de reposición. Este grupo se utilizó como unidad experimental debido a que se ha detectado la presencia de animales seropositivos con síntomas, las condiciones son controladas y fue factible el seguimiento individual de animales, su análisis clínico exhaustivo con énfasis en aparato locomotor, el seguimiento clínico individual y la toma reiterativa de muestras y tejidos y la realización de una prueba de practicidad del manejo e implementación de medidas y protocolos sanitarios.

Los animales utilizados en esta tesis se distribuyeron en las tres principales ecorregiones, el Chaco Salteño (CS) 4 explotaciones, Valles Templados de Altura (VT) 8 explotaciones y Valles y Quebradas Áridas (QA) 20 explotaciones. El Chaco es una llanura, húmeda con clima subtropical, las precipitaciones medias anuales son entre 400 a 800 mm. Los Valles Templados de Altura poseen menores temperaturas y una altitud media de 1100 msnm, las precipitaciones varían entre 500 y 1000 mm anuales. Mientras que los Valles y Quebradas Áridas de altura oscilan entre 1000 y 3000 msnm y sus precipitaciones anuales son de 250 a 500 mm. El régimen de lluvias es estival en toda la zona (Bravo et al. 2012).

La distribución de las explotaciones en ecorregiones, el número de muestras recogidas y el tipo se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Distribución de los hatos por ecorregión.

Se indica además el número de muestras, así como el tipo en cada explotación.

Establecimiento	Ecorregión <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Suero	Buffy coat
16282	CS	26	Sí	Sí
16315	CS	26	Sí	Sí
16316	CS	28	Sí	Sí
16317	CS	27	Sí	Sí
14240	QA	11	Sí	No
14241	QA	15	Sí	No
14364	QA	20	Sí	No
14365	QA	20	Sí	No
16418	QA	22	Sí	Sí
16419	QA	20	Sí	Sí
17088	QA	50	Sí	Sí
17089	QA	30	Sí	Sí
17090	QA	33	Sí	Sí
17091	QA	57	Sí	Sí
17092	QA	57	Sí	Sí
18126	QA	5	Sí	No
18190	QA	6	Sí	No
18123-24	QA	15	Sí	No
18128-29	QA	16	Sí	No
18131-191	QA	12	Sí	No
18185-87	QA	16	Sí	No
18315-19	QA	28	Sí	No
15207	VT	20	Sí	No
15208	VT	20	Sí	No
15210	VT	20	Sí	No
15304	VT	29	Sí	No
15347	VT	16	Sí	No
16253	VT	20	Sí	Sí
17096	VT	49	Sí	Sí
17138	VT	73	Sí	Sí
16180-81	QA Catamarca	52	Sí	Sí
16345	QA Jujuy	88	Sí	No

Ecorregión<sup>1</sup> QA= Valles y Quebradas Áridas VT= Valles Templados CS= Chaco Salteño. N<sup>2</sup>= Número de animales muestreados del hato.

#### **4.2 Características de las explotaciones y particularidades**

De todas las explotaciones visitadas, se recabaron los datos proporcionados por una encuesta *ad hoc*, que a través de preguntas y con la ayuda de fotos de lesiones, facilitó la recopilación de datos sanitarios, de manejo general, socioeconómicos y productivos. El detalle del formulario utilizado se muestra en el Anexo I [Encuesta socioeconómica, productiva y sanitaria](#).

Se realizarán una serie de aclaraciones de terminologías y particularidades de la zona que facilitarán el entendimiento de las descripciones que se realicen posteriormente.

- **Tipo de producción**

Se clasifican en dos tipos según el objetivo principal de cada rebaño, la cría o la producción lechera.

**Cría:** En los hatos dedicados a la cría (producción de carne), su producto final es el cabrito, por lo general entre 2 y 7 meses, para la venta o el autoconsumo. Es extraño que se comercialicen categorías de mayor edad, como cabrillonas y capones. Los establecimientos dedicados a la cría aprovechan la producción láctea de los animales para el ordeño y la producción de quesos.

**Producción lechera:** Los hatos dedicados a esta producción (tambos comerciales en algunos casos) pueden incluir la elaboración de quesos o no. Pero todos ellos tienen como excedente a los cabritos machos, que o bien se destinan al autoconsumo o se comercializan como cabritos.

- **Tipo de explotación**

En esta tesis se clasificaron las explotaciones en tres tipos, basados en el criterio de propiedad del rebaño, nivel de tecnificación alcanzado e incorporación al circuito comercial y el nivel de producción individual de los animales.

En cuanto al tipo de propiedad podemos encontrar:

**Explotación de tipo familiar:** Corresponde a un hato, que puede tener como objetivo la producción de carne (cría), representados por 22 establecimientos, o de leche y subproductos (lechera) con 20 representantes. Su característica principal es el hecho de ser propiedad, atendido y manejado por una unidad familiar. La mayoría de ellos están destinados al autoconsumo dentro del marco de economías de subsistencia, con la venta eventual de los excedentes siendo la producción individual de los animales baja.

**Explotaciones familiares capitalizadas:** Es un hato, por lo general, con mayor número de animales, destinado a la producción de carne o de leche y subproductos, propiedad de una familia, atendido y manejado por los mismos, pero con la incorporación de mejoras tecnológicas e incorporados a la red comercial. Puede poseer además empleados extra familiares.

**Tambo comercial:** Hato destinado a la producción de leche y subproductos con destino a comercialización formal. Por lo general pertenece a empresas privadas o estatales. Posee mejoras tecnológicas y una producción individual por animal alta.

### **4.3 Toma de muestras y conservación**

#### **4.3.1 Sangre periférica:**

Se realizaron extracciones de la vena yugular de animales de rodeos sospechosos en:

- Tubos con anticoagulante EDTA para la separación de plasma y el concentrado de glóbulos blancos (*buffy coat*) por centrifugación.
- Tubos sin anticoagulante para la obtención del suero tras la extracción del coágulo hemático. Todas las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

#### **4.3.2 Líquido articular**

Se tomaron muestras de líquido articular de animales con patología clínica del rebaño 17138 por punción directa de la articulación intercarpiana con el uso de material estéril y lavados quirúrgicos. Las muestras se procesaron en esterilidad bajo flujo laminar. Las muestras a remitir al Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, INTA CONICET (IABIMO), se colocaron en crio tubos con PBS y una mezcla de antibiótico y antimicótico (ATB/ATM; ©Gibco) y se conservaron en frío (4 a 10°C) para su transporte, mientras que las que se enviarían al Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-Gobierno de Navarra (IdAB), fueron resuspendidas en suero autólogo y DMSO 10%.

#### **4.3.3 Leucocitos para cultivo *in vitro***

A partir de los animales seropositivos del hato 17138, se realizó una tricotomía de la zona de la gotera yugular y tres lavados. Se efectuó la venipunción con agujas estériles y jeringas con EDTA 0,2M, las muestras se manejaron en esterilidad bajo flujo laminar y fueron remitidas frescas (5 a 18°C) de forma inmediata al IABIMO para su cultivo *in vitro*.

Los leucocitos de sangre periférica para criopreservación, se separaron por centrifugación de la sangre entera, 30 min a 1050g, obteniéndose el *buffy coat*, se realizaron dos lavados con *red blood cells (RBC) buffer* (NH<sub>4</sub>Cl 0,14M, Tris 1M, pH 7,65) estéril. Los leucocitos se resuspendieron en PBS estéril para conservarse en crio tubos con suero autólogo y 10% de DMSO en termo de nitrógeno líquido.

#### **4.3.4 Tejido dérmico:**

Se realizaron biopsias de piel del área inguinal, para el desarrollo de un cultivo primario de fibroblastos caprinos (Eca) y ovinos (Eov). Para ello se utilizaron caprinos del hato experimental 17138. Se realizó la tricotomía de la zona seleccionada y se practicaron las desinfecciones quirúrgicas pertinentes. Se aplicó anestesia local mediante un bloqueó en "L" con lidocaína-epinefrina y se practicó un corte de piel de al menos de 1cm<sup>2</sup>, se suturó y desinfectó adecuadamente. Las muestras se conservaron (4 a 10°C) en PBS con ATB/ATM para su remisión al IABIMO y al Instituto de Virología del CICVyA, INTA (IV).

#### **4.3.5 Muestras para histopatología**

A partir de los animales con patología clínica del rebaño 17138, al momento del sacrificio, se realizó la necropsia y toma de muestras para el análisis histopatológico de algunos de los casos. Se siguió el protocolo de necropsia descrito por Robles (Robles and Uzal 2001) y el procesamiento convencional por las técnicas histológicas de rutina de fijación en formol, inclusión en parafina y tinción con hematoxilina/eosina (Kiernan 2015).

#### **4.4 Remisión de muestras**

##### **IABIMO**

- Las muestras de sangre para cultivo *in vitro* se mantuvieron refrigeradas, entre 5 y 18°C y se enviaron vía terrestre para ser procesadas en un tiempo menor a 36 h.
- Las muestras de tejido (biopsias de piel y tejido articular) fueron recolectadas en el día y enviadas refrigeradas vía aérea para ser procesadas en un tiempo menor a 36 h.
- Los plasmas, sueros y *buffy coat* se remitieron congelados y acompañados de refrigerantes por vía terrestre (en un trayecto de 1600km y 24 h de duración).

##### **IdAB**

- Los leucocitos para cultivo *in vitro* y el líquido articular criopreservados, se enviaron en termos de nitrógeno líquido como paso previo al envío aéreo internacional que se conservó en hielo seco.
- Los plasmas, sueros y *buffy coat*, enviados previamente al IABIMO, se conservaron también en hielo seco durante el traslado aéreo internacional.

#### **4.5 Caracterización molecular de cepas**

##### **4.5.1 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN de los leucocitos, en el IdAB se utilizó el kit “*E.Z.N.A® Blood ADN Mini kit Quick*” de OMEGA según las indicaciones del fabricante, este kit permite realizar extracciones de ADN a partir de muestras de sangre, *buffy coat*, células de cultivo y pequeños trozos de tejido.

En el IABIMO, se utilizó para la extracción de ADN a partir de células en cultivo el método Dellaporta (Dellaporta et al. 1983). Brevemente, las células fueron congeladas y descongeladas, tres veces. Se trataron con buffer de lisis (Tris 200mM pH 8, EDTA 20mM pH 8, NaCl 200mM, SDS 2% y 2-mercaptoetanol 10mM) durante 10 min a 65°C y se agregó un volumen de acetato de potasio 5M, se mezcló por inversión suave y se centrifugó durante 30 min a 10000g en microcentrífuga. Se recuperó el sobrenadante y el ADN se precipitó mediante el agregado de un volumen de isopropanol. Luego de centrifugar durante 20 min a 10000g,

se lavó el pellet obtenido con etanol 70% y se procedió a su secado. Finalmente, el ADN precipitado fue resuspendido en 40µl de agua milli Q, calidad para PCR.

La cuantificación del ADN se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro *Nanodrop One* (Thermo).

#### 4.5.2 PCRs utilizadas

Para la caracterización molecular se utilizaron las siguientes PCRs. Sus perfiles térmicos y condiciones de ciclado se muestran en el Anexo I 9.1 [Protocolos](#).

**nPCR:** PCR *Nested* desarrollada por Grego (Grego et al. 2007), permite amplificar una región del fragmento *gag-pol* de los SRLV de 800pb aproximadamente. Para la ronda 1 (G1) de amplificación se utilizó el par de cebadores GAG F1 y POL R1, mientras que para la segunda ronda (G2) de PCR se usaron los cebadores GAG F2 y POL R2 (Tabla 2), utilizando la Taq polimerasa comercial de Biotools en el IdAB o la *GoTaq* de Promega en el IABIMO.

Se probaron diferentes cantidades de ADN molde desde 100 a 1000ng de ADN por reacción y entre 2 y 4µl de G1 como molde para G2.

**Tabla 2:** Cebadores nPCR

Cebador	Secuencia	$T_m^1$	$T_a^2$
<b>GAG F1</b>	5'-TGGTGARKCTAGMTAGAGACATGG-3'	71	66
<b>POL R1</b>	5'-CATAGGRGGHGC GGACGGCASC A-3'	78	73
<b>GAG F2</b>	5'-CAAACWGTRGCAATGCAGCATGG-3'	69	64
<b>POL R2</b>	5'-GCGGACGGCASCACACG-3'	60	55

<sup>1</sup>  $T_m$ = temperatura de *melting* <sup>2</sup>  $T_a$ = temperatura de *annealing*

**OSLO-POL-R2:** Esta PCR combina cebadores descritos por Rimstad (Rimstad et al. 1993) y Grego (Grego et al. 2007) y amplifica también un fragmento de la región *gag-pol* de los SRLV de 800 pb aproximadamente (Tabla 3).

Se realizó un gradiente de temperatura de *annealing* entre 55 y 58°C, un gradiente de MgCl<sub>2</sub> entre 1mM y 2mM y de ADN molde entre 300 y 1000ng totales.

**Tabla 3:** Cebadores OSLO-POL-R2

Cebador	Secuencia	$T_m^1$	$T_a^2$
<b>OSLO Fw</b>	5'-CAAACAGTGGCAATGCAGCATG-3'	66	61
<b>POL R2</b>	5'-GCGGACGGCASCACACG-3'	60	55

<sup>1</sup>  $T_m$ = temperatura de *melting* <sup>2</sup>  $T_a$ = temperatura de *annealing*

**LTR-OSLO:** Combinación de cebadores descritos por Zanoni y Rimstad (Rimstad et al. 1993; Zanoni et al. 1992) cuyo fragmento amplificado está situado en la región *LTR-gag* de 1260pb aproximadamente (Tabla 4).

Se realizó un gradiente de ADN molde entre 300 y 1000ng totales.

**Tabla 4:** Cebadores LTR-OSLO

Cebador	Secuencia	$T_m^1$	$T_a^2$
<b>LTR Fw</b>	5'-TGACACAGCAAATGTAACCGCAAG-3'	66	61
<b>OSLO Rw</b>	5'-GGCATCATGGCTAATACTTCTAA-3'	64	59

<sup>1</sup>  $T_m$ = temperatura de *melting* <sup>2</sup>  $T_a$ = temperatura de *annealing*

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa 1-2% teñidos con el intercalante *Midori Green Advance* (Nippon Genetics Europa) o bromuro de etidio utilizando el *buffer* de corrida TAE.

#### 4.5.3 Clonación y análisis de secuencias

Los amplicones obtenidos fueron extraídos del gel de agarosa 1-2% utilizando la matriz *Ultraclean®* (*DNA Purification Kit* de MOBIO). El fragmento se clonó en el plásmido pGEM-T® (*Easy vector System I* de Promega) y con esta construcción se transformaron bacterias *E.coli* XL1 *Blue* o en *E.coli* DH5α por electroporación o choque térmico, respectivamente. Las colonias fueron seleccionadas en placas con LB Ampicilina (Amp) con el agregado de 0,5mM IPTG y 80μg/ml X-Gal por placa (LB<sub>Amp</sub> Xgal IPTG). Se seleccionaron colonias blancas a las que se les realizó una extracción de ADN plasmídico, mediante *E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I* o utilizando el método de Bimboim y Doly, que es un método sencillo que mediante variaciones de pH insolubiliza el ADN cromosómico dejando soluble el plasmídico (Bimboim and Doly 1979). Los plásmidos obtenidos fueron analizados mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* para determinar la presencia del inserto esperado. Los vectores seleccionados fueron enviados para su secuenciación a servicios externos (StabVida y Macrogen) con la utilización del cebador universal M13 *Rv* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Una vez obtenidas las secuencias, se editaron y ensamblaron con el programa *Chromas 2.6.4* (Technelysium Pty Ltd). El alineamiento se realizó con el programa *BioEdit* (Hall 1999) utilizando las rutinas del programa *Clustal X* (Larkin et al. 2007). Para el análisis filogenético se utilizó el algoritmo *MUSCLE* para el alineamiento y para la matriz de identidad el test de máxima probabilidad compuesta con *Bootstrap* de 1000 con el *software* libre *MEGA* (Kumar et al. 2018). Los árboles filogenéticos fueron realizados con el mismo *software*.

Para el diseño de cebadores se utilizó *BioEdit* (Hall 1999) y para comprobar la compatibilidad *in silico* de los pares de cebadores se utilizó la versión *web* del programa *OligoAnalyzer 3.1* (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). El análisis de las mutaciones y sus consecuencias en la composición de aminoácidos de las cepas se realizó con la versión *web* del *software* libre *SNAP* (Korber 2000).

#### 4.5.4 Desarrollo y puesta a punto de PCRs para el diagnóstico de SRLV

**Diseño de cebadores:** Las secuencias obtenidas con nPCR y OSLO-POL-R2 se analizaron con el software BioEdit y se identificaron las regiones internas más conservadas. En base a esto se diseñaron los siguientes cebadores (Figura 14 y Tabla 5):



**Figura 14:** Lugar de reconocimiento de los cebadores.

Se muestran los cebadores diseñados nombrados por la posición de su alineamiento sobre el fragmento nPCR del animal 277.

**Tabla 5:** Cebadores diseñados para las cepas salteñas

Cebador	Secuencia	$Tm^1$	$Ta^2$
<i>Fw78</i>	5'TGGCCATGATGCCTGGRAA3'	58°C	53°C
<i>Fw191</i>	5'AATAATCCACCACCTCCAGCAG3'	66°C	61°C
<i>Fw227</i>	5'TGGATCAAATTATGGGGGTAGGAC3'	70°C	65°C
<i>Fw275</i>	5'CTAACATGGATCAGGCAAGACAA3'	66°C	61°C
<i>Rv542</i>	5'ACACTAGCCTGTTGTACTCT3'	62°C	57°C
<i>Rv700</i>	5'TGTCTGCATTGCCTTGCCTGA3'	64°C	59°C
<i>Rv738</i>	5'ATGCCCTCTTTTCCACAAT3'	56°C	51°C

<sup>1</sup>  $Tm$ = temperatura de *melting* <sup>2</sup>  $Ta$ = temperatura de *annealing*

**Puesta a punto de la PCR:** Se realizaron combinaciones de los cebadores diseñados, un gradiente de  $MgCl_2$  entre 1,5 y 2mM, un gradiente de temperatura de *annealing* entre 55 y 60°C, de 35 a 45 ciclos y un gradiente de ADN molde entre 25 y 600ng totales.

Para facilitar la nomenclatura los cebadores utilizados en las PCR se llamarán con su número (posición en el fragmento analizado donde comienza su adhesión 5' 3'), separados por una barra (/). Para aquellas PCR que utilicen más de un par de cebadores o más de una ronda de amplificación, se utilizará un nombre abreviado definido previamente.

Se pusieron a punto las PCR de punto final *Fw227/Rv700*, *Fw191/Rv738*, *Fw78/Rv738*. La PCR multiplex *Fw227-Fw275/Rv542* cuyo nombre abreviado será Multiplex de tres cebadores, (M3) se encuentra detallada en el Anexo I 9.1 [Protocolos](#).

#### Diseño de nested PCR:

Se realizaron las combinaciones de los cebadores internos de la nPCR, a lo que se llamará en lo siguiente G2 (G2=GAG F2 y POL R2) como primer ciclo, con las combinaciones de cebadores M3 y *Fw227/Rv700* (esta segunda ronda se abreviará como 500, ya que amplifica un fragmento de ese tamaño). Se utilizaron las mismas condiciones que en las PCR de tiempo

final y se probaron como molde de la segunda ronda de amplificación entre 1 y 4 microlitros del producto de la primera ronda de PCR. Finalmente se obtuvieron las dos *nested* PCR que se describen en el Anexo I 9.1 [Protocolos](#) y que se denominaron nG2/M3 y nG2/500.

## **4.6 Cribado serológico**

### **4.6.1 ELISAs indirectos comerciales**

Se realizó el cribado serológico de la totalidad de las muestras de plasma y/o suero con los test de ELISA indirecto “*Pourquier® ELISA Maedi/CAEV Screening*” del laboratorio Pourquier y “*Elitest VMV/CAEV*” del laboratorio HYPHEN BioMed. Los test *Elitest* y *Pourquier* utilizan como antígenos un péptido de una proteína de transmembrana (TM) de *env* y la proteína recombinante p25, el primero basado en la cepa EV1 y el segundo en otra perteneciente también al genotipo A de SRLV. También se utilizó el kit “*MVV/CAEVp25Ab Verification*” del laboratorio Idexx que está basado la proteína recombinante p25 de una cepa del genotipo B1 en 132 muestras elegidas y el test “*Erradikit VMV/CAEV*” del laboratorio IN3Diagnostic, sobre 348 muestras. Este último utiliza como antígeno una mezcla de antígenos recombinantes de p25 y TM de los genotipos A, B y E. Todos los kits serológicos fueron utilizados según las indicaciones del fabricante.

### **4.6.2 Prueba de péptidos sintéticos para la detección de cepas argentinas**

Se emplearon 8 péptidos sintéticos diseñados anteriormente teniendo en cuenta algoritmos de antigenicidad de la zona *gag-pol* (Ramirez 2010), como antígeno en un ensayo de ELISA con las muestras argentinas de suero/plasma. Para ello, se colocaron 100µl de una solución 0,5ng/µl de péptidos disueltos en *buffer* carbonato/bicarbonato 0,1M y se los dejó destapados en estufa de 37°C un mínimo de 8 h hasta su completa desecación. Luego, las placas fueron lavadas dos veces con una solución de lavado (SL) que fue Tritón 1% en NaCl 16% y se bloqueó la placa con 150µl de caseína 2,5% en NaOH 0,3M pH 7 en estufa de 37°C por al menos 1 h. Se lavó 4 veces con SL y se procedió a la incubación con las muestras de suero o plasma. Las muestras se diluyeron 1:20 en tampón de dilución (TD) formado por caseína 1,25% en PBS y se utilizaron 100µl por pocillo incubado a 37°C por una h. Se lavó 4 veces con SL y se adicionaron 100µl de conjugado anti rumiante (*EG5* Ingenasa) marcado con la enzima peroxidasa, diluído 1:100 en TD incubándolo a 37°C en estufa por 1 h. Luego se lavó nuevamente 4 veces con SL y se añadieron 100µl del sustrato ABTS (Millipore) resguardando las muestras de la luz un mínimo de 15 min para, a partir de ese momento, realizar un seguimiento cada 15 min midiendo el cambio de coloración en un espectrofotómetro para placas de ELISA a 405nm, por el lapso de una h.

### 4.6.3 Clonado y expresión de la proteína p25 de SRLV salteños

Para identificar la región genética que codifica la proteína de la cápside p25 en las secuencias disponibles de las cepas de SRLV salteñas, se utilizó como base la secuencia del virus CAEV *Cork* (*GenBank* M33677.1), en el que la región codificante de la proteína p25 comienza en la base 487 y termina en la 1092. Se realizó un alineamiento entre M33677.1, las salteñas y otras secuencias disponibles de genotipo B con el fin de identificar los nucleótidos que codifican los aminoácidos de la cápside utilizando el *software* libre *Justbio*, (<https://www.justbio.com/hosted-tools.html>).

#### 4.6.3.1. Diseño de cebadores para amplificar p25

Según la numeración del gen *gag* en M33677.1 de 1346pb, el cebador *Fw* comprende las bases 484 a 503, mientras que el cebador *Rv* abarca las bases 1073 a la 1092, dando un amplicón esperado de aproximadamente 608pb (Tabla 6).

Se tomó como secuencia modelo la del animal 193 del establecimiento 17138 y mediante el *software SnapGene* (GSL Biotech; [snapgene.com](http://snapgene.com)) se analizaron las enzimas de restricción que no digieren esa secuencia. Se seleccionaron por conveniencia para el uso en el vector de expresión pRSET-A (Thermo Fisher) las enzimas *BamHI* y *EcoRI*. En el cebador *Fw* se agregó un sitio de reconocimiento para *BamHI*, y el sitio *EcoRI* en el extremo 3' lo proporcionaría el vector intermediario TOPO 2.1 (Thermo Fisher). Los cebadores finales se muestran en la Tabla 6.

La PCR p25B1 se detalla en el Anexo I 9.1 [Protocolos](#).

**Tabla 6:** Cebadores para la p25B1

Cebador	Secuencia	$T_m^1$	$T_a^2$
p25B1Fw	5'-TGGATCCATGTTCCAGCAACTGCAAAC-3'	80°C	75°C
p25B1Rv	5'-ATCCCTCGGAGCCCATCTC-3'	68°C	71°C

<sup>1</sup>  $T_m$ = temperatura de *melting* <sup>2</sup>  $T_a$ = temperatura de *annealing*. Subrayado en el cebador p25B1Fw se encuentra el sitio de corte para *BamHI*.

#### 4.6.3.2. Construcción del vector de expresión pRSET-A-p25

El producto de PCR p25B1 obtenido fue extraído del gel de agarosa 1% utilizando la matriz *Ultraclean*® (*DNA Purification Kit* de MOBIO). El fragmento se clonó en el plásmido TOPO 2.1 (Thermo Fisher) y con él se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico. Las colonias fueron seleccionadas en placas con agar LB<sub>Amp</sub> Xgal IPTG. Se realizaron *minipreps* de las transformantes blancas utilizando el método de Birnboim y Doly (Birnboim and Doly 1979). Los plásmidos resultantes fueron analizados en primera instancia, mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* y estimación de su tamaño en gel de agarosa. De los clones con inserto de tamaño adecuado, se seleccionó al azar un clon y fue enviado a *Macrogen* para su

secuenciación. Una vez corroborada la secuencia se realizó el subclonado en el vector de expresión pRSET-A (*Bacterial Expression Vectors* de Thermo Fisher), que posee una etiqueta de seis histidinas (6xHis) N-terminal para una rápida purificación con resina quelante de níquel y detección con anticuerpos anti histidina (Anti-HisG). Tanto el vector pRSET-A como el clon TOPO-p25B<sub>1</sub> se digirieron con las mismas enzimas *BamHI* y *EcoRI* (BioScientific) a 37°C durante 2 h y el vector se desfosforiló con 1 UI de *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP, Thermo Scientific). El fragmento y el vector fueron purificados a partir de gel de agarosa 1%, para luego ser ligados con 1UI de la enzima *T4* ligasa (Thermo Scientific) 1 h a temperatura ambiente y 12 h en cámara fría a 4°C. Con esta ligación se transformaron células *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las colonias resultantes fueron analizadas mediante extracción de ADN plasmídico (Bimboim and Doly 1979) y digestión con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*.

#### **4.6.3.3. Expresión de la proteína de la cápside p25**

Una vez obtenida la construcción del vector de expresión pRSET-p25B<sub>1</sub>, se transformó por choque térmico -con 1 $\mu$ l de una dilución 1:20 de las *minipreps*- la cepa de expresión *E. coli* *BL21 pLys*. Se crecieron en LB-agar conteniendo los antibióticos Amp y Cloranfenicol (Cn). Se seleccionaron al azar 4 colonias que se repicaron en 2ml LB<sub>Amp/Cn</sub> líquido a 37°C en agitación toda la noche (ON). Al día siguiente, estos cultivos se utilizaron para inocular 50ml de LB<sub>Amp+Cn</sub> (dilución 1:100) y se agitaron a 20°C por 16 h hasta llegar a una densidad óptica medida a 600nm (OD<sub>600nm</sub>) de 0,5, en la que las bacterias fueron inducidas por la adición de IPTG 0,5mM y cultivadas en las mismas condiciones 3 h más. A partir de esta preparación se identificó la presencia de p25 en *WB* y se establecieron las condiciones de extracción y purificación de la proteína recombinante. Pero para la producción de p25 a mayor escala, se utilizaron cultivos de 250ml -en idénticas condiciones a las descritas- a partir de las de las colonias bacterianas que expresaban p25.

#### **SDS-PAGE y Western blot**

Las bacterias se centrifugaron 10 min a 8500g y el *pellet* fue resuspendido en 200 $\mu$ L de *Cracking buffer* (2X Tris-HCl 100mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,02%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,8%, glicerol 20%). El *pellet* resuspendido se calentó 5 min a 98°C en termobloque y luego estos extractos proteicos se cargaron en mini geles de *SDS-PAGE* (*Miniprotean* III, Biorad) al 12% (acrilamida: bisacrilamida 29:1) sometidos a una corriente constante de 100V en *buffer* Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25mM pH 8,8, glicina 190mM, SDS 0,1%). Finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel al filtro de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 130mA a 4°C por 1,5 h.

Luego de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se incubaron toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo TBS-*Tween*-leche 5% (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, *Tween*

20 0,05%, leche descremada 5%). Luego del bloqueo, se lavaron con la solución de lavado TBS-*Tween* (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, *Tween* 20 0,05%) y se incubaron con diluciones del anticuerpo primario (1:1000 para el anticuerpo monoclonal AntiHisG, Invitrogen) en *buffer* de dilución (TD) TBS-*Tween*-leche 3% (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, *Tween* 20 0,05%, leche descremada 3%). Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se recuperó la dilución del anticuerpo y se lavaron las membranas 3 veces con solución de lavado TBS-*Tween* por 10 min cada vez. Se incubaron entonces con una dilución del anticuerpo secundario en *buffer* de dilución (1:6000 cabra antiratón conjugado con la enzima Fosfatasa Alcalina (FA), KPL). Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se descartó la dilución del anticuerpo secundario y se lavaron las membranas 3 veces con solución de lavado por 10 min cada vez. Se realizó un último lavado de 10 min con el *buffer* de revelado de FA (Tris-HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM) y se agregaron 10ml de solución de revelado (10ml de *buffer* de revelado, 66μl de *Nitro blue tetrazolium* (NBT, 50mg/ml en dimetilformamida 70%, Promega) y 33μl de bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP, 50mg/ml en dimetilformamida 100%, Promega). Se incubó con agitación suave por 3 a 15 min con luz tenue, hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo por lavados con agua y los filtros se secaron al aire y se resguardaron de la luz.

#### **4.6.3.4. Purificación de la proteína p25**

Se realizaron pruebas de solubilidad de la proteína recombinante p25 expresada en bacterias *E. coli* B121 *pLys*, utilizando diferentes *buffers* de lisis.

Para ello, se concentraron bacterias procedentes de 5ml de cultivo inducido (como se detalla en el punto 4.6.3.3) y se resuspendieron en *buffer* de lisis nativo (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 8, NaCl 500mM) o en *buffer* de lisis desnaturalizante (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM pH 8, NaCl 500mM, Urea 8M). A continuación, se realizaron tres ciclos de sonicación (10 pulsos de potencia intermedia, con descanso de 1 min entre ciclos) y luego se centrifugó para separar las fracciones soluble e insoluble, que fueron analizadas mediante *WB*.

Una vez seleccionado el método de extracción, se realizaron purificaciones de la proteína recombinante p25 a partir de 250ml de cultivo. El extracto proteico obtenido en el sobrenadante con el *buffer* de lisis nativo, fue procesado mediante una columna de afinidad de intercambio iónico (IMAC) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante (resina Ni-NTA, QIAGEN).

Se tomaron alícuotas de cada paso de la purificación mediante IMAC que fueron analizadas por *SDS-PAGE* y tinción con azul de Coomassie para visualizar el grado de pureza de la proteína recombinante p25 obtenida.

#### **4.6.3.5. Evaluación de la proteína p25 obtenida**

Para la cuantificación del producto obtenido, se realizó un gel *SDS-PAGE* con concentraciones conocidas de la proteína seroalbúmina bovina (BSA) y una muestra de la purificación de p25. El gel fue teñido con azul de Coomassie para visualizar las proteínas. Utilizando el *software ImageJ*, se midieron las cantidades de píxeles producidos en cada una de las bandas de BSA. Con ello se obtuvo una curva patrón y la cantidad de p25 obtenida se extrapoló a partir de la regresión del número de *píxeles* obtenidos dentro de dicha curva modelo. Así se obtuvo la concentración de cada eluido del proceso de IMAC para la proteína de la cápside p25.

#### **Antigenicidad en WB**

Para analizar si la proteína recombinante era antigénica se enfrentó una membrana de nitrocelulosa cargada con la p25 purificada a sueros positivos (determinados con *kits* de ELISA comerciales). La membrana se cortó en tiras delgadas y éstas se enfrentaron en una dilución 1:50 de distintos *pooles* de sueros negativos o positivos. La incubación se realizó por un lapso mínimo de 1 h -al igual que lo descrito en *WB*- como anticuerpo secundario se utilizó un policlonal de conejo anticabra marcado con peroxidasa (1:3000 *rabbit anti goat IgG HRP*, KPL). Se empleó como sustrato de revelado el 4-Cloro-Naftol. Como control positivo se aplicó un anticuerpo primario AntiHis (monoclonal AntiHis, Invitrogen) y un anticuerpo secundario (cabra antiratón conjugado FA, KPL) dilución 1/10000 y se reveló usando NBT/BCIP.

#### **Antigenicidad en ELISA**

A partir de la proteína p25 purificada por IMAC se sensibilizó una placa de ELISA *Immunolon* II con 100ng de p25 en *buffer* Carbonato-Bicarbonato pH 9,6, por pocillo, siguiendo el protocolo de Rosati (Rosati et al. 2004).

Se evaluaron sueros negativos a todos los test de ELISA, positivos a los tres ELISA comerciales utilizados y positivos solo al ELISA *Erradikit*. Todos ellos en una dilución 1:50. Se utilizó como anticuerpo secundario un policlonal conejo anticabra (*rabbit anti goat IgG HRP* de KPL) en dilución 1:3000 y revelado con ABTS haciendo lecturas a partir de los 15 minutos en un lector de ELISA a 405nm ( $OD_{405}$ ). Se utilizó como punto de corte el promedio de los sueros negativos más dos veces la desviación estándar (Punto de corte establecido  $0,148 OD_{405}$ ).

#### **4.7 Aplicación de medidas de manejo para SRLV**

La disponibilidad de un rebaño (17138) compuesto inicialmente por 111 animales (100 hembras y 11 machos) con una seroprevalencia alta y con una presencia de un elevado

número de casos clínicos hizo posible el ensayo de un conjunto de medidas previamente reportadas bibliográficamente y descritas en la introducción (2.11.2 [Medidas de control](#)) buscando la factibilidad y practicidad de implementación en medio de la idiosincrasia local y nacional y tomando como base la imposibilidad de realizar un rifle sanitario y repoblación con animales sanos, es que se ensayaron medidas basadas en la identificación serológica y/o molecular de los animales infectados y la separación en dos rebaños, en dos etapas.

**Etapas iniciales:** Esta etapa comprende los años 2016 y 2017. Si bien en este momento no se contaba con un cribado serológico total del hato, se pudieron plantear las siguientes medidas:

- Dividir en dos rodeos: Hato seronegativo y hato seropositivo e indeterminado, en el segundo, se agruparon a todos individuos seropositivos y a los que no habían sido chequeados séricamente que se los denominó indeterminados.
- Segregación y descarte paulatino a través del sacrificio, de todos los animales con patología clínica. Y cambio inmediato de rodeo a todo animal que manifieste patología clínica.
- Separación física de más de 1,5 metros de animales seronegativos de todo animal seropositivo o indeterminado.

**Higiene y sanitización:** Se utilizaron agujas y jeringas descartables individualmente para cualquier maniobra. Los elementos cortantes utilizados se desinfectaron con Despadac de Laboratorio Calier (Cloruro de duodecil dimetil amonio -Bardac 22®-10%, Glutaraldehído 4 %, Formaldehído 3,15 %, Glioxal 3,2 %) según indicaciones del fabricante, a las maniobras de higiene y desinfección normales de los elementos de ordeño, se agregó la aspersion del desinfectante sobre el ambiente y elementos. También se utilizó sobre cualquier ambiente que fuese necesario y en corrales de parto luego de retirados los loquios.

**Manejo de los animales:** Los apareamientos fueron montas naturales pero dirigidas utilizando machos y hembras seronegativos; o machos y hembras seropositivos/indeterminados, maniobra realizada con la finalidad de no contagiar a los animales que se sabe libre de SRLV. El ordeño y el pastoreo se realizó primero con las hembras seronegativas. Se separaron los cabritos obtenidos en tres lotes: Hijos de madres seronegativas; hijos de seropositivas e indeterminadas que no bebieron calostro de sus madres; e hijos de seropositivas e indeterminadas que bebieron calostro de sus madres, con su crianza en guachera colectiva. El calostrado fue realizado directamente de la ubre materna (natural) en el caso de los hijos de madres seronegativas y con lauril sulfato de sodio (SLS) para los otros dos grupos de cabritos, en las cantidades habituales de 1 litro por animal. El tensioactivo SLS se utilizó para disolver la membrana lipídica del virus libre que pueda estar

presente en la leche y evitar esa vía de contagio al neonato. Se inició probando concentraciones del 5%, pero la solución de trabajo utilizada fue del 1%.

Los cabritos elegidos para la reposición del hato fueron analizados con nPCR incorporándose únicamente los negativos.

**Segunda etapa:** Esta etapa se inicia con el cribado serológico total de las existencias del hato en el tercer trimestre de 2017. Se continuó con la aplicación de las medidas descritas en la etapa inicial con la reasignación de los animales según los resultados serológicos en cada rodeo y se incorporaron la pasteurización del calostro a 56-57°C durante 30 min y de la leche a ser suministrada a los cabritos, a 63°C durante 30 min.

La segregación en esta etapa, se realizó sobre los seropositivos asintomáticos, ya que los sintomáticos ya habían sido eliminados.

#### **4.8 Desarrollo y caracterización de cultivos primarios**

Para la obtención de un cultivo primario de fibroblastos de piel ovina (Eov) y caprina (Eca), se adaptó un protocolo establecido en el IdAB. Se realizaron biopsias de piel del área inguinal con la metodología descrita en 4.3.4 [Tejido dérmico](#). Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del IV dirigido por el Dr. Osvaldo Zabal.

Se realizaron biopsias de diferentes tamaños. En un primer ensayo de 1cm<sup>2</sup> de piel, mientras que en los ensayos subsiguientes se extrajeron explantes longitudinales de 1cm x 5cm. El tejido conservado en PBS suplementado con ATB/ATM fue lavado dos veces con PBS-ATB/ATM y a continuación se procedió a una disgregación mecánica y enzimática, mediante agitación en una solución de tripsina 0,25% durante 20 min a 37°C. Finalizado ese tiempo, se recuperó la solución de tripsina y se centrifugó (800g, 5 min a temperatura ambiente) obteniéndose el *pellet* celular. Se repitió el procedimiento 5 veces hasta disgregar completamente el tejido.

Todos los *pellets* celulares recuperados fueron sembrados en botellas de cultivo T75 con medio MEM-D y 10% de suero fetal bovino, con el agregado de una solución de ATB/ATM. Los cultivos primarios Eov y Eca fueron evaluados tomando diferentes criterios: recuperación celular tras la descongelación, número de pasajes, viabilidad luego de un ciclo de criopreservación y susceptibilidad a los SRLV.

Por otro lado, el líquido articular de cabras seropositivas, se sembró de forma directa en placas de 6 pocillos con medio MEM-D y 10% de suero autólogo, con el agregado de una solución de ATB/ATM. En los sucesivos pasajes se cambió el suero autólogo por suero fetal bovino. El día número 7 se tomó una muestra del sobrenadante y se realizó el control de *Micoplasmas* con las PCR de Uemori (Uemori et al. 1992) en el IdAB y de Van Kuppeveld (van Kuppeveld et al. 1994) en IABIMO. Se obtuvieron monocapas de células articulares caprinas (Aca).

Para el cultivo y diferenciación de monocitos sanguíneos a macrófagos, las muestras de *buffy coat* se diluyeron en 5ml de PBS estéril. La suspensión celular se colocó sobre 4ml de *Lymphoprep* (d= 1,077; *Nycomed*). Se centrifugó 30 min a 2500rpm (430g) y recuperó la interfaz con pipeta pasteur. Tras tres lavados con PBS estéril se adicionaron 500µl de agua *Milli Q* con el objetivo de lisar los eritrocitos durante 10-15 seg e inmediatamente se completó el tubo con PBS estéril. Se resuspendió el *pellet* celular en 1ml del medio de cultivo RPMI completo (1% de vitaminas Gibco, 10mM piruvato de sodio, 1% amino ácidos no esenciales Sigma, 1% L-glutamina, 50µM β-mercaptoetanol, 1% ATB/ATM) sin el agregado de suero fetal bovino y se distribuyeron con una densidad celular entre 4000-6000 células/cm<sup>2</sup> entre 1 y 3 pocillos de una placa de 12. Se colocó la placa en estufa 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 4-5 h. Se retiró el RPMI completo, se lavó suavemente con PBS tres veces y se repuso el medio RPMI completo suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Se siguió y controló el cultivo por un lapso de 7 a 10 días.

#### **4.9 Aislamiento de SRLV**

Una vez obtenidos los cultivos de Eov, Eca y Aca, se prepararon monocapas de estas células en placas de 12 pocillos con una confluencia de 50% en medio MEM-D y 2% de suero fetal bovino. Se desafiaron células Eov, Eca, *GSM-T*, *OSF* y *TIGEF* con muestras de líquido articular tomadas de caprinos afectados clínicamente en la provincia de Salta.

También se utilizaron monocapas de *OSF* y *TIGEF*, que se incubaron con sobrenadante de cultivo de macrófagos de derivación sanguínea y sobrenadante del cultivo de células Aca, provenientes de caprinos seropositivos del hato 17138. Durante un lapso de 10 días postinfección se observó la presencia/ausencia de efecto citopático compatible con la infección por SRLV (formación de sincitios). La producción de partículas virales infectivas se valoró mediante inoculación de los sobrenadantes en nuevos cultivos celulares y mediante la cuantificación de la actividad retro transcriptasa por el ensayo *SG-PERT*, que se describe más adelante. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS, recuperadas y procesadas para la extracción de ADN y la confirmación de la presencia de secuencias virales mediante las PCRs antes descritas.

***SybrGreen PCR-enhanced retrotranscriptase assay (SG-PERT)***: El ensayo *SG-PERT* detecta la presencia de partículas virales mediante el revelado de la actividad retro transcriptasa (Vermeire et al. 2012). Utiliza 5µl del sobrenadante de un cultivo celular (que contiene hipotéticamente al virus libre) que es tratado con 5µl de *buffer* de lisis y 2µl de inhibidor de ARNsa (*Ribolock*). Tras la retrotranscripción (RT) de un molde comercial de ARN del bacteriófago MS2 (Roche) -que solo se produce si existe transcriptasa viral en el sobrenadante- se cuantifica mediante qPCR el cADN de MS2 utilizando cebadores (Tabla 7) y una *Master Mix* con *SYBR Green I* (*Ex Taq*, Takara). La cantidad de cADN sintetizado

representa el nivel de actividad RT en el sobrenadante de cultivo celular y, por lo tanto, es una medida de la cantidad de partículas retrovirales. Esta técnica se utilizó en casos puntuales en el IdAB. El protocolo detallado, como en las restantes PCR se encuentra en el Anexo I [Perfiles térmicos y condiciones de PCR](#).

**Tabla 7:** Cebadores SG-*PERT*

Cebador	Secuencia	$T_m^1$	$T_a^2$
<b>MS2 (Fw)</b>	5'-TCCTGCTCAACTTCCTGTCGAG-3'	68	63
<b>MS2 (Rv)</b>	5'-CAGGTCAAACCTCCTAGGAATG-3'	66	61

<sup>1</sup> $T_m$ = temperatura de *melting* <sup>2</sup> $T_a$ = temperatura de *annealing*

#### 4.10 Análisis estadístico

Se utilizó el *software* InfoStat para la obtención de los estadísticos descriptivos de los datos recabados provenientes de las encuestas socioeconómicas, productivas y sanitarias que figuran en el Anexo I [Tablas](#) que acompañaron a cada uno de los establecimientos visitados y fueron utilizadas en el análisis de factores de riesgos con respecto a la presencia de la enfermedad vírica en la zona.

Las variables utilizadas fueron las siguientes:

##### Referentes al estado de la enfermedad:

- **Seroprevalencia:** Porcentaje de seroprevalencia individual de cada hato.
- **Seroprevalencia en rangos:** Seroprevalencia en 3 grupos (seroprevalencia=0, seroprevalencia≤10%, seroprevalencia>10%).
- **Estatus:** Estado sanitario serológico (Libre/Infectado).

##### Características de los establecimientos:

- **Ecorregión:** Las ya mencionadas CS, QA y VT.
- **Objetivo de producción:** Leche/Cría.
- **Biotipo:** Tipo de animal que posee el hato. Carnicero (Criollo, Anglo Nubian, Togenbur, Boher y sus cruzas); Lechero (Saanen, Alpino y sus cruzas).
- **Animales totales:** Número total de animales en el hato.
- **Animales totales en rangos:** Es la característica anterior donde agrupa a hatos con menos y más de 100 animales.
- **Tipo de establecimiento:** Según la propiedad, tamaño y nivel tecnológico se distribuyen en Familiar, Familiar Capitalizado y Comercial.
- **Tipo establecimiento en rangos:** Es la característica anterior que se agrupa Familiar y Comercial (Familiar; capitalizado + Comercial).
- **Tipo de ordeño:** Forma de obtención de la leche (Manual/Mecánico).

- **Tipo de pastoreo:** Es la forma en que el animal accede al forraje (Extensivo/Racional por franjas).
- **Método de cría:** La forma en que se cría a los cabritos (Tradicional/Guachera colectiva).
- **Alimentación de la cría:** Alimento proporcionado a los cabritos (Leche de sus madres/ Sustituto lácteo).
- **Encierre nocturno:** Permanencia de los animales durante la noche en un corral pequeño de fácil vigilancia (Sí/No).
- **Macho:** Forma de obtención de los reproductores machos (Selección de cabritos dentro del hato/producto de la compra, alquiler, rotación, préstamo u otro que implique incorporación de machos foráneos).
- **Delimitación:** Calificación de la propiedad según la presencia o ausencia de límites territoriales.
- **Suplementación:** Suministro de granos, heno u otros. (Sí/No).
- **Desparasita:** Control de endo y ecto parásitos (Sí/No).
- **Vacuna:** Prevención de enfermedades mediante la aplicación de vacunaciones parenterales (Sí/No).
- **Productos obtenidos:** Producto final del establecimiento, destinado a la venta o el autoconsumo (Leche, queso, cabrito).
- **Responsable de la producción:** Persona a cargo de la producción (ordeño, elaboración de quesos o manejo de la Guachera): Sexo, relación de parentesco, empleado.
- **Responsable del cuidado de los animales:** Persona a cargo del cuidado de los animales. Sexo, relación de parentesco, empleado.

#### **Características de producción láctea:**

- **Litros de leche:** Cantidad de litros de leche producida en promedio por una cabra de ese hato al día.
- **Litros de leche en rangos:** Es la característica anterior donde se le asigna el número 1 a los valores menores a 0,5 litros y 2 a valores mayores o iguales a 0,5 litros.

Las variables dependientes utilizadas fueron estatus sanitario, seroprevalencia y seroprevalencia en rangos. El resto de las variables dependientes, fueron descartadas, por no poseerse datos individuales de producción o bien por presentarse como elementos que se presten a la confusión.

De las variables independientes o predictoras, referidas y definidas previamente, debido a su complejidad y desbalance en las cantidades de datos, solo se utilizaron las que se nombran a continuación:

Ecorregión, objetivo de producción, biotipo, animales totales, animales totales en rangos, tipo de establecimiento, tipo establecimiento en rango, tipo de ordeño, tipo de pastoreo, método de cría, alimentación de la cría, encierre nocturno, macho, suplementación delimitación, desparasita y vacuna.

Para la determinación de factores de riesgo, se utilizó un análisis univariado con el estadístico Chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) a modo exploratorio. Los resultados con un  $p$  valor  $\leq 0,15$  se consideraron para un análisis univariado de regresión logística (RL) como posibles factores de riesgo; ambas utilizando la versión estudiantil del *software* InfoStat (Di Rienzo et al. 2011). El valor de 15% es arbitrario, normalmente se utilizan valores exploratorios de  $\chi^2$  entre 15 y 30% (Deng et al. 2016; Hughes et al. 2007; Skjerve et al. 1998; Wells et al. 1996). En el caso de estatus sanitario, dado que las características de la variable lo permitieron ya que se ajustan al modelo de tablas de  $2 \times 2$ , también se realizó la prueba de *Odds Ratios* (OR).

El resultado de OR es un valor descriptivo, aunque si su intervalo de confianza (IC) no incluye al 1 se concluye que la asociación es estadísticamente significativa.

Aplicando la transformación de Cohen (Chen et al. 2010), se toma el siguiente criterio: una OR que 1,68 se considera insignificante; si está entre 1,68-3,47, pequeña; entre 3,47-6,71, moderada; y si es mayor que 6,71, grande.

El análisis estadístico para evaluar la concordancia de los métodos serológicos utilizados se realizó con la versión online del *software* *Graphpad* (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>).

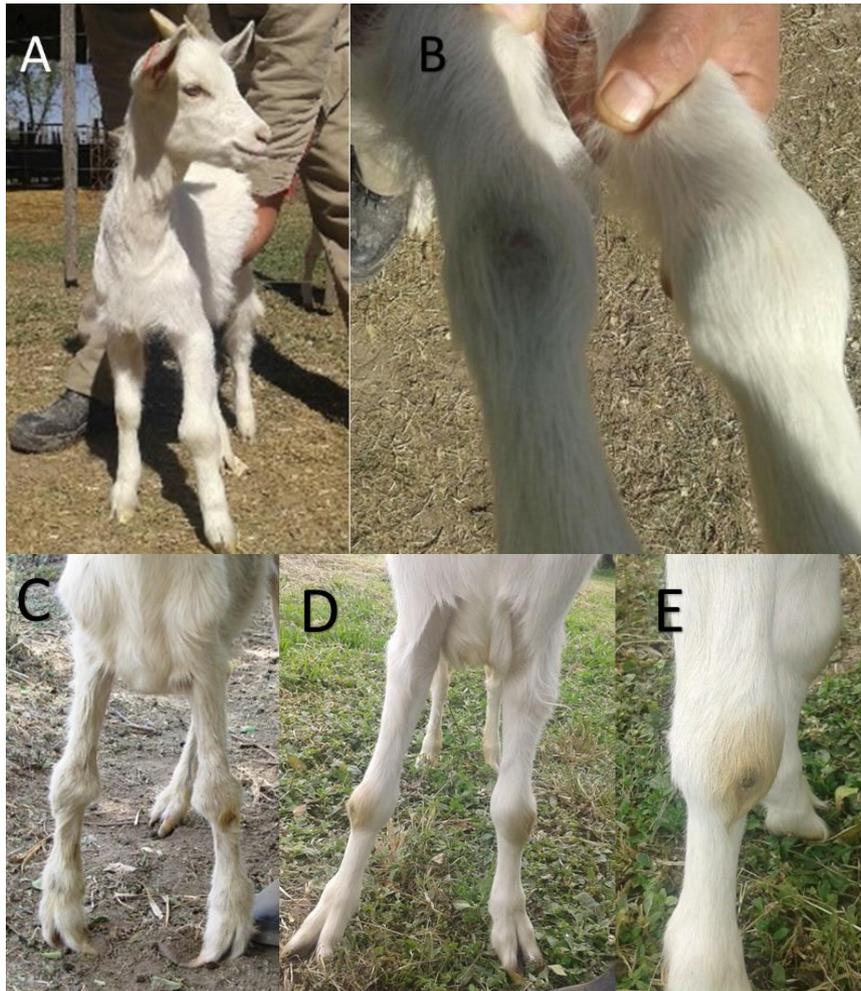
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estado inicial del Hato 17138

El caso clínico que desencadenó el desarrollo de la presente tesis mostró una gran variedad de sintomatologías y formas clínicas que fueron estudiadas y serán presentadas brevemente a continuación.

#### 5.1.1 Forma Articular:

Fue la patología más prevalente pudiendo ser unilateral o bilateral. Inicialmente se apreciaron inflamaciones de mayor o menor cuantía, con presencia de líquido evidente, fluctuante a la palpación, blanda y caliente Figura 15 A. y B. Este cuadro evolucionó con desaparición del calor presente en la zona y una disminución del tamaño y el contenido líquido de la articulación, es decir, el cambio de una patología inflamatoria aguda a una cronificación. Con una deformación en más siempre presente, pero que se torna más firme con el transcurso del tiempo (Figura 15 C, D y E).



**Figura 15:** Afección carpal unilateral izquierda en un animal joven.

(A) Presencia de deformación caliente y fluctuante a la palpación. (B) Vista más cercana del mismo animal con desgaste del pelo de la zona del carpo derecho, debido al decúbito. (C, D y E) Afección carpal bilateral crónica en tres animales. (C) Presencia de deformación anfractuosa, fría y de consistencia dura a la palpación de una lesión de larga data. (D) Cronificación de una lesión bilateral. (E) Detalle de una peladura por decúbito.

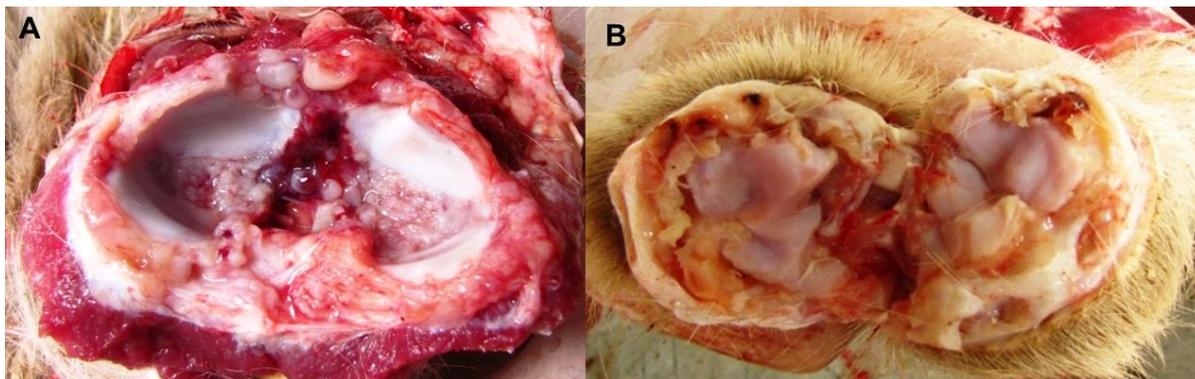
Otras afecciones articulares vistas, pero con menos frecuencia estuvieron localizadas en los tarsos (tres casos, Figura 16 A), articulaciones interfalángicas, como así la presencia de animales poliarttríticos (con la afectación de más de un tipo de articulación en el mismo individuo), incluso en la articulación coxofemoral (un caso no mostrado). Una afección que destaca por su espectacularidad es la afección de la articulación atlanto occipital, que implica la afectación de bolsas y ligamento nuczal. Es especialmente llamativa dado que se observan dos cordones de aproximadamente tres centímetros de ancho y quince de largo, que sobresalen a lo largo de la parte dorsal del cuello. Pudimos ver dos casos de este tipo a lo largo del seguimiento (Figura 16 B y C).



**Figura 16:** Afección tarsal y de las bolsas nucales.

(A) Afección tarsal unilateral derecha en un animal. (B) Necropsia de una afección de la articulación atlanto occipital que implicó las bolsas nucales. (C) Vista más cercana del mismo animal apertura del contenido a presión de las bolsas.

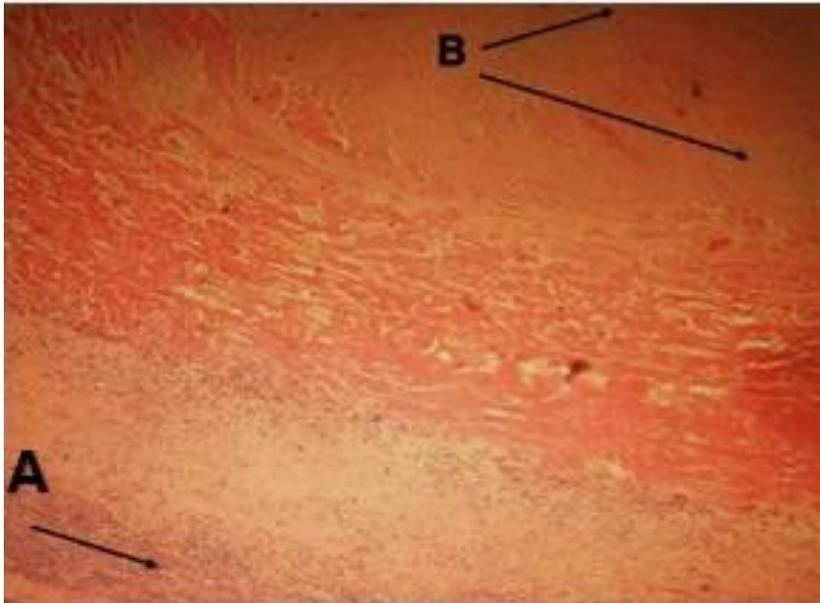
En los casos en que se logró realizar una necropsia, todos mostraron artritis que en sus inicios era de tipo serosa (Figura 17 A) y en los más severos además se apreciaba necrosis caseosa; para con el tiempo convertirse en proliferativa con erosión y adelgazamiento del cartílago articular que en algunos casos dejaba expuesto el hueso subcondral (Figura 17 B).



**Figura 17:** Artritis carpales.

(A) Artritis serosa en un caso temprano, puede verse el enrojecimiento y edema articular y la presencia de exudados. (B) Caso de artritis de larga data. Se observan lesiones proliferativas de la capsula articular, la organización los crecimientos y la casi ausencia de líquidos que denotan la cronicidad del cuadro.

Microscópicamente las lesiones articulares se caracterizaron por la infiltración linfoidea, acompañada de proliferación papilar de capsula sinovial y fibroplasia del tejido conectivo subcapsular. En algunos casos muy severos se apreció necrosis coagulativa del tejido sinovial que quedaba alojada en el interior de la articulación (Figura 18).



**Figura 18:** Histopatología de un caso clínico.

En la zona **A**, puede verse la proliferación de la cápsula articular con infiltración mononuclear y la zona **B** es una zona de necrosis coagulativa que denota la gravedad del caso.

Una de las consecuencias de la artritis y el dolor articular, son la reticencia al movimiento de los animales y la tendencia al decúbito. Lo que conlleva a un deterioro progresivo del estado general del animal progresivo. Viéndose animales con pelo hirsuto y baja condición corporal como los que se muestran en la siguiente Figura 19.



**Figura 19:** Animales con mal estado general producto de la patología clínica.

Los animales A y C presentan una clara artritis carpiana bilateral y su condición corporal es pobre. El animal B no presenta una artritis carpal evidente, pero su condición corporal es pobre y su pelo puede verse que no está en buenas condiciones.

### **5.1.2 Forma Mamaria**

Se pudieron observar casos de afección en la glándula mamaria con secados tempranos cercanos al parto, sin deformaciones apreciables a simple vista de la glándula. La mastitis fue bilateral difusa con inflamación de los ganglios retromamarios. Estos signos fueron apreciables sólo tras el parto en cuatro cabrillonas (Figura 20).



**Figura 20:** Animal con mastitis y secado temprano del hato 17138. A simple vista la glándula mamaria no presenta deformaciones.

### **5.1.3 Forma Nerviosa**

Se tuvo un caso de encefalitis en un cabrito de 50 días. Clínicamente se observó un animal alerta que responde a los estímulos, con incoordinación de movimientos, ataxia del tren posterior, que progresó hacia al anterior para terminar finalmente con decúbito, postración e incapacidad para levantarse (caso no mostrado).

### **5.1.4 Forma Pulmonar**

No se observaron casos clínicos de la forma pulmonar, siendo los mismos hallazgos de necropsia. En sólo un animal se observaron lesiones macroscópicas caracterizadas por consolidación de los márgenes pulmonares. Pero sí se pudieron observar lesiones histopatológicas en al menos 3 de los animales necropsiados (caso no mostrado).

## **5.2 Cribado serológico**

Para determinar la prevalencia de animales infectados con SRLV, comenzamos el estudio con un cribado serológico basándonos en ELISAs comerciales. En una segunda instancia, se intentaron pruebas de serodetección con péptidos sintéticos de SRLV empleando los sueros antes clasificados por los kits comerciales en todos los rebaños muestreados.

### 5.2.1 ELISAs comerciales

El análisis con ELISA comerciales indicó la presencia de animales infectados con valores de seroprevalencia bajos. Se puede observar en la Tabla 8, la presencia de animales infectados en todas las ecorregiones analizadas, con prevalencias entre 1,75 y 54,79% si utilizamos los resultados de los hatos analizados completamente por los test de *Pourquier* y *Elitest*.

**Tabla 8:** Seroprevalencias de los hatos con diferentes ELISA comerciales

Hato	Ecorregión	N	% Prev. <i>Pourquier</i>	% Prev. <i>Elitest</i>	% Prev. <i>Erradikit</i>	% Prev. <i>Idexx</i>
16282	CS	26	0,00	0,00	6,67 (1/15)	ND
16315	CS	26	0,00	3,85 (1/26)	6,67 (1/15)	ND
16316	CS	28	0,00	0,00	0 (0/10)	ND
16317	CS	27	0,00	0,00	13,33 (2/15)	ND
14240	QA	11	0,00	9,09 (1/11)	12,50 (1/8)	ND
14241	QA	15	0,00	0,00	0 (0/10)	ND
14364	QA	20	0,00	0,00	0 (0/10)	ND
14365	QA	20	0,00	5,00 (1/20)	0 (0/10)	ND
16418	QA	22	0,00	0,00	6,67 (1/15)	ND
16419	QA	20	0,00	4,76 (1/20)	0 (0/11)	ND
17088	QA	49	0,00	6,12 (3/49)	0 (0/14)	ND
17089	QA	30	0,00	6,67 (2/30)	7,14 (1/14)	ND
17090	QA	33	0,00	0,00	0 (0/10)	ND
17091	QA	57	0,00	1,75 (1/57)	21,43 (3/14)	ND
17092	QA	57	3,51 (2/57)	1,75 (1/57)	8,33 (2/24)	ND
18126	QA	5	ND	ND	ND	0,00 (0/5)
18190	QA	6	ND	ND	ND	16,66 (1/6)
18123-24	QA	15	ND	ND	ND	13,33 (2/15)
18128-29	QA	16	ND	ND	ND	6,25 (1/16)
18131-191	QA	12	ND	ND	ND	8,33 (1/12)
18185-87	QA	16	ND	ND	ND	0,00 (0/16)
18315-1	QA	28	ND	ND	ND	0,00 (0/28)
15207	VT	20	0,00	0,00	7,14 (1/14)	ND
15208	VT	20	0,00	0,00	0,00 (0/10)	ND
15210	VT	20	0,00	5,00 (1/20)	6,67(1/15)	ND
15304	VT	29	0,00	0,00	0,00 (0/10)	ND
15347	VT	16	0,00	0,00	0,00 (0/7)	ND
16253	VT	20	0,00	5,00 (1/20)	7,14 (1/14)	ND
17096	VT	49	14,29 (7/49)	14,29 (7/49)	38,89 (7/18)	ND
17138	VT	73	54,79 (40/73)	50,68 (37/73)	55,56 (10/18)	78,79 (26/33)
16180-81	QA Catamarca	52	0,00 (0/52)	0,00 (0/52)	15,00 (3/20)	ND
16345	QA Jujuy	88	7,95 (7/88)	7,95 (7/88)	10,00 (1/10)	ND

N=Cantidad de animales muestreados del hato; CS= Chaco salteño; QA= Valles y quebradas áridas de altura; VT= Valles templados de altura ND= No determinado. Entre paréntesis ( ) figura la fracción de animales positivos sobre el total testado.

A primera vista, el test serológico *Erradikit*, detecta mayor cantidad de animales seropositivos, ya que manifiesta la presencia de infección en 5 establecimientos catalogados como negativos con los dos anteriores. A pesar de no haber realizado un cribado total de los hatos, las prevalencias con este kit son por lo general mayores a las de los antes mencionados. Por otro lado, los 7 hatos que solo han podido ser dosados con *MVV/CAEVp25Ab Verification (Idexx)* confirman la circulación viral con prevalencias entre el 6,25 y 16,66%.

Para realizar el análisis de concordancia entre los kits serológicos *Elitest*, *Pourquier* y *Erradikit* ( $\alpha=5\%$ ), se utilizaron dos N diferentes: 830 para *Elitest/Pourquier* y se ajustó el N=348, para poder realizar comparaciones con *Erradikit*. La concordancia fue muy buena entre *Pourquier* y *Elitest* con  $K=0,821$ ; buena entre *Pourquier* y *Erradikit* con  $K=0,694$  mientras que para *Erradikit* y *Elitest* fue moderada con  $K=0,575$ .

Con respecto las comparaciones con *Idexx*, solo fue posible comparar animales del núcleo experimental (17138), siendo la concordancia entre *Idexx /Pourquier* moderada, con  $K=0,507$  y entre *Idexx /Elitest* débil, con  $K=0,400$ .

### **5.2.2 Péptidos sintéticos**

Se utilizaron submuestreos de los hatos haciendo hincapié en los que no presentaron reacciones positivas a ningún ELISA comercial, aunque también se incluyeron sueros detectados como positivos. Se evaluaron un total de 8 péptidos provenientes de las regiones GAG y ENV.

**Tabla 9:** Seroprevalencias de los hatos con ELISA de péptidos sintéticos

Hato	Ecorregión	N	ELISA positivo	% Prevalencia de los péptidos							
				1	2	3	4	5	6	7	8
16282	CS	4	0/4	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	0,0
16315	CS	1	1/1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16316	CS	1	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
16317	CS	12	1/12	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0
14240	QA	2	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
14241	QA	1	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
14364	QA	1	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
14365	QA	1	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
16418	QA	1	1/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
16419	QA	1	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
17088	QA	1	1/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
17089	QA	2	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
17090	QA	1	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
17091	QA	1	1/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
17092	QA	1	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
15207	VT	2	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
15208	VT	12	0/12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15304	VT	8	0/8	37,5	25,0	37,5	50,0	62,5	62,5	ND	ND
15347	VT	1	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
16253	VT	2	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
17096	VT	1	1/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
17138	VT	1	1/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0
16180-81	QA	3	2/3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16346	QA Jujuy	2	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0

N=Cantidad de animales muestreados del hato; ELISA positivos= Proporción de animales positivos a ELISAS comerciales de los utilizados; CS= Chaco Salteño; QA= Valles y Quebradas Áridas de altura; VT= Valles Templados de altura ND= No determinado Los péptidos están numerados de 1 a 8

La mayor parte de las muestras utilizadas fueron negativas a todos los péptidos, inclusive las que fueron reactivas a otros kits comerciales o PCR positivos. Sin embargo, dos hatos que no presentaron reacción ante ninguno de los ELISA comerciales, sí tuvieron animales reactivos a varios péptidos.

### 5.3 Caracterización molecular de las cepas

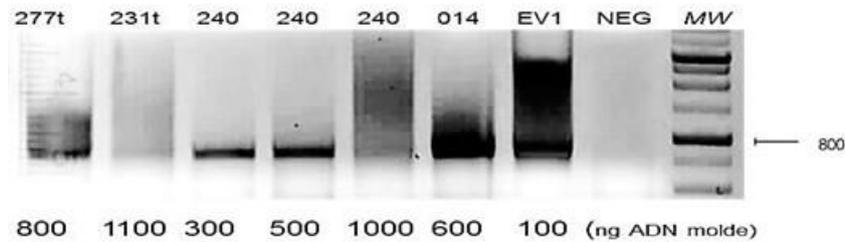
El primer paso para poder comparar a las cepas nacionales con las ya conocidas, realizar comparaciones entre métodos de diagnóstico, desarrollar técnicas moleculares y/o serológicas para la detección efectiva de las cepas circulantes y también su tipificación, es conocer su secuencia, o al menos una parte de ella.

#### 5.3.1 PCR utilizadas

Tras la extracción de ADN, se utilizó la PCR LTR-OSLO (Rimstad et al. 1993; Zanoni et al. 1992) sin resultados positivos sobre las 96 muestras analizadas. La nPCR (Grego et al. 2007)

y la PCR OSLO-POL-R2 (Grego et al. 2007; Rimstad et al. 1993) proporcionaron amplificaciones en dos rebaños (17138 y 17096).

En la Figura 21 se muestra una electroforesis en agarosa 1% de los productos obtenidos con la nPCR, empleando diferentes cantidades de ADN molde de animales de los hatos 17138 y 17096.



**Figura 21:** Gel de la nPCR.

Se muestra una electroforesis en agarosa 1% de los productos obtenidos con la nPCR, empleando diferentes cantidades de ADN molde de animales de los hatos 17138 y 17096. Ev1: control positivo, Neg: control negativo, MW: Marcador de peso molecular.

Podemos ver que a cantidades de ADN molde genómico mayores a 500ng se ven bandas menos nítidas y difuminadas con forma alargada. Por el contrario, los productos de 300 y 500ng del animal 240 dan como resultado una banda individual clara. El caso de EV1, el ADN molde proviene de una extracción de cultivo celular infectado, con lo que la carga proviral presente en el molde es muy superior a la presente en muestras de *buffy coat*.



**Figura 22:** Gel de la PCR OSLO-POL-R2

Se muestra una electroforesis en agarosa 1% de los productos obtenidos con la PCR de OSLO-POL-R2 en amplicones de ADN de *buffy coat* y de células en cultivo TIGEF, GSMT y OSF. Ev1: control positivo, Neg: control negativo, MW: Marcador de peso molecular.

Puede verse en la Figura 22 que los animales 49 y 231 presentan una banda débil, en el animal 240 es casi imperceptible. La banda es nítida en 277t, aunque presenta una sub banda, si lo comparamos con el control EV1.

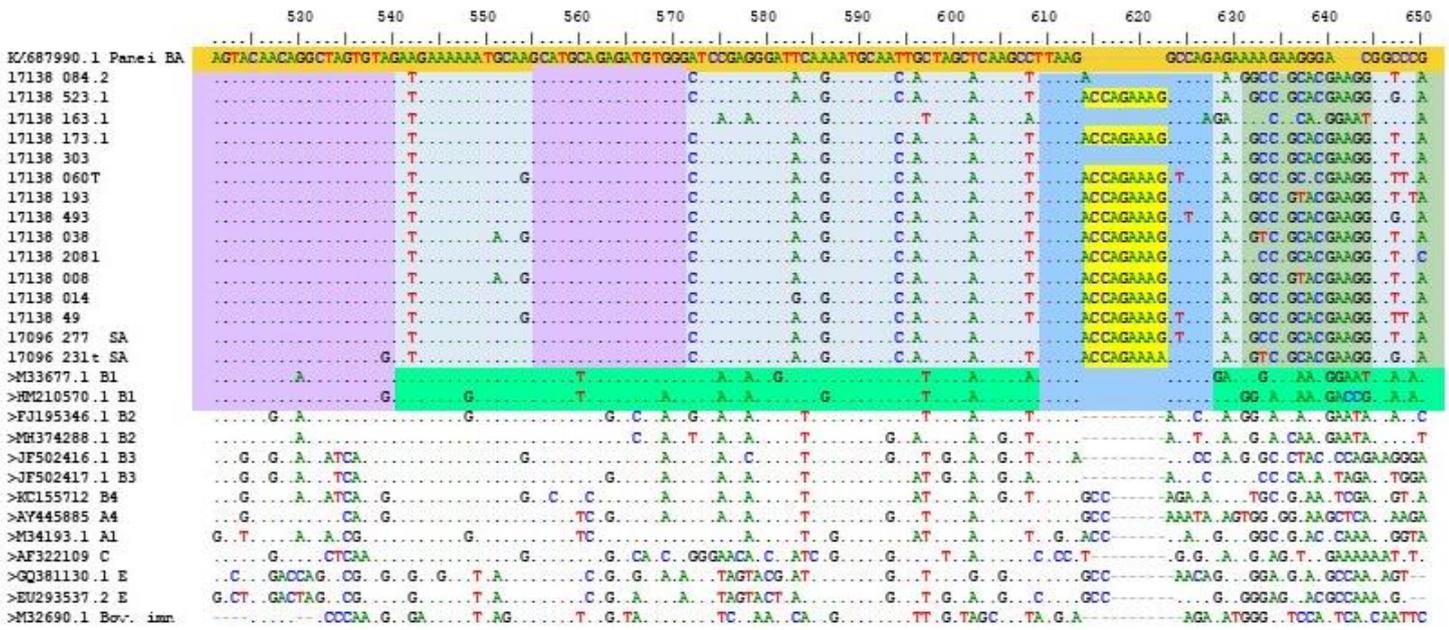
Con estas dos PCR (nPCR y OSLO-POL-R2) se obtuvieron las secuencias de 800pb que se utilizaron para el diseño de nuevos cebadores específicos de las cepas salteñas.

### 5.3.2 Secuenciación y análisis de las secuencias

Se compararon tres amplicones diferentes, el más informativo de aproximadamente 800pb que mostraron regiones heterogéneas en las cepas salteñas en comparación a las descritas previamente (Figura 23). En la Tabla 10 se pueden visualizar las similitudes y diferencias entre

las cepas salteñas y la cepa argentina KX687990.1, aislada previamente en la provincia de Buenos Aires (Panei et al. 2017).

Las secuencias de los hatos salteños –con fondo en color celeste- poseen más diferencias puntuales con la cepa argentina KX687990.1 –indicada en naranja- que con las otras B1 - señaladas en color verde- que pueden apreciarse con mayor detalle en la matriz de identidad extendida y en el alineamiento completo que se encuentran en el Anexo I ([Figuras Tabla 1](#)).



**Figura 23:** Alineamiento de las secuencias salteñas.

Se muestra una parte del alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de la nPCR utilizando el software libre BioEdit. Se incluyen secuencias referencia (>) de los genotipos A1 (M34193.1), A4 (AY445885); B1 (HM210570.1; M33677.1), B2 (FJ195346.1; MH374288.1), B3 (JF502416.1 JF502417.1; KC155712); B4 (KC155712); C (AF322109); E (GQ381130.1; EU293537.2) y la cepa B1 argentina (KX687990.1), como raíz externa se utilizó una secuencia del virus de la inmunodeficiencia Bovina (M32690.1).

En el alineamiento se destaca en amarillo, una inserción (614\_623ins) que diferencia a las cepas salteñas respecto a todos los otros subtipos. La inserción no está presente en los animales 084, 303 y 163 los cuales poseen algunas diferencias filogenéticas con el resto.

Dentro de este fragmento existen zonas conservadas como la zona (609\_617) sombreado con celeste, para los que poseen la inserción. Las regiones sombreadas con violeta son casi invariables para las salteñas, y la región sombreada con verde claro 621-646, casi invariable dentro de las cepas salteñas y, sin embargo, muy variable entre subtipos.

La matriz de identidad que compara a los animales salteños con la única cepa argentina publicada, proveniente de la provincia de Buenos Aires indica que la similaridad es menor de lo esperado variando desde el 83 al 87% (Tabla 10).

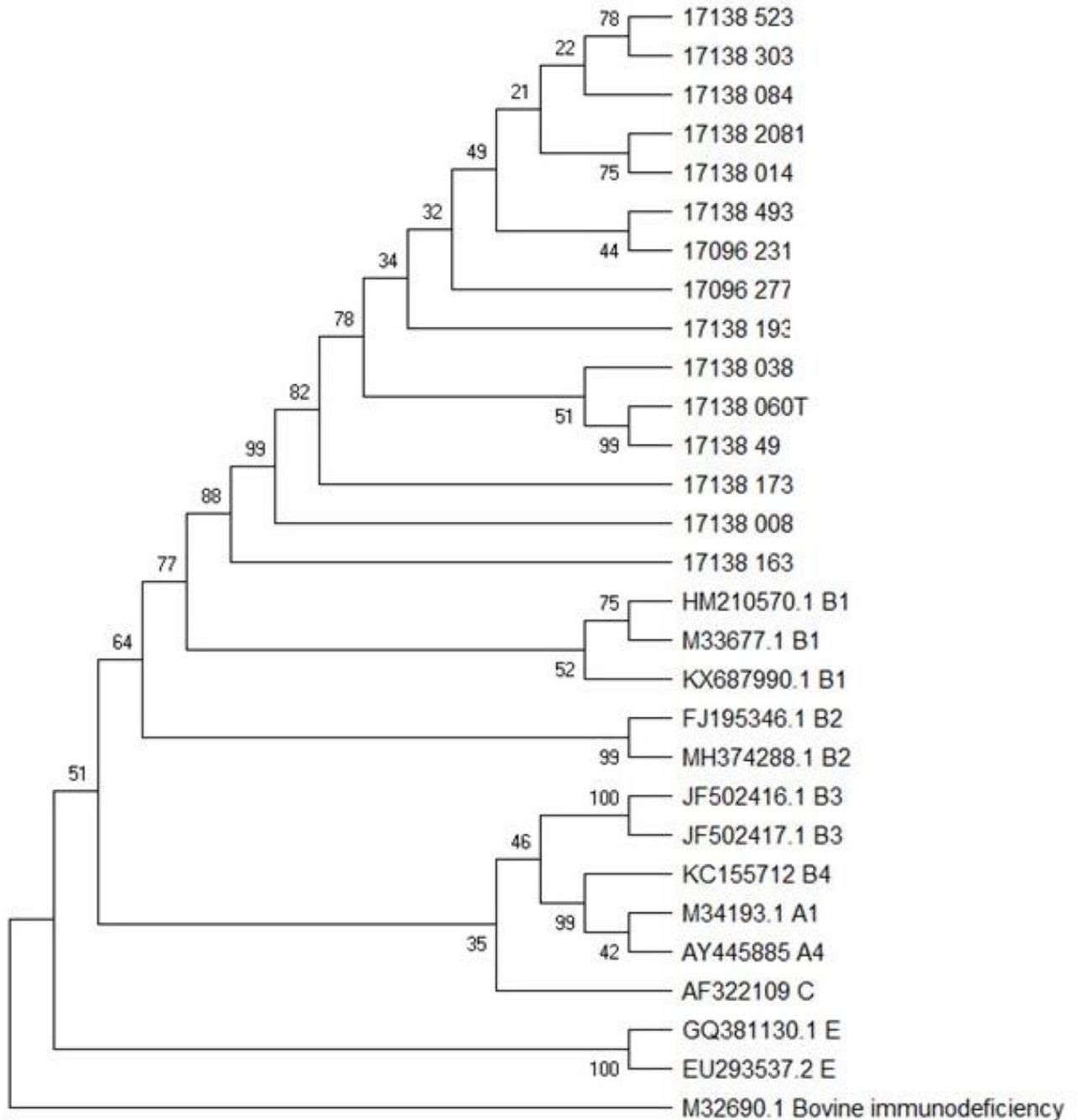
**Tabla 10:** Matriz de identidad abreviada.

	Arg	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Arg	1,00															
1	0,84	1,00														
2	0,84	0,98	1,00													
3	0,87	0,92	<b>0,90</b>	1,00												
4	0,85	0,96	0,96	0,92	1,00											
5	0,84	0,99	0,99	<b>0,90</b>	0,96	1,00										
6	0,85	0,98	0,98	<b>0,90</b>	0,96	0,98	1,00									
7	0,85	0,98	0,98	<b>0,90</b>	0,96	0,98	0,97	1,00								
8	0,84	0,98	0,98	<b>0,91</b>	0,96	0,98	0,97	0,97	1,00							
9	0,84	0,98	0,98	<b>0,90</b>	0,96	0,98	0,98	0,97	0,97	1,00						
10	0,84	0,98	0,98	<b>0,91</b>	0,96	0,98	0,97	0,97	0,98	0,97	1,00					
11	0,85	0,95	0,95	0,92	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,97	0,95	1,00				
12	0,85	0,99	0,99	0,91	0,97	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,95	1,00			
13	0,84	0,98	0,98	0,90	0,96	0,98	0,99	0,97	0,97	0,98	0,97	0,95	0,98	1,00		
14	0,83	0,97	0,97	<b>0,90</b>	0,95	0,97	0,96	0,96	0,97	0,96	0,97	0,94	0,97	0,96	1,00	
15	0,85	0,98	0,98	<b>0,90</b>	0,96	0,98	0,97	0,97	0,98	0,97	0,98	0,95	0,98	0,97	0,97	1,00

Arg: primera secuencia B1 caracterizada en Argentina KX6877990.1; (1 a 13): animales del ható 17138, (14 y 15): animales del ható 17096; (1): animal 084; 2: animal 523; 3: animal 163; 4: animal 173; 5: animal 303; 6: animal 060T; 7: animal 193; 8: animal 493; 9: animal 038; 10: animal 2081; 11: animal 008; 12: animal 014; 13: animal 49; 14: animal 231t, 15: animal 277t.

Los virus circulantes del ható 17138, tienen una identidad entre ellos superior al 90% (90,19-98,85). De igual manera, la similaridad de los animales del ható 17138 y 17096 fue entre 90,35 y 97,95%. Si comparamos las cepas salteñas con la de referencia Arg (KX687990.1), las diferencias son mayores, con valores de identidad entre el 83,17 a 87,12%.

Se pueden ver disparidades en los animales 3, 4 y 11 (163,173 y 008 del ható 17138) respecto de los propios locales, que provocan la agrupación por separado del resto como se puede observar claramente en el árbol de la Figura 24. Asimismo, el animal 3 (163 del ható 17138) destaca especialmente porque es el que presenta la menor identidad del grupo salteño; la menor coincidencia la muestra con respecto al animal 7 (193 del ható 17138), de tan solo 90,19%. Siendo el animal 3 (163 del ható 17138) el más distante filogenéticamente de este grupo.

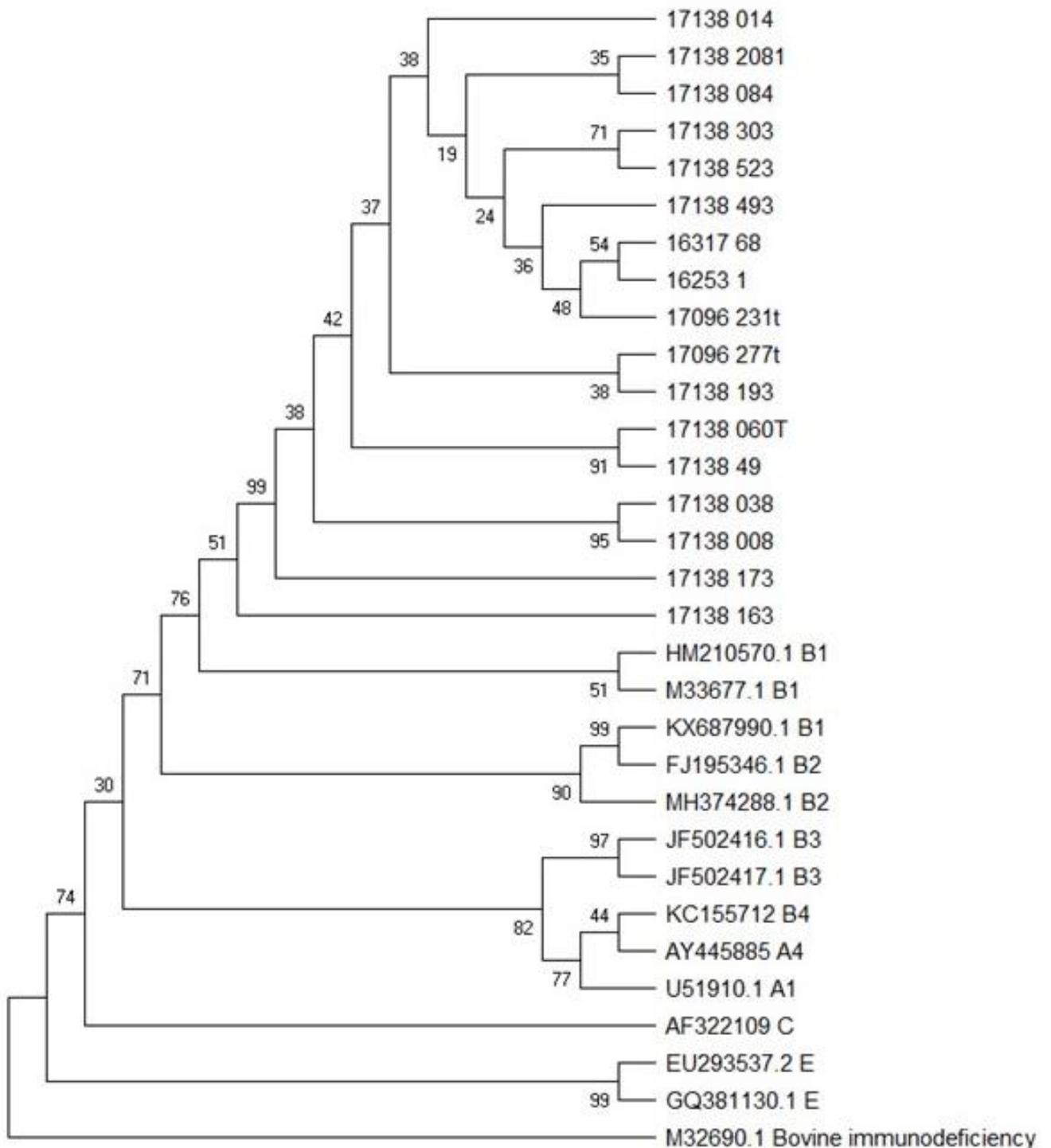


**Figura 24:** Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la nPCR (fragmento de 800pb). Los animales cuyo prefijo es el 17138 son provenientes del tambo del INTA, mientras que aquellos que poseen el prefijo 17096 corresponden a un ható de VT. Se incluyen secuencias referencia de los genotipos A1 (M34193), A4 (AY445885), B1 (HM210570.1; M33677.1), B2 (FJ195346.1 y MH374288.1), B3 (JF502416.1 JF502417.1), C (AF322109), E (EU293537.2 y QG381130.1) y la cepa B1 argentina (KX687990.1), como raíz externa se utilizó una secuencia del virus de la inmunodeficiencia Bovina (M32690.1). Método de Neighbour joining (NJ) con un test de 1000 permutaciones. Análisis evolutivo realizado con MEGA X.

En el árbol filogenético de la Figura 24 puede verse que las cepas que infectan a los animales salteños forman un *cluster* con buen soporte de bootstrap dentro del subtipo B1. Dentro de

este cluster, no se observan diferencias entre hatos. Hay animales que poseen secuencias muy similares, como el 49 y 060T del hato 17138 y otros que, como ya fuera mencionado, forman ramas propias dentro del *cluster* (animales 173,163 y 008 del hato 17138).

Los animales salteños agrupan claramente en relación a los subtipos B1, formando un *cluster* diferente en la región estudiada, al que agrupa las cepas de origen mexicano, estadounidense HM210570.1 y M33677.1 y a la cepa argentina anteriormente publicada KX687990.1.

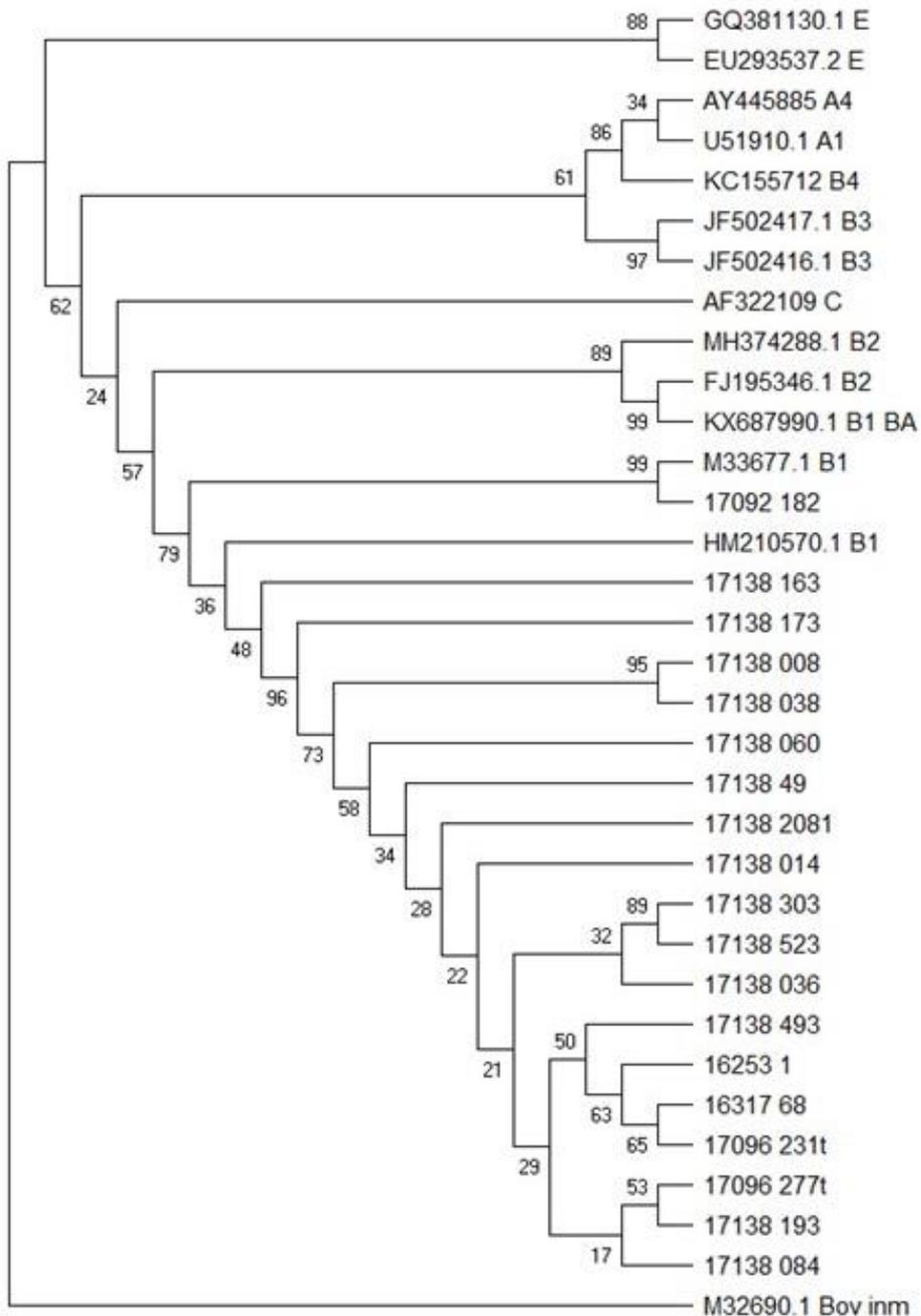


**Figura 25:** Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de *Fw227/Rv700* y *nG2/500* (fragmentos de 500pb).

Los animales cuyo prefijo es el 17138 provienen del tambo del INTA, aquellos que poseen los prefijos 17096 y 16253 corresponden a hatos de VT, los que poseen el número 16317 a un establecimiento del CS. Se incluyen secuencias referencia de los genotipos A1 (U51919), A4 (AY445885), B1 (HM210570.1; M33677.1), B2 (FJ195346.1 y MH374288.1), B3 (JF502416.1 JF502417.1), C (AF322109), E (EU293537.2 y QG381130.1) y la cepa B1 argentina (KX687990.1), como raíz externa se utilizó una secuencia del virus de la inmunodeficiencia Bovina (M32690.1). Método de Neighbour joining (NJ) con un test de 1000 permutaciones. Análisis evolutivo realizado con MEGA X.

Al realizar el análisis con secuencias de menor tamaño, es decir incorporando secuencias de 500 pb de los hatos 17138, 16317 y 16253, se puede observar en la Figura 25, que todas las cepas salteñas continúan agrupando en relación a los subtipos B1. Sin embargo, hay secuencias B1 que pasan a agrupar con el genotipo B2 y el programa no puede acomodar a las secuencias del genotipo A, ya que se muestran en una rama de bajo soporte de bootstrap junto con secuencias B3.

Analizando únicamente las secuencias salteñas, la cepa que infecta al animal 038 y al 008 guardan una relación muy estrecha en estas 500pb mientras que la de los hatos 16317 y 16325 se semejan mucho entre sí y para con el hato 17096, pero no se observan diferencias que cambien la agrupación evidenciada en el árbol obtenido al analizar un fragmento de mayor tamaño.



**Figura 26:** Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la nG2/M3 y M3 (fragmento de 300pb).

Los animales cuyo prefijo es el 17138 provienen del tambo del INTA, aquellos que poseen los prefijos 17096 y 16253 corresponden a hatos de VT, los que poseen el número 16317 a un establecimiento del CS y 17092 representa a un hato de QA. Se incluyen secuencias referencia de los genotipos A1 (U51919), A4 (AY445885), B1 (HM210570.1; M33677.1), B2 (FJ195346.1 y MH374288.1), B3 (JF502416.1 JF502417.1), C (AF322109), E (EU293537.2 y QG381130.1) y la cepa B1 argentina (KX687990.1), como raíz externa se utilizó una secuencia del virus de la inmunodeficiencia Bovina (M32690.1). Método de Neighbour joining (NJ) con un test de 1000 permutaciones. Análisis evolutivo realizado con MEGA X.

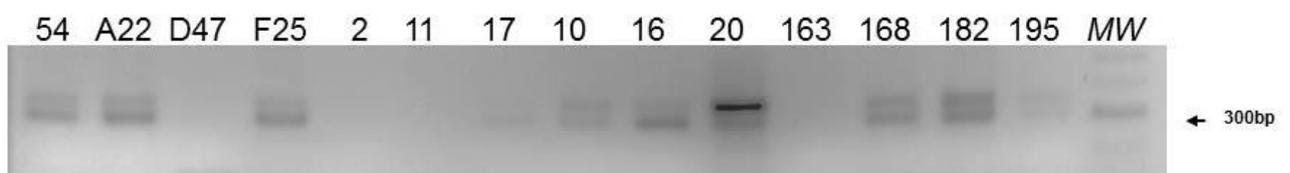
En la Figura 26 podemos ver que a medida que el fragmento analizado disminuye su tamaño, se observa un cambio en el agrupamiento de las secuencias estudiadas. Se rompe el *cluster* de las secuencias locales, apareciendo animales del ható 17092 que agrupan con la cepa Cork, la cepa argentina KX687990.1 pasa a agrupar con secuencias de subtipos B2. Se puede observar que secuencias de genotipos distintos aparecen agrupadas con bajo soporte de bootstrap, indicando que esta región de 300pb no es suficiente para la caracterización de genotipos establecida.

Otros árboles filogenéticos obtenidos para los tres fragmentos (800, 500 y 300pb) con test de 1000 permutaciones y secuencia consenso por el método de máxima verosimilitud (ML) puede verse en el Anexo I [Figuras 2 a 4](#).

### 5.3.3 Desarrollo y puesta a punto de PCR para el diagnóstico de SRLV

Basándose en las secuencias obtenidas en las muestras de Salta con la nPCR se diseñaron una serie de cebadores (Tabla 5), con la intención de amplificar específicamente las secuencias de SRLVs argentinos.

De la combinación de cebadores *Fw275-Fw227* y *Rv542* se obtuvo una PCR multiplex (M3) que amplifica dos fragmentos de 335 y 287pb (Figura 27). Esta PCR resultó ser de mayor sensibilidad, que la nPCR, e incluso fue capaz de detectar un alto número de seronegativos, pero su repetibilidad no fue la misma que la nPCR.

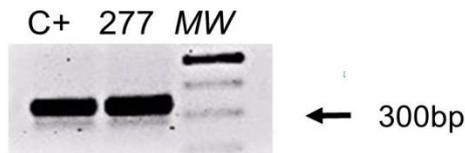


**Figura 27:** Gel de la PCR M3.

Se muestra una electroforesis en agarosa 2% de los productos obtenidos con la PCR M3 con ADN de diferentes hatos. *MW*: Marcador de peso molecular. Se marca con una flecha la banda correspondiente a los 300pb.

La PCR M3 proporciona dos fragmentos reconocibles en geles de agarosa de 1,5 a 2%, siendo más nítida a la segunda concentración de agarosa. Esta PCR emplea dos cebadores sentido sobre el mismo producto de amplificación, por lo que se aumenta la posibilidad de detección y la sensibilidad.

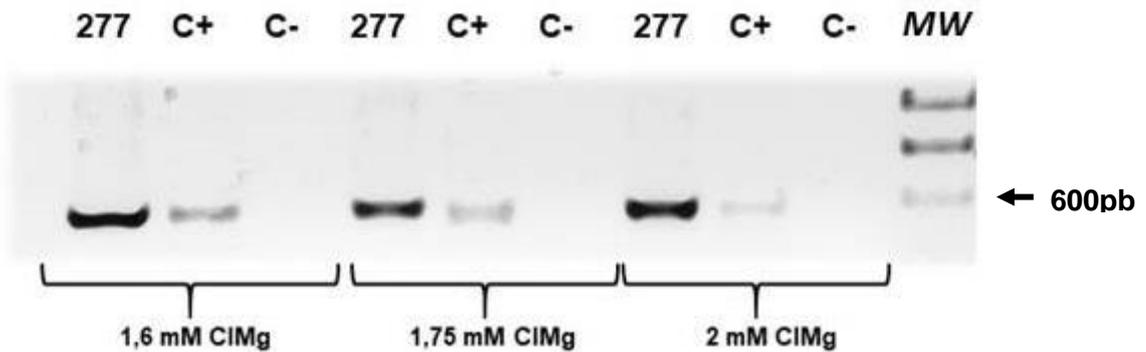
Para aumentar la repetibilidad y sensibilidad de los productos se diseñó una nested PCR con un primer ciclo utilizando los cebadores internos de la nPCR (*G2=GAG F2* y *POL-R2*) y como segundo ciclo M3, a la que se denominó nG2/M3 (Figura 28).



**Figura 28:** Gel de la PCR nG27M3.

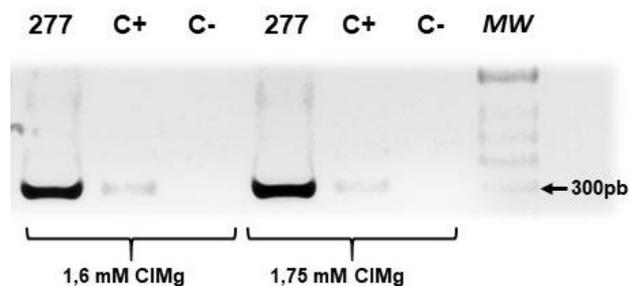
Se muestra una electroforesis en agarosa 2% de los productos obtenidos con la PCR nG2/M3 con ADN de caprino. *MW*: Marcador de peso molecular. Se indica con una flecha la banda correspondiente a los 300pb.

También se pusieron a punto otras combinaciones de cebadores, siendo interesante destacar *Fw191/Rv738*, *Fw78/Rv738* y *Fw227/Rv700* (Figuras 29 y 30) que proporcionan fragmentos de 566pb, 679pb y 493pb respectivamente e incluyen regiones antigénicas importantes para el desarrollo de métodos de diagnóstico serológico.



**Figura 29:** Gel de la PCR *Fw191/Rv738*

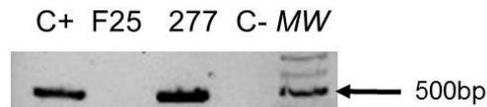
Se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos obtenidos de la PCR *Fw191/Rv738* empleando un gradiente de cloruro de Magnesio y ADN del animal 277, C+= control positivo. C-= control negativo. *MW*: Marcador de peso molecular. Se indica con una flecha la banda correspondiente a los 600pb.



**Figura 30:** Gel de la PCR *Fw227/Rv700*.

Se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1,5% de la PCR *Fw227/Rv700* empleando un gradiente de cloruro de magnesio con ADN del animal 277, C+= control positivo, C-= control negativo, *MW*= marcador de peso molecular. Se indica con una flecha la banda correspondiente a los 300pb.

A partir de estas PCR se diseñó, como ya fuera explicado, nG2/500 que se muestra a continuación (Figura 31).



**Figura 31:** : Gel de la PCR nG2/500.

Se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1% de los amplicones obtenidos con la PCR nG2/500 y ADN de diferentes hatos. C-= control negativo. MW: Marcador de peso molecular. Se marca con una flecha la banda correspondiente a los 500pb.

### 5.3.4 Resultados moleculares de los hatos

Se analizaron un total de 100 muestras de 15 rebaños por 8 PCRs diferentes (Tabla 11).

**Tabla 11:** Rebaños analizados por PCR con su referencia a serologías.

Rebaño	N	ELISA <sup>1</sup>	PCR								ΣPCR <sup>2</sup>
			nPCR	OSLO-POL-R2	M3	227/700	191/738	78/738	nG2/M3	nG2/500	
16282	4	1/4	0/4	NT	1/3	NT	0/1	0/1	NT	NT	1/3
16315	4	2/4	NT	0/4	0/2	NT	NT	NT	NT	NT	0/4
16316	4	0/4	NT	0/4	3/4	NT	NT	1/1	NT	NT	3/4
16317	4	1/4	NT	0/4	3/4	NT	NT	NT	NT	NT	3/4
16418	4	1/4	NT	0/4	1/4	NT	NT	NT	NT	1/1	1/4
16419	4	1/4	NT	0/4	3/4	NT	2/3	NT	NT	NT	3/4
17088	4	2/4	NT	1/4	1/2	NT	0/1	1/1	NT	NT	1/4
17089	4	2/4	NT	3/4	4/4	NT	NT	NT	NT	NT	4/4
17090	4	0/4	NT	2/3	1/3	NT	NT	NT	NT	NT	2/3
17091	4	2/4	NT	2/4	3/4	NT	1/2	NT	NT	NT	3/4
17092	4	2/4	NT	0/4	4/4	NT	NT	NT	NT	NT	4/4
16253	4	1/4	NT	0/4	4/4	NT	NT	NT	1/1	NT	4/4
17138	24	22/24	20/24	2/6	3/4	0/2	NT	NT	NT	2/2	20/24
17096	20	6/20	2/20	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	2/20
16180-81	8	2/8	NT	1/8	7/8	1/2	3/4	1/1	2/2	0/2	7/8
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>45/100</b>	<b>22/48</b>	<b>13/59</b>	<b>39/55</b>	<b>2/5</b>	<b>7/11</b>	<b>4/5</b>	<b>4/4</b>	<b>4/6</b>	<b>58/98</b>

ELISA<sup>1</sup>= Número de positivos totales a ELISA sobre animales analizados. nPCR=Numero de positivos sobre animales testados para cada PCR en particular. ΣPCR<sup>2</sup>= Suma del número de positivos totales a PCR sobre animales analizados. NT= No testado.

En los hatos 17138 y 17096, puede observarse que, si bien no se testaron la totalidad de los animales por métodos moleculares, al comparar los resultados serológicos y los moleculares, se confirma la presencia de virus. Ambos establecimientos poseían además las mayores seroprevalencias y la presencia de claros casos clínicos. Uno de los animales del hato 17096, debido a su alta carga proviral y la cantidad y calidad de su ADN, se utilizó como control positivo.

En casos como el del hato 16316 o el 17090, los animales utilizados dieron resultado negativo a ELISAs, pero el provirus pudo ser detectado por PCR. También en hatos como el 16253 o

el 16418 y 16419, mediante métodos moleculares se obtuvieron más positivos que utilizando esos mismos animales en ELISAs comerciales.

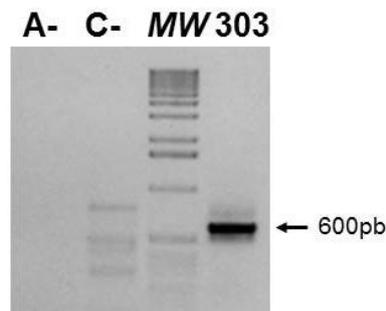
La nPCR funcionó de forma más eficiente en el hato 17138 mientras que OSLO-POL-R2 proporcionó resultados positivos en un mayor número de rebaños, pero con bandas inespecíficas que dificultaron su clonación.

### **5.3.5 Proteína p25**

Dado que muchas veces se dificulta la importación de kits de diagnóstico serológico y considerando que ahora se cuenta con las secuencias de las cepas salteñas, se exploró la producción de un antígeno recombinante para el diagnóstico serológico.

#### **5.3.5.1. Clonado de la proteína p25 de SRLV salteños**

Empleando cebadores diseñados para la secuencia de la proteína de la cápside p25B1 se realizó la PCR obteniéndose un amplicón de 608pb como se muestra en la Figura 32.

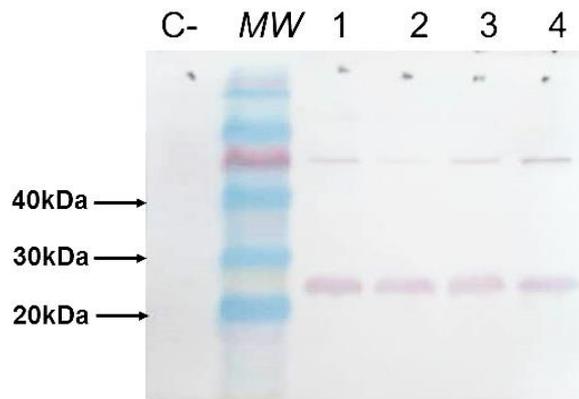


**Figura 32:** Gel de la PCR p25B1.

Se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1% de los amplicones de la PCR p25B1. A-= Control negativo sin ADN, C- = Control ADN caprino negativo, MW= Marcador de peso molecular. 303= Animal positivo del hato 17138.

#### **5.3.5.2. Expresión de la proteína de la cápside p25**

Luego de la purificación y clonación en plásmidos intermediarios su secuencia fue corroborada mediante secuenciación. Tras el subclonaje en el vector de expresión pRSET, se analizó la expresión de p25 recombinante en bacterias *E. coli* B121 pLys mediante ensayo de WB (Figura 33).

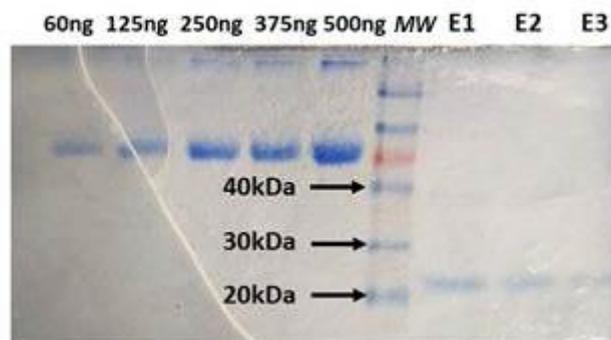


**Figura 33:** WB de proteínas totales de clones *E. coli* B121 pLys.

Se utilizó el vector de expresión pRSET-p25, el anticuerpo monoclonal anti-His. C-= *E. coli* B121 pLys sin transformar; MW= Marcador de peso molecular; 1= extracto proteico del clon 1; 2= extracto proteico del clon 2; 3= extracto proteico del clon 3; 4= extracto proteico del clon 4.

### 5.3.5.3. Producción y purificación de la proteína p25

Dado que la proteína reactiva mayoritaria en el ensayo de WB coincide con el peso molecular de la proteína recombinante p25 estimado en 25kDa, se procedió a la producción, purificación por IMAC y posterior cuantificación resultando una concentración del eluido de 268ng/μl de p25 (Figura 34).



**Figura 34:** SDS-PAGE con cantidades crecientes de seroalbúmina bovina.

Se utilizaron de 60 a 500 ng totales y los eluidos de cultivos bacterianos. MW= Marcador de peso molecular; E1-E3= Eluido n°1-3 de p25.

### 5.3.5.4. Evaluación de la proteína p25 obtenida

Finalmente se realizó un WB con la proteína recombinante p25 purificada y se probó su inmunogenicidad frente a mezclas de sueros previamente catalogados por ELISAS comerciales (Figura 35).

Se testaron sueros:

**Negativos:** A todos los ELISAS comerciales.

Animales 9, 10, 11, 12, 13 y 14 del hato 15347.

**Positivos:** A todos los ELISAS comerciales.

Animales 10, 19 y 32 del hato 16346.

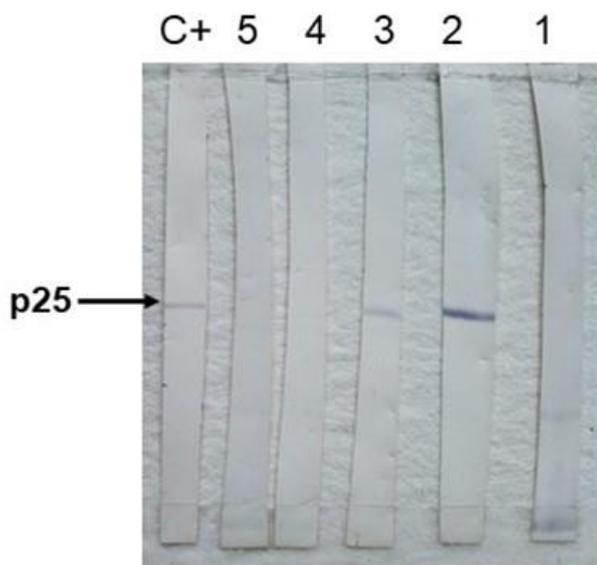
Animales 229, 231 y 235 del hato 17096.

**Positivos a un solo *kit*:**

Animal 423 del hato 16180-81.

Animal 62 y 71 del hato 16317.

Animales 8 y 24 del hato 16315.

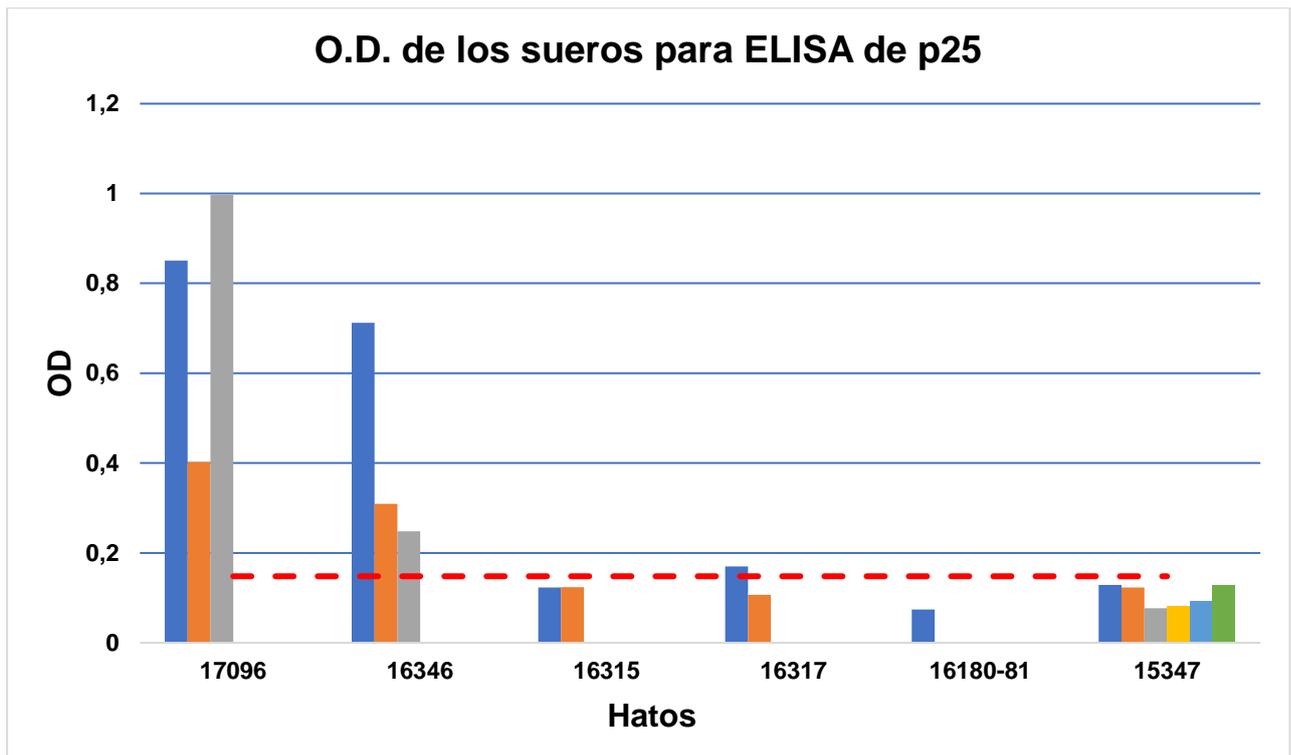


**Figura 35:** WB de p25.

En las calles pueden verse C+= Anticuerpo monoclonal anti histidina. 1= Mezcla de sueros negativos a todos los ELISAs; 2 y 3 Mezcla de sueros positivos a los ELISA comerciales; 4= Mezcla de sueros reactivos solo por un solo ELISA; 5= Suero del animal 423 del hato 16180-81 (reactivo solo por *Erradikit*).

Puede observarse que la tira de WB número 1, sueros negativos por ELISA comerciales no muestran reconocimiento a la proteína p25 recombinante. Lo mismo ocurre con la tira 4 y 5, que fueron positivos solamente a *Erradikit* o a un solo ELISA. Mientras que las tiras 2 y 3, provenientes de hatos que fueron positivos a los tres ELISAs comerciales utilizados, sí mostraron reconocimiento de la proteína recombinante.

Una vez comprobada la reactividad específica de los sueros caprinos frente a la proteína recombinante, el siguiente paso consistió en realizar un test de ELISA siguiendo el procedimiento de Rosati (Rosati et al. 2004), utilizando la p25 recombinante purificada y los sueros caprinos previamente seleccionados y catalogados.

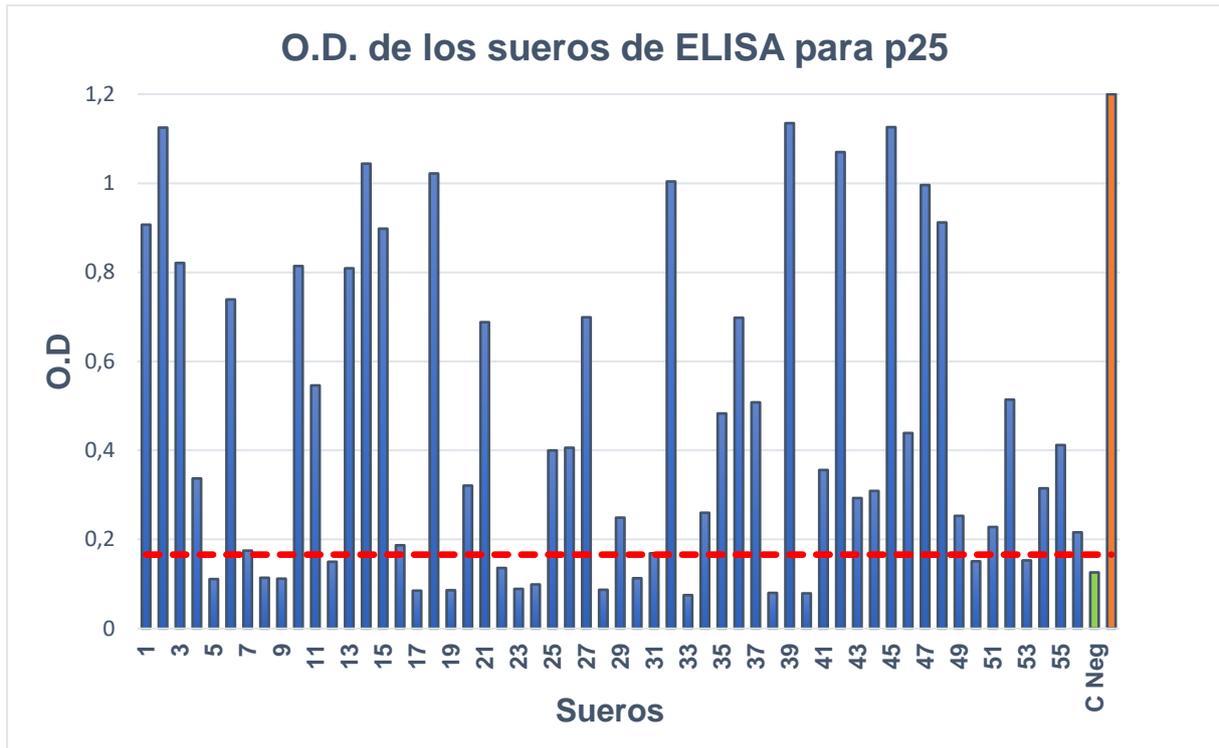


**Figura 36:** Resultados del ELISA a partir de la p25 recombinante.

En la gráfica pueden apreciarse los valores de densidad óptica (O.D). de los sueros de los animales de los hatos 17096,16346, 16315, 16317, 16180-81 y 15347. El punto de corte está representado con la línea roja discontinua, fue de 0,148 considerándose negativos los sueros que no superen ese límite.

En el resultado del ELISA (Figura 36), puede verse que los sueros considerados negativos (hato 15347), no sobrepasaron el umbral, respondiendo al criterio utilizado para su definición. Los sueros positivos a los tres ELISAs comerciales (hatos 16346 y 17096) también resultaron positivos al ELISA con p25 recombinante, mientras que la discrepancia se planteó para los sueros positivos solo a *Erradikit* (hatos 16315, 16317 y 16180-81), los cuales fueron detectados como negativos con este ELISA salvo el animal 62 del hato 16317 que en este caso superó el punto de corte ingresando a la zona umbral de positividad.

Luego de esta evaluación, se intentó una prueba de mayor envergadura utilizando la totalidad del hato experimental 17138, pero esta vez con muestras tomadas en el año 2021. El resultado se representa en la siguiente Figura 37.



**Figura 37:** Resultados del ELISA a partir de la p25 recombinante.

En la gráfica pueden apreciarse los valores de O.D. de los sueros de los animales del hato 17138 del año 2021 (del 1 al 56). Las dos últimas posiciones son el control negativo (verde) y el control positivo (naranja). El punto de corte está representado por la línea roja discontinua que fue de 0,166 considerándose negativos los sueros que no superen ese límite.

En este caso se puede observar que 40 de los 56 animales (71,42%) superan el punto de corte, mientras que 16 (28,58%) son considerados negativos con esta metodología.

#### 5.4 Desarrollo y caracterización de cultivos primarios

Se realizaron pruebas para determinar la forma más eficiente de envío de las biopsias. Inicialmente, se intentó criopreservar el tejido epitelial y enviarlo en nitrógeno líquido desde Salta al IABIMO, provincia de Buenos Aires (1600Km). Esta manera no fue de utilidad debido que el tejido no se criopreserva de la misma forma que las células disgregadas, la formación de cristales se produce por no penetrar correctamente los agentes crioprotectores, produciendo daños por la presión osmótica, el choque térmico, la nucleación intracelular de los cristales de hielo, la toxicidad propia de los criopreservadores o la rotura de la matriz (Gibson 1957; McGann et al. 1988; Meryman et al. 1977), y no fue viable para la realización de la técnica descrita en el punto [4.8](#). Por lo que se recurrió a la forma de refrigeración tradicional y al envío terrestre de las muestras.

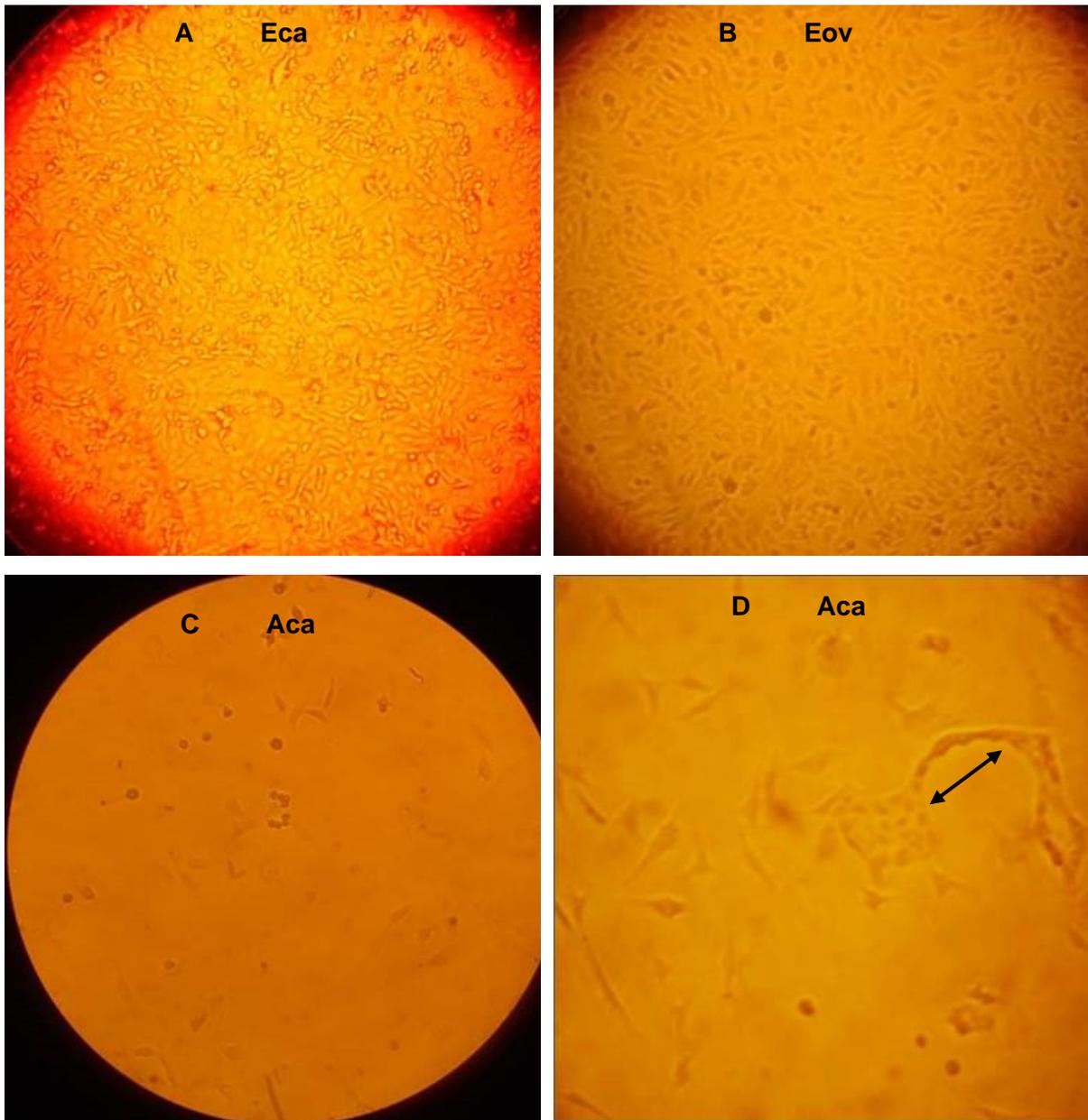
Cuando las biopsias fueron de animales adultos, si bien las células del explante se disgregaron con facilidad, el desarrollo de las monocapas fue muy lento y solo se conservaron

hasta el pasaje 3, por lo tanto, no pudieron ser utilizadas en los experimentos posteriores. Por otro lado, las muestras de piel se disgregaron con mayor facilidad si provenían de pequeñas secciones no mayores a 1 cm<sup>2</sup> y derivadas de neonatos o animales jóvenes, obteniéndose un cultivo primario tipo epiteliode de las dos especies utilizadas (ovinos y caprinos). Las células epiteliales obtenidas demoraron entre 10 y 20 días en desarrollar una monocapa adherida. Se observó que el porcentaje de células tipo epiteliode fueron las que desarrollaron y completaron la monocapa celular (Figura 38 A y B).

A partir de estos cultivos se realizaron subcultivos y se criopreservaron en los pasajes 2, 4 y 6. Luego de un mes crio conservadas (en N<sub>2</sub> líquido), fueron descongeladas y se observó una viabilidad del 90% y un crecimiento normal. A partir del pasaje 8 para el cultivo Eov y del 6 para Eca se observa la selección de clones celulares, tipo epiteliode, con los cuales se intentó obtener una línea establecida y sensible a los virus de ovinos y caprinos.

En cuanto a los animales donantes, al cabo de 10 días de realizada la biopsia, la recuperación fue completa.

Por otro lado, muestras de líquido articular de animales artríticos, fueron colocadas en placas de 6 pocillos e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se adhirieron directamente a la placa de cultivo y se las denominó "Aca". Las células obtenidas inicialmente eran redondeadas y se distinguieron al menos cuatro tipos celulares. Unas más pequeñas que mantuvieron su estructura circular, con un núcleo grande y un halo citoplasmático, otras pequeñas poliédricas, que se presentaron en aglomeraciones. Aparecieron también células de apariencia rectangular y otras del tipo fibroblásticas (Figura 38 C). Las células demoraron unas 24 h en adherirse al plástico y de 2 a 11 días en completar el pocillo. Al realizar un repique tardaron entre 24 y 48 h en estabilizarse y comenzar a crecer nuevamente y no se desprendieron con facilidad de la placa mediante el uso de tripsina. Se pudieron cultivar con buenas características morfológicas hasta el pasaje número 3.



**Figura 38:** Monocapas Eca, Eov y Aca.

En las imágenes A y B pueden verse las células epitelioides caprinas y ovinas (Eca y Eov) casi al 100% de confluencia mientras que en C se visualizan las células articulares caprinas (Aca) en crecimiento. En la imagen D puede apreciarse con una flecha una agrupación celular.

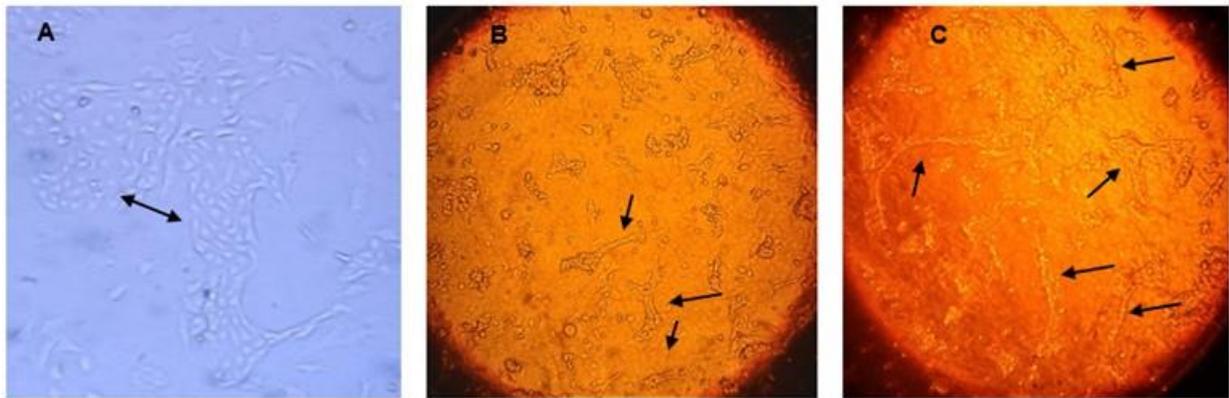
La diferenciación de monocitos sanguíneos caprinos a macrófagos, se realizó a partir de muestras criopreservadas en el IdAB, mientras que en el IABIMO se utilizaron muestras frescas refrigeradas. Se testaron diferentes condiciones de cultivos, densidad celular, el uso o no de un lavado y cambio de medio a las 5 h, utilización o no de suero autólogo o cambio del anticoagulante utilizado sin lograr una diferenciación visualmente aparente en ninguno de los casos, de todas formas, se utilizó el sobrenadante de estos cultivos para inocular monocapas celulares de Aca, OSF, GSMT y TIGEF (Tabla 12).

## 5.5 Aislamiento de SRLV

Las células de cultivo primario obtenidas en esta tesis (Eca y Eov) mostraron efecto citopático evidente a las 24 h tras el desafío con muestras de líquido articular de animales seropositivos con artritis clínica. Se desarrollaron células gigantes multinucleadas con un aspecto ameboide y extremos redondeados (Figura 39 B y C). Las células *TIGEF* mostraron sincitios en el día 7 de cultivo, al desafiarlas con sobrenadante del cultivo de monocitos. Sin embargo, dicho efecto desapareció días posteriores en los tres tipos celulares.

También se desafiaron las líneas celulares *OSF* y *GSM-T* con líquido articular y su sobrenadante, sin efectos visuales aparentes.

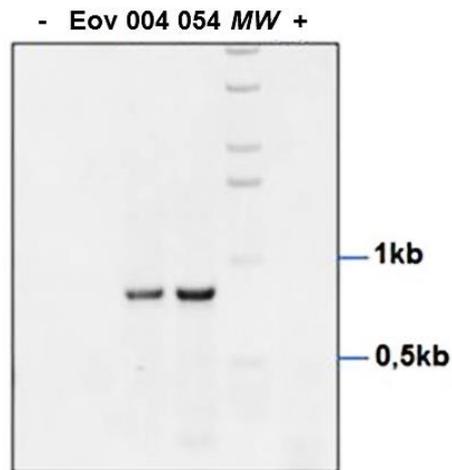
En el cultivo directo del líquido articular se observó la formación de células gigantes, más precisamente un aglomerado celular, con puentes intercelulares que no se correspondían con la forma típica de un sincitio (Figuras 38 D y 39).



**Figura 39:** Efecto citopático sobre células Aca, Eca y Eov.

En el panel A puede verse la formación de un aglomerado de células articulares carpianas (señaladas con la doble flecha) con puentes que mantienen su estructura a través del tiempo. En los paneles B y C se aprecia la formación de células gigantes de apariencia ameboide en células Eca y Eov, respectivamente (señaladas con flechas).

A estos cultivos de células Aca se les realizó extracción de ADN y análisis mediante la nPCR, obteniéndose los amplicones esperados a partir de células con el efecto citopático y de otras que no lo presentaron (Figura 40).



**Figura 40:** Gel de agarosa de la nPCR a partir de las células Aca en cultivo.

(-) Control negativo. Eov: control negativo de ADN de células Eov sin desafiar. 004: Amplificación en las células Aca sin efecto citopático de dicho animal. 054: Amplificación en las células Aca con efecto citopático de dicho animal. MW marcador de peso molecular.

Durante el desarrollo de los cultivos primarios de células Aca se pudieron observar células que desarrollaron rápidamente formando monocapas con células aglomeradas; otras que formaron monocapas, pero no presentaron aglomeraciones y otras que no llegaron a completar un pocillo. Con respecto al análisis de *Micoplasmas* realizado por el IV, las células que mostraron aglomeración fueron libres de *Micoplasmas*, mientras que las que fueron positivas a *Micoplasmas* solo completaron la monocapa o no llegaron a hacerlo. Como ejemplo de esto, se muestra el caso del animal 004 (Figura 40) que no mostró efecto citopático, fue positivo al diagnóstico por *Micoplasmas* y la nPCR lo identificó como positivo a SRLV. Con estas evidencias, estaríamos en presencia de una coinfección en el hato 17138. En el IdAB, las líneas celulares ovinas y caprinas (*OSF*, *GSM-T* y *TIGEF*) desafiadas con líquido articular y sobrenadante de cultivo de macrófagos mostraron sincitios en el caso de *TIGEF* incubadas con líquido articular, pero el virus no pudo ser detectado por técnicas moleculares a partir de ADN genómico del cultivo. Mientras que las células *OSF* y *GSM-T* desafiadas con sobrenadante de cultivo de macrófagos entre los días 5 y 8 presentaron una vacuolización citoplasmática, con la apariencia de una célula sucia por los numerosos detritos citoplasmáticos, acúmulos lisosomales y se produjo muerte celular difusa de baja cuantía (Tabla 12).

**Tabla 12:** Efectos visuales sobre cultivos celulares desafiados con los distintos inóculos.

Muestra	Células utilizadas							
	IABIMO					IdAB		
	Eca	Eov	Aca	OSF	GSMT	OSF	GSM-T	TIGEF
Líquido Articular (LA)	CG 24 h	CG 24 h	AC	SE	SE	SE	SE	S 7días
Sobrobrenadante LA	NT	NT	AC 7 días	SE	NT	NT	NT	NT
Sobrobrenadante monocitos	NT	NT	SE	V	V	SE	SE	SE
PCR	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	-

CG= Células gigantes; AC=Aglomerado celular, SE= Sin efecto, V=Vacuolización, S= Sincitios, NT= No testado, (+) = PCR Positiva, (-) = PCR Negativa.

### 5.6 Ensayo de aplicación de medidas de manejo para el control de los SRLV

Una vez confirmado el diagnóstico de SRLV en el hato 17138, se propuso implementar medidas de manejo para disminuir el índice de positividad. A partir de las prácticas realizadas en el hato experimental 17138 o Tambo de la EEA Salta, se pudieron ver los siguientes resultados.

**Etapas inicial:** Esta etapa comprende los años 2016 y 2017. Si bien en este momento no se contaba con un cribado serológico total del hato, el número de animales testados fue de 70 con una seroprevalencia de 78,8%.

Debido a la división en dos del rebaño, el manejo diario de los animales, si bien fue más complicado para el personal al cuidado de los animales, fue tomado con buen agrado cumpliéndose las medidas sugeridas. Los cabritos no aceptaron la toma de calostro con cantidades de SLS mayores a 1% por lo que se planteó una modificación para la siguiente etapa. Fue de suma importancia el manejo nutricional para evitar partos nocturnos y el incremento de posibilidad de cabritos hijos de positivas que mamaran abundante calostro. La reposición previa al testeo del año 2017 se realizó con cabritos hijos de las 6 hembras (múltiparas) negativas constatadas del hato, previa nPCR diagnóstica.

La prevalencia de SRLV con nPCR de 33 cabritos fue la siguiente: hijos de padres negativos 19,05% (4/21 con dos indeterminados), hijos de padres positivos 12,50% (1/8), hijos de indeterminados 0% (0/2). De estos animales se seleccionó la reposición de 2017.

A partir de esta etapa inicial, el porcentaje de animales sintomáticos disminuyó de un 48% a casi cero, apareciendo esporádicamente un caso clínico que era eliminado lo más pronto posible dependiendo del valor genético del mismo.

**Segunda etapa:** A partir del cribado serológico total de las existencias del hato en 2017, se pudieron reclasificar a todos los animales e incrementar el número de cabritos en el lote de hijos de madres seronegativas.

El manejo de la etapa inicial con la implementación de los descartes de sintomáticos y positivos determinados, disminuyó la seroprevalencia a 55% y los sintomáticos a cero. Los nuevos refugos fueron tendientes a eliminar a todo animal que apareciese como sintomático e ir eliminando a los positivos, substituyéndolos con una reposición libre de SRLV.

Se incorporó la pasteurización de calostro y leche como suministro seguro de alimentos para los cabritos como parte de la rutina estable del tambo.

Lamentablemente, la pandemia por SARS-CoV2, afectó tanto el trabajo en el campo experimental como en el laboratorio de diagnóstico, y no se pudo continuar con las medidas de manejo implementadas, como la separación en hemirodeos, medidas higiénicas de contención, pasteurización de calostro y leche para los cabritos, sangrados, seguimiento o control de los animales para reposición.

## **5.7 Análisis socioeconómico y productivo**

Con el fin de determinar si existe una correlación entre variables de producción caprina y el estatus sanitario, así como también para ayudar a plantear estrategias de control, se decidió realizar un análisis socioeconómico y productivo de los establecimientos involucrados en este trabajo de tesis.

### **5.7.1 Distribución geográfica de los hatos**

Los 32 establecimientos productivos están situados en las ecorregiones de Valles Templados, Chaco Salteño y Valles y Quebradas Áridas distribuidos a lo largo del NOA (Figura 41).



**Figura 41:** Mapa de distribución de los hatos.

A la derecha se puede ver la referencia a menor escala, la zona de muestreo, en el recuadro rojo. En el mapa pueden apreciarse gotas de diferentes colores según la ecorregión que les corresponda. Las gotas naranjas representan hatos en QA, las azules en VT y las verdes en CS. Los números se corresponden con el número de protocolo de laboratorio de cada establecimiento mientras que la barra color blanco y negro del margen inferior izquierdo referencian a una distancia de 50km. No se ha incluido en esta margen al hato 16180-81 de la provincia de Catamarca, por distorsionar la mejor visualización de la representación geográfica. Pero puede accederse al mapa completo con posibilidad de navegación a través del siguiente link:

[https://www.arcgis.com/apps/Embed/index.html?webmap=c8614cd492eb414dad76700fa988c540&extent=-69.8622,-26.8627,-59.3812,-22.7402&zoom=true&previewImage=false&scale=true&disable\\_scroll=true&theme=light](https://www.arcgis.com/apps/Embed/index.html?webmap=c8614cd492eb414dad76700fa988c540&extent=-69.8622,-26.8627,-59.3812,-22.7402&zoom=true&previewImage=false&scale=true&disable_scroll=true&theme=light)

Una descripción más detallada de las características de los hatos, particularidades del manejo, prácticas sanitarias, comercializaciones, suplementaciones, según ecorregiones y épocas del año y otras aclaraciones de terminologías que pueden facilitar un mejor entendimiento de las explotaciones caprinas de la zona se proporcionan en el Anexo I 9.3 Tabla [2 a 4](#).

### **5.7.2 Caracterización de los hatos**

Los establecimientos muestreados en el Chaco salteño y Valles templados son de tipo familiar, mientras que en Valles y Quebradas áridas se encontró un mayor número de hatos correspondientes a tambos comerciales y explotaciones familiares capitalizadas. Geográficamente, la ecorregión de Valles y Quebradas áridas es la que consiguió mejor distribución espacial de muestreo como puede verse en la Figura 41.

La raza preponderante fue la Criolla, aunque existe mucha introducción de sangre Anglo Nubian, Saanen y algo de Boher, siendo Criolla x Anglo Nubian la craza típica de cría (biotipo carnívoros 65,63%) y Criolla x Saanen la más común en lechería (biotipo lechero 34,38%).

### **5.7.3 Sistemas de producción en las diferentes ecorregiones**

En el Chaco Salteño (CS) el objetivo de producción fue enteramente el de cría (100%). Los dueños con la ayuda de algún familiar ordeñaban manualmente a sus animales (promedio 45,25 animales por hatos) de biotipo carnívoros (100%) para utilizar la leche, queso y cabritos como parte fundamental de su dieta. La venta de las reses era una actividad eventual y en ella era de vital importancia la figura del cabritero, que es un agente que se encarga de recorrer diferentes zonas, pasados unos dos meses la época de parición -suelen ser en noviembre y en el mes de mayo- y compra los cabritos a su criterio, al pie de la madre. Arma su lote de venta y los envía a faena pagando a los propietarios los cabritos negociados.

En Valles y Quebradas Áridas (QA) el objetivo de producción fue equilibrado entre cría y leche (45% y 55%); los animales (promedio 340,55 animales por hatos) fueron cruces del biotipo lechero (50%), los hatos lecheros fueron los que poseían mayor número de animales y valores superiores de producción láctea. En esta ecorregión, en un mayor número de establecimientos, se delegó el cuidado de los animales y la producción a manos de empleados (hasta el 40%) y donde la venta de sus productos fue más importante que su utilización para su autoconsumo. En esta ecorregión existe la figura del intermediario, que es simplemente un propietario o empleado de comercio que compra la producción completa o una cantidad semanal acordada de esa explotación ganadera. Sin la presencia de estas figuras los

productores no tienen la capacidad de comercializar las producciones animales, por lo que es fundamental en la subsistencia de tanto de las explotaciones como de las poblaciones humanas.

En Valles Templados (VT) la mayoría de los animales fueron de biotipo carnívoros (87,50%) y dedicados a la cría (62,5%). La cantidad de animales por rebaño posee un número intermedio entre CS y QA (77 animales hato promedio), dando como resultado una mayor producción de leche por hato que CS. Las explotaciones fueron un 75% del tipo familiar y solo una disponía de empleados. Los productos de autoconsumo vuelven a ser prioritarios sobre las ventas. En este caso particular solo los establecimientos familiares capitalizados y comerciales (únicamente 2) tenían vías de comercialización de productos, mientras que los familiares ofrecían sus productos a los eventuales visitantes que se los solicitaran (Anexo I [Tabla 2](#)).

Si se trata de dar una caracterización global con los datos del relevamiento de todos los establecimientos encuestados en la región bajo estudio, el ordeño era practicado por el 87,5% de los establecimientos y aunque fue típicamente manual (85,71%), 4 establecimientos poseían máquina ordeñadora (14,29%). El 81,25% de los hatos tenía al menos un producto de venta y el 68,76% practicaba el autoconsumo de su producción dejando en claro que hay hatos que solo producían para autoabastecerse, mientras que existe un porcentaje que podía obtener beneficios de parte de su producción.

El cabrito fue el producto más vendido en general y en exclusividad en el CS, mientras que el queso cobró más importancia en QA y en segundo lugar en VT. De los 3209,5 litros diarios promedio de leche producidos por 7806 animales de los establecimientos, el 89,80% correspondió a QA que poseía el 89,52% de los animales. Dicha característica queda reafirmada con los promedios individuales de leche por establecimiento en CS (13,80 litros por hato), cuya única producción es la cría. VT, donde el 37,50% de los hatos son del tipo lechero, mostró una media diaria de 34,00 litros de leche y QA de 144,10 litros promedio.

Puede verse claramente en el Anexo I [Tabla 3](#), que la falta de delimitación territorial de las propiedades fue una característica general del sistema caprino del noroeste argentino, quedando reducido el parcelamiento para tambos comerciales y explotaciones familiares capitalizadas casi en exclusividad. Lo mismo ocurrió con el uso racional del recurso forrajero, donde la utilización del alambrado eléctrico en su modalidad de franjas diarias fue el manejo más practicado. En promedio, el 75% de los hatos utilizó pastoreo extensivo sobre campos naturales con máximos del 100% en los rodeos del CS y 70% de QA, donde las necesidades de los animales lecheros unidas a las mayores capacidades tecnológicas dieron como resultado un mayor uso de los pastoreos intensivos rotativos por franjas con alambrado eléctrico. Un promedio del 68,75% de los hatos no poseía delimitación territorial, la mayor parte de los hatos pastoreaban en tierras comunales.

La suplementación fue una práctica muy recurrida con dos finalidades diferentes; fue el recurso primordial para incrementar la producción individual en el caso de muchos rodeos lecheros o para salvar los baches forrajeros estacionales y evitar la muerte de los animales en las explotaciones familiares que realizaban pastoreo extensivo de campos naturales. Para ello, se empleó una gran variedad de materiales que van desde el grano de maíz y el heno de alfalfa, pasando por los rastrojos de maíz, poroto, ají e incluso la utilización de orujo de uva. Los cuatro establecimientos de cría en VT no lo utilizan, simplemente porque escapaba a sus posibilidades.

En cuanto a la obtención de los reproductores machos, en promedio el 53,13% de los machos reproductores se obtuvieron de forma externa, pero esto varió según las capacidades económicas de los propietarios. Por ejemplo, en los rodeos de cría de la región del CS, el 100% de los machos reproductores fueron propios, mediante la selección de los mejores animales dentro del hato. Mientras que en VT y QA el 50% y 65% de incorporación de machos externos, no solo respondió a la compra de animales sino a prácticas como el préstamo, alquiler e intercambio entre vecinos.

El método de cría tradicional, donde los cabritos permanecen en el corral de encierre mientras las hembras pastorean, y maman leche por la tarde-noche, fue el más utilizado (78,13%). La guachera colectiva fue implementada por los 6 hatos lecheros más tecnificados y la utilización de sustituto lácteo fue exclusiva de 3 establecimientos de QA (2 eran tambos comerciales y una explotación familiar capitalizada). Sólo dos tambos comerciales no realizaban el encierre nocturno, cuyas características edilicias les permitían prescindir de la práctica.

Solo un promedio del 37,50% de los hatos realizaban algún tipo de vacunación (Anexo I [Tabla 3](#)), siendo la más frecuente la triple clostridial completando el esquema de vacunación con vacunas frente a la Pasteurelosis y el Ectima Contagioso. En el CS no fue una práctica asequible y su uso estuvo restringido a los 12 establecimientos que, o bien contaban con las capacidades económicas para su uso, o les eran proporcionadas por organismos oficiales, como la Secretaría de Agricultura Familiar. Por el contrario, las desparasitaciones fueron prácticas muy utilizadas, con promedio del 84,38% de los hatos. Hubo una gran variabilidad de prácticas, desde una única dosis anual, desparasitaciones estratégicas en los momentos de mayor carga, desparasitaciones solo en las categorías menores, o la aplicación de drogas según cultivo coproparasitológico e incluso hubo explotaciones lecheras más tecnificadas o instruidas, que utilizaban rotación de la droga antiparasitaria, desparasitación puntual por índice FAMACHA (Van Wyk and Bath 2002). Aunque los hatos del CS y uno solo de QA no realizaban ninguna desparasitación, la mayoría de los rebaños realizó al menos una, generalmente con benzimidazoles. Las zonas afectadas con *Fasciola hepática* utilizaban closantel.

El encierre nocturno fue practicado por 28 de los 32 establecimientos referenciados en esta tesis. Dicha práctica consistió en encerrar a los animales en un corral pequeño -corral de encierre-, por lo general en una zona de fácil control, en las inmediaciones de las casas, puestos, etc. La misma pretende evitar el extravío de animales en los campos sin delimitación territorial; proteger al hato de los predadores como el puma, los perros y los zorros; evitar el robo de los animales, entre los más frecuentes. Cabe destacar que la toma de esta medida suele colocar a todas las categorías animales (cabritos, chivos, cabras y cabrillonas) en un mismo y pequeño lugar, con las posibles consecuencias epidemiológicas en la transmisión de enfermedades infecciosas que deben ser tenidas en cuenta.

Además de la descripción coloquial de los sistemas productivos, también se obtuvieron variables cuantitativas que posibilitan un análisis estadístico de las diferentes ecorregiones. Dichas variables se muestran en la siguiente Tabla 13 y en Anexo I [Tabla 4](#).

**Tabla 13:** Estadísticos descriptivos de las variables cuantitativas utilizadas en el análisis exploratorio.

Estadísticos descriptivos de las variables cuantitativas							
Variable <sup>1</sup>		N	Media	DE	CV	Mínimo	Máximo
Total	Seroprevalencia	32	8,26	10,40	125,97	0,00	55,56
	Litros de leche	28	0,46	0,41	89,55	0,12	2,12
	Animales totales	32	237,75	696,2	292,83	13	4000
CS	Seroprevalencia	4	9,17	3,19	34,78	6,67	13,33
	Animales totales	4	45,25	36,51	80,68	26,00	100,00
	Litros de leche	4	0,31	0,01	4,56	0,30	0,33
QA	Seroprevalencia	20	6,84	6,47	94,68	0,00	21,43
	Animales totales	20	340,55	870,4	255,60	13,00	4000,00
	Litros de leche	18	0,51	0,46	91,56	0,12	2,12
VT	Seroprevalencia	8	11,35	18,54	163,38	0,00	55,56
	Animales totales	8	77,00	92,44	120,05	16,00	300,00
	Litros de leche	6	0,43	0,41	94,84	0,13	1,23

N=Número de hatos  
variación

Media=Media aritmética  
Mínimo= Valor mínimo

DE. = Desvío estándar  
CV= Coeficiente de  
Máximo= Valor máximo

En cuanto a los estadísticos descriptivos sitios en la tabla 13, se puede observar que la ecorregión de QA si bien es la que posee mayor número de animales y la mayor producción media de leche por animal, es la que menor seroprevalencia media presenta en contraste a VT que se destaca por ser la de mayor seroprevalencia y a CS la cual posee las menores

**Seroprevalencia:** Porcentaje de seroprevalencia individual de cada hato.

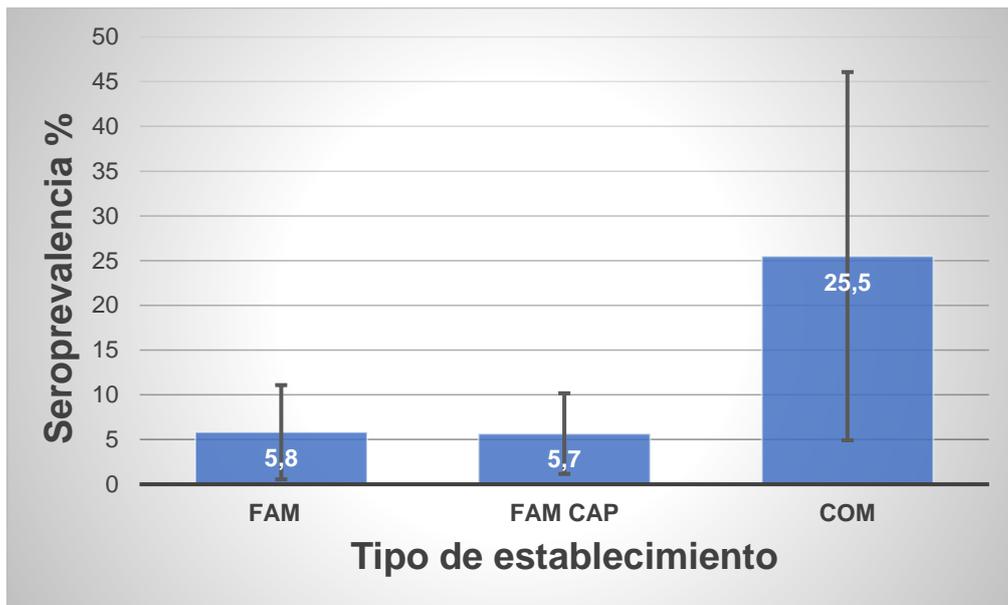
**Litros de leche:** Cantidad de litros de leche producida en promedio por una cabra de ese hato al día.

**Animales totales:** Número total de animales en el hato.

productividades en litros de leche medios y el menor número de animales por rebaño, pero no la menor seroprevalencia.

#### 5.7.4 Representaciones gráficas de variables cuantitativas

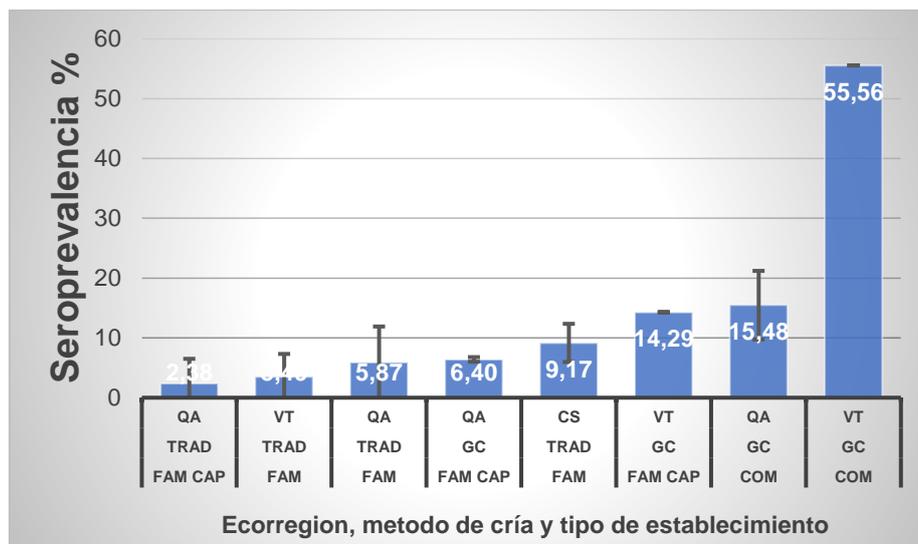
Las variables cuantitativas pueden representarse de diferentes maneras y agrupaciones que permiten apreciar mejor la distribución de los datos y las posibles asociaciones presentes que nos permitan un mejor planteo de las medidas y metodologías a utilizar. A continuación, se presentan algunas de las gráficas obtenidas, Figuras 42 a 44.



**Figura 42:** Seroprevalencia según tipo de establecimiento.

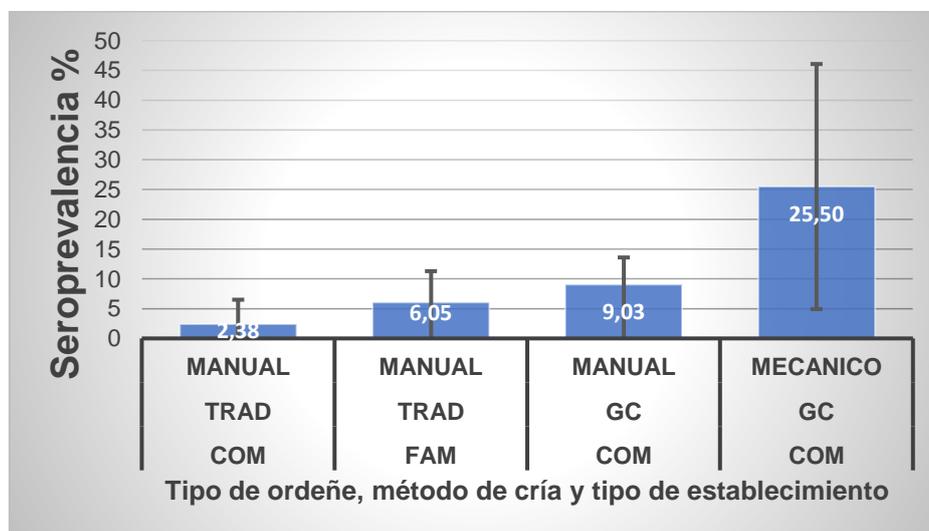
Se muestra la media y la desviación estándar de rebaños positivos a ELISA. El tipo de establecimiento está representado como: FAM: Familiar; FAM CAP= Familiar Capitalizada; COM= Tambo comercial.

En la Figura 42 puede verse que los valores más altos de seroprevalencia están presentes en los establecimientos Familiares capitalizados y Tambos comerciales. La curva no varía de forma si se incorporan el biotipo animal (dato no mostrado) y variables de manejo tales como método de cría y tipo de ordeño.



**Figura 43:** Seroprevalencia según ecorregión, método de cría y tipo de establecimiento. El método de cría se encuentra bajo las siglas GC=Guachera colectiva; TRAD=Tradicional. El tipo de establecimiento como: FAM: Familiar; FAM C= Familiar Capitalizada; COM= Tambo comercial y las ecorregiones están representadas como: CS= Chaco Salteño; VT= Valles Templados; QA= Valles y Quebradas Áridas.

Los valores más altos de prevalencia estuvieron presentes en las ecorregiones de VT y QA, en establecimientos familiares capitalizados o tambos comerciales. Variables de manejo tales como método de cría en guachera colectiva o el ordeño mecánico parecen asociarse con una mayor seroprevalencia (Figura 43).



**Figura 44:** Seroprevalencia según tipo de ordeño, método de cría y tipo de establecimiento en rangos. El tipo de ordeño MANUAL o MECÁNICO; el método de cría se encuentra bajo las siglas GC=Guachera colectiva; TRAD=Tradicional y el tipo de establecimiento R como: FAM: Familiar; COM= Tambo comercial + Familiar capitalizado.

En este caso queda bien resaltado que los hatos que tuvieron ordeño mecánico tienen en promedio un valor de seroprevalencia visualmente superior (Figura 44). Los establecimientos con ordeño manual y método de cría tradicional no presentan una diferencia numérica tan

impactante, pero estas apreciaciones visuales si bien están evidenciado algún tipo de asociaciones, deben ser valoradas estadísticamente para poder aportar datos fidedignos.

### **5.7.5 Análisis de asociación de factores de riesgo**

A partir de las representaciones gráficas de las seroprevalencias (como las Figuras 42 a 44) se pudieron realizar apreciaciones que fueron orientativas para la elección de los métodos y pasos a seguir en la búsqueda de la determinación de los factores de riesgo que pueden estar influenciando la presencia de la infección lentiviral.

Se realizó el análisis exploratorio de las variables relacionadas con la presencia de SRLV (estatus, seroprevalencia, seroprevalencia en rangos) y las variables descriptivas utilizadas<sup>2</sup>.

#### **5.7.5.1. Chi<sup>2</sup> de Pearson, Odds Ratios y Regresión Logística**

Se realizó el análisis exploratorio con el test Chi<sup>2</sup> con el programa InfoStat para probar la asociación entre estatus, seroprevalencia, seroprevalencia en rangos con el resto de las variables explicativas definidas.

Los resultados que cumplieron la premisa de obtener valores inferiores p valor ≤ 0,15, se resumen en las tablas 16 y 17. El análisis del cribado con Chi<sup>2</sup> muestra una asociación entre la variable estatus y método de cría (p=0,0436) y desparasita (p=0,1008). Para seroprevalencia lo fueron tipo de establecimiento (p=0,0843), tipo de pastoreo (p=0,1142), método de cría (p=0,0378), y tipo de ordeño (p=0,0319). Los resultados de asociación para seroprevalencia en rangos fueron macho (p=0,1159), tipo de pastoreo (p=0,1379), delimitación (p=0,0883), método de cría (p=0,0387) y tipo de ordeño (p=0,0395).

**Tabla 16:** Clasificación según RL y OR para las tablas de contingencia de Chi<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup>**Estatus:** Estado sanitario serológico (Libre/infectado).

**Seroprevalencia en rangos:** Seroprevalencia en 3 grupos (seroprevalencia=0, seroprevalencia ≤ 10%, seroprevalencia > 10%).

**Tipo de establecimiento:** Según la propiedad, tamaño y nivel tecnológico se distribuyen en Familiar, Familiar Capitalizado y Comercial.

**Tipo establecimiento en rangos:** Es la característica anterior que se agrupa Familiar y Comercial (Familiar; capitalizado + Comercial),

**Objetivo de producción:** Leche/Cría.

**Biotipo:** Tipo de animal que posee el hato. Carnicero (Criollo, Anglo Nubian, Togenbur, Boher y sus cruzas) Lechero (Saanen, Alpino y sus cruzas).

**Animales totales en rangos=** Es la característica anterior donde agrupa a hatos con menos y más de 100 animales.

**Ecorregión:** Las ya mencionadas CS, QA y VT.

**Tipo de ordeño:** Forma de obtención de la leche (Manual/Mecánico).

**Macho:** Forma de obtención de los reproductores machos (Selección de cabritos dentro del hato/producto de la compra, alquiler, rotación, préstamo u otro que implique incorporación de machos foráneos).

**Tipo de pastoreo:** Es la forma en que el animal accede al forraje (Extensivo/Racional por franjas).

**Delimitación:** Calificación de la propiedad según la presencia o ausencia de límites territoriales.

**Método de cría:** La forma en que se cría a los cabritos (Tradicional/Guachera colectiva).

**Desparasita:** Control de endo y ecto parásitos (Si/No).

**Vacuna:** Prevención de enfermedades mediante la aplicación de vacunaciones parenterales (Si/No).

		N+	Prev. promedio	Chi <sup>2</sup>	RL	OR	LI	LS
Estatus	Método de cría Tradicional	15/25 (60%)	5,41	p=0,0436	p=0,0061	0,2143	0,0227	2,0187
	Guachera Colectiva	7/7 (100%)	18,44					
	Desparasita Si	17/27 (63%)	7,81	p=0,1008	p=0,0161	2,9412	0,2994	28,8917
	No	5/5 (100%)	10,67					

N+: Numero de hatos positivos/totales y porcentaje de positividad para cada categoría. Prev. promedio: Porcentaje de seroprevalencia promedio para cada categoría o subgrupo. Chi<sup>2</sup>: p valor de Chi<sup>2</sup> obtenido para el cruce de las dos variables. RL: p valor de regresión logística obtenido para el cruce de las dos variables. OR: valor de OR obtenido para el cruce de las dos variables LI-LS: Límite inferior-superior del intervalo de confianza 95% para OR.

Como puede verse (Tabla 16) la variable Estatus tuvo una asociación significativa con el método de cría, según Chi<sup>2</sup> (0,0436) y RL (0,0061), pero el grado de asociación determinado por OR -si bien considera protector al sistema de cría tradicional y se podría expresar como 4,76 veces menos riesgoso- lo considera no significativo por incluir al 1 dentro de su IC. Por otro lado, las desparasitaciones también presentaron una asociación significativa según Chi<sup>2</sup> (0,1008) y RL (0,0161), presentado un riesgo de 2,994 veces superior para los hatos que no realizaban la práctica sobre los que sí lo hacían, pero de igual manera que el anterior, la asociación es no significativa para OR.

El análisis de RL para seroprevalencia y seroprevalencia en rangos proporcionó los resultados que se resumen en la Tabla 17 junto a su comparación con los obtenidos con la prueba de Chi<sup>2</sup>.

**Tabla 17:** Clasificación según RL de los datos obtenidos con Chi<sup>2</sup>.

		N+	Prev. promedio	Chi <sup>2</sup>	RL
Seroprevalencia	Tipo de establecimiento Familiar	14/22 (63%)	5,82	p=0,0843	NS
	Familiar Capitalizado	4/6 (67%)	5,70		
	Comercial	4/4 (100%)	18,92		
	Tipo de pastoreo Extensivo	15/24(63%)	5,63	p=0,1142	NS
	Racional	7/8 (88%)	16,13		
	Método de cría Tradicional	15/25 (60%)	5,41	p=0,0378	p=0,0496
	Guachera Colectiva	7/7 (100%)	18,44		
	Tipo de ordeño Manual	16/24 (67%)	5,96	p=0,0319	p=0,0001
	Mecánico	4/4 (100%)	25,50		
	Macho Propio	11/18 (61%)	6,20	NS	NS
	Externo	11/14 (79%)	11,86		
Seroprevalencia en rangos	Macho Propio	11/18 (61%)	6,20	p=0,1159	NS
	Externo	11/14 (79%)	11,86		
	Tipo de pastoreo Extensivo	15/24 (63%)	5,63	p=0,1379	NS
	Racional	7/8(88%)	16,13		
	Delimitación Sin	14/22 (63%)	5,54	p=0,0883	NS
	Con	8/10 (80%)	13,45		
	Método de cría Tradicional	15/25 (60%)	5,41	p=0,0387	NS
	Guachera Colectiva	7/7 (100%)	18,44		
	Tipo de ordeño Manual	16/24 (67%)	5,96	p=0,0395	NS
	Mecánico	4/4 (100%)	25,50		

N+: Numero de hatos positivos/totales y porcentaje de positividad para cada categoría. Prev promedio: Porcentaje de seroprevalencia promedio para la categoría. Chi<sup>2</sup>: p valor de Chi<sup>2</sup> obtenido para el cruce de las dos variables. RL: p valor de RL obtenido para el cruce de las dos variables. NS= Estadísticamente no significativo.

Para seroprevalencia, las variables descriptivas cribadas bajo Chi<sup>2</sup> fueron tipo de establecimiento (p=0,0843), tipo de pastoreo (p=0,1142), método de cría (p=0,0378) y tipo de ordeño (p=0,0319). El modelo de RL solo dio como significativas a método de cría (p=0,0496), y tipo de ordeño (p=0,0001).

Las variables descriptoras significativas en cribado exploratorio con Chi<sup>2</sup> para la Seroprevalencia en rangos fueron macho (p=0,1159), tipo de pastoreo (p=0,1379),

delimitación ( $p=0,0883$ ), método de cría ( $p=0,0387$ ) y tipo de ordeño ( $p=0,0395$ ). Los valores de RL para seroprevalencia en rangos y sus descriptoras, no fueron significativos en ninguno de los casos.

## 6. DISCUSIÓN

La infección por SRLV está distribuida por todo el mundo con valores preocupantes y crecientes en cuanto a su prevalencia (de Miguel et al. 2021). Una de las razones de este crecimiento es sin duda la ausencia de tratamientos o estrategias de inmunización eficaces, junto al aumento en el intercambio de animales a nivel mundial. Se estima que los valores de seroprevalencia dependen del número de estudios que se realizan en una determinada área. Así Europa es la zona que presenta mayor número de estudios y una seroprevalencia más elevada. Recientemente, estos estudios se han extendido a diferentes países de América del sur, siendo Argentina uno de ellos. A pesar de que se ha aislado y descrito la secuencia de una cepa de SRLV en la provincia de Buenos Aires, actualmente no conocemos la situación epidemiológica nacional que nos permita evaluar la importancia de la infección y desarrollar herramientas que nos den acceso a establecer planes de control a nivel nacional.

La importancia de la infección por SRLV y la necesidad de su control no solo radica en el cumplimiento de la legislación de algunos países para la importación de animales vivos, sino que modula el sistema inmunitario, incrementa la susceptibilidad a infecciones secundarias y afecta diferentes parámetros de la producción animal.

El planteo de esta tesis tuvo como puntapié inicial la presencia de signos clínicos compatibles con lentivirus y la confirmación serológica de la presencia del virus en la provincia de Salta. A pesar de que la presente tesis fue realizada sin ninguna financiación específica o propia en lo que respecta a insumos materiales, se lograron obtener resultados que confirmaron la hipótesis de trabajo y además han aportado información relevante sobre la situación de esta virosis en el país.

Antes del año 2017, la información sobre SRLVs en Argentina era escasa y no había un abierto reconocimiento de la circulación viral. Se contaba con las referencias de los trabajos serológicos de Trezeguet (Trezeguet et al. 2013; Trezeguet et al. 2010; Trezeguet et al. 2008) y los reportes de Robles (Robles et al. 2003), Marín (Marín et al. 2012) y Bedotti (Bedotti et al. 2007). Posteriormente, se publicó el primer aislamiento y caracterización genética de una estirpe de origen argentino en la provincia de Buenos Aires (Pani et al. 2017). Por tanto, la generación de información serológica de una muestra representativa de las existencias provinciales, fue el primer paso a tomar.

El stock caprino de la provincia de Salta ronda los 300000 animales y presenta fluctuaciones interanuales, como todas las provincias. El mismo, en 2017, constaba de 334427 cabezas incluyendo todas las categorías (SENASA 2023). A partir del cribado serológico de un grupo de 787 animales salteños, se alcanza una representatividad estadística de las existencias caprinas provinciales con un  $\alpha$  de 5% (QuestionPro.com 2021) que, según los cálculos del *software*, debían ser de un mínimo de 385 animales. Se incorporó un hato de la provincia de

Jujuy (88 animales) y otro de la provincia de Catamarca (53 animales) que proporcionaron resultados enriquecedores a nivel serológico y también para la evaluación socioeconómico productiva.

Las prevalencias para la provincia de Salta obtenidas del cribado serológico con tres kits comerciales *Pourquier*, *Elitest* y *Erradikit* muestran que existe circulación viral en la provincia con una prevalencia baja que ronda el 8%. Esta seroprevalencia es mayor que la reportada por Trezeguet en 2010 (Trezeguet et al. 2013) quienes presentaron a la zona como “NOA norte” (Salta-Jujuy) y las prevalencias halladas en 2010 fueron de 1,43% en caprinos (6 establecimientos con un total de 70 caprinos), mientras que para ovinos fue del 0% (con 4 establecimientos y 39 animales). En 2011 la prevalencia en caprinos fue de 3,70% (para 6 establecimientos con un total de 54 individuos) y 3,57% en ovinos, (para 2 establecimientos con 27 animales). La publicación del grupo de SENASA en 2010, donde evaluaron sueros recolectados en 2008, indicaba una prevalencia de 7,33% para caprinos salteños (con un total de 50 animales de 30 establecimientos) (Trezeguet et al. 2010). Es importante destacar que, en una publicación previa (Trezeguet et al. 2008), la infección no era detectada en Salta (105 animales de 7 predios) posiblemente porque la técnica utilizada en 2004 fue IDGA y no ELISA. Las diferencias con los estudios previos pueden explicarse por la ausencia de medidas de control en este período de 7-8 años, el tipo de muestreo, que, en el caso de los trabajos del SENASA presentados por Trezeguet, se utilizaron sueros obtenidos por el plan nacional de brucelosis caprina y no un muestreo aleatorio en busca de representatividad de cada zona establecida.

Hasta el momento, se ha demostrado que los test de ELISA tienen una mayor sensibilidad que otras metodologías de detección sérica como el IDGA, aplicables a cribados serológicos con una relación calidad: precio: facilidad y rapidez de resultados que los haría comparables (de Andrés et al. 2005). Si bien en Argentina solo se encontraban disponibles los kits comerciales de *Maedi/CAEV Total Ab (Chekit)* y *MVV/CAEV p25 Ab Verification* de Idexx -que actualmente se han discontinuado su venta y están fuera del mercado-, buscando un mayor respaldo en los resultados y debido a la posibilidad de realizar parte de esta tesis en el IdAB (España), se recurrieron a 4 test serológicos. Con dos de ellos se realizó un cribado total de los hatos (*Pourquier* y *Elitest*); mientras que el kit *Maedi/CAEV Total Ab* (Idexx) se aplicó sobre las muestras que permanecieron únicamente en Argentina, y *Erradikit* se empleó en el IdAB como test con antígenos multigenotipo con fines comparativos.

La baja seroprevalencia detectada tanto en el presente estudio como en los previos realizados en la República Argentina podrían indicar que el mantenimiento de razas locales y la baja

cuantía de las importaciones de animales estarían favoreciendo su baja distribución en la provincia de Salta.

Con respecto a la reactividad ([Tabla 8](#)), solamente 10 de los 32 hatos no presentaron animales reactivos a ELISAs comerciales (incluyendo los cuatro kits utilizados). Hubo discrepancia entre los resultados de los diferentes test, siendo *Erradikit* el test que detectó mayor número de positivos que no se visualizaron en los otros ensayos, además, debido a sus altos costos, se utilizaron muestras parciales de cada hato. Aun así, detectó positivos en los hatos 15207, 16180-81, 16317, 16282 y 16418 que no fueran detectados por otros test. También detectó nuevos positivos en los hatos 17091 y 17092. Este tipo de discrepancia es habitual y se asemeja a trabajos como el de Schaer (Schaer et al. 2022), donde la capacidad de detección varía con la utilización de diferentes test y esto depende tanto de los antígenos utilizados en cada ensayo enzimático como del tipo de cepas circulantes. Por ejemplo, *MVV/CAEVp25Ab Verification de Idexx* al poseer la proteína recombinante p25 de una cepa B1 tiene mayor sensibilidad para con el genotipo B y *Erradikit* detecta con mayor precisión los genotipos A y E. Sin embargo, no pudimos corroborar su circulación en el análisis molecular.

Los resultados del análisis estadístico que ofrece la prueba de concordancia de Kappa (Cohen 1968; Cohen 1960) representan una escala subjetiva de interpretación, pero basándose en los trabajos de Landis y Koch (Landis and Koch 1977) los coeficientes de Kappa obtenidos pueden agrupar las concordancias en: muy buenas (1-0,8), buenas (0,8-0,6), moderadas (0,6-0,4), bajas (0,4-0,2) e insignificantes (0,2-0). Por consiguiente, los resultados obtenidos entre los test *Pourquier* y *Elitest* fueron clasificados como de concordancia buena, con un  $K = 0,746$ . Destacando que hubo una discrepancia en 10 animales en los que *Elitest* el que detectó 6 animales positivos más que para *Pourquier* fueran negativos. De la misma manera, *Pourquier* detectó animales positivos que no detectó el otro, como es el caso de 3 animales del hato 17138 y uno del 17092.

Para los test de *Pourquier* y *Erradikit*, la concordancia fue también buena,  $K = 0,694$ , siendo *Erradikit* el que reveló más positivos no detectados por *Pourquier* que de la forma inversa. Mientras que las comparaciones entre *Elitest* y *Erradikit* se definieron como moderadas  $K = 0,575$ , es decir, *Erradikit* detectaba notoriamente más positivos sobre las mismas muestras. En lo que respecta a la composición antigénica de estos ELISAs comerciales, vale destacar, que los test de *Pourquier* y *Elitest* están desarrollados en base a antígenos proteicos de SRLV del genotipo A (TM y p25), mientras que *Erradikit* utiliza como antígeno una mezcla de proteínas recombinantes de las mismas regiones GAG y ENV de los genotipos A, E y B1, mientras que *MVV/CAEVp25Ab Verification de Idexx* está hecho en base a la proteína de la proteína recombinante p25 del mismo subtipo; de ahí es esperable que detecte con mayor eficacia las cepas argentinas, ya que las evidencias hasta este momento las incluyen dentro

de este subtipo (Panei et al. 2017). El número de positivos extra, detectados por *Erradikit*, podría estar justificado por sus antígenos del genotipo A y E, cepas que no han sido detectadas como circulantes en Argentina, pero no por ello debe ser negada su posible existencia.

Con respecto las comparaciones con *MVV/CAEVp25Ab Verification* (Idexx), no fue posible realizar comparaciones con un número de muestras que les otorgue una entidad propia para realizar generalizaciones. Se utilizó porque -como ya fuera explicado- este era el único kit disponible en Argentina y al no ser posible la realización de nuevos envíos intercontinentales de muestras al IdAB (que además de onerosos no cumplieron con las condiciones pautadas para una correcta conservación del valiosísimo material biológico enviado); la comparación con los otros test comerciales fue imposible. A pesar de ello, Idexx permitió detectar animales positivos dentro de establecimientos que de otra forma no hubieran podido ser cribados serológicamente. Por tanto, las pruebas de concordancia solamente fueron posibles de realizar para un grupo de 33 animales del núcleo experimental (17138) que habían sido chequeados al inicio del estudio y fueron enviados al IdAB en 2017. Hecha esta aclaración, la concordancia entre Idexx/*Pourquier* fue moderada, con  $K=0,507$ , siendo la discrepancia entre estos dos debida a 6 animales, en los que Idexx detecta 4 positivos más y *Pourquier* detecta 2 animales no reactivos con el primero. Para Idexx y *Elitest* el coeficiente obtenido fue  $K=0,400$ , en este caso discrepan en 8 animales, 6 positivos adicionales para Idexx y dos para *Elitest*. En este caso especial en que se han obtenido secuencias del hato, podemos suponer con más evidencias, que al poseer Idexx antígenos del mismo subtipo génico que el presente en el hato, el mayor de número de positivos encontrado queda justificada por sí misma, ya que los otros test utilizan antígenos del genotipo A.

Con todas estas explicaciones, se quiere recalcar que no solo es importante el número de animales detectados en cada rodeo por un test, sino que, al emplear diferentes test, los animales detectados como positivos no serán exactamente los mismos, por lo tanto, el número real de animales reactivos es subestimado con un solo test, permaneciendo animales positivos en el rodeo que impiden la erradicación de la enfermedad. Se destaca de esta forma, la importancia de no utilizar un solo kit en el diagnóstico nacional y mucho menos en la implementación de un plan de erradicación, sobre todo si no se cuenta con información sobre los genotipos circulantes. Lo ideal sería utilizar para el cribado nacional un test que utilice varios genotipos. Otras alternativas serían la rotación periódica del test de cribado -como propone De Andrés (de Andrés et al. 2013)- sobre todo en rebaños con seroprevalencias bajas o mejor aún, la utilización de un test desarrollado en base a las cepas circulantes como propone Grego (Grego et al. 2005).

Para poder aislar a un virus, es necesario contar con un cultivo celular que sea permisivo a la infección vírica. Ante la incapacidad inicial de contar con líneas celulares adecuadas (como las que luego sí pudieron ser utilizadas en el IdAB) se emplearon células del hospedador animal específico.

En SRLVs los estudios previos de Narayan et al y Rolland (Narayan et al. 1980; Narayan et al. 1977; Rolland et al. 2004), utilizaron fibroblastos y células articulares caprinas, que a nuestro criterio serían las más fáciles de obtener. Así fue, que durante el desarrollo del plan de tesis se trabajó con tejidos de origen ovino y caprino de animales jóvenes y adultos, provenientes del hato presente en la EEA Salta. Todas las prácticas y experiencias de viabilidad, transporte, tamaño de muestra y la caracterización de los cultivos, se realizó con este tipo de animales. Una vez que se obtuvieron resultados aceptables y repetibles, fue que tuvimos acceso a muestras de un neonato caprino.

Los cultivos primarios obtenidos, de origen ovino, fueron del tipo epiteliode y se llamaron Eov, provenientes de corderos de 6 meses de edad, pero al repetir el procedimiento con ovinos mayores a un año, los resultados no fueron iguales, las células tardaron mucho más en llegar a cubrir el pocillo y el número de pasajes que permitieron fue menor. Por tanto, es más eficiente la utilización de animales lo más jóvenes posibles ya que maximiza la relación esfuerzo de obtención versus durabilidad del cultivo.

Algo parecido sucedió con las células epiteliales caprinas (Eca), el tiempo transcurrido para completar la monocapa fue menor si procedían de animales más jóvenes. El número de pasajes permitido para este cultivo proveniente de animales adultos fue de 6.

Cabe destacar, que el tipo celular obtenido no fue el de fibroblastos, que son células claramente fusiformes, que a medida que crecen y coalescen se tornan más alargadas aún. Estas células, no en vano se denominaron epitelioides, dado a que son más pequeñas, cortas y poliédricas, como puede apreciarse en las fotografías de las figuras 39 A y B. Las células se asemejan más a las células queratínicas reportadas por Liu (Liu and Karasek 1978), que a las OSF (verdaderos fibroblastos ovinos), utilizadas en el IdAB. Probablemente la diferencia radique en que la tripsinización, que se repitió hasta la degradación total del tejido, en pos de obtener mayores rendimientos de cada biopsia. Otros protocolos utilizan tripsinizaciones sin hacer referencia a repeticiones de las mismas, posiblemente esta diferencia logre que en un caso preponderen las células fibroblásticas, que se encuentran unidas principalmente por el colágeno, proteína sobre la que actúa principalmente la tripsina, mientras que, al utilizar tiempos mayores, es posible degradar aún más la matriz intercelular, liberando los tipos celulares que ocupan estratos inferiores en la dermis.

La recuperación de las células Eov y Eca luego de ser congeladas en Nitrógeno líquido fue del 90% lo cual indica que son aptas para realizar una producción en cantidades adecuadas para fraccionarse y conservarse en ultracongelación.

Las células articulares caprinas (Aca) y las Eca que se obtuvieron a partir de un neonato, desarrollaron rápidamente y cubrieron el pocillo, recuperándose con facilidad luego del congelamiento en proporciones similares a Eov y Eca. Se decidió criopreservarlas para un próximo desafío cuando se tuvieran muestras frescas de líquido articular (LA) de un animal bajo sospecha de infección.

La totalidad de los crioviales, de todos los cultivos primarios obtenidos, incluyendo las del neonato, se perdieron en los dos sucesivos accidentes que hubo en el área de cultivos celulares del Instituto de Virología (IV, INTA-Castelar). La explosión de un digestor que ocasionó pérdidas humanas y lesiones gravísimas en el jefe de unidad que llevó a un inicio casi desde cero del área, sumado a un corte de luz que conllevó a la pérdida total de los cultivos celulares que habían sido desarrollados en esta tesis, dado que no había capacidad humana para intentar recuperar todas las líneas celulares del banco. Esto hizo imposible seguir trabajando y desarrollando cultivos primarios.

El resto de las células que denominamos Aca se produjeron a partir del cultivo directo de líquido articular de animales del hato 17138. Solo se nos permitió realizar punciones articulares de animales con patología clínica, que inicialmente se utilizaron como inóculo viral en cultivos celulares y posteriormente se cultivaron de forma directa en placas. Como nos fuera imposible económicamente realizar un cribado serológico para micoplasmosis, se realizaron determinaciones por PCR del sobrenadante de todos los cultivos celulares de células Aca o en los que se desafiaban con líquido articular, en el servicio del Laboratorio de determinación microorganismos adventicios del IV.

Las células Aca crecieron mejor con el agregado de suero autólogo, que al utilizar suero fetal bovino. Su desarrollo fue más rápido que el de las células Eov y Eca, pero más lento si se las compara con las células Aca obtenidas del neonato que pudieran haber ofrecido una conservación de sus características y capacidad de duplicación durante más pasajes, obteniéndose cifras más cercanas a los 7 a 10 pasajes mencionados por Mselli-Lakhal (Mselli-Lakhal et al. 1999) para las células de este tipo.

Las muestras que fueron positivas a *Micoplasmas* crecieron con mayor lentitud, muchas no llegaron a completar la monocapa como fuera referenciado por autores como Drexler o Armstrong (Armstrong et al. 2010; Drexler and Uphoff 2002), quienes indican que la presencia de este contaminante relentiza los crecimientos por competir con los sustratos nutritivos, impidiendo un normal desarrollo, afectando la morfología y la expresión de efectos citopáticos. La situación ideal hubiera sido poder chequear previamente a los animales a muestrear y poder realizar la toma de muestras en animales jóvenes negativos a SRLVs y a *Micoplasmas* o de neonatos, para luego desafiarlas con inóculos virales. Pero las limitaciones económicas,

de distancia entre los laboratorios de trabajo y de libre acceso a ese tipo de animales no lo hizo posible.

El cultivo directo y diferenciación de monocitos sanguíneos caprinos a macrófagos fue practicado según el protocolo diseñado en el IdAB para ovinos y caprinos (Crespo et al. 2013) sin resultados exitosos. Posiblemente la larga criopreservación de las muestras y los inconvenientes sufridos en el transporte internacional, que dejaron serias dudas sobre el mantenimiento de la cadena de frío de todo el material transportado, hayan tenido mucho que ver en ello.

Tomando como premisa lo antes mencionado, en el IABIMO se trabajó con muestras frescas de sangre entera de animales de diferentes edades, intentando varias formas de envío y refrigeración desde Salta. Se utilizó el protocolo exacto y luego se intentaron variaciones, cambiando el anticoagulante utilizado en la extracción de sangre, haciendo variaciones en los tiempos de lavado, la utilización de suero autólogo y concentraciones de suero fetal bovino. Ninguna de todas las pruebas logró cambios en la morfología celular que indicasen la diferenciación de monocitos a macrófagos.

Es posible que las diferencias entre los insumos utilizados tengan que ver en las fallas del protocolo o la carencia de algunos de los aditivos (no imprescindibles para la metodología como vitaminas) que se utilizaban en el IdAB y que en Argentina no fue posible conseguir. Cabe destacar nuevamente, que el material biológico utilizado tuvo una demora de al menos 24 h en ser procesado. Todos estos factores unidos a las diferencias en las marcas y calidades de los materiales de soporte utilizados, posiblemente hayan influido negativamente en los resultados obtenidos que fueron muy diferentes a los esperados.

Como ya fuera explicado, la realización de los cultivos primarios estuvo orientada a obtener un material permisivo para poder denotar la presencia de SRLV. Estos cultivos realizados en el IABIMO, junto a las líneas celulares disponibles en el IdAB, fueron desafiados con inóculos provenientes de muestras del hato experimental 17138 en busca del clásico aislamiento viral. En el IABIMO, se desafiaron cultivos primarios (Eca y Eov) con líquido articular (LA), sobrenadante del cultivo directo de células Aca y sobrenadante de cultivo de monocitos sanguíneos. En dos casos sucedió la visualización de efectos citopáticos 24 h tras la inoculación. El más claro fue en el desafío de células Eca y Eov con LA de animales seropositivos y con artritis clínica (Figura 39 B y C). Esta aparición es causada por la fusión de membranas de las células en cultivo debido a un efecto directo de proteínas de fusión como la gp135 presente en condiciones de alta carga viral (Lyll et al. 2000; Reyburn et al. 1992), pero no indicativa de la presencia de partículas virales vivas/viables. Los efectos citopáticos de la replicación viral acontecen a partir del día 5 a 7 post desafío (Chebloune et

al. 1996; Clements et al. 1980; Narayan et al. 1980; Sigurdsson et al. 1960; Thormar 1961b), debido a que es necesario ese tiempo para la integración del provirus, la producción de partículas virales y su posterior gemación y adhesión a otras células susceptibles. Esto no ocurrió en los cultivos de células epitelioideas caprinas y ovinas. El virus utilizado en estos desafíos había sido congelado en N<sub>2</sub> líquido directo en crioviales sin el agregado de criopreservantes, trasladado vía terrestre al IABIMO, y así almacenado hasta el momento de su utilización, más de 6 meses después. Es posible que la criopreservación de muestras virales en N<sub>2</sub> líquido, sin la utilización de agentes criopreservadores, haya dañado de forma importante la membrana lipídica (Hansen et al. 2015; Hubálek 2003; Wallis and Melnick 1968) del CAEV, -membrana de cuya integridad depende en gran medida el poder infectante del virus- haciendo inviable a las partículas virales, pero propiciando la aparición de células gigantes en cultivos Evo y Eca sin su posterior replicación viral.

Algo similar ocurrió con la línea celular *TIGEF* en el IdAB, en las que se pudieron observar muy pocos sincitios el día 7 post desafío, con un resultado de *SG PERT* para dicha muestra dudoso. En este caso, se pudieron ver pocos sincitios, por lo que se presta a relacionar con las dificultades que poseen algunas cepas virales, sobre todo las llamadas de “baja patogenicidad” (Ramírez et al. 2012), para su adaptación al crecimiento *in vitro* que ya fuera documentado por diferentes autores (Colitti et al. 2019; Thormar 2005).

Un caso diferente obtenido en el IABIMO, fue el resultado del cultivo directo de células del líquido articular (Aca), éstas formaron aglomeraciones sincitiales solo en aquellos cultivos que fueron negativos a *Micoplasmas* como puede verse en las fotografías de la Figura 39 A y en el gel de agarosa de la Figura 40, en los tiempos esperados (Chebloune et al. 1996; Clements et al. 1980; Narayan et al. 1980; Sigurdsson et al. 1960; Thormar 1961b). Los que fueron positivos a la bacteria crecieron con mayor lentitud, muchos no llegaron a completar la monocapa y ninguno desarrollo efectos citopático visibles que permitiesen sospechar de la presencia del virus tal como ha sido referenciado por autores como Drexler o Armstrong (Armstrong et al. 2010; Drexler and Uphoff 2002).

El cultivo directo de células Aca ha sido el caso más claro de la presencia y desarrollo de SRLV salteños en un cultivo celular, aunque el efecto observado no fue el típico descrito por autores como Sigurdsson, Thormar, Narayan o Chebloune (Chebloune et al. 1996; Narayan et al. 1980; Sigurdsson et al. 1960; Thormar 1961b), se encontraría dentro de los “efectos citopáticos poco claros” mencionados por autores como Colitti (Colitti et al. 2019). Estos cultivos se realizaron con muestras frescas que fueron únicamente refrigeradas y utilizadas en un lapso menor a las 48h de ser extraídas, medidas que parecen ser cruciales en este tipo de ensayos.

Con el fin de caracterizar molecularmente las cepas circulantes en la provincia de Salta, se muestrearon 32 hatos de las diferentes ecorregiones. Muchos de los rebaños se encontraban en parajes de difícil acceso o bien la logística de los muestreos a realizar implicaba más de dos días de trabajo en territorio, a lo cual hay que adicionarle los tiempos de llegada y regreso al laboratorio. Esto ocasionó que no en todos los lugares fuera posible tomar muestras biológicas (sangre con EDTA) para utilizar con técnicas de biología molecular, debido a la imposibilidad de una buena conservación de las mismas. Por lo explicado, se desprende que el número de hatos en los que fue posible intentar una caracterización molecular fuera mucho menor.

Al desconocer cualquier dato sobre la secuencia de las cepas circulantes, la selección de las PCR a utilizar se basó en el uso de combinaciones de cebadores disponibles y probados sobre diferentes genotipos en el IdAB. Luego de realizar estas pruebas, se pudo notar que las reacciones prediseñadas que mejor funcionaron fueron la nPCR y OSLO-POL-R2, siendo la primera la que proporcionó los mejores productos de amplificación, limpios, visibles, repetibles y utilizables para secuenciación, aunque posiblemente haya dejado fuera muestras en la que la hibridación de sus cebadores haya sido defectuosa. La nPCR se adecuó mejor a cantidades de ADN total (proveniente de *buffy coat*) no mayores a 500ng totales. Ejemplos de otras reacciones que no brindaron resultados utilizables para secuenciar, fue LRT-OSLO, mientras que con otras como CRAFT-OSLO (Diedrich et al. 2020; Rimstad et al. 1993), CAEV L'Homme (L'Homme et al. 2011) no se lograron ningún tipo de amplificación para las muestras argentinas, posiblemente debido a diferencias en las secuencias en la zona de hibridación de los cebadores.

Una vez adecuadas las metodologías al material disponible se procedió a la secuenciación y análisis de los fragmentos procedentes de nPCR y de OSLO-POL-R2 y se obtuvieron 15 secuencias de unas 800pb. En base a estas secuencias se diseñaron las PCR para diagnóstico *Fw227/Rv700* y la M3 y las *nested nG2/500* y *nG2/M3*.

Los fragmentos de 800pb amplificados pertenecieron a los hatos 17138 y 17096 y presentaron una identidad alta de entre el 90 y el 98% como puede apreciarse en la matriz de identidad cita en la [tabla 10](#). Si se mira con detenimiento, puede notarse que la mayor divergencia está centrada en el animal 163 del hato 17138, pero el resto de los individuos, presenta una variación o divergencia media de 2,92%. En las secuencias salteñas se destaca la presencia de una inserción 614\_623ins que está ausente en tres animales (084, 303 y 163 del hato 17138), de los cuales el animal 163 es de nuevo el más discrepante. Claro está que la divergencia del animal 163 no se debe exclusivamente a la ausencia de la inserción, sino que esta variación genética va acompañada por muchas otras como la mutación 47T>C; las bases

en las posiciones 142>T, 151>A,163>A, 193>T compartidas con la cepa M33677.1 y no por alguna otra salteña.

La similitud entre estos hatos salteños podría deberse a una compra de animales de reposición realizada por el establecimiento 17196 al 17138 en los años 2015-2016, previa a la detección viral dentro del último. De hecho, algunos de los animales seropositivos del hato 17096 fueron adquiridos del hato 17138.

La divergencia encontrada entre las cepas salteñas es similar a las documentadas por Leroux y Angelopolou (Angelopoulou et al. 2006; Angelopoulou et al. 2005; Leroux et al. 1995). El primero denota valores entre 2,3 y el 8,1% en ovinos de una región francesa. Por otro lado, Angelopolou cita una variación similar entre el 2,1 y el 10,7% en ovinos del norte de Grecia. Al comparar los valores salteños con los valores medios reportados por Pisoni, utilizando rebaños mixtos ovicaprinos del Piemonte italiano (Pisoni et al. 2005) 7,7%, la divergencia entre las cepas salteñas es menor. Lo mismo sucede con los informes de Fras, que utiliza también rebaños mixtos ovicaprinos, pero en la zona de Quebec, Canadá (Fras et al. 2013) donde los valores oscilan entre el 4,8 y el 16%. Pero si ampliamos la comparación incluyendo en la matriz a la cepa argentina KX687990.1, la similitud decrece a menos del 90% (84,53% medio) cayendo en valores más parecidos a los reportes ya mencionados de Fras (Fras et al. 2013) o los de Schaer (Schaer et al. 2022) que presenta datos del 80 al 92%. Existen estudios realizados que presentan divergencias intrarebaños mucho más acentuadas seguramente debido a que circulan más de un genotipo de SRLV (Giammarioli et al. 2011; Kuhar et al. 2013; Michiels et al. 2020; Molaei et al. 2020).

Al alinear los fragmentos (800, 500 y 300pb) con genotipos determinados con el objetivo de clasificar las cepas salteñas en genotipos y subtipos, podemos apreciar que la secuencia se encuentra incluida dentro de una de las regiones utilizadas por Shah en su clasificación (Shah et al. 2004a). A pesar que Grego (Grego et al. 2007) informa que con este fragmento se llega a un idéntico resultado respecto a Shah, no es posible aseverar una clasificación dado que se carece de información adicional sobre otras regiones genómicas.

De todas formas, al análisis filogenético basado en el fragmento de 800pb indicó que las cepas salteñas se agrupan con el subtipo B1, lo mismo sucede con la cepa argentina publicada (KX687990.1). Las cepas salteñas guardan mayor similitud con la cepa mexicana HM210570.1 que con la cepa argentina KX687990.1, dato que puede verse en el Anexo I 9.3 [Tabla 1](#). De nuevo una importación de animales común, entre México y Argentina, o una microevolución similar de las quasiespecies en un hospedador determinado podrían explicar las similitudes.

Debemos señalar que al realizar los recortes para confeccionar los filogramas con secuencias de 500pb y 300pb (Figuras 26 y 27), existen cambios en la agrupación las cepas salteñas, e

incluso en la de genotipos reportados. Todo esto nos indica, que estos fragmentos de menor tamaño informan de la secuencia, pero no son aptos para tipificar, puesto que, ni siquiera las agrupaciones realizadas entre cepas previamente caracterizadas (con secuencia completa) son correctas o coherentes.

Una vez obtenidas las primeras secuencias se desarrollaron y pusieron a punto PCR para el diagnóstico de SRLVs locales. El diseño y combinación de una serie de cebadores generó diferentes PCRs con productos de tamaños variados. Las PCR con amplicones de mayor tamaño: *Fw191/Rv738* y *Fw78/Rv738*, funcionaron eficientemente con ADN de calidad y/o alta carga proviral, dando buenos productos de amplificación en muestras de animales ya analizados por nPCR. Mientras que, en otros tipos de muestras, las bandas fueron débiles y no pudieron ser clonadas para su secuenciación. Estos resultados podrían indicar la necesidad de aumentar la sensibilidad de las PCR basadas en el tiempo final mediante el diseño de PCR anidadas.

Las PCR que mayor número de nuevos positivos ofrecieron (respecto a las serologías), fueron las de fragmentos más pequeños *Fw275-Rv542* *Fw227-Rv542*, su multiplex M3 y la Nested nG2/M3, con fragmentos de 335 y 287 pb. Al ser fragmentos menores, un molde de menor calidad sería mejor tolerado. Con la M3, debido a la de baja calidad del molde, la intensidad de la banda de amplificación presentó poca repetibilidad, dando los mismos animales bandas sutiles o intensas. Esto quedó solucionado al diseñar la Nested nG2/M3, que, al poseer un paso de amplificación previo, los productos de la segunda ronda fueron de intensidades importantes a punto de tener que aclarar las imágenes o bajar el volumen de siembra en el gel (Figuras 29 a 32).

Particularmente la M3 y nG2/M3, deben ser utilizadas con mucha precaución en el momento de su preparación, porque su elevada sensibilidad puede dar falsos positivos por contaminaciones con mucha mayor facilidad que en la amplificación de fragmentos de tamaños superiores.

Cabe destacar que los productos de amplificación de estas combinaciones de cebadores diseñados en cepas salteñas tuvieron por lo general bandas de amplificación más intensas en controles positivos de ADN de los animales 277 y 303 o en productos de amplificación clonados de los animales 014 y 231, que en extracciones de cultivos celulares infectados con las cepas EV1, 496 o un plásmido con CAEV Cork. El diseño específico de cebadores asegura una detección mas sensible de las cepas circulates (Cardinaux et al. 2013; Reina et al. 2006). Por lo antes mencionado, la PCR diseñada que mejor se presta para el diagnóstico sería la nG2/M3, que no es tan exigente con la calidad del molde utilizado, debido a que, en las tomas de muestras realizadas en muchos lugares del país, es difícil asegurar la correcta ejecución de los protocolos de extracción, envío y conservación de las muestras biológicas, no sería lo

indicado utilizar técnicas que dependan de ello ya que no serían eficientes, desperdiciando tiempo dinero y energía sin resultados veraces.

En un contexto ideal, lo correcto sería realizar pruebas con diferentes formas de envío y extracción de ADN, por ejemplo, muestras de sangre entera embebidas en papel *Whatman*, como las matrices FTA e *IsoCode* (*Whatman* y *Schleicher and Schuell* respectivamente) asociadas a otro método de extracción de ADN, ya que se realizaron extracciones directas con dichas técnicas con malos resultados como también lo denotan autores como Zhong (Zhong et al. 2001) o adecuando las condiciones de PCR para este soporte.

Como ya fuera explicado, los resultados moleculares de los hatos han sido obtenidos de una submuestra de los animales, de los que se disponía de material biológico. Aun así, se pudo observar que, por técnicas moleculares es posible detectar la presencia viral aún en animales que fueron seronegativos. Puede verse en la [Tabla 11](#) -donde se compararon los resultados de serologías y moleculares-, existen hatos que tuvieron animales positivos a PCR, en los que ni uno solo fuera considerado positivo bajo ninguno de los kits serológicos utilizados (hatos 16316, 17090), y otros en los que se tuvo evidencia serológica de la infección y los métodos moleculares detectaron nuevos animales positivos obteniéndose de ellos una secuencia que verifica la existencia del genoma proviral. Dado que no existe variabilidad en la secuencia de los epitopes inmunodominantes entre los diseños ELISA comerciales y las cepas circulantes en Salta, la fluctuación en el título de anticuerpos durante la infección (de Andrés et al. 2005; de Andrés et al. 2003), así como la seroconversión retardada (Rimstad et al. 1993) podrían explicar estos resultados.

En el caso de la aparición de nuevos animales portadores del virus en los hatos 16317 y 16253 se confirma la presencia del virus que había sido detectada serológicamente dentro del hato, en otros casos, como en los hatos 16316 y 17090, los métodos moleculares delatan la presencia del virus, ya que ninguno de los tres ELISAs pudieron diagnosticarlas. De esta forma, se reafirman las recomendaciones de utilizar métodos de biología molecular en acción conjunta a las serológicas, para el cribado y erradicación de la enfermedad (de Andrés et al. 2005; Brinkhof et al. 2010a; Brinkhof et al. 2010b; Brinkhof and Maanen 2010; Herrmann-Hoesing 2010; Reina et al. 2009a). El mayor inconveniente y requisito necesario para la utilización de PCR en el diagnóstico de la enfermedad por SRLVs, es la adaptación de la técnica a las cepas circulantes, debido a la alta variabilidad que poseen este tipo de virus (de Andrés et al. 2005).

Un punto especialmente importante en el que la técnica de PCR podría ayudar, por sobre la serología, es en la detección temprana de cabritos y corderos infectados. Los animales jóvenes que no fuesen privados del calostro, poseen anticuerpos maternos que son reactivos a ELISA, mientras que, si se utiliza un método molecular para la búsqueda de provirus

integrado a las células mononucleares, el resultado es independiente de la presencia de anticuerpos maternos. De esta manera, se podría diagnosticar tempranamente a estos animales, permitiendo realizar mejores medidas de manejo y selección de los individuos a reponer sin tener que esperar a la disminución natural de los anticuerpos calostrales, que no ocurre antes de los 6 meses de edad (Reina et al. 2009a). Esta celeridad, compensaría económicamente la inversión en el diagnóstico.

En el caso de los ensayos serológicos contra SRLV, en el país sólo se contaba con un test importado, cuyo costo imposibilitaba la adquisición e implementación para la mayoría de los productores. Recientemente se ha discontinuado su distribución, con lo que en la actualidad no existe ningún kit disponible en el país para la detección de SRLVs.

La proteína p25 ha sido utilizada inicialmente en IDGA (Adams et al. 1985; Adams et al. 1984; Adams and Gorham 1986) y luego en ELISAs (Brinkhof and Maanen 2010; Juste et al. 2000; Power et al. 1995; Reina et al. 2010) y forma parte de los test con los que se realizó el cribado serológico, como *Elitest*, *Pourquier*, *Erradikit* y *CAEV p25 Ab Verification* de Idexx, que la utilizan sola o junto a la TM.

La disponibilidad de métodos serológicos basados en ELISA para SRLV que contemple a las cepas circulantes en el país y sea más asequible, se combinaría de forma ideal con los métodos moleculares y brindarían un abanico más completo en la lucha contra estas virosis para llegar a un diagnóstico más temprano y completo que permita implementar más y mejores medidas de control y manejo.

El rendimiento del sistema de producción de proteína p25 recombinante en *E.coli* permitió realizar pruebas a cerca de su inmunogenicidad frente a sueros caprinos -testeados anteriormente con otros test de ELISA comerciales.

En una prueba piloto, se evaluó la reactividad de diferentes *pools* de sueros caprinos frente a la proteína recombinante p25 en ensayos de *western blot* y en ELISA.

Tanto en el *WB* como en el ELISA ([Figuras 35](#) y [36](#) respectivamente), la proteína p25 no fue reconocida por el *pool* de sueros catalogados como negativos a los ELISAs comerciales (controles negativos). Tampoco reaccionaron frente a los sueros que solo fueron detectados por *Erradikit* en conjunto, pero al evaluarlos de forma individual en ELISA, uno de esos sueros sí la reconoció débilmente. Probablemente debido a que este kit comercial posee proteína p25 de varios genotipos y otros antígenos extra que le aportasen mayor sensibilidad.

Los sueros que fueran reactivos a los tres ELISAs comerciales (controles positivos) reconocieron a la proteína p25 recombinante, ya sea en forma de *pool* ([Figura 35](#)) o en forma individual ([Figura 36](#)).

Se estableció un punto de corte consistente en el promedio de los valores O.D de los controles negativos más tres desvíos estándar de los mismos (de Andrés et al. 2013). Contar con un

panel de sueros positivos y negativos analizados por test serológicos conocidos, ayudaría a la validación del ensayo ELISA con la p25 salteña de manera más precisa.

Siguiendo la misma línea de pensamiento que se utilizó con la proteína p25 y en la búsqueda explotar posibilidades para obtener una forma de diagnóstico lentiviral, se aprovechó la oportunidad de realizar un ensayo con una serie de péptidos sintéticos disponibles en el IdAB, descrito en trabajos anteriores (de Andrés et al., 2013), que por similitud en la secuencia podrían ser de utilidad. La utilización de este tipo de péptidos facilitaría la repetibilidad de los resultados y la adaptación de los antígenos a las cepas circulantes en diferentes áreas geográficas.

Como puede verse en la [Tabla 9](#), los péptidos utilizados no fueron capaces de evidenciar la presencia de anticuerpos frente a SRLVs en sueros detectados como positivos por varios ELISAs comerciales y brindaron reacciones positivas en muestras que no pudieron ser chequeadas por otro método diagnóstico, incluidas PCR.

La reacción positiva de los péptidos frente a los hatos 16282 y 16304, ameritan una revisión minuciosa de los resultados ya que los péptidos relevan la presencia de anticuerpos en animales en los que no se encontró evidencia de la infección por otros ELISA o PCR.

Los péptidos poseen una conformación lineal, con una secuencia muy determinada y de corta extensión, diferente a la de las proteínas nativas que contienen además epitopes conformacionales. Aunque es necesario considerar posibles reacciones inespecíficas, como reacciones cruzadas con inmunoglobulinas reactivas a otras enfermedades no circulantes en los lugares donde fueron diseñados los péptidos, identifican la infección en un rebaño considerado positivo por un método comercial y uno molecular, sin embargo, proporcionan resultados no coincidentes a nivel individual. Debido a estas discrepancias, no podemos descartar por completo la posibilidad de la existencia de nuevas cepas divergentes no detectadas dentro de dichos rebaños.

A partir de los ensayos sobre el manejo del hato 17138 se pudo poner en práctica una serie de medidas que podrían ser de utilidad en un proponer un protocolo de manejo para el control y/o erradicación de SRLV que puede ser adoptado en la provincia de Salta.

Partiendo de un hato con una prevalencia muy alta (78,8%), en poco tiempo, se pudo disminuir en gran medida (a 55%), eliminar la presencia de animales sintomáticos y obtener cabritos libres de SRLV incluso proviniendo del cruzamiento de padres seropositivos, al menos hasta los 8 meses de edad, incluso proviniendo del cruzamiento de padres seropositivos. El hato, que en 2017 contaba con una dotación entre 60 y 70 animales, fue manejado en su totalidad por dos empleados experimentados dirigidos por el área de producción animal y asesorados por el grupo de Salud Animal.

Fue fundamental plantear la toma de medidas de control, como una continuidad de las rutinas normales, debido a que el abandono momentáneo de las medidas, podría aparejar un retroceso importantísimo en los esfuerzos aunados hasta ese momento. Esto se pudo apreciar en el hato experimental 17138, donde el impedimento momentáneo en la aplicación de medidas durante la pandemia y la disposición de Aislamiento Preventivo Social Obligatorio los años 2020-2021 llevó a un incremento de la seroprevalencia a valores similares al punto de partida.

El manejo diferencial en dos rodeos “hato positivo y hato negativo” ha sido propuesto por muchos autores (de Boer et al. 1978; Houwers and Nauta 1989; Minguijón et al. 2015; Pérez et al. 2013; Schipper et al. 1985), esta metodología está basada en la separación física de los animales. Es un sistema de manejo que requiere infraestructura y un cuidado permanente a lo largo del tiempo. En el caso del hato 17138, se realizó un manejo de dos grupos hato seronegativo y hato sospechoso, en el segundo se incluyeron los animales seropositivos y los que no pudieron ser determinados y por tanto se desconocía su estatus individual. Al realizar un cribado serológico total en 2017 se pudo reagrupar a los animales con mayor seguridad. Estas medidas en el manejo en animales al aire libre, impedirían de gran forma los contagios. Por ello, es importante recalcar el mantenimiento de la distancia de seguridad entre rodeos todo el tiempo posible. Pero un caso diferente, es la permanencia de los animales en lugares cerrados, como fuera un claro ejemplo el primer brote en Islandia (Sigurdsson et al. 1957; Sigurdsson 1954; Sigurdsson et al. 1952). En este caso y haciendo uso de la situación pandémica, podemos inferir que una separación física no es suficiente, debido a la permanencia de virus en aire; cobrando importancia la ventilación de los ambientes (Bar-On et al. 2020). Esta realidad no es muy común en Argentina, ya que la mayoría de las explotaciones son a campo abierto (Suarez et al. 2017b; Suarez et al. 2017a; Suarez et al. 2015) e incluso el hato de mayor cuantía utilizado en esta tesis (16345), con cerca de 4000 animales estabulados en un sistema de *Dry lot*, estaba compuesto por paredes abiertas.

Por otro lado, si bien se cree que la transmisión por medio de las pasturas es muy baja, incluso durante las fases clínicas de la enfermedad (Pálsson, 1972, 1976), aún no está bien determinado el tiempo de saneamiento de las mismas. Pálsson habla de la experiencia Islandesa con vacíos sanitarios de 1 a 2 semanas, pero posiblemente la desecación y la radiación solar sean capaces de eliminar el virus de las secreciones infectantes que puedan haber dejado animales infectados en horas, como ocurre en otros virus de esta familia (Resnick et al. 1986). Por lo que, de utilizar el mismo cuadro de pastoreo para los dos hemirodeos, la pastura debe asolearse por horas para permitir la eliminación del virus. Lo ideal es que el hato sano pastoree primero y luego lo haga el hato infectado o sospechoso con un posterior descanso de la parcela.

El manejo de los servicios se vio sumamente facilitado con el uso de dos reproductores machos chequeados, uno seronegativo y otro seropositivo, evitando el uso de inseminación artificial (IA) propuesta por muchos autores (Cortez-Romero et al. 2013; Fieni et al. 2017b; Fieni et al. 2012; Kaba et al. 2013; Lamara et al. 2002a; Nowicka et al. 2015). La técnica de IA laparoscópica, es laboriosa, requiere obligatoriamente de un profesional capacitado y da resultados de un 50% de preñez (Eduardo Gibbons et al. 2019; Gibbons et al. 2011). La utilización de semen fresco o refrigerado depositado en el orificio cervical externo (Baldassarre 2007), tiene porcentajes de preñez más altos (entre el 60 y 80%) y similares a la monta natural (Cueto and Gibbons 2012; Hernández Ballesteros et al. 2019), permitiendo utilizar un único reproductor, que puede destinarse al uso colectivo entre productores cercanos.

Debido a la diversidad de situaciones y realidades que surcan la Argentina, se puede comprender que la utilización de técnicas de reproducción asistida podrán ser empleadas por establecimientos de gran envergadura o por aquellos que estén suficientemente organizados como los que perteneces a grupos CREA (<https://www.crea.org.ar>) o en las asociaciones vecinales que funcionan muy bien en Patagonia norte (Bidinost y Reisen, 18/05/2008, comunicación personal), pero no es una técnica asequible para pequeños productores aislados.

En el manejo de los partos, existen varios estudios que demuestran la replicación efectiva del virus en células del aparato reproductor femenino y su presencia en los loquios como fuente de contaminación ambiental (Fieni et al. 2003; Fieni et al. 2002; Rowe and East 1997). Y como estos normalmente se agrupan en momentos precisos, ya sea por una sincronización, manejo estacionado o la propensión natural de los nacimientos hacia la primavera/verano. La utilización de lugares específicos para los partos que acontecen uno tras otro no da oportunidad un vacío sanitario que permita la eliminación natural del virus (Pálsson 1976). Por lo que es importante que esta cantidad de tejidos y fluidos contaminados sean retirados lo antes posible y el ambiente debidamente desinfectado con un producto adecuado. En el caso del hato 17138 se utilizó el desinfectante Despadac® que fuera donado para este ensayo por el laboratorio Calier de Argentina y utilizado mediante un aspensor como mejor y más práctica forma de aplicación, siguiendo las indicaciones del fabricante.

La eliminación del virus de un rebaño tiene como punto crítico la obtención de animales sanos para la reposición y por ello es esencial el manejo del cabrito desde el momento del nacimiento. La práctica del retiro de alimentos voluminosos a partir de la tarde durante el periparto de las hembras, redujo prácticamente a cero el número de nacimientos nocturnos

en el hato 17138, facilitando la atención y separación de los neonatos y el manejo del calostrado seguro.

La separación de los cabritos en el momento de su nacimiento, no solo responde al trabajo con rodeo sano y rodeo infectado, sino que busca prevenir el contagio horizontal en el postparto inmediato (Konishi et al. 2011; Souza de Oliveira Nascimento et al. 2020). Evitando la permanencia del neonato entre los loquios infectantes (Fieni et al. 2003; Fieni et al. 2002; Rowe and East 1997) y el contacto directo con madres seropositivas que puedan transmitir por secreciones respiratorias, así como el consumo directo del calostro de sus madres (Álvarez et al. 2006; Álvarez et al. 2005; Juste et al. 2009).

Proporcionar a los neonatos un calostro seguro, es un punto muy importante a tratar debido a que al menos el 15% de los contagios de las crías se da en este momento (Broughton-Neiswanger et al. 2010). Como se desconoce en qué momento puede seroconvertir una hembra en el periodo entre serodiagnósticos -ya desde los años 80 se habló de un tiempo mínimo de 40 días a partir de inoculaciones experimentales (Adams et al. 1980)-, la medida más conservadora es que los cabritos ingieran preferentemente, calostro pasteurizado como ya lo indicara Rowe (Rowe and East 1997) o en segunda instancia provenientes de madres seronegativas. El empleo de lauril sulfato de sodio (SLS) en calostro se utilizó en el hato 17138, presentando un rechazo a la ingesta en concentraciones mayores al 1%. Cabe destacar que su manipulación ha sido dificultosa, debido a la espuma que provoca el tensioactivo, lo cual llevó a implementar la pasteurización, que, según autores (Adams et al. 1983; Lang 2008; Rowe and East 1997) son efectivos para los SRLVs a partir de 40°C. En esta protocolización se decidió adoptar la temperatura de 56°C debido a que actúa sobre otros microorganismos como *Micobacterium*, *Micoplasmas*, *Salmonellas*, etc., que mejorarían las condiciones sanitarias de los cabritos y evitaría también el contagio de estos microorganismos (Doderó et al. 2016a; Elizondo-Salazar et al. 2010; Elizondo-Salazar et al. 2008; Elizondo-Salazar 2007; Juste et al. 2009).

Al igual que el calostro, la leche es una fuente potencial de ingreso del virus e infección de los cabritos (Adams et al. 1983; De Boer et al. 1979; de Boer et al. 1978; Houwers et al. 1983; Rowe and East 1997). Al igual que con el calostro, existen diversas formas de pasteurización, sanitización o esterilización del fluido, la diferencia radica en la laboriosidad, la cantidad de gérmenes que se eliminan y la calidad biológica del producto procesado (Gao et al. 2002; Rowe et al. 1992a; Rowe et al. 1992b; Rowe and East 1997; Stabel et al. 2004; Stabel 2001). El manejo posterior de los cabritos se corresponde con la separación física en dos hemirodeos hijos de madres negativas e hijos de positivas -en este caso- y un testeo serológico de SRLV al final de la recría (8 meses de vida) para determinar su estatus y permanencia en el hato como reposición. De querer realizar un testeo temprano y destinar a faena a los positivos sin esperar a los 8 meses, -periodo en el cual decaen los anticuerpos calostrales que pudieran

actuar como falsos positivos- la determinación del estatus debe ser mediante PCR, debido a que la presencia de inmunoglobulinas puede indicar la transferencia de anticuerpos calostrales que aún no decayeron.

El análisis socioeconómico indica la importancia que tiene la producción caprina de la zona. La totalidad de las explotaciones del Chaco Salteño (CS) fueron de tipo familiar, con bajas producciones individuales donde el cabrito fue el producto de venta, lo que hacía que la reposición fuese baja y el consumo de carne se valiese de animales adultos, como bien lo explica Suarez en su publicación (Suarez et al. 2015). También coincidiendo con el autor, se constató el ordeño manual y la producción de queso para autoconsumo con datos de prevalencia similares, 9,17% en este estudio frente al 10% previamente publicado (Suarez et al., 2015, 2017).

La mayor parte de los establecimientos lecheros, familiares capitalizados y comerciales, se ubicaron en Quebradas y Valles Áridos (QA), con un biotipo animal lechero y las mayores producciones individuales por animal de este trabajo. Se pudo identificar un aumento en el número de animales por hato promedio (340,55), mientras que el reportado anteriormente ascendía 124,5 animales (Suarez et al. 2017b). Al igual que datos publicados, la gran mayoría de los establecimientos, dedicaron su producción quesera a la venta y el excedente al autoconsumo. En esta ecorregión se destacó la diversidad de suplementos ofrecidos a los animales y un mayor acceso a la sanidad, representado por el más alto porcentaje de vacunación (45%) dato que se ha incrementado, desde el 15% citado por Suarez. En concordancia con la cita, el 95% de los hatos realizaban tratamientos contra las parasitosis, de los cuales muchos utilizaron al índice FAMACHA como método indicativo para la desparasitación. Los estudios previos indican prevalencias de la infección por SRLV de 2,5 y 12,5% (Doderó et al. 2017; Doderó et al. 2015; Suarez et al. 2017b) que han sido confirmadas en este estudio, con un valor intermedio de 6,48%.

En Valles Templados (VT), la actividad mayoritaria fue la cría (62,5%) y el 87,50% de los animales fueron de crúza criolla y en unidades productivas familiares con una preponderancia femenina en el cuidado de los animales y todas ellas realizaban desparasitaciones al igual que lo describe Suarez (Suarez et al. 2017a). Existe una gran diversidad de establecimientos, incluyendo los que no ordeñan, en los que el autoconsumo vuelve a ser prioritario, coexistiendo con otros que se dedican a la venta de su producción láctea. Por ejemplo, el 25% de los hatos, los cuales eran comerciales (Familiares capitalizados y tambo comercial) realizaban pastoreo racional, su producción estaba destinada a la venta, utilizaban empleados, compraban los reproductores, tenían guachera colectiva y vacunaban a sus animales. Mientras que los establecimientos familiares, tenían pastoreo extensivo, la producción se destinaba principalmente al autoconsumo, la mano de obra era familiar, los

machos seleccionados de sus propios animales, los cabritos se criaban de la forma tradicional y solo una aplicaba vacunas.

Si se observan los estadísticos descriptivos por ecorregiones de las variables cuantitativas (Tabla 13), *a priori* VT es la región con la mayor seroprevalencia media, seguida de CS y QA. Si observamos las agrupaciones de las prevalencias según tipo de establecimiento ([Figura 42](#)), se puede apreciar claramente que el salto cuantitativo está dado por los establecimientos comerciales. Ahondando en estos datos, el método de cría de guachera colectiva (Figuras 43 y 44) parece estar influenciando a las mayores seroprevalencias, así como el tipo de ordeño mecánico (Figura 44).

Al realizar el análisis estadístico de los factores de riesgo para la presencia de la enfermedad lentiviral, se pudo ver que existían variables muy complejas de evaluar como en manos de qué persona está la responsabilidad de la producción o el cuidado de animales, si eran empleados, propietarios o familiares, que debieron ser descartadas.

Para cuantificar la implicación de los factores de riesgo en la presencia de la enfermedad, se empleó la prueba *Odds Ratios* que no posee límites claros para su interpretación tornándose subjetivo. Su información es fundamentalmente descriptiva, aunque si su intervalo de confianza (IC) no incluye al 1 se concluye que la asociación es estadísticamente significativa. Es por ello que se ha intentado ponderar la magnitud del efecto de *OR*. La clasificación actualmente más aceptada (Chen et al. 2010; Cohen 1988).

La variable explicativa que más fuertemente estuvo asociada a Estatus (estatus sanitario serológico) fue desparasitaciones. El método de *OR* la define como un riesgo pequeño, de 2,994 veces superior para los hatos que no realizaban la práctica sobre los que sí lo hacían. Si bien las drogas antiparasitarias no tienen acciones comprobadas sobre los SRLVs, el efecto que poseen éstas sobre el estado general y por ende de salud de los animales podría estar aportando el efecto protector que esta asociación nos indica. En relación a ello, si bien este factor no ha sido tomado en cuenta por otros autores, Junkuszew consideró la condición corporal, el estado general y la presencia de diarreas (tres condiciones que están estrechamente vinculadas a la presencia de parasitosis), como factores de riesgo, donde la presencia de diarreas es la mayor importancia con 4,22 más riesgo para los animales diarreicos (Junkuszew et al., 2016).

Otra variable descriptiva que tuvo una asociación significativa con estatus fue el método de cría, según  $Ch^2$  y RL: Como grado de asociación determinado por *OR* fue menor a uno, se indica a esta variable como protectora. Para poder comparar valores menores a uno se utiliza su inversa, en este caso los animales que criados en el sistema tradicional tuvieron 4,66 menos

riesgo de estar infectados que los criados en guachera colectiva, que según Choen representa una asociación moderada.

Para Seroprevalencia, las variables cribadas bajo  $Ch^2$  que fueron confirmadas por RL fueron método de cría y tipo de ordeño, observándose que la totalidad de los establecimientos que utilizaban guachera colectiva estaban infectados y las seroprevalencias medias eran más del triple (18,44%) que los que utilizaron el método de cría tradicional. Para el caso del tipo de ordeño ocurre algo similar, la totalidad de los hatos con ordeño mecánico han resultado seropositivos y solo el 67% de los que utilizaban ordeño manual tuvieron animales seroreactivos, mientras que las seroprevalencias medias fueron aproximadamente 5 veces mayores para los más tecnificados. Ambas variables favorecen el contacto directo entre animales posibilitando la transmisión horizontal del virus.

La forma en la que las explotaciones obtienen sus machos, el tipo de pastoreo, el uso de delimitaciones en las fincas, el método de cría y el tipo de ordeño también parecen tener relación con la Seroprevalencia en rangos, según  $Ch^2$  que, sin embargo, no se confirma con RL.

Si partimos de la premisa de que las tres variables dependientes utilizadas (estatus, seroprevalencia y seroprevalencia en rangos) están construidas a partir del mismo dato serológico, podemos inferir que los tres resultados estarán relacionados. El método de cría ha sido un factor que resultara significativo para Estatus, Seroprevalencia y Seroprevalencia en rangos con todas las metodologías utilizadas. Adicionalmente se empleó análisis de correlación, métodos no paramétricos como *Kruskal Wallis*, test de *Irwin Fisher*, entre otros (no mostrado) que confirmaron los resultados, identificándolo como factor de riesgo para la presencia de la infección lentiviral.

Si analizamos las causas que puedan estar determinando la presencia de la infección según el método de cría, se puede pensar que en el sistema de guachera colectiva la densidad animal es menor que en la cría tradicional y por ello debiera, asociarse negativamente con el riesgo de infección en algunos casos. Sin embargo, en este sistema la leche y el calostro provienen de diferentes madres, aumentando la probabilidad de que una de ellas pueda transmitir la infección más de un cabrito debido a la forma de alimentación colectiva, a menos que el suministro lácteo esté pasteurizado o se corresponda con un sustituto (Álvarez et al. 2006; Álvarez et al. 2005; Rowe et al. 1992a; Rowe et al. 1992b; Rowe and East 1997). De igual manera, la utilización de tetinas o baldes de acceso colectivo puede actuar de fómite a la hora la difusión de la enfermedad como lo plantea Rowe (Rowe and East 1997). Otro factor que podría intervenir en este método de cría, es el estrés de los animales privados de sus madres, que afecta el sistema inmunológico haciéndolos más susceptibles a enfermedades (Bojar et al. 2018).

En la cría tradicional coexisten cabritos con adultos potenciales portadores del virus, en cambio, cada cabrito bebe leche de su propia madre, por lo que la transmisión solo ocurre si su madre es portadora. Esto unido a las bajas seroprevalencias presentes entre los hatos que emplearon este tipo de cría, posiblemente justifiquen efecto protector denotado por el método de *OR*.

Es importante recalcar que, si bien por lo antes expuesto, la crianza artificial bajo el sistema de GC puede favorecer el contagio de los cabritos, también podría ser un eje central en la prevención de los mismos a partir del momento en que se determine la presencia lentiviral en un rodeo, facilitando la implementación de medidas colectivas de prevención sobre esta categoría que puede transformar la debilidad del método en una fortaleza.

El ordeño mecánico está asociado a seroprevalencias más altas, pero si vemos el número de hatos, podemos apreciar que al ser solo 4 los establecimientos que utilizaron esta modalidad, posiblemente el resultado de RL para seroprevalencia en rangos esté relacionado a que en el cruce de rango 2 (mayor a 0 y menor a 10%) hay solo un hato, perdiendo potencia la metodología al categorizar la variable.

Otros posibles factores de riesgo, como el tipo de pastoreo, la delimitación territorial y la forma de obtención de los reproductores machos han resultado significativos, dependiendo del método con que eran estudiados, dejando la duda sobre su verdadera importancia. Para una valoración superadora, sería importante contar con más establecimientos permitiendo una mejor evaluación de estos posibles factores de riesgo.

El tipo de pastoreo guarda una estrecha relación con el contacto directo entre animales infectados y sanos, donde a mayor cantidad de animales por unidad de superficie mayor será el riesgo de un contagio. Así lo justifica Brülisauer (Brülisauer et al., 2005), quién incluye como factor de riesgo la utilización de pastos comunales que posibilitan el contacto directo o indirecto con ovejas y cabras infectadas de otros rebaños. De esta misma forma los manejos racionales de forraje como el de franjas diarias, tendrían por lógica mayores contagios que los de grandes áreas extensivas. Barquero y otros (Barquero et al., 2013; Junkuszew et al., 2016; Lago et al., 2012; Pérez et al., 2010) relacionan un mayor riesgo de los sistemas intensivos sobre los semi intensivos con valores de *OR* de pequeños a moderados. El estudio de Pérez (Pérez et al. 2010) valora la densidad animal y los días de permanencia en confinamiento como factores de riesgo, al igual que Cirone (Cirone et al. 2019), quien habla de una relación entre la densidad animal y el sistema productivo, donde un mayor número de animales ligado a un sistema más intensivo favorecerían la presencia de la enfermedad. También la forma de obtención de los machos y animales de reposición han presentado asociación, según algunos autores (Kaba et al. 2013; Konishi et al. 2011) con *OR* superiores a 13 según Kaba.

Los SRLV están presentes en las explotaciones caprinas de la provincia de Salta según hemos demostrado mediante la presencia de anticuerpos y de secuencias virales genuinas. La seroprevalencia global encontrada es llamativamente menor de la encontrada en otros estudios (de Miguel et al. 2021). La presencia de estirpes divergentes que escapen al diagnóstico serológico comercial basado en antígenos de estirpes europeas en su mayoría o el escaso intercambio de animales unido al aislamiento de la zona podrían haber contribuido al mantenimiento de poblaciones negativas. La ganadería caprina se erige como una actividad de gran importancia en la provincia de Salta ya sea como motor económico de zonas agrarias o como una opción real de autoabastecimiento y subsistencia de las poblaciones humanas en el entorno rural. La reciente importación de animales podría estar diseminando la infección, con la consecuente reducción de la producción animal y el aumento de las infecciones secundarias. Sin tratamiento ni vacunas disponibles, el curso de la infección lentiviral es inexorable y requiere de una vigilancia epidemiológica, que resulta esencial especialmente en este momento. La disponibilidad de herramientas diagnósticas de alta sensibilidad y adaptadas a la realidad del campo argentino es clave para el control de los SRLV.

## 7. CONCLUSIONES

. - Se ha demostrado la presencia de lentivirus en la provincia de Salta mediante el empleo de diferentes ELISA, a través de la obtención de secuencias virales genuinas y tras el análisis clínico y anatomopatológico hallando diferentes formas clínicas, siendo la articular la de mayor prevalencia. Sin embargo, no se obtuvieron éxitos a la hora de aislar los SRLV circulantes con métodos de cultivo celular.

- Se ha logrado actualizar y mejorar la información sobre la presencia de la lentivirus en la provincia de Salta, obteniendo estimaciones de seroprevalencia muy bajas. El mantenimiento de razas locales en ausencia de importaciones o la circulación de cepas divergentes no detectadas por ELISAs comerciales podría explicar los valores de seroprevalencia.

. – Las secuencias de las cepas salteñas indican su agrupación con el genotipo B1, pero con diferencias significativas en la región *gag-pol* que podrían comprometer su detección con métodos estándar.

. –El diseño de PCR de diagnóstico específico de las cepas salteñas y su elaboración como *nested*PCR es eficaz e incluso capaz de detectar animales seronegativos. Asimismo, las pruebas de concordancia de los test serológicos reafirman la necesidad de utilizar más de una técnica o kit diagnóstico en la elaboración y ejecución de un programa de erradicación de SRLVs.

. -Se detectó la falta de aplicación de tratamientos antiparasitarios como un factor de riesgo que incrementa la posibilidad de la presencia de la infección. También el uso de ordeño mecánico está asociado con mayores seroprevalencias, al igual que la crianza en guachera colectiva.

. – La retirada de animales clínicos junto con la elección de crías seronegativas para la reposición son medidas adecuadas para sanear explotaciones con una alta seroprevalencia.

. - La proteína p25 obtenida de las cepas salteñas puede emplearse como antígeno en serodiagnóstico (ELISA y WB).

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbink TEM, Berkhout B. HIV-1 Reverse Transcription: Close Encounters Between the Viral Genome and a Cellular tRNA. *Adv Pharmacol.* 2007;55(07):99–135.
- Adams DS, Crawford TB, Banks KL, McGuire TC, Perryman LE. Immune responses of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Infect Immun.* 1980;28(2):421–7.
- Adams DS, Gogolewski RP, Barbet AF, Cheevers WP. Identification of Caprine Arthritis-Encephalitis Retrovirus Proteins in Immunodiffusion Precipitin Lines. *J. gen. Virol.* 1985.
- Adams DS, Gorham JR. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res Vet Sci.* 1986;40(2):157–60.
- Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res [Internet].* 1983;44(9):1670–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6625321>
- Adams DS, Oliver RE, Ameghino E, DeMartini JC, Verwoerd DW, Houwers DJ, et al. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Record.* 1984;115(19):493–5.
- Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Pellerin JL, Guiguen F, Cherel Y, Chatagnon G, et al. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology.* 2008;69(4):473–80.
- Álvarez V, Arranz J, Daltabuit-Test M, Leginagoikoa I, Juste RA, Amorena B, et al. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. *Res Vet Sci.* 2005;78(3):237–43.
- Álvarez V, Daltabuit-Test M, Arranz J, Leginagoikoa I, Juste RA, Amorena B, et al. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res Vet Sci.* 2006;80(2):226–34.
- Amorena B, Andres B, Gonzalez S, de Andrés D, Vargas A, Luján L. Mecanismos patogenos y respuesta inmune. *Ovis.* 2001;(72):24–35.
- de Andrés D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Blacklaws BA, et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol.* 2005;107(1–2):49–62.
- de Andrés D, Pérez M, Amorena B, Reina R, González B, Luján L. Tropismo y respuesta inmune en infecciones por el virus de la artritis encefalitis caprina - Dialnet. *Ovis*, Nº. 87 [Internet]. 2003 [cited 2020 Nov 12];45–57. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=651344>
- de Andrés X, Ramírez H, Bertolotti L, San Román B, Glaria I, Crespo H, et al. An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Vet*

- Immunol Immunopathol [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;152(3–4):277–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.017>
- de Andrés X, Reina R, Ciriza J, Crespo H, Glaria I, Ramírez H, et al. Use of B7 costimulatory molecules as adjuvants in a prime-boost vaccination against Visna/Maedi ovine lentivirus. *Vaccine*. 2009 Jul 23;27(34):4591–600.
- Andrésdóttir V. Evidence for recombination in the envelope gene of maedi-visna virus. *Virus Genes*. 2003;27(1).
- Andrésdóttir V, Tang X, Agnarsdóttir G, Andrésón ÓS, Georgsson G, Skraban R, et al. Biological and genetic differences between lung- and brain-derived isolates of maedi-visna virus. *Virus Genes*. 1998;16(3).
- Angelopoulou K, Brellou GD, Greenland T, Vlemmas I. A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus Res*. 2006;118(1–2):178–84.
- Angelopoulou K, Karanikolaou K, Papanastasopoulou M, Koumpati-Artopiou M, Vlemmas I, Papadopoulos O, et al. First partial characterisation of small ruminant lentiviruses from Greece. *Vet Microbiol*. 2005;109(1–2).
- Ariztia Reyes A. Programas voluntarios de control y certificación | SAG [Internet]. Ovinos – maedi visna. 2013 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/programas-voluntarios-de-control-y-certificacion>
- Armstrong SE, Mariano JA, Lundin DJ. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*. 2010 Mar;38(2):211–3.
- Arsenault J, Dubreuil P, Girard C, Simard C, Bélanger D. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Prev Vet Med*. 2003;59(3).
- Badiola J, Gonzalez L, Gelabert J. Demonstration of Maedi Visna in Spain. EEC workshop “Slow viruses in sheep, goats and cattle.” Edimburgh: Commission of the European Communities; 1983.
- Baird AN, Shipley CF. Diseases of the musculoskeletal system. Sheep, Goat, and Cervid Medicine. Elsevier; 2021. p. 251–80.
- Balbin MM, Belotindos LP, Abes NS, Mingala CN. Caprine arthritis encephalitis virus detection in blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the proviral gag region. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Elsevier Inc.; 2014 May 1;79(1):37–42.
- Baldassarre H. Assisted reproduction in goats: artificial insemination to cloning. *Rev Bras Reprod Anim*, [Internet]. Belo Horizonte: CBRA; 2007 [cited 2021 Aug 20]. Available from: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)
- Barlough J, East NE, Rowe JD, Van oosear K, Derock E, Bigornia L, et al. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral

- DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J Virol Methods*. 1994;50(1–3):101–13.
- Bar-On YM, Flamholz A, Phillips R, Milo R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *Elife*. eLife Sciences Publications, Ltd; 2020 Mar 1;9.
- Barquero N, Gomez-Lucia E, Arjona A, Toural C, las Heras A, Fernández-Garayzábal JF, et al. Investigation of risk factors associated with infections caused by small ruminant lentiviruses. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. National Veterinary Research Institute*; 2013;57(4):473–8.
- Barros SC, Andrésdóttir V, Fevereiro M. Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch Virol*. 2005;150(2):201–13.
- Bedotti DO, Fort M.C., Giménez H, Langhoff A, Garré J, Hertsommer O. Descripción de un caso de artritis- encefalitis caprina en la provincia de la pampa, argentina. V Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina [Internet]. Mendoza, Argentina; 2007. p. 4–6. Available from: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_caprinos/08-bedotti.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_caprinos/08-bedotti.pdf)
- Begara I, Luján L, Collie DDS, Miller HRP, Watt NJ. Early pulmonary cell response during experimental maedi-visna virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996;55(1–3):115–26.
- Behre G, Whitmarsh AJ, Coghlan MP, Hoang T, Carpenter CL, Zhang DE, et al. c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.*; 1999 Feb 19;274(8):4939–46.
- Benavides J, García-Pariente C, Carmen Ferreras M, Fuertes M, Francisco García-Marín J, Pérez V. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Veterinary Journal*. 2007;174(3):655–8.
- Benavides J, García-Pariente C, Fuertes M, Ferreras MC, García-Marín JF, Juste RA, et al. Maedi-Visna: the Meningoencephalitis in Naturally Occurring Cases. *J Comp Pathol*. 2009;140(1):1–11.
- Bergonier D, De Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res*. 2003;34:689–716.
- Bertolotti L, Mazzei M, Puggioni G, Carrozza ML, dei Giudici S, Muz D, et al. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the mediterranean basin. *Journal of General Virology*. 2011;92(8):1923–9.
- Bieniasz PD. Intrinsic immunity: A front-line defense against viral attack. *Nat Immunol*. 2004.

- Bimboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(6).
- Blacklaws BA, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Watt NJ, de Andrés D, Klein D, et al. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol.* 2004;101(3):199–208.
- Blacklaws BA, Bird P, McConnell I. Early events in infection of lymphoid tissue by a lentivirus, maedi-visna. *Trends Microbiol.* 1995;3(11):434–40.
- de Boer GF, Terpstra C, Houwers DJ. Studies of Zwoegerziekte (Maedi) in the Netherlands, a review. *Bull. Off. Int. Epiz. [Internet].* 1978 [cited 2021 Aug 27];89(7/8):487–506. Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302096756>
- De Boer GF, Terpstra C, Houwers DJ, Hendriks J. Studies in epidemiology of maedi/visna in sheep. *Res Vet Sci.* 1979;26(2).
- Bojar W, Junkuszew A, Dudko P, Olech M, Olesiński Z, Gruszecki T, et al. Risk factors associated with small-ruminant lentiviruses in sheepfold buildings. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine. Institute of Agricultural Medicine;* 2018;25(3):383–7.
- Bolea R, Monleón E, Carrasco L, Vargas A, de Andrés D, Amorena B, et al. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Vet Res.* 2006;37(1):133–44.
- Brajon G, Mandas D, Liciardi M, Taccori F, Meloni M, Corrias F, et al. Development and Field Testing of a Real-Time PCR Assay for Caprine. *Open Virol J.* 2012;6(i):82–90.
- Bravo G, Bianchi A, Volante J, Alderete Salas S, Sempronii G, Vicini L, et al. Regiones Agroeconómicas Del Noroeste Argentino. 2012;228(1):7.
- Brinkhof J. Detection and control of lentiviral infections in sheep and goats. [Netherlands]: FVM. Utrecht University; 2009.
- Brinkhof J, Houwers DJ, Moll L, Dercksen D, van Maanen C. Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet Microbiol. Elsevier;* 2010a May 19;142(3–4):193–8.
- Brinkhof J, Van Maanen C. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2007;14(9):1210–4.
- Brinkhof J, Maanen K. Detection and control of lentiviral infections in sheep and goats. *Veterinary Sciences Tomorrow.* 2010.
- Brinkhof J, Moll L, van Maanen C, Houwers DJ. Use of serology and polymerase chain reaction for the rapid eradication of small ruminant lentivirus infections from a sheep flock: A case report. *Res Vet Sci. W.B. Saunders;* 2010b Feb 1;88(1):41–3.

- Brodie SJ, De La Concha-Bermejillo A, Koenig G, Snowden GD, De Martini JC. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. *Journal of Infectious Diseases*. 1994;169(3):653–7.
- Brodie SJ, Pearson LD, Snowden GD, DeMartini JC. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Arch Virol*. 1993;130(3–4):413–28.
- Broughton-Neiswanger LE, White SN, Knowles DP, Mousel MR, Lewis GS, Herndon DR, et al. Non-maternal transmission is the major mode of ovine lentivirus transmission in a ewe flock: A molecular epidemiology study. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010;10(7):998–1007.
- Brülisauer F, Vogt HR, Perler L, Rüfenacht J. Risk factors for the infection of Swiss goat herds with small ruminant lentivirus: A case-control study. *Veterinary Record*. 2005;157(8).
- Cardinaux L, Zahno ML, Deubelbeiss M, Zanoni R, Vogt HR, Bertoni G. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet Microbiol*. Elsevier; 2013 Mar 23;162(2–4):572–81.
- Carrozza ML, Mazzei M, Bandecchi P, Arispici M, Tolari F. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *J Virol Methods*. 2003;107(2):121–7.
- Carrozza ML, Niewiadomska A-M, Mazzei M, Abi-Said M, Hue S, Singer JB, et al. Global genetic diversity of small ruminant lentiviruses, and a hypothesis regarding their pandemic spread. [Internet]. *bioRxiv*. 2018 [cited 2018 May 30]. p. 1–28. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/05/30/236117>
- Carrozza M-L, Niewiadomska A-M, Mazzei M, Abi-Said MR, Hué S, Hughes J, et al. Emergence and pandemic spread of small ruminant lentiviruses. *Virus Evol* [Internet]. Oxford University Press (OUP); 2023 Feb 13 [cited 2023 Apr 22];9(1). Available from: <https://academic.oup.com/ve/article/doi/10.1093/ve/vead005/6990579>
- Carter G, Wise D, Flores E. *Virología Veterinaria*. International Veterinary Information Service. 2005;42.
- Castro RS, Greenland T, Leite RC, Gouveia AMG, Mornex JF, Cordier G. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *Journal of General Virology*. 1999;80(7):1583–9.
- Chacón T, Naranjo P. Sanidad animal | SAG | Chile 2004 [Internet]. Informe sanitario animal 2004. 2004 [cited 2020 Aug 27]. p. 1–2. Available from: [https://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/noviembre\\_2004/4.htm](https://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/noviembre_2004/4.htm)
- Chebloune Y, Sheffer D, Karr BM, Stephens E, Narayan O. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology*. 1996;222(1):21–30.

- Cheevers WP, McGuire TC. The Lentiviruses: Maedi/Visna, Caprine Arthritis-Encephalitis, and Equine Infectious Anemia. *Adv Virus Res.* 1988;34(C):189–215.
- Chen H, Cohen P, Chen S. How Big is a Big Odds Ratio? Interpreting the Magnitudes of Odds Ratios in Epidemiological Studies. <https://doi.org/10.1080/03610911003650383> [Internet]. Taylor & Francis Group ; 2010 Apr [cited 2021 Oct 20];39(4):860–4. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03610911003650383>
- Chessa B, Pereira F, Arnaud F, Amorim A, Goyache F, Mainland I, et al. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science* (1979). 2009;324(5926):532–6.
- Christodoulouopoulos G. Milk Production and Milk Fat Content in Commercial Karagouniko Breed Flocks Infected by Maedi Disease in Greece. *Proceedings of the VI International Sheep Veterinary Congress, Hersonissos Crete, Greece.* 2005. p. 344–5.
- Christodoulouopoulos G. Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Ruminant Research.* 2006;62(1-2 SPEC. ISS.):47–53.
- Cirone F, Maggolino A, Cirilli M, Sposato A, de Palo P, Ciappetta G, et al. Small ruminant lentiviruses in goats in southern Italy: Serological evidence, risk factors and implementation of control programs. *Vet Microbiol. Elsevier B.V.;* 2019 Jan 1;228:143–6.
- Clavijo A, Thorsen J. Serologic diagnosis of caprine arthritis-encephalitis by elisa with two recombinant proteins in a parallel testing format. *J Immunoassay.* 1995;16(4):419–36.
- Clements JE, Narayan O, Cork LC. Biochemical characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *Journal of General Virology.* 1980;50(2):423–7.
- Clements JE, Zink MC. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(1):100–17.
- Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas.* 1960;20(1).
- Cohen J. Weighted kappa: Nominal scale agreement provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull.* 1968;70(4).
- Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioural sciences.* Hillside. NJ: Lawrence Earlbaum Associates. 1988.
- Colitti B, Coradduzza E, Puggioni G, Capucchio MT, Reina R, Bertolotti L, et al. A new approach for small ruminant lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains. *PLoS One.* 2019;14(2):1–12.
- Cork LC, Hadlow WJ, Crawford TB, Gorham JR, Piper RC. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *Journal of Infectious Diseases.* Oxford Academic; 1974 Feb 1;129(2):134–41.

- Cortez-Romero C, Fieni F, Roux C, Russo P, Guibert JM, Guiguen F, et al. Detection of ovine lentivirus in the cumulus cells, but not in the oocytes or follicular fluid, of naturally infected sheep. *Theriogenology*. 2006;66(5):1131–9.
- Cortez-Romero C, Pellerin JL, Ali Al Ahmad MZ, Chebloune Y, Gallegos-Sánchez J, Lamara A, et al. The risk of small ruminant lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: State-of-the-art review. *Theriogenology*. Elsevier Inc; 2013;79(1):1–9.
- Coward JE, Harter DH, Morgan C. Electron microscopic observations of visna virus-infected cell cultures. *Virology*. 1970;40(4):1030–8.
- Crawford TB, Adams DS. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J Am Vet Med Assoc*. 1981;178(7).
- Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science; 1980 Feb 29;207(4434):997–9.
- Crespo H, Bertolotti L, Juganaru M, Glaria I, De Andrés D, Amorena B, et al. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet Res. BioMed Central*; 2013 Sep 26;44(1):1–13.
- Crespo H, Jauregui P, Glaria I, Sanjosé L, Polledo L, García-Marín JF, et al. Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Vet Res*. 2012;43(1):1–6.
- da Cruz JCM, Singh DK, Lamara A, Chebloune Y. Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. *Viruses*. 2013;5(7):1867–84.
- Cueto M, Gibbons A. Inseminación Artificial con Semen Fresco en Ovinos. *Agrovet Market Animal Health* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 23];1–9. Available from: <https://www.agrovetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/inseminacion-artificial-con-semen-fresco-en-ovinos>
- Cutlip RC, Jackson TA, Laird GA. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am J Vet Res*. 1977;38(7).
- Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Brogden KIMA, Sacks M. In a retrospective study , clinical signs and necropsy lesions were com-. 1986;12:283–8.
- Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Brogden KIMA, Schmerr MJOF. Vaccines were prepared from cell culture fluid ( CCF ) that was harvested from embryonic ovine lung ( EOL ) cells infected with WLC-1 strain of OPP virus and concentrated about 50-fold by dialysis with polyethylene glycol . To inactivate the virus , aliqu. 1987;13:201–4.
- Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Whipp SC, McClurkin AW. Effects on ovine fetuses of exposure to ovine progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res*. 1982;43(1).
- Czopowicz M, Szaluś-Jordanow O, Mickiewicz M, Moroz A, Witkowski L, Markowska-Daniel I, et al. Haptoglobin and serum amyloid A in goats with clinical form of caprine arthritis-encephalitis. *Small Ruminant Research*. 2017;156(September):73–7.

- Czopowicz M, Szaluś-Jordanow O, Mickiewicz M, Moroz A, Witkowski L, Markowska-Daniel I, et al. Decline of maternal antibodies to small ruminant lentivirus in goat kids. *Animal Science Journal*. 2018;89(9):1364–70.
- Dahlberg JE, Gaskin JM, Perk K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J Virol*. 1981;39(3):914–9.
- Dawson M, Jeffrey M, Chasey D, Venables C, Sharp JM. Isolation of a syncytium-forming virus from a goat with polyarthritis. *Vet Rec*. 1983;112(14).
- Dawson M, Venables C, Jenkins CE. Experimental infection of a natural case of sheep pulmonary adenomatosis with maedi-visna virus. *Vet Rec*. 1985;116(22):588–9.
- DEFESA. Programa Estadual de Sanidade dos Caprinos e Ovinos [Internet]. Programa Estadual de Sanidade dos Caprinos e Ovinos Sao Paulo. 2001 [cited 2018 Sep 26]. Available from: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/programas/?/sanidade-animal/programa-estadual-de-sanidade-dos-caprinos-e-ovinos/&cod=22>
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Report*. 1983;1(4):19–21.
- Deng H, Dam-Deisz C, Lutikholt S, Maas M, Nielen M, Swart A, et al. Risk factors related to *Toxoplasma gondii* seroprevalence in indoor-housed Dutch dairy goats. *Prev Vet Med*. 2016;124.
- Diedrich CR, Rutledge T, Maiello P, Baranowski TM, White AG, Borish HJ, et al. SIV and *Mycobacterium tuberculosis* synergy within the granuloma accelerates the reactivation pattern of latent tuberculosis. *PLoS Pathog*. Public Library of Science; 2020 Jul 1;16(7):e1008413.
- Dillon JH, Rossi GL, Ferro JL, Zenobi C, Rodríguez Toledo J. Manual de técnicas de diagnóstico serológico para Maedi Visna y Artritis Encefalitis Caprina (CAE) [Internet]. SENASA. 2015a [cited 2020 Sep 4]. p. 1–20. Available from: [http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/SENASA\\_COMUNICA/CP/277/manual.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/SENASA_COMUNICA/CP/277/manual.pdf) Accessed: 2020-09-04
- Dillon JH, Rossi GL, Ferro JL, Zenobi C, Rodríguez Toledo J. Manual de técnicas de diagnóstico serológico para Maedi Visna y Artritis Encefalitis Caprina (CAE) [Internet]. Manual de técnicas de diagnóstico serológico para Maedi Visna y Artritis Encefalitis Caprina. Buenos Aires; 2015b [cited 2021 May 10]. p. 20. Available from: [http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/SENASA\\_COMUNICA/CP/277/manual.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/SENASA_COMUNICA/CP/277/manual.pdf)
- Dodero AM, Gutierrez G, Martinez GM, Chavez M. Protocolo de pasteurización de calostro como inicio en el saneamiento del rodeo lechero. In: Marin, editor. XXI AAVLD. San

- Salvador de Jujuy: Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico; 2016a. p. 1.
- Dodero AM, Micheloud JF, Alfaro JR, Alfaro EJ, Pinto GB, Suarez VH. Caracterización de la enfermedad de la artritis y encefalitis caprina en las provincias de Salta y Jujuy. *FAVE Secc Cienc Vet.* 2017;16(1):7–12.
- Dodero AM, Suarez VH, Bertoni EA, Rossetto C. Enfermedades en hatos caprinos de valles áridos y chaco semiárido. IX Seminario de la fundación Charles Louis Davisavis. Salta, Argentina: Fundación Charles Louis Davis; 2015. p. 1–2.
- Dodero AM, Suarez VH, Salatin AO, Raia NA, Pinto GB. Artritis y encefalitis caprina en las provincias de Salta y Jujuy. In: Marin, editor. XXI AAVLD. San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina: Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico; 2016b. p. 1.
- Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology.* 2002.
- Echeverría Garín I. Identificación de lentivirus de pequeños rumiantes en granulomas post-vacunales y evaluación de métodos de diagnóstico y selección genética en la lucha frente a la infección. [Pamplona]: Universidad Pública de Navarra; 2021.
- Echeverría I, De Miguel R, De Pablo-Maiso L, Glaria I, Benito AA, De Blas I, et al. Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Front Vet Sci. Frontiers Media S.A.*; 2020 Apr 30;7.
- Eduardo Gibbons A, Fernandez J, Macarena Bruno-Galarraga M, Victoria Spinelli M, Isabel Cueto M. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Anim Reprod [Internet].* 2019 [cited 2021 Aug 23];16(4):803–9. Available from: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>
- Elizondo-Salazar JA. Alimentación y manejo del calostro en el ganado de leche. *Agronomía Mesoamericana.* 2007;18(2):271.
- Elizondo-Salazar JA, Jayarao BM, Heinrichs AJ. Effect on bacterial count and immunoglobulin G concentration. *Redvet.* 2008;9(9):unpaginated.
- Elizondo-Salazar JA, Jayarao BM, Heinrichs AJ. Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and immunoglobulin G concentration. *J Dairy Sci. Elsevier;* 2010 Mar 1;93(3):961–7.
- Eltahir YM, Dovas CI, Papanastassopoulou M, Koumbati M, Giadinis N, Verghese-Nikolakaki S, et al. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J Virol Methods.* 2006;135(2).
- Exopol. exopol | autovacunas & diagnóstico [Internet]. [cited 2020 Oct 21]. Available from: [https://www.exopol.com/es/exoone/product.php?lang=es&tipo=small\\_ruminants&\\_kp\\_Ppr=84](https://www.exopol.com/es/exoone/product.php?lang=es&tipo=small_ruminants&_kp_Ppr=84)

- Farnet CM, Bushman F. HIV-1 cDNA integration: Requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell*. 1997;88(4):483–92.
- Fassati A, Goff SP. Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol*. 2001;75(8):3626–35.
- Fieni F, Grant C, Gard-Schnuelle J, Perry G, Wrenzycki C, Blondin P. Research priorities for safe sanitary trade of embryo and semen. *Reprod Fertil Dev*. CSIRO Publishing; 2017a;29(1):161.
- Fieni F, Lamara A, Ali Al Ahmad MZ, Cortez-Romero C, Pellerin JL. Caprine arthritis encephalitis: An example of risk assessment for embryo trading. *Reprod Fertil Dev*. 2017b;29(1).
- Fieni F, Pellerin JL, Roux C, Poulin N, Baril G, Fatet A, et al. Can caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) be transmitted by in vitro fertilization with experimentally infected sperm? *Theriogenology*. 2012;77(3).
- Fieni F, Rowe J, Van Hoosear K, Burucoa C, Oppenheim S, Anderson G, et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenology*. 2002;57(2).
- Fieni F, Rowe J, Van Hoosear K, Burucoa C, Oppenheim S, Anderson G, et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology*. 2003;59(7):1515–23.
- Fras M, Leboeuf A, Labrie FM, Laurin MA, Singh Sohal J, L'Homme Y. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: Multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013;19.
- Ganser-Pornillos BK, Pornillos O. Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. *Nat Rev Microbiol*. Springer US; 2019;17(9):546–56.
- Gao A, Mutharia L, Chen S, Rahn K, Odumeru J. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J Dairy Sci* [Internet]. Elsevier; 2002;85(12):3198–205. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74408-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74408-1)
- Garcia-Etxebarria K, Sistiaga-Poveda M, Jugo B. Endogenous Retroviruses in Domestic Animals. *Curr Genomics*. 2014;15(4).
- Gendelman HE, Narayan O, Molineaux S, Clements JE, Ghotbi Z. Slow, persistent replication of lentiviruses: Role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(20):7086–90.
- Georgsson G. Maedi - Visna. *Pathology and Pathogenesis*. 1990a.

- Georgsson G. Maedi - Visna. Pathology and Pathogenesis. In: Pétursson G, Hoff-Jørgensen R, editors. Maedi-Visna and Related Diseases. Amsterdam: M. Wolfe Publishing Mosby ; 1990b. p. 19–54.
- Giammarioli M, Bazzucchi M, Puggioni G, Brajon G, Dei Giudici S, Taccori F, et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes*. 2011;43(3):380–4.
- Gibbons A, Cueto M, Wolff M. Inseminación artificial en la especie Caprina [Internet]. [www.inta.gov.ar](http://www.inta.gov.ar). 2011 [cited 2021 Aug 24]. p. 1–17. Available from: [https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-manual\\_inseminacion\\_artificial\\_en\\_caprinos.pdf](https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-manual_inseminacion_artificial_en_caprinos.pdf)
- Gibson T. Viability of cartilage after freezing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1957;147(929).
- Gifford R. Viral evolution in deep time: Lentiviruses and mammals. *Trends in Genetics*. 2012. p. 89–100.
- Giovanna Coelho c. Programa Estadual de Sanidade dos Caprinos e Ovinos - Agência Goiana de Defesa Agropecuária [Internet]. Programa Estadual de Sanidade dos Caprinos e Ovinos. 2014 [cited 2018 Sep 26]. Available from: <https://www.agrodefesa.go.gov.br/aceso-a-informacao/2-institucional/65-programa-estadual-de-sanidade.html>
- Gjerset B, Jonassen CM, Rimstad E. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus Res*. 2007;125(2).
- Gjerset B, Storset AK, Rimstad E. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: Characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *Journal of General Virology*. 2006;87(3):573–80.
- Glaria I, Reina R, Ramírez H, De Andrés X, Crespo H, Jauregui P, et al. Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Vet Microbiol*. 2012;155(2–4):137–46.
- Gómez Meza JI. Sanidad animal | SAG | Chile 2016 [Internet]. Informe sanitario animal 2016. 2016 [cited 2020 Aug 27]. p. 1–81. Available from: [https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/informe\\_situacion\\_sanitaria\\_animal-2016.pdf](https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/informe_situacion_sanitaria_animal-2016.pdf)
- Gomez-Lucia E, Barquero N, Doménech A. Maedi-Visna virus: current perspectives. *Veterinary Medicine : Research and Reports*. 2018;9:11–21.
- González B, Reina R, García I, Andrés S, Glaria I, Alzueta M, et al. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine*. 2005;23(34):4342–52.

- Grego E, Bertolotti L, Carrozza M, Profiti M, Mazzei M, Tolari F, et al. Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Vet Microbiol.* 2005 Apr 10;106(3–4):179–85.
- Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, et al. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: Evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *Journal of General Virology.* 2007;
- Hall TA. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95–8.
- Hamza LA, Özkan C. Serological investigation of maedi-visna in sheep with chronic respiratory disease in Erbil, Iraq. *Ataturk Universitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* 2017;12(3):227–34.
- Hansen LJJ, Daoussi R, Vervaeet C, Remon JP, De Beer TRM. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. *Vaccine.* Elsevier Ltd; 2015 Oct 13;33(42):5507–19.
- Hasegawa MY, Meira EBS, Lara MCCSH, Castro RS, Rodrigues JNM, Araújo J, et al. Small ruminant lentivirus variants and related clinical features in goats from southeastern Brazil. *Small Ruminant Research.* Elsevier B.V.; 2016;140:32–6.
- Hayman M, Arbuthnott G, Harkiss GD, Brace H, Filippi P, Philippon V, et al. Neurotoxicity of peptide analogues of the transactivating protein tat from maedi-visna virus and human immunodeficiency virus. *Neuroscience.* 1993;53(1):1–6.
- Hernández Ballesteros JA, Navarrete Méndez R, Benítez Meza JA, Moreno Flores LA, Gómez Gurrola A, Bernal Partida MA. Fertilidad con el uso de inseminación artificial en ovejas [Internet]. BM Editores. 2019 [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://bmeditores.mx/ganaderia/fertilidad-con-el-uso-de-inseminacion-artificial-en-ovejas-2460/>
- Herrmann-Hoesing LM. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:843–55.
- Hötzel I, Bastos E de S, Ravazzolo AP, Moojen V. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26(11):1175–9.
- Hötzel I, Cheevers WP. Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: Host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology.* 2002;301(1):21–31.
- Houwers DJ. Economic Importance, Epidemiology and Control. In: Pétursson G, Hoff-Jørgensen R, editors. *Maedi-Visna and Related Diseases* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1990. p. 83–117. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1613-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1613-8_6)

- Houwers DJ, Gielkens ALJ, Schaake J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet Microbiol. Elsevier*; 1982 Jul 1;7(3):209–19.
- Houwers DJ, König CDW, de Boer GF, Schaake J. Maedi-visna control in sheep I. Artificial rearing of colostrum-deprived lambs. *Vet Microbiol.* 1983;8(2).
- Houwers DJ, Nauta IM. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Vet Microbiol. Elsevier*; 1989 Feb 1;19(2):127–39.
- Huang J, Sun Y, Liu Y, Xiao H, Zhuang S. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA. *Arch Virol.* 2012;157(8):1463–9.
- Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology. Academic Press Inc.*; 2003;46(3):205–29.
- Hughes P, Dowling A, Callinan A. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics and associated risk factors on sheep farms in the lower North Island of New Zealand. *Z Vet J. Taylor & Francis Group* ; 2007;55(4):177–83.
- Hutter S, Martínez Avilés M, Ramírez Matus MC, Maresca R. Uruguay OIE [Internet]. Misión de Evaluación PVS de Seguimiento Uruguay. París; 2014. p. 1–136. Available from: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Support\\_to\\_OIE\\_Members/pdf/PVS-Final-Report-Uruguay-FU.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Support_to_OIE_Members/pdf/PVS-Final-Report-Uruguay-FU.pdf)
- Idoate I, Vander Ley B, Schultz L, Heller M. Acute phase proteins in naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. *Vet Immunol Immunopathol. Elsevier B.V.*; 2015;163(3–4):221–6.
- Iliev PT, Georgieva TM. Acute phase proteins in sheep and goats – function, reference ranges and assessment methods: An overview. *Bulg J Vet Med.* 2018;21(1):1–16.
- Johnson LK, Meyer AL, Zink MC. Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by in situ hybridization, PCR, and cocultivation with susceptible cells. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992;65(3):254–60.
- Juganaru M, Reina R, Bertolotti L, Stella MC, Profiti M, Armentano M, et al. In vitro properties of small ruminant lentivirus genotype E. *Virology.* 2011;410(1):88–95.
- Junkuszew A, Dudko P, Bojar W, Olech M, Osiński Z, Gruszecki TM, et al. Risk factors associated with small ruminant lentivirus infection in eastern Poland sheep flocks. *Prev Vet Med.* 2016a;127:44–9.
- Junkuszew A, Dudko P, Bojar W, Olech M, Osiński Z, Gruszecki TM, et al. Risk factors associated with small ruminant lentivirus infection in eastern Poland sheep flocks. *Prev Vet Med. Elsevier B.V.*; 2016b May 1;127:44–9.

- Juste RA, Minguijón E, Arranz J, Fuertes M, de Heredia IB. Lamb mortality in an outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* mastitis, as a collateral effect of colostrum feeding for Lentivirus-control. *Small Ruminant Research*. Elsevier; 2009 Oct 1;86(1–3):46–51.
- Juste RA, Ott TL, Kwang J, Bazer FW, De La Concha-Bermejillo A. Effects of recombinant interferon- $\tau$  on ovine lentivirus replication. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 1996;16(12).
- Juste RA, Ott TL, Kwang J, Bazer FW, De La Concha-Bermejillo A. Effects of recombinant ovine interferon- $\tau$  on ovine lentivirus replication and progression of disease. *Journal of General Virology*. 2000;81(2):525–32.
- Juste RA, Villoria M, Leginagoikoa I, Ugarte E, Minguijon E. Milk production losses in Latxa dairy sheep associated with small ruminant lentivirus infection. *Prev Vet Med*. 2020;176.
- Kaba J, Czopowicz M, Ganter M, Nowicki M, Witkowski L, Nowicka D, et al. Risk factors associated with seropositivity to small ruminant lentiviruses in goat herds. *Res Vet Sci*. 2013;94(2):225–7.
- Karr BM, Chebloune Y, Leung K, Narayan O. Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*. 1996;225(1):1–10.
- Keen J, Kwang J, Littledike ET, Hungerford LL. Ovine lentivirus antibody detection in serum, colostrum and milk using a recombinant transmembrane protein ELISA. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996;51(3–4):253–75.
- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 5th ed. Scion Publishing, editor. *Folia Histochem Cytobiol*. Oxford: Scion Publishing; 2015.
- Konishi M, Nagura Y, Takei N, Fujita M, Hayashi K, Tsukioka M, et al. Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. *Small Ruminant Research*. 2011 Jul;99(1):65–71.
- Korber B. SNAP: Synonymous Non-synonymous Analysis Program. *HIV Signature and Sequence Variation Analysis*. Computational Analysis of HIV Molecular Sequences, Chapter 4. Dordrecht, Netherlands: Rodrigo and Gerald H. Learn, eds. Kluwer Academic Publishers.; 2000. p. 55–72.
- Korber BT, Kunstman KJ, Patterson BK, Furtado M, McEvelly MM, Levy R, et al. Genetic differences between blood- and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences. *J Virol*. 1994;68(11):7467–81.
- Krebs FC, Miller SR, Malamud D, Howett MK, Wigdahl B. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. *Antiviral Res*. Elsevier; 1999;43(3):157–73.

- Kristbjörnsdóttir HB, Andrésdóttir V, Svansson V, Torsteinsdóttir S, Matthíasdóttir S, Andrésón ÓS. The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Virology*. 2004;318(1):350–9.
- Kuhar U, Barlič-Maganja D, Grom J. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses detected in Slovenia. *Vet Microbiol*. 2013;162(1):201–6.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547–9.
- van Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bölske G, van der Logt JT, et al. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(1):149–52.
- De La Concha-Bermejillo A. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1997;13(1):13–34.
- De La Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ, DeMartini JC. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am J Vet Res*. 1996;57(5):684–8.
- Lacerenza D, Giammarioli M, Grego E, Marini C, Profiti M, Rutili D, et al. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;112(3–4):264–71.
- Lago N, López C, Panadero R, Cienfuegos S, Pato J, Prieto A, et al. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. *Prev Vet Med*. 2012;103(2–3).
- Lamara A, Fieni F, Chatagnon G, Larrat M, Dubreil L, Chebloune Y. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. Elsevier Ltd; 2013;36(4):397–404.
- Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Chatagnon G, Bruyas JF, Tainturier D, et al. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology*. Elsevier; 2002a Oct 1;58(6):1153–63.
- Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Tainturier D, Chebloune Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res*. 2001;79(1–2):165–72.
- Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Tainturier D, Chebloune Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV). *Virus Res*. Elsevier; 2002b Jul 1;87(1):69–77.
- Landis JR, Koch GG. An Application of Hierarchical Kappa-type Statistics in the Assessment of Majority Agreement among Multiple Observers. *Biometrics*. 1977;33(2).
- Lang B. Colostrum for the Dairy Calf. Evaluation. 2008;(08):1–4.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947–8.

- Lee WC, McConnell I, Blacklaws BA. Cytotoxic activity against maedi-visna virus-infected macrophages. *J Virol*. 1994;68(12):8331–8.
- Leginagoikoa I, Daltaubuit-Test M, Álvarez V, Arranz J, Juste RA, Amorena B, et al. Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. *Res Vet Sci* [Internet]. 2006a;80(2):235–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528805001062>
- Leginagoikoa I, Juste RA, Barandika J, Amorena B, de Andrés D, Luján L, et al. Extensive rearing hinders Maedi-Visna Virus (MVV) infection in sheep. *Vet Res*. 2006b;37(6):767–78.
- Leginagoikoa I, Minguijón E, Berriatua E, Juste RA. Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *J Virol Methods*. 2009;156(1):145–9.
- Leitner G, Krifucks O, Weisblit L, Lavi Y, Bernstein S, Merin U. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Veterinary Journal*. 2010 Mar;183(3):328–31.
- Leitner G, Silanikove N, Merin U. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research*. 2008;74(1–3):221–5.
- Lerondelle C, Godet M, Mornex JF. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet Res*. 1999;30(5–6).
- Lerondelle C, Ouzrout R. Expression of maedi-visna virus in mammary secretions of a seropositive ewe. *Dev Biol Stand*. 1990;72.
- Leroux C, Chastang J, Greenland T, Mornex JF. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: Existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol*. 1997a;142(6):1125–37.
- Leroux C, Lerondelle C, Chastang J, Mornex JF. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet Res*. 1997b;28(2):115–21.
- Leroux C, Minardi CJ, Mornex J-F. SRLVs: A Genetic Continuum of Lentiviral Species in Sheep and Goats with Cumulative Evidence of Cross Species Transmission. *Curr HIV Res*. 2010;8(1).
- Leroux C, Vuillermoz S, Mornex JF, Greenland T. Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *Journal of General Virology*. 1995;76(6):1533–7.
- Lezama Carrasco J. Radiofarmacia y radioinmunoanálisis. *Educación Química*. 2018;8(1):17.

- L'Homme Y, Ouardani M, Lévesque V, Bertoni G, Simard C, Pisoni G. Molecular characterization and phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses isolated from Canadian sheep and goats. *Viol J. BioMed Central*; 2011 Jun 3;8(1):1–7.
- Lin FH, Thormar H. Ribonucleic Acid-Dependent Deoxyribonucleic Acid Polymerase in Visna Virus. *J Virol*. 1970;6(5):702–4.
- Liu SC, Karasek M. Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. *Journal of Investigative Dermatology*. 1978;71(2):157–64.
- Loman DC. Het Texels schaap. *Magazijn voor Landbouw en Kruidkunde II*. 1862;66–70.
- Luján L, Begara I, Collie DDS, Watt NJ. Ovine Lentivirus (Maedi-visna Virus) Protein Expression in Sheep Alveolar Macrophages. *Vet Pathol*. 1994;31(6):695–703.
- Luján L, Gómez N, Bolea R. Cuadro clínico y lesional. *Ovis*. 2001;(72):36–52.
- Luján L, Gómez N, Bolea R, García-Marín JF, Varea R, Vargas A, et al. *Ovis: Tratado de Patología y Producción Ovina*. Ovis. Luzan 5; 1989.
- Luján L, Pérez M, de Andrés D, Reina R. Pulmonary lentivirus infection in sheep. *Small Ruminant Research*. 2019;181.
- Lyll JW, Solanky N, Tiley LS, Lyll JW, Tiley LS. Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *Journal of General Virology* [Internet]. Microbiology Society; 2000 Dec 1 [cited 2018 Apr 24];81(12):2919–27. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-81-12-2919>
- Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9).
- MAPA. Sanidade de Caprinos e Ovinos [Internet]. Sanidade de Caprinos e Ovinos. 2017 [cited 2018 Sep 26]. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/sanidade-de-caprinos-e-ovinos>
- Marchesin DM, Moojen V, Ravazzolo AP. Molecular characterization of part of the gag gene of caprine arthritis-encephalitis virus isolated from naturally infected goats from Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 1998;18(3–4):119–26.
- Marin RE, Setti W, Carrillo BJ, Wooton S. Descripción de un caso de adenomatosis pulmonar ovina en la Puna de Jujuy, Argentina. *Sitio Argentino de Producción Animal*. 2012;29(289):1–5.
- Martínez Navalón BM, Peris Ribera CP, Roche Julián ML, Caballero C. Efectos del virus de la artritis-encefalitis caprina sobre la producción y composición de la leche en cabras murciano-granadinas. *PR: pequeños rumiantes*. 2002;3(3):26–30.
- Martínez-Navalón B, Peris C, Gómez EA, Peris B, Roche ML, Caballero C, et al. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production

- by dairy goats. *Veterinary Journal* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;197(2):311–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.020>
- McGann LE, Stevenson M, Muldrew K, Schachar N. Kinetics of osmotic water movement in chondrocytes isolated from articular cartilage and applications to cryopreservation. *Journal of Orthopaedic Research*. 1988;6(1).
- McGuire TC, Adams DS, Johnson GC, Klevjer-Anderson P, Barbee DD, Gorham JR. Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats. *Am J Vet Res*. 1986;47(3).
- Menéndez-Arias L, Sebastián-Martín A, Álvarez M. Viral reverse transcriptases. *Virus Res*. Elsevier B.V.; 2017;234:153–76.
- Meryman HT, Williams RJ, Douglas MSJ. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*. 1977;14(3).
- Michiels R, Adjadj NR, de Regge N. Phylogenetic analysis of belgian small ruminant lentiviruses supports cross species virus transmission and identifies new subtype B5 strains. *Pathogens* [Internet]. MDPI AG; 2020 Mar 1 [cited 2020 Oct 28];9(3):183. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/3/183>
- de Miguel R, Arrieta M, Rodríguez-Largo A, Echeverría I, Resendiz R, Pérez E, et al. Worldwide Prevalence of Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Animals* 2021, Vol. 11, Page 784 [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021 Mar 11 [cited 2021 Sep 14];11(3):784. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/3/784/htm>
- Milczewski V, Sotomaior C, Reischak D, Von Groll A, editors. Relato do primeiro isolamento do vírus maedi-visna no Estado do Paraná. In: XXV Congr. Bras. Med. Vet., p. 179. XXV Congr. Bras. Med. Vet. 1997.
- Minagri. BOLETIN OFICIAL REPUBLICA ARGENTINA - MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y PESCA - Resolución 597/2014 [Internet]. BO - Resolución 597/2014. 2014 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/111694/20140909?busqueda=1>
- Minagri. BOLETIN OFICIAL REPUBLICA ARGENTINA - MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA - Resolución 528/2016 [Internet]. BO- Resolución 528/2016. 2016 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/151302/20160923>
- Minguijón E, Reina R, Pérez M, Polledo L, Villoria M, Ramírez H, et al. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet Microbiol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;181(1–2):75–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.007>

- Molae V, Bazzucchi M, de Mia GM, Otarod V, Abdollahi D, Rosati S, et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–12.
- Mselli-Lakhal L, Favier C, Leung K, Guiguen F, Grezel D, Miossec P, et al. Lack of Functional Receptors Is the Only Barrier That Prevents Caprine Arthritis-Encephalitis Virus from Infecting Human Cells. *J Virol.* 2000;74(18):8343–8.
- Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, Du J, Favier C, Durand J, et al. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology.* 1999;259(1):67–73.
- Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, Favier C, Durand J, Grezel D, et al. Immortalized goat milk epithelial cell lines replicate CAEV at high level. *Vet Res.* 2001;32(5):429–40.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol.* Academic Press; 1987 Jan 1;155(C):335–50.
- Nakagawa M, Motoi Y, Iizuka M, Azuma R. Histopathology of enzootic chronic polyarthritis of goats in Japan. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo).* 1971;11(4):191-undefined.
- Nalbert T, Czopowicz M, Szaluś-Jordanow O, Witkowski M, Witkowski L, Słoniewska D, et al. Impact of the subclinical small ruminant lentivirus infection of female goats on the litter size and the birth body weight of kids. *Prev Vet Med.* 2019;165.
- Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *Journal of General Virology.* 1989;70(7):1617–39.
- Narayan O, Clements JE, Strandberg JD, Cork LC, Griffin DE. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *Journal of General Virology.* Microbiology Society; 1980 Sep 1;50(1):69–79.
- Narayan O, Griffin DE, Clements JE. Virus mutation during “slow infection”: Temporal development and characterization of mutants of Visna virus recovered from sheep. *Journal of General Virology.* 1978;41(2):343–52.
- Narayan O, Griffin DE, Silverstein AM. Slow virus infection: Replication and mechanisms of persistence of visna virus in sheep. *Journal of Infectious Diseases.* 1977;135(5):800–6.
- Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Sheffer D, Griffin DE, Clements JE. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect Immun.* 1983;41(1):67–73.
- Narayan O, Wolinsky JS, Clements JE, Strandberg JD, Griffin DE, Cork LC. Slow virus replication: The role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *Journal of General Virology.* 1982;59(2):345–56.
- Narayan O, Zink MC, Gorrell M, Crane S, Huso DL, Jolly P, et al. The Lentiviruses of Sheep and Goats. *The Retroviridae.* 1993.
- Nermut M V., Fassati A. Structural Analyses of Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 Intracellular Reverse Transcription Complexes. *J Virol.* 2003;77(15):8196–206.

- Ney Rômulo de Oliveira P, Andrioli A, Cardoso J de FS, Pinheiro RR, Sousa FML, Souza KC de, et al. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Ruminant Research*. 2009;85(1):27–33.
- Niesters HGM. Clinical virology in real time. *Journal of Clinical Virology*. 2002.
- Nowicka D, Czopowicz M, Szaluś-Jordanow O, Witkowski L, Bagnicka E, Kaba J. Seropositive bucks and within-herd prevalence of small ruminant lentivirus infection. *Central European Journal of Immunology*. Termedia Publishing House Ltd.; 2015;40(3):283–6.
- OIE. OIE - HANDISTATUS II - Situación zoonosanitaria plurianual CAEV [Internet]. Situación zoonosanitaria 1994-2004 CAEV. 2005a [cited 2020 Aug 27]. Available from: [http://web.oie.int/hs2/sit\\_mald\\_freq\\_pl.asp?c\\_cont=2&c\\_mald=49](http://web.oie.int/hs2/sit_mald_freq_pl.asp?c_cont=2&c_mald=49)
- OIE. OIE - HANDISTATUS II - Situación zoonosanitaria plurianual Maedi Visna [Internet]. Situación zoonosanitaria 1994-2004 Maedi Visna. 2005b [cited 2020 Aug 27]. Available from: [http://web.oie.int/hs2/sit\\_mald\\_freq\\_pl.asp?c\\_cont=2&c\\_mald=57](http://web.oie.int/hs2/sit_mald_freq_pl.asp?c_cont=2&c_mald=57)
- OIE. Systema Mundial de Información zoonosanitaria Maedi Visna [Internet]. Mapas de distribución de las enfermedades. 2009a [cited 2020 Aug 27]. Available from: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail)
- OIE. Systema Mundial de Información zoonosanitaria CAEV [Internet]. Mapas de distribución de las enfermedades. 2009b [cited 2020 Aug 27]. Available from: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail)
- OIE. OIE World Animal Health Information System MV [Internet]. OIE 2020. 2020a [cited 2020 Oct 6]. Available from: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail)
- OIE. OIE World Animal Health Information System CAE [Internet]. OIE 2020. 2020b [cited 2020 Oct 6]. Available from: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail)
- OIE. Enfermedades Animales - OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal [Internet]. <https://www.oie.int>. 2021a [cited 2021 Sep 15]. Available from: <https://www.oie.int/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/enfermedades-animales/>
- OIE. Acceso en línea al Código Terrestre - OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal [Internet]. <https://www.oie.int>. 2021b [cited 2021 Sep 15]. Available from: [https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre\\_caprine\\_arthritis\\_encephalitis.htm](https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_caprine_arthritis_encephalitis.htm)
- Olech M, Kubi P, Lipecka C, Junkuszew A, Gruszecki TM, Kumak J. Presence of specific antibodies and proviral DNA of small ruminant lentiviruses in lambs in their first weeks of life. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2014;58(4):507–11.

- Olech M, Kycko A, Kuźmak JK. Molecular Characterization of Small Ruminant Lentiviruses Isolated from Polish Goats with Arthritis. *Viruses* 2022, Vol. 14, Page 735 [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2022 Mar 31 [cited 2022 May 5];14(4):735. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/4/735/htm>
- Olech M, Rachid A, Croise B, Kuźmak J, Valas S. Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res.* Elsevier; 2012 Feb 1;163(2):528–36.
- Olech M, Valas S, Kuźmak J. Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. Roques P, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2018 Mar 5;13(3):e0193892.
- Oliver RE, Adams DS, Gorham JR, Julian AF, McNiven RA, Muir J. Isolation of caprine arthritis-encephalitis virus from a goat. *N Z Vet J.* Taylor & Francis Group ; 1982;30(10):147–9.
- Olivier M, Berthon P, Chastang J, Cordier G, Lantier F. Establishment and characterisation of ovine blood monocyte-derived cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;82(3–4):139–51.
- O’Sullivan BM, Eaves FW, Baxendell SA, Rowan KJ. LEUCOENCEPHALOMYELITIS OF GOAT KIDS. *Aust Vet J.* 1978;54(10):479–83.
- Pal A, Chakravarty AK. Disease resistance for different livestock species. *Genetics and Breeding for Disease Resistance of Livestock.* Elsevier; 2020. p. 271–96.
- Pálsson PA. Maedi-visna. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* 1972;6:115–20.
- Pálsson PA. Maedi and visna in sheep. *Front. Biol.* 1976;44:17–43.
- Panei CJ, Gos ML, Valera AR, Galosi CM, Echeverria MG. First isolation and nucleotide comparison of the gag gene of the caprine arthritis encephalitis virus circulating in naturally infected goats from Argentina. *Open Vet J [Internet].* 2017;7(1):32–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28331831><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5356288><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28331831><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5356288>
- Pasick J. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct Species or Quasispecies and its Implications for Laboratory Diagnosis. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 1998;62(4):241–4.
- Pearson LD, Poss ML, Demartini JC. *Animal Lentivirus Vaccines : Problems and Prospects.* 1989;20:183–212.
- Peluso R, Haase AT, Stowring L, Edwards M, Ventura P. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology.* 1985;147(1):231–6.
- Pépin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E. Maedi-visna virus infection in sheep: A review. *Vet Res.* 1998;29(3–4):341–67.

- Pérez M, Biescas E, de Andrés X, Leginagoikoa I, Salazar E, Berriatua E, et al. Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón (Spain). *Veterinary Journal*. 2010;186(2).
- Pérez M, Biescas E, Reina R, Glaria I, Marín B, Marquina A, et al. Small Ruminant Lentivirus–Induced Arthritis: Clinicopathologic Findings in Sheep Infected by a Highly Replicative SRLV B2 Genotype. *Vet Pathol*. 2015;52(1):132–9.
- Pérez M, Muñoz JA, Biescas E, Salazar E, Bolea R, de Andrés D, et al. Successful Visna/maedi control in a highly infected ovine dairy flock using serologic segregation and management strategies. *Prev Vet Med. Elsevier*; 2013 Nov 1;112(3–4):423–7.
- Pérez Villalobos N. Herramientas innovadoras en el diagnóstico del síndrome respiratorio bovino (SRB). [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria; 2016.
- Peterhans E, Greenland T, Badiola JJ, Harkiss GD, Bertoni G, Amorena B, et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res*. 2004;35(3):257–74.
- Peterson K, Brinkhof J, Houwers DJ, Colenbrander B, Gadella BM. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*. 2008;69(4):433–42.
- Pétursson G. Experience with Visna Virus in Iceland. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;724(1):43–9.
- Pétursson G, Matthíasdóttir S, Svansson V, Andrésdóttir V, Georgsson G, Martin AH, et al. Mucosal vaccination with an attenuated maedi-visna virus clone. *Vaccine*. 2005;23(24):3223–8.
- Pinczowski P, Sanjosé L, Gimeno M, Crespo H, Glaria I, Amorena B, et al. Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Vet Pathol*. 2017;54(3):413–24.
- Piret J, Desormeaux A, Bergeron MG. Sodium Lauryl Sulfate, a Microbicide Effective Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. *Curr Drug Targets. Bentham Science Publishers Ltd.*; 2005 Mar 25;3(1).
- Pisoni G, Bertoni G, Puricelli M, Maccalli M, Moroni P. Demonstration of Coinfection with and Recombination by Caprine Arthritis-Encephalitis Virus and Maedi-Visna Virus in Naturally Infected Goats. *J Virol*. 2007a;81(10):4948–55.
- Pisoni G, Moroni P, Turin L, Bertoni G. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology*. 2007b;369(1):119–30.
- Pisoni G, Quasso A, Moroni P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology*. 2005;339(2):147–52.

- Poletti V, Mavilio F. Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. Elsevier Ltd.; 2018;8(March):31–41.
- Power C, Richardson S, Briscoe M, Pasick J. 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. *Clin Diagn Lab Immunol*. American Society for Microbiology; 1995;2(5):631–3.
- Prezioso S, Renzoni G, Allen TE, Taccini E, Rossi G, Demartini JC, et al. Colostral transmission of maedi visna virus: Sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Vet Microbiol*. 2004;104(3–4):157–64.
- Prezioso S, Sanna E, Sanna MP, Loddo C, Cerri D, Taccini E, et al. Association of Maedi Visna Virus with *Brucella ovis* infection in rams. *European Journal of Histochemistry*. 2003;47(2):151–7.
- Quérat G, Barban V, Sauze N, Filippi P, Vigne R, Russo P, et al. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J Virol*. 1984;52(2):672–9.
- QuestionPro.com. Calculadora de tamaño de muestra | QuestionPro [Internet]. Calculadora de tamaño muestral. 2021 [cited 2021 May 18]. Available from: <https://www.questionpro.com/es/calculadora-de-muestra.html>
- Ramírez H. Universidad pública de navarra. 2010;
- Ramírez H, Reina R, Amorena B, de Andrés D, Martínez HA. Small ruminant Lentiviruses: Genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses*. 2013.
- Ramírez H, Reina R, Bertolotti L, Cenoz A, Hernández MM, San Román B, et al. Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Vet Res*. 2012;8.
- Ramírez H, Román BS, Glaria I, Reina R, Hernández MM, De Andrés X, et al. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology*. 2009;72(8):1085–96.
- Rampersad S, Tennant P. Replication and Expression Strategies of Viruses. *Viruses: Molecular Biology, Host Interactions, and Applications to Biotechnology*. Elsevier; 2018. p. 55–82.
- Ravazzolo AP, Nenci C, Vogt HR, Waldvogel A, Obexer-Ruff G, Peterhans E, et al. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*. 2006;350(1):116–27.
- Ravazzolo AP, Reischak D, Peterhans E, Zanoni R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Res*. 2001 Oct 5;79(1–2):117–23.

- Reczyńska D, Zalewska M, Czopowicz M, Kaba J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Acute phase protein levels as an auxiliary tool in diagnosing viral diseases in ruminants—A review. *Viruses*. 2018.
- De Regge N, Cay B. Development, validation and evaluation of added diagnostic value of a q(RT)-PCR for the detection of genotype A strains of small ruminant lentiviruses. *J Virol Methods*. Elsevier B.V.; 2013;194(1–2):250–7.
- Reina R, Barbezange C, Niesalla H, De Andrés X, Arnarson H, Biescas E, et al. Mucosal immunization against ovine lentivirus using PEI-DNA complexes and modified vaccinia Ankara encoding the gag and/or env genes. *Vaccine*. 2008;26(35):4494–505.
- Reina R, Berriatua E, Luján L, Juste RA, Sánchez A, de Andrés D, et al. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *Veterinary Journal*. 2009a;182(1):31–7.
- Reina R, Bertolotti L, Dei Giudici S, Puggioni G, Ponti N, Profiti M, et al. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet Microbiol*. 2010;144(1–2):24–31.
- Reina R, Grego E, Bertolotti L, De Meneghi D, Rosati S. Genome Analysis of Small-Ruminant Lentivirus Genotype E: a Caprine Lentivirus with Natural Deletions of the dUTPase Subunit, vpr-Like Accessory Gene, and 70-Base-Pair Repeat of the U3 Region. *J Virol*. 2009b;83(2):1152–5.
- Reina R, Mora MI, Glaria I, García I, Solano C, Luján L, et al. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res*. 2006;121(2):189–98.
- Resino S. Reacciones inmunoenzimáticas II [Internet]. EMEI. 2011 [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://epidemiologiamolecular.com/reacciones-inmunoenzimaticas-ii/>
- Resnick L, Veren K, Salahuddin SZ, Tondreau S, Markham PD. Stability and Inactivation of HTLV-III/LAV Under Clinical and Laboratory Environments. *JAMA* [Internet]. American Medical Association; 1986 Apr 11 [cited 2021 Sep 2];255(14):1887–91. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/403632>
- Reyburn HT, Roy DJ, Blacklaws BA, Sargan DR, McConnell I. Expression of maedi-visna virus major core protein, p25: development of a sensitive p25 antigen detection assay. *J Virol Methods*. Elsevier; 1992 Jun 1;37(3):305–20.
- Ridler AL, Smith SL, West DM. Seroconversion and semen shedding in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *N Z Vet J*. 2014;62(1).
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat*. versión 24. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba; 2011.
- Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, DeRock E, Pedersen NC. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res*. 1993;54(11):1858–62.

- Ritchie C, Hosie B. Health schemes: Increase in maedi-visna breakdowns. *Veterinary Record*. 2010.
- Robles C, Layana JE, Cabrera RF, Raffo F, Cutlip RC. Estudio serológico retrospectivo de Maedi (Neumonía Progresiva) en ovinos y de Artritis- Encefalitis en caprinos de Patagonia, ARGENTINA. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2003;84(3):96–9.
- Robles C, Martinez A. Artritis encefalitis caprina ( AEC ): una enfermedad que genera controversias. *Revista Presencia*. 2017;67:34–8.
- Robles C, Uzal F. Guía práctica de necropsia en ovinos y caprinos. 1st ed. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur S.A; 2001.
- Rolland M, Chauvineau C, Valas S, Mamoun RZ, Perrin G. Establishment and characterization of a goat synovial membrane cell line susceptible to small ruminant lentivirus infection. *J Virol Methods*. 2004;118(2):123–30.
- Rosati S, Profiti M, Lorenzetti R, Bandecchi P, Mannelli A, Ortoffi M, et al. Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. *J Virol Methods*. 2004;121(1):73–8.
- Rossanigo CE, Delgado F, Alvarez I, Delgado F. PRESENTACIÓN CLINICA DE UN CASO DE ARTRITIS-ENCEFALITIS CAPRINA (CAE) y TOXOPLASMOSIS EN SAN LUIS (ARGENTINA). In: Marin, editor. XXI AAVLD. San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina: Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico; 2016. p. 10–2.
- Rowe JD, East NE. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. Elsevier; 1997 Mar 1;13(1):35–53.
- Rowe JD, East NE, Franti CE, Thurmond MC, Pedersen NC, Theilen GH. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *Am J Vet Res* [Internet]. 1992a Dec 1 [cited 2021 Jun 7];53(12):2396–403. Available from: <https://europepmc.org/article/med/1335710>
- Rowe JD, East NE, Thurmond MC, Franti CE, Pedersen NC. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am J Vet Res*. 1992b;53(12):2386–95.
- Roy DJ, Watt NJ, Ingman T, Houwers DJ, Sargan DR, McConnell I. A simplified method for the detection of maedi-visna virus RNA by in situ hybridization. *J Virol Methods*. 1992;36(1):1–11.
- Ruiz V, Porta NG, Lomonaco M, Trono K, Alvarez I. Bovine Leukemia virus infection in neonatal calves. risk factors and control measures. *Front Vet Sci*. 2018;5(OCT):1–7.
- Ryan DP, Greenwood PL, Nicholls PJ. Effect of Caprine Arthritis—Encephalitis Virus Infection on Milk Cell Count and N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase Activity in Dairy Goats. *Journal of Dairy Research*. 1993;60(3):299–306.

- Ryan S, Tiley L, McConnell I, Blacklaws BA. Infection of Dendritic Cells by the Maedi-Visna Lentivirus. *J Virol*. 2000;74(21):10096–103.
- Ryu W-S. Retroviruses. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. 2017;227–46.
- SAG. Sanidad animal | SAG | Chile [Internet]. Informe sanitario animal 2017. Santiago de Chile; 2017 [cited 2018 Sep 25]. p. 1–94. Available from: [http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/informe\\_situacion\\_sanitaria\\_animal-2017.pdf](http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/informe_situacion_sanitaria_animal-2017.pdf)
- Saltarelli M, Querat G, Konings DAM, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*. 1990;179(1):347–64.
- Sánchez A, Rodríguez D, Garzón A, Amorena B, Esteban M, Rodríguez JR. Visna/maedi virus Env protein expressed by a vaccinia virus recombinant induces cell-to-cell fusion in cells of different origins in the apparent absence of Env cleavage: Role of glycosylation and of proteoglycans. *Arch Virol*. 2002;147(12):2377–92.
- Sánchez JH, Martínez HA, García MM, Garrido G, Gómez L, Aguilar JA, et al. The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology*. Elsevier Inc; 2016;86(8):1953-1957.e1.
- Sanna E, Sanna MP, Vitali CG, Renzoni G, Sanna L, Spano S, et al. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Comp Pathol*. 1999;121(3):271–6.
- Santry LA, de Jong J, Gold AC, Walsh SR, Menzies PI, Wootton SK. Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario, Canada. *Virus Res*. Elsevier B.V.; 2013;175(1):30–44.
- Schaer J, Cvetnic Z, Sukalic T, Dörig S, Grisiger M, Iscaro C, et al. Evaluation of Serological Methods and a New Real-Time Nested PCR for Small Ruminant Lentiviruses. *Pathogens* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2022 Jan 1 [cited 2022 May 10];11(2). Available from: </pmc/articles/PMC8875174/>
- Schalie J Vander, Bradway DS, Besser TE, Evermann JF. Evaluation of a kinetic enzyme-linked immunosorbent assay for detection of caprine arthritis-encephalitis virus-specific antibodies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1994;6(1):30–3.
- Schipper IA, Light MR, Ludeman L. Control of ovine progressive pneumonia (OPP). *N. Dakota Farm Res*. [Internet]. 1985 [cited 2021 Aug 27];43:30–1. Available from: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-78149413192&origin=inward>
- Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F, et al. HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell*. 2002;110(4):521–9.
- SENASA. MAGyP [Internet]. Existencias Caprinas. 2023 [cited 2023 Jan 23]. Available from: <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/caprinos/estadisticas/>

- Shah C, Böni J, Huder JB, Vogt HR, Mühlherr J, Zanoni R, et al. 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*. 2004a;319(1):12–26.
- Shah C, Huder JB, Böni J, Schönmann M, Mühlherr J, Lutz H, et al. Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *J Virol*. 2004b;78(14):7518–22.
- Shuljak BF. Lentiviruses in ungulates. I. General features, history and prevalence. *Bulg J Vet Med*. 2006;9(No3):175–181.
- Sierra CA. Indicators of well-being in tropical bovine: A vision from stress and the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Revista Veterinaria. Universidad Nacional de Nordeste (UNNE)*; 2019 Dec 13;30(2):101–14.
- Sigurdardóttir B, Thormar H. Isolation of a Viral Agent from the Lungs of Sheep Affected with Maedi. *J Infect Dis*. 1964;114(1):55–60.
- Sigurdsson B. Vaccination against paratuberculosis (Johne's disease). *J Immunol*. 1952;68(5):559–65.
- Sigurdsson B. RIDA, A Chronic Encephalitis of Sheep. *British Veterinary Journal. Elsevier BV*; 1954 Sep 1;110(9):341–54.
- Sigurdsson B. Immunological problems in paratuberculosis. *Bacteriol Rev. American Society for Microbiology (ASM)*; 1956;20(1):1–13.
- Sigurdsson B. Adenomatosis of sheep's lungs - Experimental Transmission. *Arch Gesamte Virusforsch. Springer-Verlag*; 1958 Feb;8(1):51–8.
- Sigurdsson B, Grímsson H, Pálsson P. Maedi, a chronic, progressive infection of sheep's lungs. *Journal of Infectious Diseases*. 1952;90(3):233–41.
- Sigurdsson B, Pálsson PA. Visna of sheep; a slow, demyelinating infection. *Br J Exp Pathol*. 1958;39(5):519–28.
- Sigurdsson B, Pálsson PA, Grímsson H. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1957;16(3):390–403.
- Sigurdsson B, Thormar H, Pálsson PA. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1960;10(3).
- Sihvonen L, Nuotio L, Rikula U, Hirvelä-Koski V, Kokkonen UM. Preventing the spread of maedi-visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. *Prev Vet Med*. 2000;47(3).
- da Silva Teixeira MF, Lambert V, Mselli-Lakahl L, Chettab A, Chebloune Y, Mornex JF. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *Am J Vet Res. Am J Vet Res*; 1997 Jun;58(6):579–84.

- Simard CL, Briscoe MR. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can J Vet Res.* 1990;54(4):451–6.
- Singh DK, Chebloune Y, Mselli-Lakhal L, Karr BM, Narayan O. Ovine lentivirus-infected macrophages mediate productive infection in cell types that are not susceptible to infection with cell-free virus. *Journal of General Virology.* 1999;80(6):1437–44.
- Skjerve E, Waldeland H, Nesbakken T, Kapperud G. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev Vet Med.* 1998;35(3).
- Snowder GD, Gates NL, Glimp HA, Gorham JR. Prevalence and effect of subclinical ovine progressive pneumonia virus infection on ewe wool and lamb production. *J Am Vet Med Assoc.* 1990;197(4).
- Sonigo P, Alizon M, Staskus K, Klatzmann D, Cole S, Danos O, et al. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell.* 1985;42(1):369–82.
- de Sousa ALM, Pinheiro RR, Araújo JF, de Azevedo DAA, Peixoto RM, Andrioli A, et al. Sodium dodecyl sulfate as a viral inactivator and future perspectives in the control of small ruminant lentiviruses. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* [Internet]. Instituto Biológico; 2019 Nov 28 [cited 2021 Aug 16];86:1–9. Available from: <http://www.scielo.br/j/aib/a/4pbDxkGS7y5dCxm7hTVT5qF/?lang=en>
- Souza de Oliveira Nascimento V, de Oliveira Pinheiro G, da Silva Lima E. The Importance of Artificial Breastfeeding in Goat Breeding-Literature Review [Internet]. *Revista Electronica de Veterinaria.* 2020 Jun. Available from: <http://www.veterinaria.org>
- Stabel JR. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *J Dairy Sci* [Internet]. Elsevier; 2001;84(2):524–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74503-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74503-1)
- Stabel JR, Hurd S, Calvente L, Rosenbusch RF. Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. in raw milk by a commercial on-farm high-temperature, short-time pasteurizer. *J Dairy Sci* [Internet]. Elsevier; 2004;87(7):2177–83. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70038-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70038-7)
- Staskus KA, Couch L, Bitterman P, Retzel EF, Zupancic M, List J, et al. In situ amplification of visna virus DNA in tissue sections reveals a reservoir of latently infected cells. *Microb Pathog.* 1991;11(1):67–76.
- Stavrou D, Deutschlander N, Dahme E. Granulomatous encephalomyelitis in goats. *J. Comp. Pathol.* 1969;79:393–6.
- Stowring L, Haase AT, Charman HP. Serological definition of the lentivirus group of retroviruses. *J Virol.* 1979;29(2):523–8.

- Stunzi HF, Buchi HL, Le Roy RL, Leemann W. Endemic arthritis chronica of goat. Schweiz. Arch. f. Tierheilk. 1964;12(106):778–88.
- Suarez VH, Doderó AM, Martínez Almudevar F, Bertoni EA, Salatin AO, Viñabal AE, et al. Presencia de enfermedades y prácticas de manejo en majadas caprinas de los valles templados del noroeste argentino. RAVE. 2017a;XXXIV(10805):1–25.
- Suarez VH, Martínez GM, Nievas JD, Quiroga Roger J. Prácticas de manejo y producción en sistemas familiares de cría caprina en las quebradas áridas de Jujuy y Salta. RIA [Internet]. 2017b [cited 2020 Aug 28];43(2):186–94. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/864/86452401015.pdf>
- Suarez VH, Rosetto CB, Gaido AB, Salatin AO, Bertoni EA, Doderó AM, et al. Prácticas de manejo y presencia de enfermedades en majadas caprinas de la región del chaco salteño. Revista Veterinaria Argentina. 2015;32(332):23.
- Sundquist B. Goat visna virus: Isolation of a retrovirus related to visna virus of sheep. Arch Virol. Springer-Verlag; 1981 Jun;68(2):115–27.
- Tadich N. Bienestar animal en bovinos lecheros. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2011 Sep;24(3):293–300.
- Takemoto KK, Mattern CFT, Stone LB, Coe JE, Lavelle G. Antigenic and Morphological Similarities of Progressive Pneumonia Virus, a Recently Isolated “Slow Virus” of Sheep, to Visna and Maedi Viruses. J Virol. 1971;7(3):301–8.
- Takeuchi JS, Ren F, Yoshikawa R, Yamada E, Nakano Y, Kobayashi T, et al. Coevolutionary dynamics between tribe Cercopithecini tetherins and their lentiviruses. Sci Rep. 2015;5.
- Tecles F, Martínez-Subiela S, Parra MD, Cerón JJ. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA: CONCEPTOS BÁSICOS Y PRINCIPALES APLICACIONES CLÍNICAS EN MEDICINA VETERINARIA. Acute phase proteins: general concepts and main clinical applications in veterinary medicine. Anales de Veterinaria de Murcia. 2001.
- Terpstra C, De Boer GF. Precipitating antibodies against maedi-visna virus in experimentally infected sheep. Arch Gesamte Virusforsch. 1973;43(1–2):53–62.
- Thiermann A, González M. Paraguay OIE [Internet]. Report PVS de seguimiento Paraguay. 2009 [cited 2020 Aug 27]. p. 139. Available from: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Support\\_to\\_OIE\\_Members/docs/pdf/FinalReport-Paraguay.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Support_to_OIE_Members/docs/pdf/FinalReport-Paraguay.pdf)
- Thormar H. An electron microscope study of tissue cultures infected with visna virus. Virology. 1961a;14(4):463–75.
- Thormar H. An electron microscope study of tissue cultures infected with visna virus. Virology. 1961b;14(4):463–75.
- Thormar H. Maedi-visna virus and its relationship to human immunodeficiency virus. AIDS Rev. 2005.

- Thormar H. The Origin of Lentivirus Research: Maedi-Visna Virus. *Curr HIV Res.* 2013;11(1):2–9.
- Thormar H, Cruickshank JG. THE STRUCTURE OF VISNA VIRUS STUDIED BY THE NEGATIVE STAINING TECHNIQUE. *Virology.* 1965;25:145–8.
- Thormar H, Georgsson G, Pálsson PA, Balzarini J, Naesens L, Torsteinsdóttir S, et al. Inhibitory effect of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine on visna virus infection in lambs: a model for in vivo testing of candidate anti-human immunodeficiency virus drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995;92(8):3283–7.
- Thormar H, Georgsson G, Pálsson PA, Gunnarsson E, Torsteinsdóttir S, Balzarini J, et al. Visna in sheep as a model for chemotherapy of lentiviral central nervous system infections. *Clinical Microbiology and Infection.* 1998;4(11):618–21.
- Tiley LS, Malim MH, Cullen BR. Conserved functional organization of the human immunodeficiency virus type 1 and visna virus Rev proteins. *J Virol.* 1991;65(7):3877–81.
- Toma B, Eloit M, Savey M. Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1990;9(4):1077–119.
- Torfason EG, Gudnadóttir M, Löve A. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of visna-maedi. *Arch Virol. Springer-Verlag;* 1992 Mar;123(1–2):47–58.
- Torsteinsdóttir S, Matthíasdóttir S, Vidarsdóttir N, Svansson V, Pétursson G. Intratracheal inoculation as an efficient route of experimental infection with maedi-visna virus. *Res Vet Sci.* 2003;75(3):245–7.
- Tothova C, Nagy O, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: A review. *Vet Med (Praha).* 2014;59(4):163–80.
- Trezeguet MÁ, Debenedetti R, Suarez MF, Barral LE, Periolo F. Manual de técnicas de diagnóstico serológico para Maedi Visna y Artritis Encefalitis Caprina [Internet]. SENASA. 2015 [cited 2019 Jan 29]. Available from: [http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENESA/SENESA COMUNICA/CP/277/manual.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENESA/SENESA COMUNICA/CP/277/manual.pdf)
- Trezeguet MÁ, Debenedetti R, Suarez MF, Barral LE, Ramos M. Detección de la Artritis-Encefalitis Caprina, en Majadas Generales, en Argentina. *Revistas Veterinaria Argentina* [Internet]. 2010;26(2):270–9. Available from: <https://www.veterinariargentina.com/revista/2010/10/13888/?hilite=%27trezeguet%27%2C%272010%27>

- Trezeguet MÁ, Funes G, Debenedetti R, Suarez MF, Barral LE, De la Sota MD. Estudio serológico de la Artritis - Encefalitis caprina, en cabañas y tambos caprinos, en la Republica Argentina. *Rev. Med. Vet.* 2008;89:93–8.
- Trezeguet MÁ, Gallardo ICR, Debenedetti R, Barral LE, Suarez MF, Rodríguez Eugui J, et al. Seguimiento de un foco de virus de artritis encefalitis caprina (VCAE), en la provincia de San Luis, República Argentina. *Revista Veterinaria Argentina.* 2017;34(353):1–12.
- Trezeguet MÁ, Suárez MF, Barral LE, Periolo F, Maidana CE, Farías PC, et al. Situación epidemiológica de maedi-visna y artritis encefalitis caprina en la Argentina. *Revista Senasa. Publicación Periódica Científico-Tecnológica [Internet].* 2013 [cited 2023 Mar 4];1(1):1–11. Available from: [https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_caprinos/72-maedi-visna.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_caprinos/72-maedi-visna.pdf)
- Trono D. Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J Virol.* 1992;66(8):4893–900.
- Tu PA, Shiu JS, Lee SH, Pang VF, Wang DC, Wang PH. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *J Virol Methods.* 2017;243:98–104.
- Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol.* 1999;285(1):1–32.
- Uemori T, Asada K, Kato I, Harasawa R. Amplification of the 16S-23S Spacer Region in rRNA Operons of Mycoplasmas by the Polymerase Chain Reaction. *Syst Appl Microbiol.* Urban & Fischer; 1992 May 1;15(2):181–6.
- Urcelay S, Celedón MO, Roseblitt M. Pesquisa de anticuerpos para virus neumonía progresiva ovina (maedi-visna) en Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias.* 1993 Jan 1;8(2):1–4.
- Vainas E, Papakostaki D, Christodoulou V, Besenfelder U, Amiridis GS, Kuehholzer B, et al. Exploitation of embryos collected from Maedi-Visna seropositive ewes during eradication programs. *Small Ruminant Research.* 2006;62(1-2 SPEC. ISS.):129–34.
- Vargas Terán M, Kahn S, Arroyo Kuribreña M, Pérez Zapata CA. Bolivia OIE [Internet]. Misión de Evaluación PVS de Seguimiento Bolivia. 2014 [cited 2020 Aug 27]. p. 176. Available from: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Support\\_to\\_OIE\\_Members/pdf/PVS-Evaluation-FU-Report\\_Bolivia.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Support_to_OIE_Members/pdf/PVS-Evaluation-FU-Report_Bolivia.pdf)
- Vellutini C, Philippon V, Gambarelli D, Horschowski N, Nave KA, Navarro JM, et al. The maedi-visna virus Tat protein induces multiorgan lymphoid hyperplasia in transgenic mice. *J Virol.* 1994;68(8):4955–62.
- Vermeire J, Naessens E, Vanderstraeten H, Landi A, Iannucci V, van Nuffel A, et al. Quantification of Reverse Transcriptase Activity by Real-Time PCR as a Fast and

- Accurate Method for Titration of HIV, Lenti- and Retroviral Vectors. *PLoS One*. 2012;7(12).
- Villet S, Faure C, Bouzar BA, Morin T, Verdier G, Chebloune Y, et al. Lack of trans-activation function for Maedi Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus Tat proteins. *Virology*. 2003;307(2):317–27.
- Voller A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination. *Br J Exp Pathol*. 1976;57(2):243–7.
- Wallis C, Melnick JL. Stabilization of Enveloped Viruses by Dimethyl Sulfoxide. *J Virol*. 1968.
- Watt NJ, Roy DJ, McConnell I, King TJ. A case of visna in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 1990;126(24).
- Wells SJ, Dargatz DA, Ott SL. Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Prev Vet Med*. 1996;29(1).
- Wilkinson AC. Color atlas of diseases and disorders of the sheep and goat. 1st ed. Linklater and Mary C. Smith M, editor. M. Wolfe Publishing Mosby Year Book Europe Ltd.; 1997.
- Van Wyk JA, Bath GF. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet. Res. EDP Sciences*; 2002;33.
- Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. Elsevier; 2000. p. 298–307.
- Yamada E, Yoshikawa R, Nakano Y, Misawa N, Kobayashi T, Ren F, et al. A naturally occurring bovine APOBEC3 confers resistance to bovine lentiviruses: Implication for the co-evolution of bovids and their lentiviruses. *Sci Rep*. 2016;6.
- Zanoni R, Cordano P, Nauta IM, Peterhans E. -PCR for the detection of lentiviruses from small ruminants-. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 1996;138(2):93–8.
- Zanoni R, Krieg A, Peterhans E. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J Clin Microbiol*. 1989;27(3):580–2.
- Zanoni R, Nauta IM, Kuhnert P, Pauli U, Pohl B, Peterhans E. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet Microbiol*. 1992;33(1–4):341–51.
- Zanoni R, Nauta IM, Pauli U, Peterhans E. Expression in *Escherichia coli* and sequencing of the coding region for the capsid protein of Dutch maedi-visna virus strain ZZV 1050: Application of recombinant protein in enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of caprine and ovine lentivirus. *J Clin Microbiol*. 1991;29(7):1290–4.
- Zanoni R, Vogt H -R, Pohl B, Böttcher J, Bommeli W, Peterhans E. An ELISA Based on Whole Virus for the Detection of Antibodies to Small-ruminant Lentiviruses. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 1994;41(1–10):662–9.

- Zeder MA. Animal Domestication in the Zagros : A Review of Past and Current Research. *Paléorient*. 1999;25(2).
- Zeder MA. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008.
- Zhang C, de Silva S, Wang JH, Wu L. Co-evolution of primate SAMHD1 and Lentivirus Vpx leads to the loss of the vpx gene in HIV-1 Ancestor. *PLoS One*. 2012;7(5).
- Zhong KJY, Salas CJ, Shafer R, Gubanov A, Gasser J, Magill AJ, et al. Comparison of IsoCode STIX and FTA gene guard collection matrices as whole-blood storage and processing devices for diagnosis of malaria by PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3).
- Zink MC, Johnson LK. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Res*. Elsevier; 1994 May 1;32(2):139–54.
- Zink MC, Yager JA, Nyers JD. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus: Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *American Journal of Pathology*. 1990;136(4):843–54.

## 9. ANEXO I

### 9.1 Protocolos

#### 9.1.1 Perfiles térmicos y condiciones de PCR

##### Ciclo térmico 1 nPCR:

1. 94°C 10 min
  2. 94°C 30 seg
  3. 55°C 1 min
  4. 72°C 2 min
  5. 72°C 10 min
- } x35

##### Condiciones Ciclo 1 nPCR:

1. ADN molde 300ng
2. Mg: 1.5mM
3. Cebadores: 4μM
4. dNTP: 2mM
5. Taq Biotools: 1UI/50μl  
GoTaq: 0.5UI/25μl

##### Ciclo térmico 2 nPCR:

1. 94°C 10 min
  2. 94°C 30 seg
  3. 60°C 1 min
  4. 72°C 1:15 seg
  5. 72°C 10 min
- } x35

##### Condiciones Ciclo 2 nPCR:

1. 2μl de 1 nPCR
2. Mg: 1.5mM
3. Cebadores: 4μM
4. dNTP: 2mM
5. Taq Biotools: 1UI  
GoTaq: 0,5UI/25μl

##### Ciclo térmico Oslo-Pol:

1. 95°C 3 min
  2. 95°C 30 seg
  3. 57°C 40 seg
  4. 72°C 1,15 seg
  5. 72°C 10 min
- } x45

##### Condiciones Oslo-Pol:

1. ADN molde 300ng
2. Mg: 1.25mM
3. Cebadores: 3uM
4. dNTP: 2mM
5. Taq Biotools: 1UI

### Ciclo térmico M3

1. 95°C 3min
  2. 95°C 30 seg
  3. 60°C\* 40 seg
  4. 72°C 40 seg
  5. 72°C 2 min
  6. \*56°C con Taq Biotools  
\*60°C con GoTaq
- } x 40

### Condiciones M3:

1. DNA molde 25-300ng
2. Mg: 1.50mM
3. Cebadores: 3uM
4. dNTP: 2mM
5. GoTaq: 0,5UI/25µl  
Taq Biotools: 1UI/50µl

### Ciclo térmico 1 nG2/M3

1. 94°C 10 min
  2. 94°C 30 seg
  3. 60°C 1 min
  4. 72°C 1,15 min
  5. 72°C 5 min
- } x35

### Condiciones ciclo 1 nG2/M3:

1. ADN molde 100-300ng
2. Mg: 1.50mM
3. Cebadores: 3uM
4. dNTP: 2mM
5. GoTaq: 0,5UI/25µl

### Ciclo térmico 2 nG2/M3

1. 95°C 3min
  2. 95°C 30 seg
  3. 60°C 40 seg
  4. 72°C 40 seg
  5. 72°C 2 min
- } x 40

### Condiciones ciclo 2 nG2/M3:

1. □µl de 1 N G2/M3
2. Mg: 1.50mM
3. Cebadores: 3uM
4. dNTP:2mM
5. GoTaq: 0,5UI/25µl

### Ciclo térmico 227/700

1. 95°C 3min
  2. 95°C 30 seg
  3. 58°C 40 seg
  4. 72°C 40 seg
  5. 72°C 2 min
- } x 40

### Condiciones 227/700:

1. ADN molde 25-300ng
2. Mg: 1.50mM
3. Cebadores: 3uM
4. dNTP:2mM
5. GoTaq: 0,5UI/25µl

### Ciclo térmico 1 nG2/500

1. 94°C 10 min
  2. 94°C 30 seg
  3. 60°C 1 min
  4. 72°C 1,15 min
  5. 72°C 5 min
- } x35

### Condiciones ciclo 1 nG2/500:

1. ADN molde 100-300ng
2. Mg: 1.50mM
3. Cebadores: 3uM
4. dNTP: 2mM
5. GoTaq: 0,5UI/25µl

### Ciclo térmico 2 nG2/500

1. 95°C 3min
  2. 95°C 30 seg
  3. 58°C 40 seg
  4. 72°C 40 seg
  5. 72°C 2 min
- } x 40

### Condiciones ciclo 2 nG2/500:

1. 3µl de 1 N G2/500
2. Mg: 1.50mM
3. Cebadores: 3uM
4. dNTP: 2mM
5. GoTaq: 0,5UI/25µl

**Ciclo térmico 191/738**

1. 95°C 3min
  2. 95°C 30 seg
  3. 50°C 40 seg
  4. 72°C 45 seg
  5. 72°C 10 min
- } x45

**Ciclo térmico 78/738:**

1. 95°C 3min
  2. 95°C 30 seg
  3. 50°C 40 seg
  4. 72°C 1 min
  5. 72°C 10 min
- } x45

**Ciclo térmico SG PERT**

1. 42°C 20min
  2. 95°C 30 seg
  3. 95°C 5 seg
  4. 60°C 30 seg
  5. 72°C 15 seg
- } x45

\* 5µl de sobrenadante y añadir 5µl de buffer  
*lisis 2x*

\*\*inhibidor de ARNasa "Ribolock<sup>®</sup>" por cada  
100 µl de buffer).

**Ciclo térmico 1 p25B1**

1. 94°C 10 min
  2. 94°C 30 seg
  3. 55°C 1 min
  4. 72°C 2 min
  5. 72°C 10 min
- } x35

**Ciclo térmico 2 p25B1**

1. 94°C 5 min
  2. 94°C 30 seg
  3. 47°C 30 seg
  4. 72°C 30 seg
  5. 72°C 2 min
- } x35

**Condiciones ciclo 191/738:**

1. ADN molde 300ng
2. Mg: 1.7mM
3. Cebadores Fw: 2µM
4. Cebador Rv: 2µM
5. dNTP: 2mM
6. Taq Biotools: 1UI

**Condiciones ciclo 78/738:**

1. ADN molde 300ng
2. Mg: 1.7mM
3. Cebadores Fw: 4µM
4. Cebador Rv: 2µM
5. dNTP: 2mM
6. Taq Biotools: 1UI

**Condiciones ciclo SG PERT**

1. 10µl molde\*
2. 0,1 µl MS2 ARN (100µM)
3. 5µl SybrGreen (4x)
4. 0,1 µl Ribolock\*\*
5. Cebadores MS2 Fw 0,1 µl (100µM)
6. Cebadores MS2 Rv 0,1 µl (100µM)

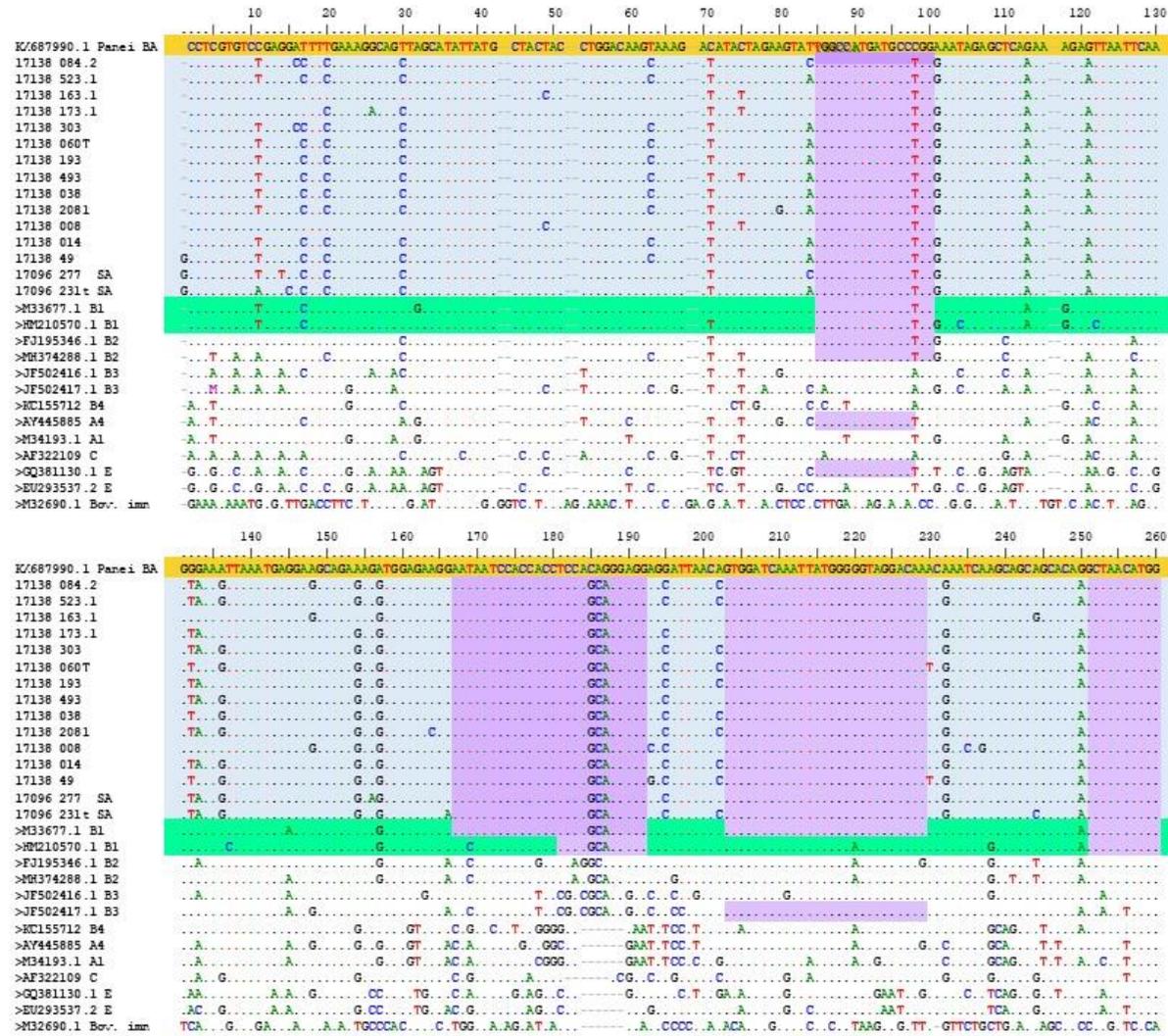
**Condiciones ciclo 1 p25B1**

1. ADN molde 50ng
2. Mg: 1.5mM
3. Cebadores: 4µM
4. dNTP:2mM
5. GoTaq: 0.5UI/25µl

**Condiciones ciclo 2 p25B1**

1. 2µl de 1 p25 Cap B1
2. Mg: 1.5mM
3. Cebadores: 4µM
4. dNTP: 2mM
5. GoTaq: 0,5UI/25µl

## 9.2 Figuras



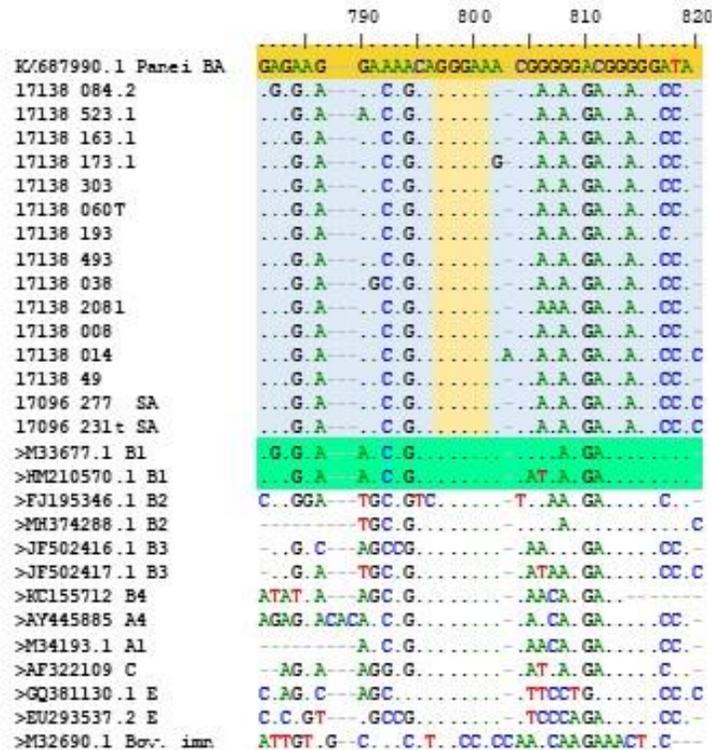
```

      270      280      290      300      310      320      330      340      350      360      370      380      390
K0687990.1 Panei BA ATCAGGCA AGACAAATATGCCTGCAATGGGTAATACAGCATTAAAGAGCAGTAAAGCAATATGACTCATAAACCCGGGAATCCATGTTAATAAGCCAAAACAAAATGAGTCATATGAAGACTTTACAG
17138 084.2 .....T.C.....T.G.....G.A.....G.G.C.G.G.....C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
17138 523.1 .....T.C.....T.G.....G.A.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
17138 163.1 .....T.C.....T.G.....G.C.G.G.....C.G.A.....GC.....AC.....A.G.....
17138 173.1 .....C.T.C.G.....T.G.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....C.....G.G.....
17138 303 .....T.C.....T.G.....G.A.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
17138 060T .....T.C.....T.G.....G.....G.G.C.GG.....C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
17138 193 .....T.C.....T.....G.A.....G.G.C.G.....A.....GC.....AC.....G.....
17138 493 .....T.C.....T.G.....G.A.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
17138 038 .....T.C.....T.G.....G.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....C.....G.GT.....
17138 2081 .....T.C.....T.G.....G.A.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
17138 008 .....T.C.....T.G.....G.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....C.....G.GT.....
17138 014 .....T.C.....T.G.....A.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....G.AC.....G.G.....
17138 49 .....T.C.....T.G.....G.A.....G.G.C.GG.....C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
17096 277 SA .....T.C.....T.....G.A.....G.G.C.G.....C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
17096 231t SA .....T.A.....T.G.....G.A.....G.G.C.G.G.....G.C.G.A.....GC.....AC.....G.G.....
>M33677.1 B1 .....G.....AT.....A.....G.G.C.GG.....C.G.A.....G.....C.....T.....G.....
>HM210570.1 B1 .....A.....T.....C.....G.....C.....G.....AA.....G.....G.....
>FJ195346.1 B2 C.A.....T.A.....T.C.G.....T.....G.....GG.....A.....T.....G.G.AA.....G.GT.....C.....G.....
>MH374288.1 B2 C.A.....C.T.....T.....T.....G.....G.....A.C.T.....G.AA.....G.GT.....C.....T.....G.....
>JF502416.1 B3 .....A.....TT.....G.....T.T.CA.....GT.G.C.A.....G.A.....G.....C.....A.....GT.C.AAGT.....G.A.....TT.....
>JF502417.1 B3 .....G.....T.T.G.....C.T.T.C.....G.G.C.....G.....GG.....T.....C.G.G.A.....GGT.....AAAT.....G.....GTT.....
>KC155712 B4 .....A.....G.....T.....AT.C.G.....T.T.G.A.....T.....GG.....A.....T.C.G.A.....G.G.AT.CA.....AGT.....C.T.....
>AY445885 A4 .....A.....T.A.....G.....C.....T.G.....C.....G.G.....GG.T.C.....T.....GG.A.G.....AT.....AAGT.....G.A.C.T.....
>M34193.1 A1 .....G.....G.....G.....T.....G.....T.A.....G.....A.C.T.....G.G.A.G.....G.AT.C.....AGT.....C.T.....
>AF322109 C .....A.....A.....T.....A.....G.....T.....G.C.....G.....A.....C.C.GG.....A.....C.....AAC.....G.....G.C.....
>GQ381130.1 E .....T.....G.C.....A.G.....CAT.T.....C.T.G.GG.T.....C.AAT.C.AA.....GC.TC.G.....G.C.....G.....GTG.....
>EU293537.2 E .....G.....A.....CAT.T.....C.T.G.....G.....C.....G.....AAT.C.AA.....GC.GC.A.....G.C.....A.C.T.....
>M32690.1 Bov. imm G.AGAATGC...G.CT.T.AGA.G...GC.GCAG...GCT.TG.AG.GGCA.GGCA.AA...GCTA.CCCAGG...C.CAAC.TCAT.GGG.C.C.G...C.G.CAC...T.A
      400      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500      510      520
K0687990.1 Panei BA CAAAA TTGCTAGAGCAATAGATGCAGAGCCTGTGACACAGGCCATAAAGAAATATTTAAAGCTAACATTACTTTACACAAATGCATCC TGGGACTGTCAA AAAACAAATGGATAGAGTA CTAGGACAGAG
17138 084.2 .....G.G.C.....G.....G.....CT.....C.....T.....A.....G.....G.....
17138 523.1 .....G.G.C.....G.....C.....C.....T.....T.....C.G.....A.....C.....G.....G.....
17138 163.1 .....G.C.....C.....C.....T.....G.....A.....T.....G.....G.....C.....G.....T.....A.....
17138 173.1 .....G.C.T.....C.....C.....T.....T.....G.....A.....G.....G.....G.....
17138 303 .....G.G.C.....G.....C.....C.....T.....T.....C.G.....A.....G.....G.....G.....
17138 060T .....G.G.C.....G.....C.....C.....T.....T.....A.....A.....G.....G.....
17138 193 .....G.G.C.....G.....CA.....C.....T.....T.....A.....A.....G.....G.....
17138 493 .....G.GC.....G.....C.....C.....T.....T.....G.....A.....G.....G.....G.....
17138 038 .....G.G.C.....G.....C.....C.....G.....T.....T.....A.....A.....G.....G.....
17138 2081 .....G.C.....G.....G.....C.....G.....T.....T.....A.....A.....G.....G.....
17138 008 .....G.G.C.....G.....C.....C.....G.....T.....T.....A.....A.....G.....G.....
17138 014 .....G.G.C.....G.....C.....C.....T.....T.....A.....A.....G.....G.....
17138 49 .....G.G.C.....G.....C.....C.....T.....T.....A.....A.....G.....G.....
17096 277 SA .....G.G.C.....G.....C.....C.....T.....G.....T.....A.....A.....G.....G.....
17096 231t SA .....G.G.C.....G.....C.....T.....T.....G.A.A.....G.....G.....
>M33677.1 B1 .....G.C.....A.T.....C.T.....T.C.....C.....T.....AG.A.T.....G.G.....AC.....A.....
>HM210570.1 B1 .....G.C.....G.....G.T.....C.....C.....T.....A.A.T.....G.G.G.....C.....
>FJ195346.1 B2 .....GGC.....G.....A.A.C.....C.T.....A.....GC.....C.....T.A.A.T.....G.....A.....
>MH374288.1 B2 .....GGC.....G.....A.A.C.....C.T.....A.....T.....C.....A.....C.....T.....A.....
>JF502416.1 B3 .....G.....AT.....T.....A.A.C.....C.T.....AG.C.....A.....T.....TAG.A.A.....T.C.....T.....A.....
>JF502417.1 B3 .....T.G.....AT.G.....C.....A.....T.A.C.T.....AG.T.C.....A.....TAG.A.A.....C.....T.....A.....
>KC155712 B4 .....G.....AT.G.....T.....A.A.C.....GG.CC.T.C.....AC.....CC.G.....AG.....TC.G.A.....T.....G.....GT.....CA.A.....
>AY445885 A4 .....G.C.CT.....T.....T.A.A.T.....TG.CC.T.....AC.....AG.....G.....TAGTA.....T.....G.....C.....ACG.....ACA.....
>M34193.1 A1 .....TGGCC.A.....G.....T.....G.A.A.....GG.CC.T.....AC.....AG.....G.A.T.....TAG.A.A.....G.....G.....GAC.T.G.GAC...
>AF322109 C .....GG.....T.....A.C.T.C.A.C.T.....G.....TC.G.....AAT.....A.....T.....C.....GT.G.G.A.....
>GQ381130.1 E .....C.G.....T.....C.....G.A.....TG.GC.C.T.....T.G.....C.C.A.T.....G.A.T.....AA.A.A.A.....G.....C.A.A.....G.....T.....A.T.A.....
>EU293537.2 E .....C.G.....T.....G.....C.....G.GCAC.....T.G.....CC.T.....T.....A.....T.....TAATA.A.A.....C.A.AG.....G.....T.....GA.T.A.....
>M32690.1 Bov. imm AT.G...AG.G.C...CC.T.A.GTAT.G.G.CTC.G.AA...C...C.CTC.A.CATC...ATTGATC...CAATGAA...C...GTCT...TCTA...CCTT.G...C...

```

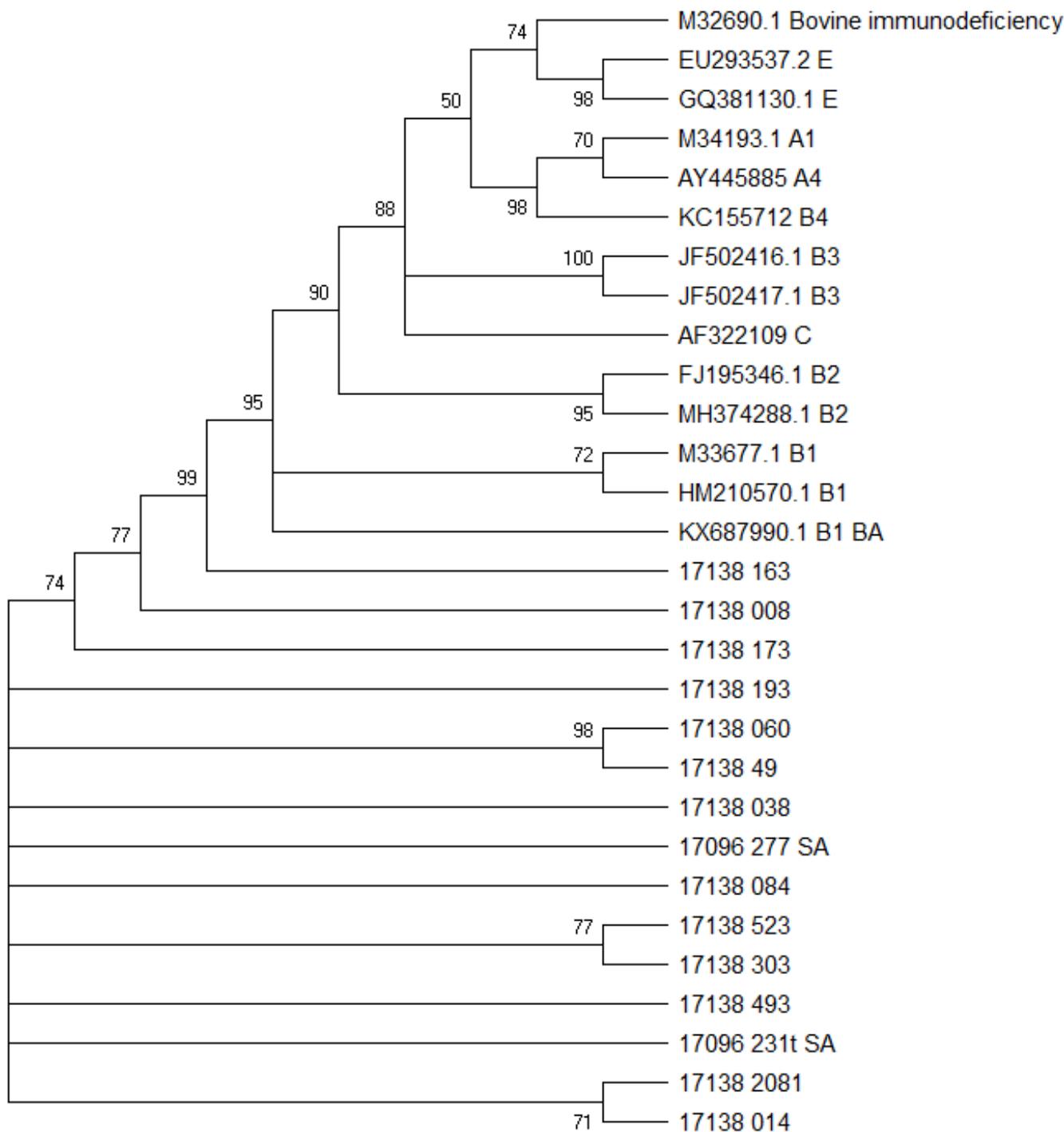
	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
K/687990.1 Panel BA	AGTACACACGGCTAGTGTAGAGAAAAATGCCAGCATGCAAGAGATGGGAT	CCGAGGGATTCAAAATGCCAATTC	TAGCTCAAGCCTTAAG	GCCAGAAAAAGAGGA	GGCCCG								
17138 084.2	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	A	A	GCC
17138 523.1	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GCC
17138 163.1	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GCC
17138 173.1	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GCC
17138 303	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GCC
17138 060T	T	T	G	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	T	A
17138 193	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GCC
17138 493	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	T	A
17138 038	T	A	G	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GTC
17138 2081	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	CC
17138 008	T	A	G	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GCC
17138 014	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GCC
17138 49	T	T	G	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	T	A
17096 277 SA	T	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	T	A
17096 231t SA	G	T	T	C	A	G	C	A	A	T	ACCAGAAAG	A	GTC
>M33677.1 B1	A	G	T	A	A	G	T	A	A		GA	G	AA
>HM210570.1 B1	G	G	T	A	A	G	T	A	A		GG	A	AA
>FJ195346.1 B2	G	A	G	T	C	A	G	A	A	T	T	A	T
>MH374288.1 B2	A	A	T	A	A	T	G	A	A	G	T	A	T
>JF502416.1 B3	G	G	A	ATCA	G	A	A	C	T	G	T	G	A
>JF502417.1 B3	G	G	A	TCA	G	A	A	A	T	AT	G	A	G
>K1155712 B4	G	A	ATCA	G	G	C	C	A	A	T	AT	A	G
>AY445885 A4	G	CA	G	T	C	G	A	A	A	T	G	T	A
>M34193.1 A1	G	T	A	ACG	G	T	C	A	A	T	G	AT	A
>AF322109 C	G	CTCAA	G	G	C	A	C	GGG	A	C	A	T	C
>GQ381130.1 E	C	G	AC	CAG	OG	G	G	T	A	C	G	A	A
>EU293537.2 E	G	CT	GA	CTAG	OG	G	T	A	A	TAG	T	ACT	A
>M32690.1 Bov. imm	C	CCAA	G	GA	T	AG	T	G	TA	TC	AA	CA	G

	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
K/687990.1 Panel BA	GTACAAAGGCTACAA	TTGTGGGAATCGGGACA	TCTAGCAAAAGCAATGC	AGACAGGACTCACAT	GCCACAAAT	TGTGGAAAGAAAGGA	CA	TGTACAAAAAGA	TTGTAGAGGGA	GAAGAA	CATGA		
17138 084.2	CA	A	GCTA	AG	G	A	A	T	A	G	G	A	G
17138 523.1	CA	A	GCTA	AG	G	A	A	T	T	A	G	G	A
17138 163.1	CA	A	A	C	A	T	AG	G	A	A	T	A	G
17138 173.1	CA	GA	GCT	AG	G	A	A	T	A	G	G	A	G
17138 303	CA	A	GCTA	AG	G	A	A	T	T	A	G	G	A
17138 060T	CA	A	GCT	AG	G	A	A	T	A	G	G	A	G
17138 193	CA	A	GC	AG	G	A	A	T	A	G	G	A	G
17138 493	CA	A	GCTA	C	AG	G	A	A	T	C	A	G	G
17138 038	CA	A	GCT	AG	G	A	A	T	C	A	G	G	A
17138 2081	CA	A	GCTA	AG	G	A	A	T	A	G	G	A	G
17138 008	CA	A	GC	AG	G	A	A	T	C	A	G	G	A
17138 014	CA	A	GCTA	AG	G	A	A	T	A	G	G	A	G
17138 49	CA	A	GC	AG	G	A	A	T	A	G	G	A	G
17096 277 SA	CA	A	GCT	AG	G	A	A	T	C	A	G	G	A
17096 231t SA	CA	A	GCTA	AG	G	A	A	T	G	A	G	G	A
>M33677.1 B1	CC	T	C	A	C	A	G	T	A	A	T	T	C
>HM210570.1 B1	C	A	C	A	A	A	A	T	T	C	A	G	G
>FJ195346.1 B2	C	G	T	C	A	C	CAG	GA	G	A	A	T	T
>MH374288.1 B2	C	G	A	G	C	AGG	G	G	T	A	GA	T	T
>JF502416.1 B3	AG	G	AA	T	T	C	C	OGA	G	A	G	T	T
>JF502417.1 B3	AA	G	AA	T	G	AA	C	CA	A	G	T	TC	Y
>K1155712 B4	G	AA	T	A	C	CT	OG	G	T	C	C	A	CA
>AY445885 A4	AAT	AA	T	C	C	GA	G	T	G	A	A	A	T
>M34193.1 A1	AAT	A	T	T	A	C	A	G	T	A	A	A	T
>AF322109 C	TAG	GG	A	T	T	C	A	GCC	C	CAG	AG	A	CA
>GQ381130.1 E	G	CA	C	C	C	T	GA	T	AGT	G	AAA	T	T
>EU293537.2 E	G	C	C	A	C	C	CT	G	T	AGT	G	AAA	G
>M32690.1 Bov. imm	CAG	GTCT	CT	CAC	ACCA	GCA	TATG	C	CCAA	OCT	GG	CCGAGG	T

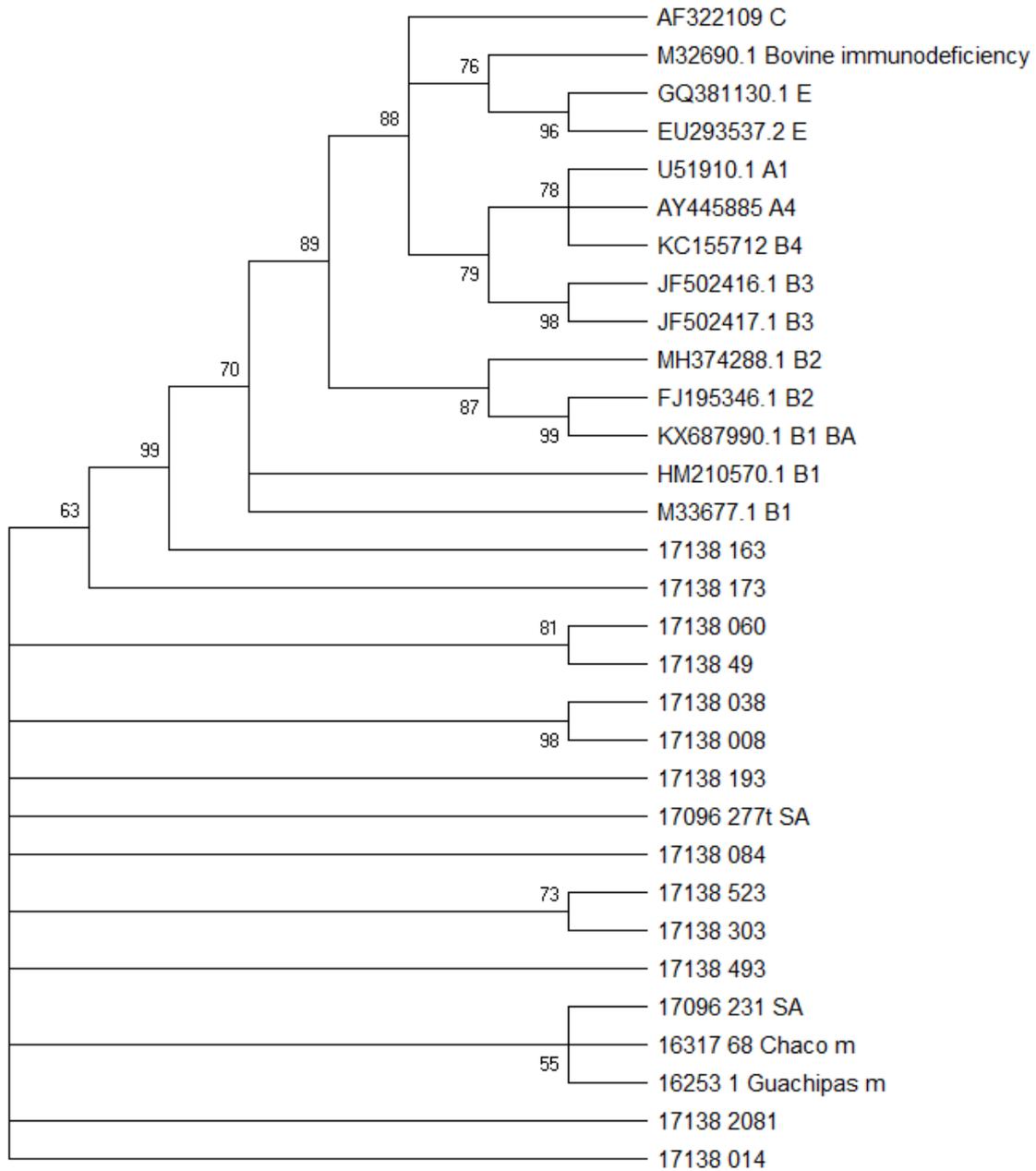


**Figura 1:** Alineamiento completo del fragmento de la nPCR

Se muestra el alineamiento completo de las secuencias de 800pb obtenidas utilizando el *software* libre BioEdit. Se incluye la secuencia B1 Argentina KX6877990.1 sombreada con naranja; (2 a 14): animales del ható 17138, (15 y 16) animales del ható 17096; (17 a 29) sombreadas en verde claro, 2: animal 084; 3: animal 523; 4: animal 163; 5: animal 173; 6: animal 303; 7: animal 060T; 8: animal 193; 9: animal 493; 10: animal 038; 11: animal 2081; 12: animal 008; 13: animal 014; 14: animal 49; 15: animal 231t, 16: animal 277t; y secuencias referencia (<) de los genotipos B1 (M33677.1 y HM210570.1) en verde oscuro; B2 (FJ195346.1; MH374288.1), B3 (JF502416.1 JF502417.1); B4 (KC155712); A4 (AY445885); A1 (M34193.1); C (AF322109); E (GQ381130.1 y EU293537.2) y, como raíz externa se utilizó una secuencia del virus de la inmunodeficiencia Bovina (M32690.1). Este alineamiento fue el mismo utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos presentados. Las referencias en colores guardan relación a lo descrito en la Figura 23 presente en [Resultados](#).

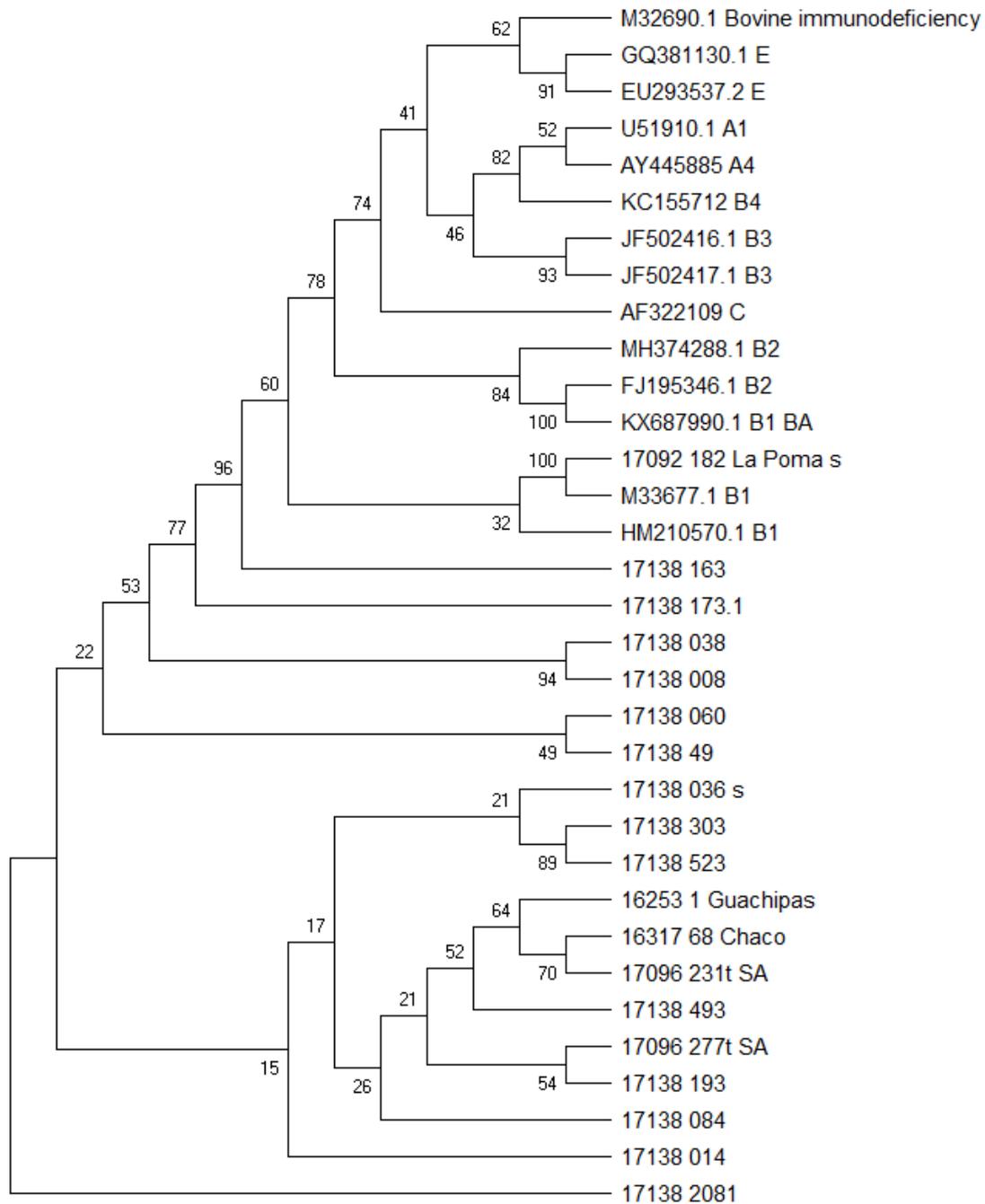


**Figura 2:** Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la nPCR (fragmento de 800pb). Los animales cuyo prefijo es el 17138 son provenientes del tambo del INTA, mientras que aquellos que poseen el prefijo 17096 corresponden a un hato de VT. Se incluyen secuencias referencia de los genotipos A1 (M34193), A4 (AY445885), B1 (HM210570.1; M33677.1), B2 (FJ195346.1 y MH374288.1), B3 (JF502416.1 JF502417.1), C (AF322109), E (EU293537.2 y QG381130.1) y la cepa B1 argentina (KX687990.1), como raíz externa se utilizó una secuencia del virus de la inmunodeficiencia Bovina (M32690.1). Método de máxima verosimilitud (MV) con un test de 1000 permutaciones. Árbol consenso. Análisis evolutivo realizado con MEGA X.



**Figura 3:** Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de *Fw227/Rv700* y *nG2/500* (fragmento de 500pb).

El árbol contiene las secuencias obtenidas a partir de la nPCR (recortadas) Los animales cuyo prefijo es el 17138 provienen del tambo del INTA, aquellos que poseen los prefijos 17096 y 16253 corresponden a hatos de VT, los que poseen el número 16317 a un establecimiento del CS. Se incluyen secuencias referencia de los genotipos A1 (U51919), A4 (AY445885), B1 (HM210570.1; M33677.1), B2 (FJ195346.1 y MH374288.1), B3 (JF502416.1 JF502417.1), C (AF322109); E (EU293537.2 y QG381130.1) y la cepa B1 argentina (KX687990.1), como raíz externa se utilizó una secuencia del virus de la inmunodeficiencia Bovina (M32690.1). Método de máxima verosimilitud (MV) con un test de 1000 permutaciones. Árbol consenso. Analisis evolutivo realizado con MEGA X.



**Figura 4:** Árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de nG2/M3 y M3 (fragmento de 300 pb).

El árbol contiene las secuencias obtenidas a partir de la nPCR y de *Fw227/Rv700* y *nG2/500* (recortadas) Los animales cuyo prefijo es el 17138 provienen del tambo del INTA, aquellos que poseen los prefijos 17096 y 16253 corresponden a hatos de VT, los que poseen el número 16317 a un establecimiento del CS y 17092 representa a un hato de QA. Se incluyen secuencias referencia de los genotipos A1 (U51919), A4 (AY445885), B1 (HM210570.1; M33677.1), B2 (FJ195346.1 y MH374288.1), B3 (JF502416.1 JF502417.1), C (AF322109); E (EU293537.2 y QG381130.1) y la cepa B1 argentina (KX687990.1), como raíz externa se utilizó una secuencia del virus de la inmunodeficiencia Bovina (M32690.1). Método de máxima verosimilitud (MV) con un test de 1000 permutaciones. Árbol consenso. Análisis evolutivo realizado con MEGA X.

### 9.3 Tablas

#### 9.3.1 Encuesta socioeconómica, productiva y sanitaria

Encuestador:	Fecha: ...../...../.....	Encuesta N°:
--------------	-----------------------------	--------------

##### 1. Descripción general

Propietario o encargado:	
Nombre del establecimiento/puesto:	
Dirección:	
Localidad mas cercana:	Departamento:
Superficie total de pastoreo:	

##### Existencias caprinas:

<i>Categoría</i>	<i>Cantidad</i>
Cabras adultas	
Cabras 1er. parto	
Chivos	
Mantillas- Cabrillonas	
Caponcitos	
<i>Total</i>	

##### Otras especies:

<i>Especie</i>	<i>Cantidad</i>
Bovinos	
Ovinos	
Equinos	
Porcinos	
Perros	
Gatos	

Razas cabras:		Raza chivos:	
---------------	--	--------------	--

Introducen caprinos ¿		Cuantos ¿?		Sexo (M/H)	
-----------------------	--	------------	--	------------	--

Instalaciones:
----------------

Fuente de agua:	Calidad:
-----------------	----------

##### 2. Manejo reproductivo último año

*N*

*Mes*

Cabras en servicio:			<i>Inicio</i>	<i>Fin</i>
Cabras vacías		Fecha de la parición		
Cabras paridas:				
Cabritos nacidos:		Destete y venta cabritos		
Cabritos señalados				
Cabrillas para reposición:		Nº de cabras melliceras		

Estaciona servicio		¿Cuándo?
Utilizan chivos de otros rebaños (S/N) ?		

### 3. Manejo nutricional

¿Pastorea el mismo lugar o cambia a lo largo del año?	
---	--

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Alimentos consumidos en:				

Suplementa (si/no)		Tipo de suplemento:	
--------------------	--	---------------------	--

4. Datos Productivos del último año o balance

Cabritos vendidos	
Adultos vendidos (especificar x categoría)	
Nº de cabras ordeñadas	
Litros leche entregados/recogidos/día	
Kg de quesos o molde realizados al día	
Cuánto queso vendido x temporada	

Manejo del ordeño:

Inicio	fin	Productos	Finalidad (consumo o venta)
Hace ½ leche?			

5. Sanidad

5.1. Mortandad general último año

<i>Categoría</i>	<i>Cantidad</i>
Cabras	
Cabrillas (destete al servicio)	
Chivos	
Cabritos lactando	
Cabritos de menos de 24 hs	
Vida útil de una cabra	

Observaciones

## 5.2 Signos de enfermedades observados en los caprinos

<i>Signo</i>	<i>Categoría/s</i>	<i>Meses</i>
Abortos (grande-chico) o mal paridas		
Retención de placenta		
Cabritos deslomados, débiles al nacer		
Cabritos parálisis progresiva (2 a 6 meses)		
Abscesos en ganglios (pus, color?)		
Bocio		
Pizootia: Boquera, costras ubres		
Costras en cabeza, orejas, escroto (picazón)		
Garrapatas, pique		
Diarreas (color, consistencia)		
Fotosensibilización		
Hinchazón rodillas		
Marcha en círculos (encef., locura)		
Moco purulento con estornudos		
Muerte postcastración convulsiones		
Muerte súbita,		
Muerte masivas (intoxicaciones)		
Muerte al dar ración (acidosis)		
Muerte lenta, debilitamiento		
Ojos irritados, nubes		
Parálisis progresiva		
Rascado (piojos ? )		
Tetania o flacidez, caída postparto		
Animales caídos, débiles		
Tos, decaimiento, agitación y muerte		
Ubres hinchadas y leche con grumos		
Ubres secas		
Problemas podales o de aplomos		

Otros.....

.....

.....

Otras alteraciones, lesiones y parásitos observados

<i>Alteración, lesión, parásito</i>	<i>Categoría/s</i>	<i>Meses</i>
Bicheras		
Bolsitas de agua en epiplón		
Garrapatas		
Granos blancos en esófago		
Gusanos chatos en hígado		
Gusanos chatos en intestinos		
Parásitos rojos en cuajo		
Parásitos en la piel, costras (piojo, garrapata, sama)		
Muerte por predadores		
Vesículas en hígado o pulmón		
Chupos, Apostemas, nódulos		

Otros.....

.....

Resumen de los problemas sanitarios más importantes

Problema sanitario	Diag veter	% morb	% mort	Categoría	Epoca (meses)	Síntomas observados

5.3. Prácticas sanitarias realizadas

Práctica	s/n	Mes	Categoría/s	Producto
Vacunación Mancha/GG/Enterotoxemia				
Vacunación Ectima/boquera/pizotia				
Otra vacuna				
Minerales/vitaminas Inyectables				
Cobre Inyectable				
Antiparasitario Interno				
Tratamiento gusano de la nariz/cuerno				
Antiparasitario externo (piojos, miasis, etc)				
Despezñado				
Revisan chivos antes de servicio				
Limpieza de los corrales de ordeño				
Realizan desparasitación de perros				

¿Otras prácticas?

.....

6. Opinión personal del productor

¿Se le ocurre algún otro problema sanitario de los cabritos?

.....

¿Se le ocurre algún otro problema de los caprinos adultos?

.....

¿Qué afecciones sanitarias considera como más importantes en cabritos y en cabras adultas?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Muestras recogidas:

.....

### Manejo del ordeño y del cabrito

5.1 Explicar el manejo del cabrito y ordeño

5.3. ¿Quién ordeña? Hombre Mujer niños cuantos ordeñan

### 9.3.2 Tabla 1: Matriz de entre todas las cepas argentinas y los subtipos B1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	1,00																												
2	0,88	1,00																											
3	0,88	0,99	1,00																										
4	0,91	0,93	0,93	1,00																									
5	0,89	0,97	0,97	0,94	1,00																								
6	0,88	0,99	1,00	0,93	0,97	1,00																							
7	0,89	0,98	0,98	0,93	0,97	0,98	1,00																						
8	0,90	0,98	0,98	0,93	0,97	0,98	0,98	1,00																					
9	0,88	0,98	0,99	0,93	0,97	0,99	0,98	0,98	1,00																				
10	0,89	0,98	0,98	0,93	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98	1,00																			
11	0,89	0,99	0,99	0,93	0,97	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	1,00																		
12	0,90	0,96	0,96	0,94	0,97	0,96	0,97	0,96	0,96	0,98	0,96	1,00																	
13	0,89	0,99	0,99	0,94	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,96	1,00																
14	0,89	0,98	0,98	0,93	0,97	0,98	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,99	1,00															
15	0,88	0,98	0,98	0,93	0,97	0,98	0,97	0,97	0,98	0,97	0,98	0,95	0,98	0,97	1,00														
16	0,89	0,98	0,98	0,93	0,97	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,99	0,98	0,97	1,00													
17	0,90	0,90	0,90	0,93	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,90	0,90	0,90	0,90	0,89	0,90	1,00												
18	0,91	0,90	0,90	0,92	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,91	0,90	0,90	0,90	0,93	1,00											
19	0,901	0,89	0,89	0,92	0,90	0,89	0,90	0,90	0,89	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,89	0,90	0,95	0,93	1,00										
20	0,90	0,89	0,89	0,91	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,88	0,89	0,94	0,92	1,00	1,00									
21	0,91	0,89	0,89	0,92	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89	0,94	0,92	1,00	1,00	1,00								
22	0,90	0,89	0,89	0,91	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,90	0,94	0,92	1,00	1,00	1,00	1,00							
23	0,90	0,89	0,89	0,91	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89	0,94	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00						
24	0,92	0,89	0,89	0,91	0,90	0,89	0,90	0,90	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,90	0,91	0,92	0,92	0,92	0,93	0,92	0,92	1,00					
25	0,90	0,89	0,90	0,91	0,90	0,90	0,89	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,89	0,90	0,91	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,91	1,00				
26	0,92	0,89	0,89	0,91	0,89	0,89	0,88	0,89	0,88	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,88	0,89	0,92	0,91	0,92	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,92	0,93	1,00		
27	0,91	0,89	0,89	0,92	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,88	0,89	0,89	0,90	0,89	0,88	0,90	0,92	0,91	0,91	0,91	0,90	0,91	0,91	0,91	0,91	0,95	0,93	1,00	
28	0,89	0,91	0,91	0,92	0,92	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,90	0,90	0,90	0,89	0,90	0,89	0,89	0,90	0,91	0,91	0,91	1,00
29	0,90	0,89	0,89	0,91	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89	0,90	0,89	0,90	0,89	0,90	0,89	0,89	0,91	0,90	0,90	0,91	0,89	1,00

(1): primera secuencia B1 caracterizada en Argentina KX6877990.1; (2 a 14): animales del ható 17138, (15 y 16) animales del ható 17096; (17 a 29): Cepas B1 totalmente secuenciadas; 2: animal 084; 3: animal 523; 4: animal 163; 5: animal 173; 6: animal 303; 7: animal 060T; 8: animal 193; 9: animal 493; 10: animal 038; 11: animal 2081; 12: animal 008; 13: animal 014; 14: animal 49; 15: animal 231t, 16: animal 277t; 17: cepa M33677.1; 18: cepa HM210570; 19: cepa KT749878.1; 20: cepa GU120138.1; 21: cepa KT214469.1; 22: cepa KT749880.1; 23: cepa KT749879.1; 24: cepa MH374290.1; 25: cepa MG554412.1; 26: cepa MG554410.1; 27: cepa MG554411.1; 28: cepa MG554413.1; 29: cepa MH374289.1. Por una necesidad de espacio físico la tabla ha sido resumida a solo 2 decimales

**9.3.3 Tabla 2: Tipo de producción de los establecimientos utilizados en esta tesis.**

Hato	O. Prod <sup>1</sup> .	Biotipo <sup>2</sup>	n <sup>3</sup>	Ordeñe <sup>4</sup>	Litros <sup>5</sup>	Productos <sup>6</sup>		Resp prod. <sup>7</sup>		Cuidado de anim. <sup>8</sup>	
						Venta	Autoc.	Mujer	Homb	Mujer	Homb
16282	Cría	Cr	100	Man	30		Que y Cab	Dueño		Famil.	Famil.
16315	Cría	Cr	26	Man	7-10	Cab	Que y Cab	Famil.	Famil.	Famil.	Famil.
16316	Cría	Cr	27	Man	7-10	Cab	Que y Cab	Dueño		Dueño	
16317	Cría	Cr	28	Man	7-10	Cab	Que y Cab	Famil.	Famil.	Famil.	Famil.
14240	Cría	Cr	31	No	0	Cab	Cab	Dueño		Dueño	
14241	Cría	Cr	42	Man	6	Cab	Que y Cab	Dueño		Dueño	
14364	Cría	Cr	60	Man	30	Que y Cab	Que y Cab	Dueño		Dueño	
14365	Cría	Cr	46	Man	17	Que y Cab	Que y Cab	Dueños	Dueños	Dueños	Dueños
16180-81	Leche	AN y M	190	Mec	40	Que		Empl.	Empl.	Empl.	Empl.
16345	Leche	SxAN	4000	Mec	1500	Que y Cab		Empl.	Empl.	Empl.	Empl.
16418	Leche	S	33	Man	70 y compra	Que y Cab			Empl.		Dueño
16419	Leche	CrxANxS	200	Man	150	Que y Cab			Dueño		Dueño
17088	Leche	SxT	200	Man	150	Que y Cab		Famil.	Famil.	Famil.	Famil.
17089	Leche	CrxAN	150	Man	70	Que y Cab		Famil.	Famil.	Famil.	Famil.
17090	Leche	CrxAN	100	Man	40	Que y Cab			Famil.		Famil.
17091	Leche	S	500	Mec	500	Que y Cab		Empl.		Empl.	
17092	Leche	CrxANxTxB	250	Man	100	Que y Cab			Empl.		Empl.
18126	Cría	CrxAN	13	No	0		Cab	Dueño		Dueño	
18123-24	Cría	CrxAN	80	Man	23	Que y Cab	Que y Cab	Dueño		Dueño	
18128-29	Cría	SxAN	100	Man	20	Cab	Que y Cab	Dueño		Dueño	
18131-191	Cría	CrANxS	83	Man	40	Que y Cab	Que y Cab	Dueño	Dueño	Dueño	Dueño
18185-87	Cría	CrxANxS	340	Man	41	Que y Cab	Que y Cab	Matrim.	Matrim	Matrim.	Matrim.
18190	Leche	CrxANxS	78	Man	30	Que y Cab	Cab	Matrim.	Matrim	Matrim.	Matrim.
18315-19	Leche	CrxANxS	315	Man	55	Que y Cab	Cab	Dueños	Dueños	Dueños	Dueños
15207	Cría	CrxAN	22	Man	5	Cab	Que y Cab	Dueño		Dueño	
15208	Cría	CrxAN	52	Man	10	Cab	Que y Cab	Dueño		Dueño	
15210	Cría	CrxAN	67	No	0		Cab	Famil.	Famil.	Famil.	Famil.
15304	Leche	CrxAN	31	Man	10	Que	Cab	Dueño		Dueño	
15347	Cría	CrxAN	16	No	0		Que y Cab	Dueños	Dueños	Dueños	Dueños
16253	Cría	CrxAN	55	Man	7		Cab	Matrim.	Matrim	Matrim.	Matrim
17096	Leche	CrxAN	300	Man	150		Que y Cab	Dueño		Dueño	
17138	Leche	S	73	Mec	90		Que y Cab		Empl.		Empl.

1=O. Prod.: Objetivos de producción. 2= Biotipo: Cr= Criollo; AN=Anglo Nubian; S=Saanen; T=Togenbur; B=Boher; M=Ovejas Manchegas; X= Cruza. 3= Número total de animales en el hato. 4= Tipo de ordeño: Man=Manual; Mec= Mecánico; No=No ordeña.5= Litros de leche promedio producidos por el total de los animales en ordeño al día.6= Productos obtenidos: Venta/ Autoconsumo: Que= Queso; Cab= Cabrito. 7= responsable de la producción (ordeño, elaboración de quesos o manejo de la Guachera): Mujer/ Hombre: Dueño; Famil. = Familiar; Matrim. =Matrimonio; Emp=Empleado. 8= responsable del cuidado de los animales: Mujer/Hombre: D=Dueño; Fa=Familiar; M=Matrimonio; Emp=Empleado

### 9.3.4 Tabla 3: Manejo alimentario y sanitario de los establecimientos

#### utilizados en esta tesis

Hato	Tierra <sup>9</sup>	Past. <sup>10</sup>	Supl. <sup>11</sup>	Macho <sup>12</sup>	Met. de Cría <sup>13</sup>	Alim. Cría <sup>14</sup>	Enc. noct. <sup>15</sup>	Vacuna <sup>16</sup>	Desp. <sup>17</sup>
16282	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	No
16315	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	No
16316	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	No
16317	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	No
14240	Sin lim.	Ex	SÍ	C\$	Tradicional	Leche	SÍ	No	2a
14241	Sin lim.	Ex	SÍ	C\$	Tradicional	Leche	SÍ	2d	2a
14364	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	1d	2a
14365	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	2a
16180-81	Aparc.	RL	SÍ	C\$	Guachera	Leche	No	2d	IF
16345	Estab.	IR	SÍ	C\$	Guachera	Sustituto	No	2d	IF
16418	Aparc.	RL	SÍ	Prest. y C\$	Guachera	Sustituto	SÍ	2d	IF
16419	Sin lim.	RL	SÍ	Prest. y Rot	Tradicional	Leche	SÍ	No	IF
17088	Aparc.	RL	SÍ	Prest. y Rot	Guachera	Leche	SÍ	2d	IF
17089	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest. y Rot	Tradicional	Leche	SÍ	2d	IF
17090	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest. y Rot	Tradicional	Leche	SÍ	No	2a
17091	Aparc.	RL	SÍ	C\$	Guachera	Sustituto	SÍ	EC	IF
17092	Sin lim.	Ex	SÍ	C\$	Tradicional	Leche	SÍ	1d	1a
18126	Aparc.	Ex	SÍ	Prest. Y Rot	Tradicional	Leche	SÍ	No	3a
18123-24	Aparc.	Ex	SÍ	C\$ y Alq.	Tradicional	Leche	SÍ	No	1a
18128-29	Sin lim.	Ex	SÍ	C\$	Tradicional	Leche	SÍ	No	1a
18131-191	Sin lim.	Ex	SÍ	C\$	Tradicional	Leche	SÍ	No	3a
18185-87	Sin lim.	Ex	SÍ	R	Tradicional	Leche	SÍ	No	1a
18190	Sin lim.	Ex	SÍ	Alq.	Tradicional	Leche	SÍ	No	No
18315-19	Sin lim.	Ex	SÍ	Alq.	Tradicional	Leche	SÍ	No	2a
15207	Sin lim.	Ex	No	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	2a
15208	Sin lim.	Ex	No	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	1a
15210	Sin lim.	Ex	No	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	1a
15304	Aparc.	Ex	SÍ	Prest. y C\$	Tradicional	Leche	SÍ	No	2a
15347	Sin lim.	Ex	SÍ	Prest. y C\$	Tradicional	Leche	SÍ	2d	3a
16253	Sin lim.	Ex	No	Prest.	Tradicional	Leche	SÍ	No	2a
17096	Aparc.	RL	SÍ	C\$	Guachera	Leche	SÍ	2d	2a
17138	Aparc.	RL	SÍ	C\$	Guachera	Leche	SÍ	2d	IF

9= Delimitación de la propiedad: Sin lim. = Sin delimitación territorial; Aparc. = Aparcelado perimetral; Est= Propiedad delimitada, animales estabulados. 10= Tipo de pastoreo: Ex=Extensivo; RF=Racional por franjas; IR=Intensivo en ración. 11= Suplementación: No=Sin suplantación; Sí= Con suplementación. 12= Forma de obtención de los reproductores machos: Prop. = Propio (Selección de cabritos dentro del hato); C\$= Compra (Producto de la compra comercial); Alq. = Alquiler (Se paga por servicio estacional); Rot= Rotación (Intercambio con vecinos); Pr: Préstamo. 13= Método de cría: Tradicional; Guachera= Guachera colectiva. 14= Alimentación de los cabritos: Leche= Leche de sus madres. Sustituto= Sustituto lácteo. 15= Encierre nocturno: Sí/No. 16= Vacunación: No= No vacuna; 1d= 1 dosis de triple clostridiales; 2d= 2 dosis de triple clostridiales; EC=Esquema completo (2 dosis de triple clostridiales, Ectima contagioso, complejo respiratorio). 17= Desparasitaciones: No= No desparasita; 1a= 1 desparasitación por año; 2a=2 desparasitaciones por año; 3a= 3 desparasitaciones por año; IF= Desparasitaciones a según las necesidades del hato o según índice FAMACHA

**9.3.5 Tabla 4: Estadísticos descriptivos de las unidades productivas utilizadas en esta tesis.**

		Total	CS <sup>1</sup>	VT <sup>2</sup>	QA <sup>3</sup>	
Objetivo de producción	Cría	56,25 % (18)	100,00 % (4)	62,50 % (5)	45,00 % (9)	
	Leche	43,75 % (14)		37,50 % (3)	55,00 % (11)	
Tipo de establecimiento	Familiar	68,75 % (22)	100,00 % (4)	75,00 % (6)	60,00 % (12)	
	Capitalizado	18,75 % (6)		12,50 % (1)	25,00 % (5)	
	Tambo	12,5 % (4)		12,50 % (1)	15,00 % (3)	
Biotipo	Cruza	34,38 % (11)		12,50 % (1)	50,00 % (10)	
	Cruza	65,63 % (21)	100,00 % (4)	87,50 % (7)	50,00 % (10)	
Ordeñe	Manual	85,71 % (24)	100,00 % (4)	82,33 % (5)	83,33 % (15)	
	Mecánico	14,29 % (4)		16,67 % (1)	16,67 % (3)	
Producto de	Venta	Cabrito	30,77 % (8)	100,00 (3)	50,00 % (2)	15,79 % (3)
		Queso	7,70 % (2)		25,00 % (1)	5,26 % (1)
		Queso y	61,55 % (16)		25,00 % (1)	78,95 % (15)
	Autoconsumo	Cabrito	31,82 % (7)		42,86 % (3)	36,36 % (4)
		Queso				
		Queso y	68,18 % (15)	100,00 % (4)	57,14 % (4)	63,64 % (7)
Litros de leche <sup>4</sup>		3209,50	55,50	272,00	2882,00	
Litros de leche promedio <sup>5</sup>		100,30	13,88	34,00	144,10	
Suma total de animales de los hatos <sup>6</sup>		7608	181	616	6811	
Animales totales promedio/ hatos <sup>7</sup>		237,80	45,25	77,00	340,55	
Tamaño de la muestra <sup>8</sup>		927	107	247	573	
Tamaño muestra promedio por hatos		28,97	26,75	30,88	28,65	
Responsable de la producción	Familiar	84,38 % (27)	100,00 % (4)	87,50 % (7)	80,00 % (16)	
	Emplead@	15,63 % (5)		12,50 % (1)	20,00 % (4)	
Responsable del cuidado de los animales	Familiar	78,13 % (25)	100,00 % (4)	75,00 % (6)	75,00 % (15)	
	Emplead@	21,88 % (7)		25,00 % (2)	25,00 % (5)	
Pastoreo	Extensivo	75,00 % (24)	100,00 % (4)	75,00 % (6)	70,00 % (14)	
	Racional	25,00 % (8)		25,00 % (2)	30,00 (6)	
Delimitación de la tierra	Aparcelado	31,25 % (10)		37,50 % (3)	35,00 % (7)	
	Sin limites	68,75 % (22)	100,00 % (4)	62,50 % (5)	65,00 % (13)	
Suplementa	Sí	87,50 % (28)	100,00 % (4)	50,00 % (4)	100,00 % (20)	
	No	12,50 % (4)		50,00 % (4)		
Reproductores macho <sup>9</sup>	Propio	46,88 (15)	100,00 (4)	50,00 (4)	35,00 (7)	
	Externo	53,13 (17)		50,00 (4)	65,00 (13)	
Método de cría	Tradicional	78,13 % (25)	100,00 (4)	75,00 % (6)	75,00 % (15)	
	Guachera	21,88 % (7)		25,00 % (2)	25,00 % (5)	
Alimentación de la cría	Leche	90,63 % (29)	100,00 % (4)	100,00 % (8)	85,00 % (17)	
	Sustituto	9,38 % (3)			15,00 % (3)	
Encierre nocturno	Sí	93,75 % (30)	100,00 % (4)	100,00 % (8)	90,00 % (18)	
	No	6,25 % (2)			10,00 % (2)	
Vacunación	Sí	37,50 % (12)		37,50 % (3)	45,00 % (9)	
	No	62,50 % (20)	100,00 % (4)	62,50 % (5)	55,00 % (11)	
Desparasitación	Sí	84,38 % (27)		100,00 % (8)	95,00 % (19)	
	No	15,63 % (5)	100,00 % (4)		5,00 % (1)	

1 CS= Chaco salteño; 2 VT= Valles Templados; 3 QA= Valles y quebradas áridas 4=Sumatoria de litros de leche promedio diario por hatos. 5=Litros de leche promedio diario por hatos 6=Sumatoria de la cantidad total de animales de los hatos utilizados. 7=Número de animales promedio por hatos 8=Tamaño de la muestra utilizada 9=Reproductor macho: Propio= Seleccionado dentro de sus propios animales Externo=Producto de la compra, préstamo, rotación, proveniente de otro rebaño.

Entre paréntesis aparecen la cantidad de establecimientos que responde a cada referencia.