

Instituto de Agrobiotecnología

Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Gobierno de Navarra

upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Universidad Pública de Navarra

Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación

**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**

Memoria presentada por

IRACHE ECHEVERRÍA GARÍN

para optar al grado de Doctor por la Universidad Pública de Navarra

Director: Dr. Ramsés Reina Arias

Director: Dr. Damián de Andrés Cara

Directora: Dra. Idoia Glaria Ezquer

Pamplona/Iruña, 2021

Dr. RAMSÉS REINA ARIAS, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Dr. DAMIÁN DE ANDRÉS CARA, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Dra. IDOIA GLARIA EZQUER, Técnico Superior Especializado del Consejo Superior de Investigación Científicas (CSIC).

INFORMAN:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral **“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”** elaborada por Doña **IRACHE ECHEVERRÍA GARÍN** ha sido realizada bajo su dirección y que cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firman la presente en Pamplona, a 7 de Mayo de 2021.

Fdo. Ramsés Reina Arias

Fdo. Damián de Andrés Cara

Fdo. Idoia Glaria Ezquer

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Presidente

Estanislao Nistal Villán

Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo

Secretario

Christian de la Fé Rodríguez

Departamento de Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia

Vocal

Julio Benavides Silván

Instituto de Ganadería de Montaña
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Suplente del presidente

Lluís Luján Lerma

Departamento de Patología
Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

Suplente del secretario

Jaione Valle Turrillas

Instituto de Agrobiotecnología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Suplente del vocal

Alejandro Toledo Arana

Instituto de Agrobiotecnología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Revisores externos

Julio Benavides Silván

Christian de la Fé Rodríguez

Suplente de los revisores externos

Paula Jáuregui Onieva

Estanislao Nistal Villán

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Pública de Navarra, al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y al Gobierno de Navarra por haber hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis directores, a Damián por darme la oportunidad de trabajar en su equipo. A Idoia, por suponer un soplo de aire fresco en esta última etapa. Es una pena que no quede reflejado todo el esfuerzo que hemos hecho con SAMHD1, pero muchas gracias por tu dedicación y empeño, y por supuesto, por conseguir que le volviese a coger cariño a SAM. A Ram, tengo tanto que agradecerte que no sé ni por dónde empezar! A lo largo de estos cuatro años hemos vivido muchas cosas que nos han puesto las cosas difíciles, pandemia incluida, pero siempre he encontrado en tí el apoyo necesario. Lo das todo por tu trabajo y tu gente, y de verdad, no se me ocurre nadie mejor con el que haber realizado este camino. ¡Muchas gracias por la confianza y el apoyo!

A Beatriz Soret por iniciarme en el mundo del laboratorio, apoyarme y animarme a seguir por este camino. Cuando surgió la oportunidad de pedir una beca con el grupo de Damián pensaste en mí e hiciste que esto fuese posible. ¡Muchas gracias!

A Carmen y Lorena, llegué al grupo muy perdida pero con vuestra dedicación y paciencia me enseñasteis a trabajar en el labo. Las largas jornadas siempre eran más amenas con vuestra compañía. ¡Gracias por las risas y los buenos ratitos! ¡Os deseo lo mejor en vuestra nueva etapa y en las que vendrán!

A Andrea, Javi y Esther, por estos últimos meses repletos de sangres y risas! A Hugo, fue un placer compartir esos meses contigo. Especialmente a mi partner Ricardo, es un lujo compartir laboratorio contigo aunque de vez en cuando te vacunes... Eres motivación, humildad y alegría personalizada. ¡Una gran suerte tenerte de partner y compañero!

A las MJ, en especial a Irati, porque los ELISAs y clonajes siempre eran más amenos con vuestra compañía. A Irene, porque has sido un gran descubrimiento. Por esos cafés y conversaciones transcendentales sobre la vida. ¡Espero que pronto nos podamos juntar en nuestra piscina!

A las Runners en Prácticas, los Pintxopotos y la gente del Tubo, por esos momentos de evasión entre risas y vinos.

A mi familia, siempre me habéis animado y apoyado a hacer lo que yo quisiera. Me habéis enseñado lo que es la constancia, el sacrificio y la pasión por el trabajo. A mis sobrinas, por alegrarme los días. Y sí chicas, ¡por fin he terminado de escribir este libro!

A Iñaki, porque desde el principio me has apoyado en esta locura que supone el Doctorado. En estos cuatro años la vida nos ha dado algún que otro revés pero juntos siempre hemos superado todo y hemos salido reforzados. ¡Gracias por todo!

¡Muchísimas gracias a tod@s porque de una u otra forma me habéis ayudado a superar este reto tan importante para mí!

Los capítulos de esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

1. **Echeverría, I.***, **de Miguel, R.***, **Asín, J.**, **Rodríguez-Largo, A.**, **Fernández, A.**, **Pérez, M.**, **de Andrés, D.**, **Luján, L.**, **Reina, R.**, (2020). Replication of Small Ruminant Lentiviruses in Aluminum Hydroxide-Induced Granulomas in Sheep: a Potential New Factor for Viral Dissemination. *Journal of Virology*, vol. 95, no 2.

*Irache Echeverría and Ricardo de Miguel contributed equally to this work. Author order was determined by increasing seniority.

2. **Echeverría, I.**, **De Miguel, R.**, **De Pablo-Maiso, L.**, **Glaría, I.**, **Benito, A.A.**, **De Blas, I.**, **De Andrés, D.**, **Luján, L.**, **Reina, R.**, (2020). Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 7, p. 182.

3. **Ramírez, H.***, **Echeverría, I.***, **Benito, A.A.**, **Glaría, I.**, **Benavides, J.**, **Pérez, V.**, **de Andrés, D.**, **Reina, R.**, (2021). Accurate Diagnosis of Small Ruminant Lentivirus Infection Is Needed for Selection of Resistant Sheep through TMEM154 E35K Genotyping. *Pathogens*, vol. 10, no 1, p. 83.

*Hugo Ramírez and Irache Echeverría contributed equally to this work. Author order was determined by increasing seniority.

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

- “Adyuvantes vacunales alternativos en enfermedades infecciosas ovinas para hacer frente a los efectos adversos derivados del hidróxido de aluminio como adyuvante”.
RTI2018-096-172-B-C31
- “Inmunidad innata en procesos inmunomediados, ASIA ovino y lentivirus animales”.
MINECO AGL 2013-49137-C3-1R
- “Epidemiología molecular y control innato de las infecciones lentivirales en el ganado Navarro.”
Gobierno de Navarra. Plan de Desarrollo Rural (PDR).

Irache Echeverría Garín agradece a la Universidad Pública de Navarra (UPNA) la beca otorgada para la Formación de Personal Investigador predoctoral, que ha permitido la realización de este trabajo de investigación.

La Tesis Doctoral comprendida en este volumen está organizada de tal forma que los resultados obtenidos durante la realización de la misma se agrupan en capítulos que se corresponden con los artículos científicos a los que han dado lugar dichos resultados. Así, cada capítulo contiene su propio resumen, una introducción específica, describe los materiales y métodos utilizados, presenta los resultados, la discusión de los mismos y, por último, la bibliografía correspondiente. Por tanto, cada capítulo agrupa la información necesaria relacionada al tema que en él se desarrolla, permitiendo su lectura de manera independiente al resto de los capítulos. Además, este documento incluye un resumen, una introducción general, unos objetivos, una discusión global respecto a los proyectos futuros de la investigación y, por último, se exponen las conclusiones finales.

ÍNDICE

ÍNDICE	XIV
RESUMEN	19
SUMMARY	25
INTRODUCCIÓN	31
1. <i>El género lentivirus</i>	31
1.1 Historia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (SRLV).....	32
1.2 Estructura y genoma	34
1.3 Ciclo replicativo	38
1.4 Rutas de transmisión.....	42
2. <i>Patogénesis</i>	44
2.1 Forma pulmonar.....	47
2.2 Forma nerviosa.....	48
2.3 Forma mamaria.....	48
2.4 Forma articular.....	49
3. <i>Clasificación filogenética</i>	50
4. <i>Respuesta inmunitaria frente a la infección por SRLV</i>	55
4.1 Inmunidad innata	56
4.2 Inmunidad adaptativa	59
5. <i>Factores de susceptibilidad a la infección</i>	63
6. <i>Diagnóstico</i>	70
6.1 Diagnóstico clínico y anatomopatológico	70
6.2 Diagnóstico inmunológico.....	71
6.3 Diagnóstico viral.....	75
7. <i>Importancia de la infección</i>	78
7.1 Distribución	78
7.2 Impacto económico.....	82
7.3 Prevención y control	86

8. Vacunación	93
8.1 El uso de vacunas en medicina veterinaria	93
8.2 Adyuvantes: mecanismos de acción y tipos	94
8.3 Efectos adversos de la vacunación	98
8.4 Granulomas post-vacunales.....	103
REFERENCIAS.....	105
OBJETIVOS	131
CHAPTER I.....	133
<i>Replication of Small Ruminant Lentiviruses in Aluminium Hydroxide-Induced Granulomas in Sheep: a Potential New Factor for Viral Dissemination</i>	133
ABSTRACT	135
INTRODUCTION	136
MATERIAL AND METHODS	138
RESULTS.....	142
DISCUSSION.....	150
REFERENCES.....	155
CHAPTER II.....	159
<i>Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses</i>	159
ABSTRACT	161
INTRODUCTION.....	162
MATERIAL AND METHODS	164
RESULTS.....	167
DISCUSSION.....	176
REFERENCES.....	180
CHAPTER III.....	183
<i>Accurate Diagnosis of Small Ruminant Lentivirus Infection Is Needed for Selection of Resistant Sheep through TMEM154 E35K Genotyping</i>	183
ABSTRACT	185
INTRODUCTION.....	186
MATERIAL AND METHODS	188
RESULTS.....	191
DISCUSSION.....	202
REFERENCES.....	206
PROYECTOS FUTUROS.....	209
CONCLUSIONES	229

RESUMEN

RESUMEN

La infección por lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) es seguramente la infección incurable más extendida en el ganado ovino y caprino de todo el mundo. La enfermedad afecta a pulmones, articulaciones, sistema nervioso central y/o glándula mamaria, causando diversos problemas en la salud y la producción de los animales infectados en función de la estirpe viral, la raza o el sistema de producción. Tras la infección, que se produce principalmente mediante la ingesta de calostro infectado o a través de secreciones respiratorias, los animales desarrollan una respuesta humoral de por vida, que se puede detectar en el suero mediante el empleo de técnicas serológicas, como el ELISA. El virus se integra en el genoma de monocitos o células dendríticas ocultándose del sistema inmunitario, modificando así la respuesta y adaptando el ambiente celular para favorecer su replicación. En ausencia de estrategias de vacunación efectivas, el control epidemiológico de la infección se realiza mediante la identificación serológica de los animales infectados y su posterior eliminación del rebaño. A pesar de los buenos resultados obtenidos con esta estrategia, la gran diversidad antigénica de los SRLV, la presencia de animales infectados en ausencia de anticuerpos detectables y el diseño mono-estirpe empleado en la mayoría de los test disponibles en el comercio, ponen en cuestión su efectividad. Por ello, se han identificado genes candidatos para el desarrollo de estrategias de control basadas en la selección genética de animales resistentes a los SRLV.

Esta Tesis plantea tres objetivos que se desarrollarán en tres capítulos independientes, correspondientes a sus respectivas publicaciones. Por un lado, se ha caracterizado la presencia y replicación de SRLV en macrófagos procedentes de granulomas inducidos tras la vacunación con formulaciones basadas en hidróxido de aluminio, el adyuvante más común en las vacunas ovinas. En segundo lugar, se ha analizado una población de más de 1000 individuos en diferentes sistemas de producción y razas e infectados por diferentes cepas de SRLV. Se ha realizado un estudio serológico y molecular con las herramientas disponibles en el comercio y se ha analizado la asociación de parámetros productivos, en granjas de carne y leche, con la presencia de infección. Por último, se han analizado poblaciones ovinas correspondientes a cuatro razas de importancia productiva teniendo en cuenta su estado sanitario y el genotipo de la proteína TMEM154, uno de los candidatos más prometedores para su implantación en programas de selección genética.

Presencia de SRLV en granulomas post-vacunales. La replicación de SRLV en granulomas inducidos por sales de aluminio ha sido demostrada *in vitro* en 5 de las 10 ovejas analizadas. Mediante inmunohistoquímica (IHC) se ha evidenciado la presencia de SRLV en los macrófagos presentes en los granulomas. Las secuencias virales obtenidas en granulomas, monocitos sanguíneos y otros tejidos son similares en la mayoría de los animales. Sin embargo, también se encontraron animales con diferencias notables entre las cepas aisladas en los granulomas y otros tejidos. El genotipo B2 ha sido el predominante, alcanzando una distribución corporal más amplia de lo descrito anteriormente. También se han identificado eventos de recombinación entre los genotipos B2 y A3. Por tanto, nuestros resultados indican que los granulomas derivados de la inoculación de hidróxido de aluminio pueden representar un compartimento ideal para la replicación de SRLV y tal vez, alterar la infección natural proporcionando un ambiente adecuado para la propagación, alcanzando así una mayor distribución en el organismo.

Asociación de la infección a parámetros productivos cárnicos y lecheros en diferentes razas. En este estudio se ha analizado la asociación entre la infección por SRLV y la variación de parámetros productivos de cuatro rebaños ovinos, dos de raza Latxa Navarra orientados a la producción láctea; y dos de Raza Navarra orientados a la producción cárnica. Para llevar a cabo la clasificación de los animales en función del estado de la infección se han utilizado tres tests ELISA comerciales y dos técnicas de PCR. La prevalencia total de la infección por SRLV se estimó en un 19% y, sorprendentemente, menos de la mitad de los animales infectados fueron detectados por un solo método diagnóstico, destacando la importancia de combinar diferentes test. Los parámetros productivos fueron analizados a lo largo de todo un período de lactancia o reproducción y fueron comparados entre los animales positivos y negativos. El análisis estadístico reveló que utilizando la combinación de métodos diagnósticos para realizar la clasificación de los animales, se encuentra asociación entre la infección por SRLV y un menor tamaño de la camada, un menor peso en el nacimiento y una menor ganancia media diaria en el caso de los rebaños de aptitud cárnica. En los rebaños de aptitud lechera la infección se asoció con una menor producción láctea, con una menor cantidad de grasa y proteína, y con un recuento de células somáticas mayor. Por tanto, una estrategia multiplataforma para el diagnóstico de SRLV es útil para asegurar una correcta clasificación de los animales, validando los estudios posteriores que valoran su efecto sobre diferentes parámetros productivos.

Evaluación de estrategias de selección genética de animales resistentes en base al genotipo TMEM154. Los estudios de asociación de todo el genoma han descrito el polimorfismo E35K de la proteína TMEM154 como un buen marcador genético para la selección de animales resistentes a la infección por SRLV en algunas razas americanas y europeas. En este estudio, con el objetivo de conocer el estado de la infección, se realizó un cribado serológico y virológico multiplataforma de más de 500 animales de cuatro razas diferentes y todos ellos fueron genotipados para caracterizar el polimorfismo TMEM154 E35K. La frecuencia de los alelos de TMEM154 difirió sustancialmente entre las razas y se encontró una asociación positiva entre la seroprevalencia y el genotipo TMEM154 solo en una de ellas. La selección genética basada en TMEM154 puede ser adecuada para algunas razas ovinas o cepas de SRLV específicas, pero la generalización a todo el espectro genético de SRLV, a todas las razas ovinas o situaciones epidemiológicas necesitaría una validación adicional.

SUMMARY

SUMMARY

Small ruminant lentiviruses (SRLV) cause the most widespread incurable infection in sheep and goats worldwide. The disease affects the lungs, carpal joints, central nervous system and/or udder, causing health problems that may affect animal production depending on a myriad of factors including breed susceptibility, virulence of circulating strains or management system. Animals are mainly infected by ingestion of infected colostrum or through contact with respiratory secretions. After infection, animals develop a lifelong humoral response, which can be detected by serological techniques, such as ELISA. The virus integrates into the genome of monocytes or dendritic cells hiding from the immune system, thus modifying the response and adapting the cellular environment in favor of its replication. Due to the lack of treatments and protective vaccination strategies, epidemiological control is focused on the identification of infected animals through serological techniques and culling of the seropositives. However, antigenic heterogeneity, poor antibody production and single strain design of most available ELISA test, pose a threat to SRLV diagnosis. Therefore, genome-wide association studies (GWAS) have opened the possibility to apply genetic selection programs by describing a number of candidate genes associated to SRLV resistance.

This Thesis addresses three objectives that will be developed in three independent chapters corresponding to their respective publications. In the first one, SRLV presence and replication has been demonstrated in macrophages within granulomas induced after inoculation with aluminium-based vaccines, the most common adjuvant in ovine vaccines. Second, a population of more than 1000 sheep belonging to different production systems, breeds and infected by different SRLV strains has been analyzed serologically and molecularly using commercially available tools, in association to productive traits in meat and dairy farms. Finally, sheep corresponding to four different breeds relevant for the sheep industry have been analyzed taking into account their infectious status and the TMEM154 (E35K) genotype, one of the most promising candidates for genetic selection programs.

Presence of SRLV in post-vaccination granulomas. *In vitro* studies demonstrated SRLV presence and replication in aluminium induced granulomas from 5 out of 10 sheep analyzed. Immunohistochemistry (IHC) evinced granular, intracytoplasmic SRLV presence in macrophages within granulomas. Viral sequences obtained from granulomas, blood monocytes, and other tissues were similar in most animals. However, notable differences

between isolated strains in granulomas and other tissues in specific animals were also observed. The B2 genotype was the most commonly found, reaching a wider body distribution than previously described. Recombination events between genotypes B2 and A3 have also been identified. Therefore, our results indicate that aluminum hydroxide-derived granulomas may represent an ideal compartment for SRLV replication, perhaps altering natural SRLV infection by providing a new suitable environment for propagation, thus achieving greater distribution within the organism.

Association of SRLV infection to meat and dairy production traits in different ovine breeds. In this study, association between SRLV infection and ovine productive traits were evaluated in four sheep flocks belonging to two different production systems (dairy and meat) and breeds (Raza Navarra and Latxa Navarra). Animal classification according to SRLV infection status was achieved using three different ELISA and two PCR strategies. SRLV was present in 19% of the total population, and surprisingly, less than half of the infected animals were detected by a single diagnostic method, highlighting the importance of combining different diagnostic techniques. Productive parameters were recorded along one whole lactation or reproductive period and compared between positive and negative animals. Statistical analysis employing animal classification using all the diagnostic methods associated lambing size, lamb weight at birth, and daily weight gain with SRLV infection status in meat flocks. Lower milk production with, in addition, a lower amount of fat and protein, as well as a higher somatic cell count were associated with SRLV infection in dairy flocks. Therefore, a multi-platform SRLV diagnostic strategy was useful for ensuring correct animal classification, thus validating downstream studies investigating production traits.

Evaluation of strategies based on the genetic selection of resistant sheep according to the TMEM154 genotype. Genome-wide association studies have described TMEM154 E35K polymorphism as a good genetic marker for the selection of resistant animals to SRLV infection in some American and European breeds. In this study, a multitargeted serological and virological screening of more than 500 animals from four different breeds attending to SRLV infection status was performed. Then, animals were genotyped to characterize TMEM154 E35K polymorphism. TMEM154 allele frequency differed substantially among breeds and a positive association between seroprevalence and TMEM154 genotype was found only in one of them. Selection based on TMEM154 may be

suitable for specific ovine breeds or SRLV strains, however generalization to the whole SRLV genetic spectrum, ovine breeds, or epidemiological situations may need further validation.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El género lentivirus

El género Lentivirus, perteneciente a la familia Retroviridae, presenta en su genoma dos cadenas positivas idénticas de RNA viral monocatenario, que se retrotranscriben a DNA de doble cadena gracias a la acción de la retrotranscriptasa (Rt), enzima clave de esta familia.

Los lentivirus pueden clasificarse atendiendo a diferentes aspectos como el tropismo, la filogenia y el efecto sobre el sistema inmunitario, entre otros. En función del tropismo celular y del tipo de enfermedad que provocan, los lentivirus se pueden clasificar en dos grupos. Por un lado se encuentran los que replican en linfocitos y macrófagos, y causan un síndrome de inmunodeficiencia adquirida como consecuencia de la depleción o el mal funcionamiento de los linfocitos T CD4+. En este grupo se encuentran los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HIV-1 y HIV-2), el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) y el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV). En el segundo grupo se encuentran virus que no infectan linfocitos y se replican predominantemente en macrófagos. Causan una enfermedad caracterizada por la afección del sistema retículo-endotelial, pulmones, sistema nervioso central (SNC), articulaciones y glándula mamaria, sin una severa depleción linfocitaria en sangre. Estos son el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), el virus Maedi Visna (VMV) y el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV).

En 1843 se describió en Francia por primera vez en caballos la presencia de ciclos recurrentes de fiebre, anemia, pérdida de peso y edema ventral. A esta enfermedad se le denominó anemia infecciosa equina (EIA), y en 1904 se comprobó que era causada por un virus (Carre and Vallee, 1906, 1904), convirtiéndose en la primera enfermedad animal a la que se le asigna una etiología viral. Años después, la enfermedad producida en ovejas por el virus Maedi Visna (VMV) fue la primera descrita bajo la categoría de las denominadas “infecciones lentas”, y la primera cuyo agente causal fue identificado como un lentivirus (Sigurdsson, 1954); y veinte años después, se describió en Estados Unidos la enfermedad causada por el virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV) (Cork et al., 1974). Estos dos últimos, a pesar de que inicialmente fueron descritos de forma diferencial atendiendo a la especie afectada, ovinos en el caso de VMV y caprinos en el de CAEV, hoy se agrupan dentro de un mismo grupo genético denominado lentivirus de pequeños rumiantes (*Small*

Ruminant Lentiviruses, SRLV), debido a la proximidad filogenética y a la capacidad de traspasar la barrera inter-específica (Minardi da Cruz et al., 2013; Shah et al., 2004a; Zaroni, 1998). El BIV se descubrió a finales de la década de los 60, en búsqueda del agente infeccioso causante de la leucemia/linfoma bovino/o (Van Der Maaten et al., 1972). En 1983, el HIV fue descrito y considerado como el agente causal de la epidemia del SIDA por el equipo de Luc Montagnier en Francia (Barré-Sinoussi et al., 1983). Actualmente se conoce que existen dos tipos, HIV-1 y HIV-2, siendo el primero más virulento e infeccioso y el causante de la mayoría de infecciones de HIV en el mundo. Dos años después fue descubierto el SIV en macacos Rhesus cautivos que sufrían una enfermedad similar al SIDA, y posteriormente se demostró que el HIV-1 y el HIV-2 provenían de lentivirus de los simios, evidenciándose así la habilidad de los lentivirus para cruzar la barrera de especie (Apetrei et al., 2004). Finalmente, en 1986 fue descubierto el FIV en una colonia de gatos que tenía una alta prevalencia de infecciones oportunistas y condiciones degenerativas, causando un síndrome similar al del SIDA (Pedersen et al., 1987). Actualmente está presente en poblaciones de gatos domésticos y salvajes de todo el mundo, la prevalencia varía según la región pero se estima que en todo el mundo hay millones de animales infectados por FIV (Eckstrand et al., 2017).

1.1 Historia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (SRLV)

Durante la recesión económica provocada por la caída de la bolsa neoyorquina en 1929, el gobierno de Islandia, con el objetivo de mejorar la producción de las razas autóctonas, decidió permitir en 1933 la importación de 20 machos de raza Karakul procedentes de Alemania (Sigurdsson, 1954). En el momento de la importación, los animales no presentaban ninguna patología respiratoria y tras pasar el periodo de cuarentena, se incorporaron a varios rebaños islandeses. Como se descubrió más adelante, algunos de estos animales eran portadores del virus Maedi Visna, de la Paratuberculosis y de la Adenomatosis Pulmonar Ovina (APO) (Pálsson, 1962; Sigurdsson, 1954). Sin embargo, no fue hasta 1939 cuando se tomó conciencia de que la cabaña islandesa presentaba una enfermedad desconocida hasta el momento, la cual fue identificada por primera vez por el equipo del Dr. Gíslason (Sigurdsson, 1954). La enfermedad se manifestaba, por un lado, en animales que presentaban un síndrome respiratorio al que comenzaron a llamar Maedi (palabra que en islandés significa disnea o fatiga) y, por otro, en animales con un cuadro nervioso que denominaron Visna (en islandés, desgaste o adelgazamiento) (Sigurdsson,

1954). A finales de 1952, todas las ovejas que se encontraban en las zonas afectadas por la enfermedad fueron sacrificadas, se estima 300.000 cabezas, y se introdujeron aproximadamente 180.000 ovejas sanas procedentes de zonas indemnes de la isla.

En 1957 el virus Maedi Visna (VMV) fue aislado por Sigurdsson (Sigurdsson and Palsson, 1958), convirtiéndose en el primer lentivirus descrito y dando lugar a la introducción del concepto de infecciones lentas, caracterizadas por presentar un periodo de latencia largo en el que el virus se propaga constantemente, diseminándose por el cuerpo sin dar lugar a ningún tipo de sintomatología hasta que, tras un proceso de replicación y exposición al sistema inmunitario, aparece el período de signos clínicos. En 1974 se llegó a la conclusión de que tanto el “Maedi” como el “Visna” eran dos síndromes producidos por un mismo virus (Gudnadóttir, 1974). Ese mismo año se describió en Estados Unidos la enfermedad causada por el CAEV, así como su etiología retroviral (Cork et al., 1974) y finalmente fue aislado en 1980 (Crawford et al., 1980).

Sin embargo, la primera referencia de la enfermedad podría datar del año 1862, cuando se describe una enfermedad con cuadro respiratorio crónico en el ganado ovino de la isla holandesa de Texel (Loman, 1862). En otros lugares se habían descrito cuadros clínicos idénticos al del virus Maedi Visna (VMV) pero se les dieron diferentes denominaciones. En Sudáfrica recibió el nombre de “enfermedad de Graaff-Reinet” (De Kock, 1929), en Estados Unidos se le llamó “enfermedad de Montana” (Marsh, 1923) o “Neumonía Progresiva Ovina (*Ovine Progressive Pneumonia*, OPP)” (de la Concha-Bermejillo, 1997), en Francia se le denominó “Bouhite” o “lymphomatose pulmonaire maligne du mouton” (Lucam, 1942) y en Holanda se conocía como “Zwoegerziekte” (Koens, 1943). En 1968 Ressang y colaboradores propusieron (Ressang et al., 1968) el nombre islandés Maedi Visna para todas ellas y aunque actualmente la mayoría utilizan esta nomenclatura, en algunos países como en EEUU, se le sigue denominando Neumonía Progresiva Ovina.

Tras su descubrimiento en Islandia, la infección se identificó en varios países, entre ellos, Dinamarca en 1968 (Hoff-Jorgensen, 1978), Canadá en 1970 (Dukes et al., 1979), Hungría en 1972 (Suveges and Szeky, 1973), Francia en 1976 (Cottureau et al., 1977), Noruega en 1979 (Krogsrud and Udnes, 1978) y Finlandia en 1994 (Sihvonen et al., 1999). En nuestro país, la primera descripción fue realizada a principios de los años ochenta en el País Vasco (Badiola et al., 1983). Por tanto, el MV supone un claro ejemplo de transmisión

y epidemia de un virus en una población animal como resultado de la importación de ejemplares vivos infectados (Pálsson, 1976).

Debido al impacto socioeconómico que provoca el Maedi Visna, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) la ha incluido en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de animales terrestres y acuáticos con un importante impacto en el comercio internacional de animales y los productos derivados de los mismos (<https://www.oie.int>).

1.2 Estructura y genoma

Todos los lentivirus presentan una estructura y una organización genómica muy similares. Se componen de una envoltura lipídica, que procede de la membrana plasmática celular, en la que están embebidas las glicoproteínas de la envoltura viral (Env) formadas por dos subunidades, una transmembrana (Tm) y una externa (Su). En el interior se encuentra la matriz proteica (Ma) que rodea a la cápside (Ca). A su vez, esta última rodea a la nucleocápside (Nc) donde se encuentran el genoma viral y varias proteínas asociadas como la retrotranscriptasa (Rt), la proteasa (Pr) y la integrasa (In). El genoma viral está constituido por dos cadenas monocatenarias de RNA idénticas de sentido positivo, de entre 8 y 9,5 Kb dependiendo de las estirpes, que contiene tres genes estructurales (*env*, *gag* y *pol*) y tres genes accesorios (*vif*, *vpr-like* y *rev*), flanqueados en ambos extremos cuando se encuentra en forma de DNA proviral, por una región repetida no codificante denominada Long Terminal Repeat (LTR) (**Figura 1**).

Genes estructurales:

- I. **Gen *env* (*envelope*):** codifica las glicoproteínas de la envoltura viral responsables de la unión con el receptor celular. Éstas se sintetizan a partir de un único precursor, la glicoproteína gp160, que es digerido por una proteasa celular en las subunidades transmembrana (Tm o gp46) y de superficie (Su o gp135). La proteína Env se expresa en la membrana de células infectadas y es capaz de unirse a receptores en la membrana de células sanas adyacentes provocando la fusión de membranas y permitiendo así la propagación de la infección sin necesidad de producir partículas virales completas (Sánchez et al., 2002; Yan and Chen, 2012). Dicha fusión celular origina *in vitro* la formación de sincitios o células multinucleadas, que forma parte del efecto citopático (CPE), característico de las infecciones por SRLV. Las proteínas codificadas por el gen *env* desencadenan la formación de anticuerpos neutralizantes, aunque se han descrito

- mutantes de escape a la neutralización (Haflidadóttir et al., 2008; Laakso et al., 2007). El reconocimiento del receptor celular por parte de la proteína Env la convierte en un factor potencialmente determinante del tropismo y la patogénesis de los SRLV (Pisoni et al., 2007; Ramírez et al., 2012).
- II. Gen *gag* (*group specific antigen*): se transcribe como una única poliproteína (p55), que es digerida por la proteasa viral produciendo las proteínas estructurales de la nucleocápside (Nc o p14), cápside (Ca o p25) y matriz (Ma o p17). La proteína de la cápside, p25, es la más abundante del virión, forma el core hidrofóbico viral y es capaz de inducir una fuerte respuesta humoral, por lo que se emplea como antígeno en los test ELISA indirectos disponibles en el comercio (de Andrés et al., 2005). Además, p25 está relativamente conservada entre los genotipos de SRLV, lo que favorece la detección de anticuerpos por reactividad cruzada (Rosati et al., 1999). La proteína de la matriz, p17, asegura la unión entre la cápside y la envoltura, mientras que la proteína de la nucleocápside, p14, engloba el RNA viral junto con las enzimas necesarias para la transcripción e integración del virus.
- III. Gen *pol* (*polymerase*): codifica proteínas que ejercen su actividad en distintos puntos del ciclo viral y están relacionadas con la replicación y la integración del material genético. Una de ellas es la retrotranscriptasa (Rt), enzima clave de los retrovirus, capaz de sintetizar una doble cadena de DNA a partir de RNA viral monocatenario. Además, durante el proceso degrada la hebra de RNA del híbrido RNA/DNA y elimina el cebador tRNA^{Lys-3} a través de su actividad RNAasa H. También se encuentran las regiones que dan lugar a la proteasa (Pr), la cual madura el precursor proteico de Gag (p55) en las tres proteínas estructurales; y la integrasa (In), encargada de activar los extremos de los transcritos reversos para la integración del DNA viral en forma de provirus en el genoma celular del hospedador. En el gen *pol* también se encuentra la secuencia que codifica la dUTPasa (desoxiuridin trifosfatasa), implicada en la virulencia y la tasa de mutación viral (Payne and Elder, 2005). Su función es la de hidrolizar dUTP a dUMP, impidiendo así la mutagénesis por incorporación errónea de uracilo durante la retrotranscripción. Esta actividad enzimática es de especial importancia en células que no se dividen, como los macrófagos, que son además células diana de los SRLV (Terai and Carson, 1991), aunque se le han asociado otras funciones relacionadas con la estimulación de la inmunidad innata en otros virus (Ariza et al., 2014). Los SRLV desprovistos de dUTPasa de manera artificial mediante ingeniería genética, se replican con menor eficiencia en macrófagos

in vitro (Turelli et al., 1996), aunque no es necesaria para causar neuropatogenicidad *in vivo* (Pétursson et al., 1998). Sin embargo, algunos SRLV pertenecientes al genotipo E y carentes de dUTPasa de manera natural, no presentan un alto número de mutaciones y se encuentran en altas cargas virales *in vivo*, lo cual lleva a replantear la definición de las funciones de la dUTPasa (Reina et al., 2009a).

Genes accesorios:

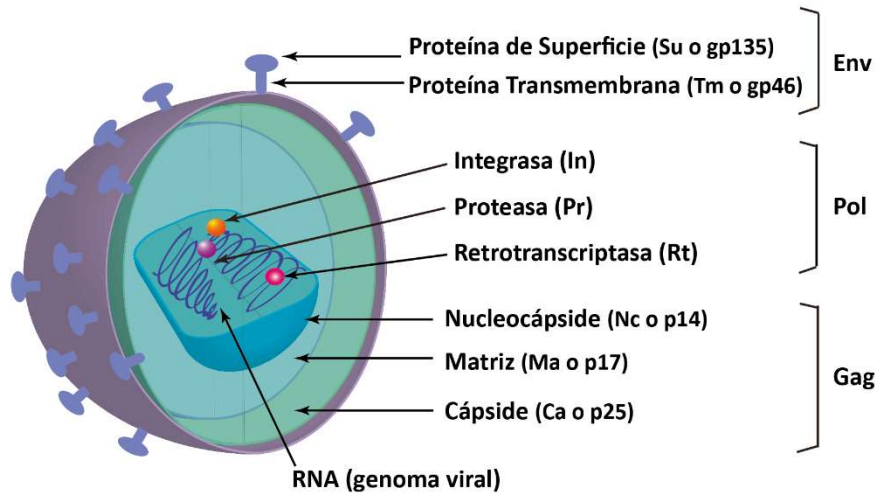
- I. Gen **vif** (**viral infectivity factor**): codifica una proteína esencial para la replicación de HIV-1 en linfocitos (Gabuzda et al., 1992) y es también necesaria en la replicación de HIV-2 (Reddy et al., 1995), SIV (Desrosiers et al., 1998), FIV (Tomonaga et al., 1992) y CAEV (Harmache et al., 1995). En el caso del VMV, se ha considerado esencial para la replicación en las células diana naturales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kristbjörnsdóttir et al., 2004). Se han identificado mutaciones en *vif* que dan lugar a una replicación atenuada en macrófagos *in vitro* y virus delecionados en *vif* que presentan un aumento en la tasa de mutaciones. Su importancia se centra en evitar la incorporación en las partículas virales del factor de restricción celular APOBEC3 (A3) presente en las células no permisivas (Sheehy et al., 2002). Tras la unión, Vif induce la degradación de A3 vía proteasoma (de Pablo-Maiso et al., 2017a; LaRue et al., 2010) con implicación de cofactores como la Ciclofilina A (CYPA) (Kane et al., 2015).
- II. Gen **rev** (**regulator of virion expression**): codifica una proteína esencial para la replicación viral, que está implicada tanto en el “*splicing*” (corte y empalme) que sufre el mRNA viral durante su maduración, como en la protección y el transporte del mismo desde el núcleo al citoplasma para su posterior traducción. Contiene señales que le permiten entrar al núcleo donde ejerce su acción mediante su unión al RRE (**Rev Responsive Element**), situado en el gen *env* (Tiley et al., 1991; Toohey and Haase, 1994).
- III. Gen **vpr-like** (**viral protein R**): en un principio se denominó *tat* por su analogía con la posición en el genoma de HIV, sin embargo, su actividad transactivadora es prácticamente nula (Villet et al., 2003b). Posteriormente, estudios funcionales demostraron una mayor compatibilidad con la proteína Vpr (Villet et al., 2003a), que ejerce un papel importante en la regulación del transporte del complejo de preintegración (PIC, **Preintegration complex**) al núcleo. Además, es necesaria para la replicación del virus en células que no se dividen, como las de la serie monocito-macrófago, células diana del virus. Sin embargo, puede inducir un bloqueo del ciclo

celular en fase G2 y apoptosis en células en proliferación, lo que puede desencadenar una disfunción inmunitaria (Villet et al., 2003a). También es capaz de inducir apoptosis por la vía clásica (Bouzar et al., 2003).

- IV. **LTR (Long Terminal Repeat)**: son repeticiones de material genético que no dan lugar a proteínas. En la forma de provirus, la región LTR está presente de manera duplicada en ambos extremos del genoma. Contiene tres regiones: U3, R y U5, y su principal función es la de proporcionar los sitios de unión a los factores de transcripción celulares, activando o regulando la transcripción de las proteínas virales (Barros et al., 2005). Incluye todas las señales necesarias para la expresión génica de eucariotas como el promotor o *enhancer*, el punto de inicio de la transcripción (*capping*), el terminador de la transcripción y la señal de poliadenilación. La expresión, dirigida por las señales contenidas en la LTR, se lleva a cabo por las enzimas de la célula hospedadora. La región U3, situada en el extremo 5' del provirus, contiene la caja TATA, que marca el inicio de la transcripción, y los elementos de unión a factores de transcripción necesarios para la regulación. Además, contiene los elementos que median la activación inducida por IFN- γ y por TNF- α . La región U5 es la primera que se retrotranscribe y constituye el extremo 3' del provirus, y por último, la región R contiene el sitio CAP y la señal de poliadenilación de los mRNA. La región LTR, también es importante desde el punto de vista del diagnóstico molecular por PCR, ya que presenta secuencias duplicadas en el provirus con zonas conservadas (Álvarez et al., 2006), lo que favorecería el diseño de cebadores específicos y podría aumentar la sensibilidad. Además, numerosos autores han asignado a esta región un papel importante en el tropismo y la patogénesis de SRLV ya que puede regular las fases productivas de la infección, aunque actualmente no hay un consenso sobre el mecanismo que explique su implicación en la patogénesis de la infección (Gomez-Lucia et al., 2014; Murphy et al., 2010).

En 2008 se caracterizó una nueva proteína auxiliar, denominada Rtm, que se produce mediante un corte y empalme adicional del mRNA, sugiriendo además que el patrón de corte y empalme del genoma de los SRLV es más complejo de lo descrito hasta el momento y es capaz de generar un repertorio más amplio de proteínas. La alta conservación del sitio de corte y emplame utilizado para la síntesis del mRNA de Rtm entre las cepas de CAEV y VMV sugiere que esta proteína juega un papel en la propagación de los SRLV *in vivo*, probablemente compitiendo con las funciones de la proteína Env (Valas et al., 2008).

A)



B)

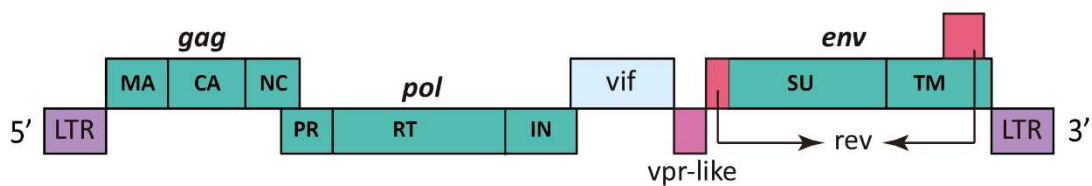


Figura 1. Estructura del virión y genoma de los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV). A) Virión de SRLV mostrando sus principales componentes, entre ellos las dos cadenas de RNA de sentido positivo, las proteínas estructurales de Gag (nucleocápside, Nc, cápside, Ca y matriz, Ma), las proteínas Pol (proteasa, Pr, retrotranscriptasa, Rt e integrasa, In) y las glicoproteínas Env (superficie, Su y transmembrana, Tm) distribuidas en la envoltura lipídica de origen celular. B) Genoma de los SRLV (LTRs, *gag*, *pol*, *vif*, *vpr-like*, *rev* y *env*). Se han representado en distintos marcos de lectura (*Reading frames*) que permiten al virus minimizar su longitud para producir todas las proteínas señaladas.

1.3 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo de los lentivirus consta de las siguientes fases: entrada a la célula hospedadora, retrotranscripción, integración, expresión de las proteínas virales, ensamblaje, maduración de las partículas virales y finalmente, salida de la célula (**Figura 2**).

I. Entrada en la célula hospedadora

El ciclo viral comienza con el reconocimiento de un receptor situado en la superficie de una célula susceptible por parte de la glicoproteína de la envoltura viral (Su o gp135). Tras

la unión, se produce la fusión entre la membrana celular y la envoltura vírica, con la consiguiente liberación de la cápside vírica en el interior de la célula hospedadora. Las células diana principales son los monocitos/macrófagos y las células dendríticas, sin embargo, se ha descrito la infección en otros tipos celulares. Aunque hasta el momento no se ha identificado un receptor celular único para los SRLV, sí hay descritos diferentes receptores en función del tipo celular (Bruett et al., 2000; Crane et al., 1991; Crespo et al., 2011) y algunos autores incluso proponen un uso diferencial del receptor según la estirpe de SRLV (Hötzel and Cheevers, 2002).

II. Retrotranscripción e integración

En el interior de la célula, la cápside se separa de la membrana plasmática y libera al citoplasma el genoma viral y varias enzimas, entre las que se incluyen la Rt, In y Pr, que serán transportadas al núcleo. Durante su viaje al núcleo se forma el complejo de pre-integración (PIC), en el que se completará la retrotranscripción de la doble cadena de DNA a partir del RNA viral. Este proceso comienza en la región U5, ya que es donde se encuentra el sitio de unión del cebador (PBS, *primer binding site*) de tRNA^{Lys-3}, marcando el inicio de la síntesis de la cadena complementaria de DNA de sentido negativo (cDNA-). El RNA del híbrido RNA-DNA es degradado por la actividad RNAasa H de la Rt, que finalmente sintetiza la cadena de sentido positivo (cDNA+) desde los denominados tractos de polipurinas (cPPT) situados al final del gen *pol* e inmediatamente aguas arriba de la 3'-LTR (3'PPT), que no son degradados por la RNAasa H. Durante este proceso se han duplicado las regiones U3, R y U5, generándose dos copias de la región LTR que se sitúan a ambos flancos del DNA viral. Este material genético se conoce como DNA proviral o provirus. La Rt posee una alta tasa de error que puede generar mutaciones en el provirus, que pueden resultar beneficiosas para la supervivencia de los virus, ya que podría ayudarles a evadir el sistema inmunitario del hospedador.

A continuación, esta doble cadena de DNA es transportada al núcleo donde se integra en el genoma de la célula hospedadora, gracias a la acción de la proteína integrasa. La zona donde se localiza el punto de integración es aleatoria y cada célula integra solamente un único provirus, ya que existen fenómenos de interferencia que impiden que la célula vuelva a infectarse. El provirus se mantiene estable comportándose inicialmente como cualquier otra región del cromosoma, no interfiriendo en la actividad de la misma, y únicamente se replica cuando la célula se divide, transmitiéndose así a células hijas (Coffin M., 1996). Los

monocitos infectados de la médula ósea, principal reservorio de la infección (Peluso et al., 1985), contienen en su genoma el DNA proviral, quedando así el animal infectado de por vida. La diferenciación a macrófagos tisulares es esencial en la activación de la replicación viral, como veremos más adelante.

III. Transcripción

El provirus integrado en el DNA del hospedador puede permanecer en estado latente durante un período indeterminado. La producción vírica es baja pero constante, quedando oculta al sistema inmunitario, y depende de la maquinaria de transcripción celular. Los mecanismos moleculares que regulan su expresión dependen de factores microambientales, siendo uno de los más importantes el grado de maduración de las células.

El virus muestra niveles muy bajos de transcripción y no se detectan proteínas virales en los monocitos sanguíneos infectados, lo cual indica que los monocitos podrían actuar como meros transportadores del virus en la sangre circulante. Tras su maduración a macrófagos tisulares, el virus induce una infección productiva, probablemente debido a que se desencadenan señales para que la RNA polimerasa II celular reconozca y se una a la caja TATA de la región LTR, y comience la transcripción (Mselli-Lakhal et al., 1999; Petursson et al., 1992), y el aumento de la expresión de factores de transcripción celulares (Gendelman et al., 1986; Narayan et al., 1983). De este modo, la transcripción no estaría sólo regulada por los factores disponibles en las células infectadas, sino también por los sitios de unión presentes en la región LTR del virus a dichos factores, el número de éstos y su disposición. Se ha descrito, además, la presencia de sitios de unión a factores de transcripción celulares relacionados con la inmunidad innata del hospedador. Los sitios GAS y TAS estarían alterando la transcripción del genoma viral en presencia de IFN- γ y TNF- α respectivamente, presumiblemente aumentando la replicación viral en zonas en las que se den procesos de inflamación (Murphy et al., 2012, 2007)

A diferencia de los genes *vif*, *vpr-like* y *rev* que se transcriben como mRNA completamente procesados, el mismo RNA codifica las proteínas Gag y Pol por *frame-shift*.

IV. Traducción

La síntesis de las proteínas víricas tiene lugar en dos emplazamientos diferentes del citoplasma y a partir de dos unidades distintas del mRNA. Las proteínas Gag y Pol se

sintetizan en los polirribosomas libres del citoplasma celular, gracias a una modificación post-transcripcional llevada a cabo por la proteasa viral. Mientras que las proteínas de la envoltura se sintetizan a partir del precursor proteico de Env pase por el retículo endoplasmático rugoso y por el aparato de Golgi, donde se glicosila, para transportarse a la cara interna de la membrana plasmática donde comienza el ensamblaje. Una proteasa celular digiere dicho precursor, dando como resultado las proteínas maduras de la envoltura vírica, Su y Tm (Murphy et al., 1999). Los genes *vif*, *rev* y *vpr-like* se traducen como un único mRNA completamente procesado.

V. Ensamblaje, maduración y liberación

Los mecanismos específicos de maduración y liberación no se han desvelado para el caso específico de los SRLV, sin embargo, por analogía con el resto de lentivirus podemos inferir algunos de ellos. Se trata de un proceso concertado y regulado por Gag y por proteínas celulares. Las proteínas Gag y las codificadas por *pol* se ensamblan rodeando el genoma del virus y se asocian a las glicoproteínas virales ancladas en la membrana plasmática. Tras el ensamblaje, la partícula vírica se dirige hacia la membrana celular donde, por un proceso de gemación, sale al medio extracelular cubierta por la membrana plasmática de la célula (envoltura del virus), y de la cual sobresalen las glicoproteínas Su (Coffin M., 1996). La unión de las espículas y una proteólisis final constituyen la fase de maduración final de los precursores proteicos, lo que confiere capacidad infectante a la partícula vírica, tras su liberación al medio extracelular (Murphy et al., 1999).

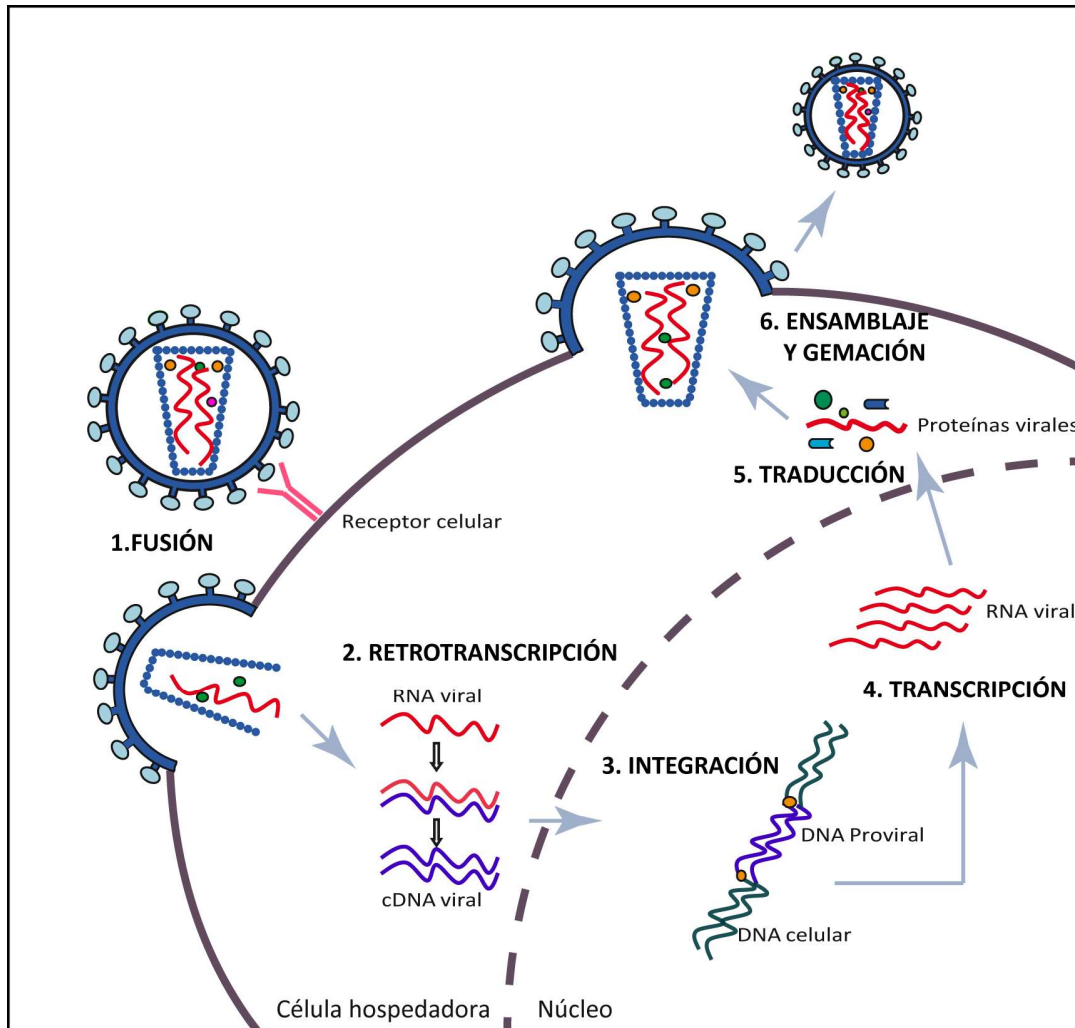


Figura 2. Ciclo viral de los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV). El ciclo viral de los lentivirus comienza con la fusión de la envoltura del virus con la membrana de la célula, entrada del virus en la célula hospedadora, desencapsidación y liberación del material genético en el citoplasma celular. Tras la liberación del material genético comienza la retrotranscripción y la formación del complejo de preintegración, que se transporta al núcleo, donde tiene lugar la integración del DNA proviral en el genoma celular. La maquinaria de transcripción y traducción celular sintetiza las proteínas virales que se ensamblan formando los nuevos viriones que se liberan por gemación.

1.4 Rutas de transmisión

La transmisión de los SRLV ocurre principalmente a través de dos rutas, la horizontal y la vertical. La primera se produce por el contacto directo entre animales sanos e infectados, mediante la aspiración de aerosoles u otras secreciones (Blacklaws et al., 2004; Luján et al., 1994; Peterhans et al., 2004), considerándose la vía oronasal la más efectiva a la hora de transmitir la infección (Blacklaws et al., 2004; Houwers et al., 1989; Leginagoikoa et al.,

2010, 2006b). Esta vía se ve favorecida por el hacinamiento de los animales (Barquero et al., 2013) y el sistema de ordeño (Blacklaws et al., 2004).

La transmisión vertical ha sido demostrada en animales infectados naturalmente (Hasegawa et al., 2017), y se refiere a la transmisión de la madre al cordero que se puede producir durante la gestación, el parto o la lactancia. La transmisión mediante la vía lactogénica se produce por la ingesta de calostro o leche procedente de madres infectadas, y es considerada la principal ruta de transmisión vertical (Peterhans et al., 2004). Se ha detectado la presencia de SRLV en tejido mamario de hembras lactantes mediante PCR *in situ* (Carrozza et al., 2003; Preziuso et al., 2003) y en macrófagos de leche y calostro (Álvarez et al., 2006; Blacklaws et al., 2004; Brinkhof et al., 2010; Extramiana et al., 2002). También se ha demostrado su presencia en células mononucleares del tejido linfoide de la submucosa intestinal en corderos alimentados con calostro infectado (Álvarez, 2005; Preziuso et al., 2004). En un estudio se determinó que corderos aislados alimentados con calostro o leche procedente de ovejas infectadas, seroconvirtieron meses más tarde, y en algunos casos fueron diagnosticados con signos clínicos en su vida adulta (Blacklaws et al., 2004). Hay evidencias de que la transmisión lactogénica es más significativa en pequeños rumiantes que en primates, debido a la mayor permeabilidad del tracto digestivo de pequeños rumiantes en las primeras 24 horas posteriores al parto (Pisoni et al., 2010; Preziuso et al., 2004), lo que permite que viriones y células infectadas sean absorbidos por el intestino del cordero. Dentro del grupo de los SRLV también hay diferencias en la eficiencia de transmisión por esta vía, ya que la envoltura varía entre las diferentes cepas determinando algunas de sus propiedades fisicoquímicas y, por tanto, facilitando o no la transmisión lactogénica (Pisoni et al., 2010). En cuanto a la transmisión intrauterina, los datos oscilan entre un 0 y un 10% de corderos infectados, y se desconoce si la infección se produce *in utero* o en el momento del parto (Ali Al Ahmad et al., 2005). La transmisión en el momento del parto puede darse mientras el cordero pasa a través del tracto genital de la madre y queda, de este modo, expuesto a fluidos corporales y sangre.

En condiciones naturales la vía lactogénica parece tener una importancia relativa menor en la diseminación de la infección en comparación con la transmisión horizontal entre la madre infectada y el cordero, donde la duración del estrecho contacto entre ambos parece jugar un papel decisivo (Álvarez, 2005; Broughton-Neiswanger et al., 2010; Leginagoikoa et al., 2006a).

Se han realizado numerosos estudios tratando de identificar otras vías de transmisión, pero los resultados que muestran son heterogéneos. Experimentalmente se ha conseguido la transmisión de la infección mediante diferentes inóculos, como secreciones de animales infectados, agua contaminada, homogeneizados de órganos o aislamientos víricos, por vía respiratoria (intratraqueal, intranasal, intrapulmonar e intratorácica), intracerebral, endovenosa, digestiva, intramuscular, subcutánea, intrarticular e incluso mediante inoculación en el saco amniótico (Badiola and González, 1990; Torsteinsdóttir et al., 2003). Sin embargo, se desconoce su importancia o relevancia *in vivo*. Algunos autores sugieren que el agua de los bebederos contaminada con saliva o secreciones nasales de ovejas infectadas puede suponer una vía de contagio (Sigurdsson et al., 1953; Villoria et al., 2013), ya que se ha detectado la presencia de ácidos nucleicos del virus en ella. De manera similar, se han detectado partículas virales en tejidos genitales de ovejas infectadas de forma natural (Cortez-Romero et al., 2011). También se han detectado partículas virales y anticuerpos con valor diagnóstico en el semen de animales infectados (Ramírez et al., 2009). La transmisión sexual se ha demostrado empleando semen infectado *in vitro* (Souza et al., 2013) pero, sin embargo, no existe evidencia de una transmisión natural eficaz por esta vía (Peterson et al., 2008; Reina et al., 2011). El riesgo potencial de transmisión asociado a la máquina de ordeño o el uso de agujas no ha sido estudiado en profundidad (Villoria et al., 2013).

El conocimiento de los diferentes mecanismos de transmisión y su importancia relativa es indispensable para la elaboración de programas de control y la erradicación de la infección. A pesar de que las principales rutas de transmisión de los SRLV han sido descritas por diferentes autores, su importancia relativa y alcance continúan sin estar claros.

2. Patogénesis

Independientemente de la ruta de transmisión, una vez el virus entra en el organismo, cruza la barrera de las mucosas e infecta monocitos, macrófagos y células dendríticas. En la concepción clásica de la patogénesis debida a los SRLV, las células dendríticas situadas bajo el epitelio migran por la linfa aferente a los ganglios, donde transmiten la infección a los monocitos/macrófagos, que se diseminan a través del sistema linfático eferente y del conducto torácico. De este modo, los monocitos infectados se introducen en el torrente sanguíneo y distribuyen el virus por los distintos órganos diana. Una vez en los tejidos, los

monocitos maduran a macrófagos activando la replicación viral. La activación de los macrófagos y la expresión de proteínas virales provocan la llamada de más células del sistema inmunitario induciendo los típicos infiltrados linfocitarios presentes en las lesiones (Narayan et al., 1983). Los monocitos infectados pueden entrar en la médula ósea, donde pueden transmitir la infección a células madre mieloides o células del estroma (Gendelman et al., 1986; Grossi et al., 2005). De este modo, la médula ósea actúa como reservorio del virus, siendo una continua fuente de células infectadas que mantienen la infección durante toda la vida del animal (Gendelman et al., 1985). Sin embargo, este extremo no ha sido confirmado y algunos estudios indican que la positividad en la médula ósea no es mayor que en otros lugares, e incluso la infección experimental por esta vía es menos eficaz que utilizando la vía intratraqueal (Juganaru et al., 2011).

En los monocitos, el virus es capaz de entrar, retrotranscribirse e integrarse, pero no de causar una infección productiva, ya que la replicación está estrechamente controlada. De este modo, no son detectados ni eliminados y pueden continuar diseminándose por los tejidos, donde maduran, favoreciendo una infección productiva; esta estrategia es conocida como “Caballo de Troya” (Peluso et al., 1985). Se desconocen los mecanismos específicos de la diferente cinética viral que se observa en monocitos y macrófagos. Se ha sugerido que la expresión de ciertos factores de transcripción necesarios para la activación de LTR y la transcripción viral, presentes en macrófagos y no en monocitos, son los responsables (Shih et al., 1992). Sin embargo, no todas las estirpes patogénicas *in vivo* presentan estos sitios (Glaría et al., 2009). Recientemente, resultados de nuestro grupo han desvelado que la isoforma Z1 de APOBEC3 podría tener un papel en la restricción observada en monocitos, en los que su expresión es significativamente mayor que en macrófagos (de Pablo-Maiso et al., 2017a).

Tras la infección del animal se observa una breve viremia inicial en la que los antígenos virales se exponen al sistema inmunitario, dando lugar a la síntesis de anticuerpos y produciéndose la seroconversión del hospedador. Aunque los viriones extracelulares pueden ser temporalmente neutralizados por estos anticuerpos, el provirus no es accesible a los anticuerpos y la infección continúa. Tras esa viremia inicial, la infección entra en un período de latencia que puede durar semanas, meses o incluso años, hasta que por diferentes factores, el virus retoma el ciclo replicativo y se sintetizan antígenos virales que serán presentados a los linfocitos a través de células presentadoras de antígeno (APCs). La

consiguiente reacción inmunológica desemboca en la infiltración y acumulación de linfocitos (con un bajo ratio CD4+/CD8+), macrófagos y células plasmáticas en el tejido infectado, causando una inflamación no supurativa y fibrosis, características de la infección por SRLV (Pépin et al., 1998). Debido a que la patología asociada a la infección se produce principalmente por la respuesta inmunitaria crónica del hospedador frente a los antígenos virales, se puede clasificar como inmunomediada (Blacklaws, 2012). Es probable que la exposición antigénica continua contribuya al desarrollo de lesiones inflamatorias crónicas que dan lugar al cuadro patológico de la enfermedad. En este sentido, se ha observado un proceso de inmunodeficiencia asociada a las manifestaciones clínicas de la infección por SRLV, que se caracteriza por la incapacidad del animal de producir respuestas de recuerdo frente a antígenos de SRLV u otros. Este fallo en la respuesta se relaciona con la disminución de los niveles de moléculas coestimuladoras necesarias para la correcta presentación de los antígenos (Reina et al., 2007).

La progresión de la infección da lugar al desarrollo de lesiones en los pulmones, el sistema nervioso central (SNC), las articulaciones y la glándula mamaria, provocando una inflamación multisistémica que cursa con neumonía, encefalitis, artritis y/o mastitis. Generalmente, uno de los órganos se ve más afectado, aunque varios pueden mostrar lesiones con severidad variable. El tipo y el grado del cuadro clínico que se desarrolla está determinado por un lado, por la base genética del animal hospedador, que condiciona tanto la respuesta inmunitaria innata como la adquirida y, por otro lado, por las características genéticas y biológicas de la estirpe infectante que condicionarán tanto el tropismo como la virulencia. En los tejidos afectados se ha descrito una relación directa entre los niveles de virus y el grado de lesión. Se ha observado que la expresión de RNA y proteínas virales concuerdan con la gravedad de la lesión desarrollada en el tejido nervioso (Stowring et al., 1985); la carga proviral en pulmón y macrófagos alveolares con la severidad de las lesiones pulmonares (Brodie et al., 1993; Zhang et al., 2000) y que la carga viral (Ravazzolo et al., 2006) y proviral en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se relaciona con el desarrollo de cuadros clínicos en los diferentes órganos diana (Herrmann-Hoesing et al., 2009).

Las lesiones que se desarrollan en una infección por SRLV se caracterizan por una infiltración de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas en los órganos diana que gradualmente serán los responsables de la manifestación clínica de la enfermedad. A

continuación, se describen las cuatro formas de afección clínicas derivadas de una respuesta inflamatoria crónica de los SRLV:

2.1 Forma pulmonar

Se presenta en forma de disnea o dificultad para respirar como principal signo clínico, acompañada de aumento en la frecuencia respiratoria, respiración abdominal y jadeo (Thormar, 2013). Tras la disnea, se aprecia una pérdida progresiva de peso, que conduce a la caquexia y, en la fase final, el animal termina postrado en el suelo, muriendo por insuficiencia respiratoria. La respiratoria es la forma más frecuente y la más fácil de reconocer (Luján et al., 2019). Generalmente la forma respiratoria no es evidente en animales menores de 2 años, pero en la actualidad se está observando la aparición de signos clínicos respiratorios ligados al desarrollo de la patología en los pulmones en animales de un año o incluso menos (Luján et al., 2019).

Macroscópicamente, los pulmones presentan un notable aumento de volumen y peso, bordes redondeados (principalmente el borde dorsal y los lóbulos diafragmáticos), una forma acampanada y una consistencia gomosa y poco elástica. A nivel microscópico se observa una neumonía intersticial linfocitaria, con dominio de linfocitos T CD8+ (Watt et al., 1992), acompañada de hiperplasia del músculo liso interalveolar (Dawson, 1980; Lujan et al., 1991) e incluso fibrosis de los pulmones en lesiones avanzadas. En los ganglios mediastínicos y traqueobronquiales aparece una hiperplasia de las áreas corticales y paracorticales. En el lavado broncoalveolar (BAL) se evidencia un aumento de la expresión de moléculas MHC de clase II en macrófagos y linfocitos y de las moléculas de adhesión LFA-1 y LFA-3 en linfocitos. Ambos tipos de moléculas pueden tener un papel importante en el desarrollo de las lesiones pulmonares, pudiendo estar implicadas en la entrada, activación, proliferación y atracción de linfocitos al parénquima pulmonar (Cadoré et al., 1996).

Herrmann-Hoesing y colaboradores observaron, mediante inmunohistoquímica en macrófagos alveolares, pero no en la membrana sinovial, la co-localización del antígeno de la cápside viral y de dos moléculas CD163 y CD172, comunes en macrófagos antiinflamatorios. Estos resultados sugieren que ambas moléculas podrían estar implicadas en la fagocitosis y/o endocitosis del antígeno capsídico y/o del virus completo en dichas células (Herrmann-Hoesing, 2010).

2.2 Forma nerviosa

La forma nerviosa, también denominada Visna (desgaste en islandés), se detectó por primera vez en Islandia al igual que la forma clínica pulmonar. Durante el siglo pasado, se describieron casos esporádicos de esta forma (Lujan et al., 1991; Sigurdsson et al., 1957) pero recientemente se han diagnosticado numerosos casos, a menudo con afección medular, en ovejas del noroeste de España, siendo la causa principal de pérdida de animales adultos en granjas de Castilla y León (Benavides et al., 2009, 2007, 2006b). Pese a que, como en el caso anterior, generalmente se observa en animales mayores de dos años (Brahic and Haase, 1981), la forma nerviosa también ha sido descrita en corderos de 4 a 6 meses de vida (Benavides et al., 2007).

Presenta dos manifestaciones clínicas, la más característica es la medular que se asocia a lesiones de la médula espinal provocando la parálisis progresiva del tercio posterior (Benavides et al., 2006b). La forma encefálica se produce por afección del tronco del encéfalo (Christodoulopoulos, 2006) y se manifiesta clínicamente como ataxia, movimientos circulares e inclinación de la cabeza, temblor de músculos de la cara e incluso ceguera (Petursson et al., 1976; Watt et al., 1992).

No es frecuente encontrar lesiones macroscópicas en el cerebro y la médula espinal, y ocasionalmente se ha identificado daño tisular severo con licuefacción de zonas de la sustancia blanca del encéfalo y malacia en zonas de la médula espinal (Benavides et al., 2006a; Christodoulopoulos, 2006; Sigurdsson et al., 1957). Microscópicamente se caracteriza por una leucoencefalomielitis no purulenta desmielinizante crónica. Las lesiones se distribuyen principalmente en la pared de ventrículos laterales y columnas dorsales y laterales de la médula espinal (Cutlip et al., 1979), a veces también junto a lesiones en encéfalo y raramente existe destrucción neuronal (Sigurdsson et al., 1957).

2.3 Forma mamaria

La presentación de esta forma es frecuente (Asadpour et al., 2014), y en el caso de España, se ha descrito de forma importante en la raza Rasa Aragonesa (Lujan et al., 1991). Suele ir asociada a la forma pulmonar y presenta, como signo clínico más evidente, una mastitis indurativa crónica de carácter difuso, bilateral y no dolorosa, así como tumefacción de los nódulos linfáticos retromamarios (Lujan et al., 1991).

Macroscópicamente, las mamas se ven afectadas bilateralmente, muy endurecidas, firmes y tersas. A la sección presentan un aspecto no glandular con superficie lisa, húmeda y uniforme (Dawson, 1987; Zink and Johnson, 1994). Microscópicamente se aprecia una mamitis intersticial crónica con inflamación linfocitaria e hiperplasia de folículos linfoides (Dawson, 1987) que puede producir la pérdida de tejido glandular, fibrosis y estenosis de los conductos galactóforos obstruyendo parcial o totalmente la luz y provocando atrofia del tejido (Anderson et al., 1985).

La presentación de la forma mamaria es la principal causa de las pérdidas económicas provocadas por la enfermedad en los rebaños de aptitud lechera. La inflamación crónica que se produce en la mama, provoca un descenso en la producción y en la calidad de la leche, debido principalmente al aumento del recuento de células somáticas (RCS). La mamitis producida por SRLV no está asociada con alteraciones organolépticas de la leche, salvo que coexistan otras enfermedades de diferente etiología.

2.4 Forma articular

Clásicamente ha sido asociada exclusivamente a cabras, pero en la actualidad hay numerosas descripciones de artritis derivadas por la infección con lentivirus en ovinos (Pérez et al., 2015). Los análisis filogenéticos indican que las artritis están causadas por SRLV del genotipo B1 en caprinos (Panei et al., 2017; Ramírez et al., 2011) y del B2 en ovinos (Glaría et al., 2009; Grego et al., 2007).

La forma articular se caracteriza por una artritis que cursa con inflamación periarticular y acumulación excesiva de líquido sinovial, lo que provoca cojera y una marcha dificultosa. La inflamación afecta sobre todo a los carpos aunque también puede afectar a la articulación del tarso observándose una tumefacción bilateral (Watt et al., 1994).

A nivel macroscópico se observan afectadas las articulaciones carpal y tarsal, en las que se aprecia engrosamiento y congestión de las membranas sinoviales y la cápsula articular, cartílago y tendones, por lo que el cociente carpo/metacarpo está aumentado ($>2,0$) (Cutlip et al., 1988; Perry et al., 1995; Watt et al., 1992). Aparece edema, hiperemia, hiperplasia y necrosis de la membrana sinovial, necrosis y erosión del hueso articular, necrosis y fibrosis del hueso subcondral y fibrosis periarticular que puede llegar a anquilosar la articulación e incluso producir fracturas (Cutlip et al., 1985). Microscópicamente existe proliferación de la membrana sinovial e infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Puede

aparecer fibrina y depósitos de inmunoglobulina en la membrana sinovial y evolucionar hacia una degeneración del cartílago articular, mineralización de la cápsula articular y su reemplazo por crecimiento periostial (Narayan et al., 1992).

En España, esta forma ha sido descrita principalmente en la región de Aragón (Biescas, 2006), y de hecho, la estirpe 496 (genotipo B2), que se utiliza como prototipo en ensayos *in vitro* en nuestro laboratorio, fue aislada de un ovino a partir de un brote artrítico en esta misma región (Glaría et al., 2009). El hecho de que en estas ganaderías coexistan ovinos y caprinos, y que las cabras muestren positividad a SRLV además de lesiones similares, sugiere una transmisión interespecie del virus.

Únicamente las formas respiratoria y nerviosa conllevan un riesgo de muerte, mientras que la forma mamaria y articular implican una incapacidad prolongada para la cría de los corderos o dificultades crónicas en movimientos articulares, respectivamente, provocando ambas afecciones un desvieje prematuro. En raras ocasiones, otros órganos infectados por SRLV como riñones o testículos han presentado lesiones específicas sin causar aparentemente señales detectables (Luján et al., 2019).

3. Clasificación filogenética

Los lentivirus son un grupo muy heterogéneo genética y antigénicamente, lo cual se debe a la confluencia de varios factores (Ramírez et al., 2013). Por un lado, la enzima Rt posee una tasa de error elevada, estimada entre 0,1 y 2 mutaciones por genoma y ciclo replicativo (Roberts et al., 1988) que, junto con la ausencia de un sistema de corrección de errores, contribuye a una alta frecuencia de mutaciones puntuales que incluyen inserciones y deleciones. Otro mecanismo de variabilidad es la recombinación, fenómeno que se produce cuando una célula es co-infectada por dos o más virus (Smyth et al., 2012). En estos casos la Rt puede “saltar” de un genoma a otro durante la retrotranscripción dando lugar a virus recombinantes que pueden suponer una ventaja evolutiva (L’Homme et al., 2015). Otra posible fuente de variabilidad es la originada por la presión selectiva que ejerce el sistema inmunitario, como en el caso de las proteínas de la familia APOBEC3, que son capaces de incorporarse en los viriones y desaminar citosinas produciendo mutaciones de G a A en la cadena cDNA+ durante la retrotranscripción (Bishop et al., 2004; Vartanian et al., 1991); o en el de los anticuerpos neutralizantes inducidos tras la infección, que seleccionan mutantes de escape (Torsteinsdóttir et al., 2007). Por último, la propia célula

diana de los SRLV también puede contribuir a aumentar la variabilidad genética, ya que los macrófagos poseen un alto ratio de dUTP:dTTP, lo que proporciona uracilos que pueden ser incorporados, mutando el DNA viral (Terai and Carson, 1991).

Todas estas fuentes de variabilidad genética han dado lugar a la aparición de diferentes genotipos de SRLV capaces de infectar un amplio rango de hospedadores. Esto se puede traducir en una mayor dificultad para que la respuesta inmunitaria del hospedador logre frenar la infección, en una mayor variabilidad biológica, reflejada en el amplio abanico de signos clínicos que muestran los animales infectados, y en una mayor dificultad en el diseño de test diagnósticos y en el desarrollo de vacunas (Murphy et al., 1999).

En un inicio se propuso una clasificación de los SRLV atendiendo a sus características biológicas y bioquímicas (Quérat et al., 1984), pero los aislados de campo muestran una gran variabilidad y no siempre pueden clasificarse correctamente en estas categorías. En 1998 Zanoni (Zanoni, 1998) publicó un primer intento de establecer una filogenia integral de SRLV con herramientas filogenéticas avanzadas y desde entonces hasta el 2004, se identificaron seis grupos diferentes de SRLV numerados del I al VI, basándose en secuencias relativamente cortas de las regiones *gag*, *pol* y *env* (Rolland et al., 2002). Estas secuencias cortas no son las más óptimas para fines filogenéticos y llevó a reconsiderar la clasificación. Shah y colaboradores (Shah et al., 2004a) propusieron una clasificación de tipo filogenético siguiendo los criterios empleados para la clasificación de HIV, basándose en la agrupación de los genotipos virales en función de las diferencias en la secuencia de dos segmentos de los genes *gag-pol* y *pol* de 1,8 kb y 1,2 kb, respectivamente. En el estudio se analizaron 104 aislados procedentes de Suiza, y se incluyeron seis aislados que, en ese momento, estaban secuenciados y disponibles en las bases de datos. A pesar de que posteriormente se demostró que esta clasificación podía obtenerse teniendo en cuenta otras zonas genómicas como LTR (Mendiola et al., 2019; Reina et al., 2006), en la actualidad es la más utilizada.

Según esta clasificación se definen 4 grupos genéticamente distintos (A, B, C y E), que difieren entre un 25% y un 40% en su secuencia nucleotídica (**Figura 3**). A su vez, los genotipos A, B y E albergan subtipos que difieren entre un 15% y un 27% en su secuencia. El genotipo A (estirpes tipo VMV) y el B (estirpes tipo CAEV), que hasta el momento se subdividen en veintiún (A1-A21) y cinco (B1-B5) subtipos, respectivamente, son los genotipos predominantes y se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo.

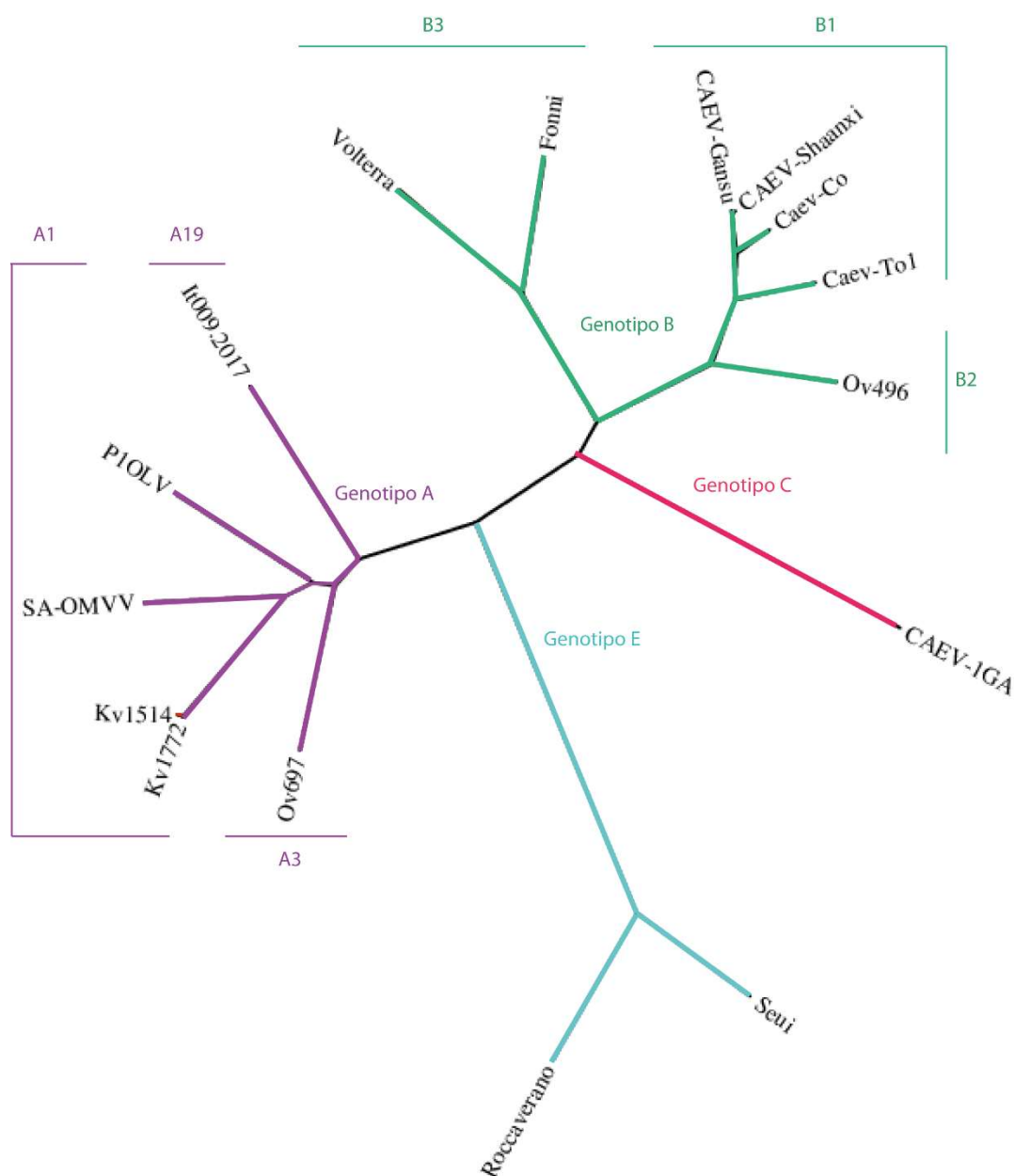


Figura 3. Variabilidad genética de lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV). Árbol filogenético a partir de secuencias completas de las estirpes depositadas en las bases de datos, pertenecientes a los diferentes genotipos.

Dentro del genotipo A se encuentran aislados como el británico Ev1 (Sargan et al., 1991) obtenido de un animal con artritis y afectación pulmonar, el aislado español 697 (Glaría et al., 2012), a partir de un brote nervioso en ovejas de la raza Assaf, o los aislados Islandeses responsables de la pandemia a mediados del siglo XX (Sigurdardóttir and Thormar, 1964). La descripción de nuevos tipos y subtipos, así como el número de aislados secuenciados se ha incrementado constantemente en los últimos años (**Tabla 1**).

Dentro del genotipo B se encuentran estirpes referencia como la CAEV-Co del subtipo B1 obtenido en Estados Unidos de una cabra con leucoencefalomielitis (Cork et al., 1974; Saltarelli et al., 1990), y del que se ha obtenido un clon molecular. En España, se aisló la estirpe Ov496, perteneciente al subtipo B2, a partir de una oveja Rasa Aragonesa con cuadro artrítico (Glaría et al., 2009). El subgrupo B3 fue descrito en Italia en 2011 a partir de dos ovejas de raza Sarda (Bertolotti et al., 2011), el B4 en Canadá (Santry et al., 2013) y recientemente se ha descrito en Bélgica, a partir de dos cabras, el subtipo B5 (Michiels et al., 2020) (**Tabla 2**).

El genotipo C, está compuesto por aislados de ovejas y cabras noruegas, y el aislado 1GA, obtenido a partir del carpo de una cabra con artritis (Gjerset et al., 2006) ha sido secuenciado en su totalidad (GenBank: AF322109).

El genotipo E, cuya presencia queda limitada por el momento a Italia, está formado por el subtipo E1 (estirpe Roccaverano; GenBank: EU293537), aislada a partir de glándula mamaria de una cabra sin síntomas clínicos (Grego et al., 2007); y el subtipo E2 (aislado Seui; GenBank: GQ381130), procedente de una cabra artrítica (Reina et al., 2010). Este genotipo se ha descrito como específico de cabras hasta el momento, con unas diferencias genéticas y biológicas importantes en comparación con el resto de genotipos (Grego et al., 2009; Juganaru et al., 2010; Reina et al., 2010, 2009a).

Tabla 1. Aislados más representativos de cada uno de los subtipos del genotipo A. Se indica el subtipo al que pertenece, el número de acceso a GenBank, el año, la especie y el país de aislamiento, así como la referencia bibliográfica.

Subtipo	Aislados	GenBank	Año	País	Especie	Referencias
A1	Ev1	S51392	1991	Escocia	Ovino	(Sargan et al., 1991)
	SA-OMVV	M31646	1990	Sudáfrica	Ovino	(Querat et al., 1990)
	KV1514	M60610	1964	Islandia	Ovino	(Sigurdardóttir and Thormar, 1964)
	P1OLV	AF479638.1	2004	Portugal	Ovino	(Barros et al., 2004)
A2	Varios	Varios	1996	Norteamérica	Ovino	(Karr et al., 1996)
A3	Varios	Varios	2004	Suiza	Caprino y ovino	(Shah et al., 2004a)
	697	HQ848062	2012	España	Ovino	(Glaría et al., 2012)
A4	Varios	Varios	2004	Suiza	Caprino y ovino	(Shah et al., 2004a)
A5	5560	AY454175	2004	Suiza	Caprino	(Shah et al., 2004a)
A6	676	U35796	1998	Francia	Caprino y ovino	(Zanoni, 1998)
A7	5692	AY454277	2004	Italia	Caprino	(Shah et al., 2004a)
A8	Varios	Varios	2007	Italia	Caprino	(Grego et al., 2007)
A9	Varios	EF676016-20	2007	Italia	Caprino y ovino	(Grego et al., 2007)
A10	Varios	HM449450-683	2010	Italia	Caprino	(Pisoni et al., 2010)
A11	Varios	Varios	2011	Italia	Caprino y ovino	(Giammarioli et al., 2011)
A12	Varios	Varios	2012	Polonia	Ovino	(Olech et al., 2012)
A13	Varios	Varios	2012	Polonia	Ovino	(Olech et al., 2012)
A14	SLO 2	JQ610989	2013	Eslovenia	Caprino y ovino	(Kuhar et al., 2013)
A15	Varios	JQ611027-30	2013	Eslovenia	Caprino y ovino	(Kuhar et al., 2013)
A16	g2993	KY865009.1	2018	Polonia	Caprino	(Olech et al., 2018)
A17	Varios	Varios	2018	Polonia	Caprino	(Olech et al., 2018)
A18	Varios	Varios	2019	Polonia	Ovino	(Olech et al., 2019)
A18bis	It038.2017	MG554409	2019	Italia	Caprino	(Colitti et al., 2019)
A19	It009.2017	MH374287	2019	Italia	Ovino	(Colitti et al., 2019)
A21	Varios	Varios	2020	Alemania	Ovino	(Molae et al., 2020)
A22	Varios	Varios	2020	Irán	Ovino	(Molae et al., 2020)

Tabla 2. Aislados más representativos de cada uno de los subtipos del genotipo B. Se indica el subtipo al que pertenece, el número de acceso a GenBank, el año, la especie y el país de aislamiento, así como la referencia bibliográfica.

Subtipo	Aislados	GenBank	Año	País	Especie	Referencias
B1	CAEV-Co	M33677.1	1990	EEUU	Caprino	(Saltarelli et al., 1990)
	CAEV-To1/89	MH374290.1	2002	Italia	Caprino	(Grego et al., 2002)
B2	SNCR5720	AY454283	2004	Suecia	Ovino	(Shah et al., 2004a)
	Ov496	FJ195346	2009	España	Ovino	(Glaría et al., 2009)
B3	Fonni	JF502417	2011	Italia	Ovino	(Bertolotti et al., 2011)
	Volterra	JF502416	2011	Italia	Ovino	(Bertolotti et al., 2011)
B4	CAN_1-9-CAEV	KC241933.1	2013	Canadá	Caprino	(Santry et al., 2013)
B5	VB.5.6, LB.2.3	MN784770-781	2020	Bélgica	Caprino	(Michiels et al., 2020)

El estudio de los diferentes aislados virales ha permitido establecer relaciones entre la secuencia del virus y su comportamiento tanto *in vivo* (patogénesis y tropismo tisular) como *in vitro* (cinética de la infección y tropismo celular).

4. Respuesta inmunitaria frente a la infección por SRLV

La función del sistema inmunitario es proteger al organismo de la invasión e infección por parte de agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente, además de asegurar la homeostasis. Para ello, debe detectar una gran variedad de patógenos y diferenciarlos de las células y tejidos propios, así como de las bacterias que componen la microbiota normal del organismo.

La respuesta innata constituye la primera barrera de defensa frente a agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente. Genera una respuesta inmediata e inespecífica, pero no tiene capacidad de conferir una inmunidad duradera (Hoffmann et al., 1999). Este sistema incluye, además de las barreras físicas, químicas y biológicas, tales como la piel, las mucosas, las diferentes enzimas de secreciones corporales y la microbiota normal, componentes celulares (células epiteliales, células dendríticas, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células NK), moléculas del sistema del complemento y la inflamación, así como la intervención de citoquinas. La respuesta innata es capaz de detectar la presencia de agentes invasores y determinar en gran medida la respuesta adaptativa, ya que es la encargada, a través de macrófagos y células dendríticas, de

reconocer macroestructuras propias de los patógenos y presentar los antígenos a los linfocitos, generándose así una respuesta inmunitaria específica capaz de conferir memoria para posteriores exposiciones. Sin embargo, a pesar de que la infección por SRLV induce una respuesta inmunitaria innata y adquirida, el virus interfiere en su correcta regulación y eficacia para favorecer su replicación (Blacklaws, 2012; Reina et al., 2007), permaneciendo de forma crónica en el organismo (Pépin et al., 1998) mediante la integración en el genoma del hospedador. Por ello, provoca una enfermedad de progresión lenta con una etapa subclínica, que puede durar meses o incluso años, en la que la carga viral es baja (Haase et al., 1977; Sigurdsson and Palsson, 1958).

Entre los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria, la alta tasa de mutación de estos virus, como ya se ha indicado, contribuye indudablemente a la generación de mutantes de escape. Además, la infección es capaz de modificar el patrón de diferenciación de los macrófagos favoreciendo la aparición de macrófagos antiinflamatorios que permiten la replicación viral y promueven respuestas adaptativas basadas en la producción de IgG1 (Bird et al., 1995). Finalmente, aunque los SRLV no infectan linfocitos como otros lentivirus causantes de inmunodeficiencia, son capaces de inducir estados de anergia linfocitaria (Reina et al., 2007), provocando fallos en las respuestas de recuerdo (Pyrah and Watt, 1995), e incluso en la producción de anticuerpos (Perry et al., 1995).

4.1 Inmunidad innata

El sistema inmunitario innato es capaz de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) y señales endógenas asociadas al daño tisular (DAMPs, *danger associated molecular patterns*) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*). Los PAMPs, por tanto, actúan como diana para la activación del sistema inmunitario innato y entre ellos se encuentra una gran cantidad y variedad de componentes propios de los patógenos y poco comunes en los mamíferos, como el lipopolisacárido, el ácido teicoico, las secuencias de DNA CpG no metiladas, glicosilaciones de proteínas como la manosilación o el RNA bicatenario presente en algunos virus. Los DAMPs se asocian a proteínas de fase aguda, autofagia u otros procesos que impliquen el reconocimiento de una situación de estrés en el organismo.

Hay una gran variedad de PRRs presentes en la membrana plasmática, en la membrana de orgánulos como endosomas, y en el citoplasma, que intervienen en la detección de PAMPs y DAMPs (**Tabla 3**). Entre los PRRs asociados a membrana que reconocen PAMPs destacan los *Toll-like receptors* (TLRs), capaces de reconocer una gran variabilidad de estructuras macromoleculares y desencadenar la activación de diferentes rutas proinflamatorias. Además, los *C-type lectin receptors* (CLRs) se encargan de la detección de lectinas de tipo C como la Concanavalina A, o la de proteínas manosiladas. Dentro de los PRRs citosólicos encontramos *NOD-like receptors* (NLRs) y los *RIG-I like receptors* (RLRs), encargados de identificar macromoléculas que aparecen como resultado de la replicación viral, como por ejemplo determinadas especies de RNA; finalmente los sensores de DNA (DIR) reconocen y eliminan especies exóticas de DNA

Tabla 3. Resumen de los diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en función de su localización y diana de reconocimiento.

PRRs de membrana		Localización	Diana de reconocimiento
TLR (<i>Toll-like Receptors</i>)	TLR 1,2,4,5,6,10	Superficie celular	Bacterias, virus, parásitos y hongos
	TLR 3,7,8,9	Endosoma	
CLR (<i>C-type Lectin Receptors</i>)	<u>Tipo 1:</u> DEC205 y receptor de la manosa	Superficie celular	Bacterias, virus y hongos
	<u>Tipo 2:</u> Dectin 1 ó 2, DC-SIGN, Mincle y DNGR-1		
	<u>Soluble:</u> Manosa y <i>N-acetilglucosamina</i> .		
PRRs citosólicos		Localización	Diana de reconocimiento
RLR (<i>Retinoic acid-inducible-gene-1-like receptors</i>)	RIG-I	Citoplasma	Virus RNA
	MDA-5		
	LGP2		
NLR (<i>NOD-like Receptors</i>)	NODs	Citoplasma	Bacterias, virus, parásitos y levaduras
	NLRPs		
	IPAF		

En respuesta a estas señales detectadas por los PRRs, el sistema inmunológico innato se activa mediante la expresión de genes antivirales y de citoquinas proinflamatorias (Akira et al., 2006). El interferón de tipo I (IFN α y β) es la principal citoquina implicada en la respuesta inmunitaria innata (Borden et al., 2007) ya que induce la expresión de cientos de

proteínas con actividad antiviral y con función de reclutamiento de células del sistema inmunológico a la zona infectada, conocidas con el nombre genérico de *interferon stimulated genes* (ISGs).

Las células diana de los SRLV son los monocitos, macrófagos y las células dendríticas, pero se desconoce cómo la inmunidad innata reconoce la infección por SRLV. Los TLRs parecen jugar un papel importante, ya que se ha demostrado que durante la infección se produce una activación de los TLR7 y 8, induciendo, a su vez, un aumento en la producción de IFN- α , IL-6, TNF- α , y en la expresión de proteínas antivirales (Blacklaws, 2012). Se ha visto que en animales con lesiones pulmonares su expresión se mantiene elevada (Larruskain et al., 2013), y se han asociado diferentes frecuencias de mutación en los genes de TLR7, TLR8 y TLR9 con la infección por SRLV (Mikula et al., 2010; Mikula and Mikula, 2011; Sarafidou et al., 2013). Tras el reconocimiento del virus, la producción de IFN de tipo I conlleva la activación de las células infectadas (macrófagos y células dendríticas), las cuales modificarán el patrón transcripcional de cientos de ISGs. La activación de estos genes genera un estado antiviral y provoca la activación de la inmunidad adaptativa. Los factores de restricción son proteínas antivirales que forman parte de este conjunto de ISGs, e inhiben directamente algún paso del ciclo viral. Forman parte de la denominada inmunidad intrínseca antiviral, y directamente restringen la replicación y/o el ensamblaje viral. Aunque normalmente su expresión es inducida por interferón, se expresan de manera constitutiva en ciertos tipos celulares. De este modo, su actividad está presente en la célula sin necesidad de señalización provocada por el virus u otro tipo de comunicación celular. Estos factores de restricción del hospedador tienen contacto directo con determinadas proteínas virales que actúan a modo de contramedidas codificadas generalmente por los genes accesorios, que degradan dichos factores, recuperando así la infectividad.

En el caso de los lentivirus, los factores de restricción celulares más estudiados son TRIM5 α , APOBEC3, BST-2 y SAMHD1 que son contrarrestados por la variabilidad antigénica de Gag y la acción directa de Vif, Vpu y Vpx, respectivamente.

A pesar de estos mecanismos de respuesta, la infección sigue su curso debido a la puesta en marcha de mecanismos de evasión de la respuesta. Uno de ellos lo protagoniza la dUTPasa, que es capaz de reducir la inducción de la expresión de IFN (Fu et al., 2020). Así, la incipiente respuesta innata da lugar al procesamiento de antígeno y, con ello, al desarrollo de la respuesta adaptativa.

4.2 Inmunidad adaptativa

El reconocimiento de PAMPs por parte de los PRRs conduce a la activación de las defensas innatas del organismo. El papel fisiológico de los diferentes PRRs en la detección de patógenos y en la inducción de la respuesta adaptativa es aún objeto de numerosos estudios, pero está claro que determinan el tipo de infección invasora e instruyen a los linfocitos para la inducción de respuestas efectoras, demostrando que la respuesta innata determina la adaptativa.

Los monocitos, macrófagos y célula dendríticas, son las encargadas de captar y presentar antígenos a los linfocitos para generar una respuesta inmunitaria específica mediada por células y por anticuerpos.

Respuesta humoral

En la respuesta humoral, los componentes del sistema inmunológico atacan a los antígenos mediante anticuerpos o proteínas del sistema del complemento. La respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos se origina como resultado de la presentación antigénica a los linfocitos T CD4+, que, debido a las citoquinas presentes, maduran a linfocitos T *helper* de tipo dos (Th2) y son capaces de estimular la expansión clonal y diferenciación de los linfocitos B, que producirán los anticuerpos. Los anticuerpos son glucoproteínas del tipo gamma globulina, conocidos también como inmunoglobulinas (Ig) y generalmente están constituidos por dos unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos cadenas pesadas y dos ligeras. En función de la cadena pesada que poseen, se distinguen diferentes isotipos o tipos de anticuerpos. En mamíferos placentarios se conocen 5 isotipos; IgA, IgD, IgE, IgG e IgM que difieren en sus propiedades biológicas, localizaciones funcionales y en la capacidad para reconocer diferentes tipos de antígenos. Así, las inmunoglobulinas de tipo A (IgA), que se encuentran principalmente en las mucosas (saliva, lágrima, calostro y leche) y en secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias, actúan como una barrera protectora evitando que los antígenos de agentes patógenos invasores penetren en el plasma. Las de tipo D (IgD) suponen entre el 0 y el 1% de las inmunoglobulinas totales y no se encuentran de forma soluble en el plasma. Las IgE están implicadas en procesos de alergia y en la respuesta inmunitaria efectiva contra diferentes agentes patógenos, especialmente parásitos. Las IgM son las primeras en sintetizarse tras

la infección y se encuentran hasta que existen suficientes IgGs. Tienen la capacidad de opsonizar determinados antígenos presentes en virus, bacterias y otros agentes patógenos. Por último se encuentran las de tipo G (IgG), que son las predominantes en los fluidos internos del cuerpo (sangre, líquido cefalorraquídeo y líquido peritoneal) y suponen el 80% de las Ig totales. Son proteínas especializadas que se sintetizan en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus. Además, son los únicos anticuerpos con capacidad de cruzar la placenta para proporcionar inmunidad pasiva al feto.

En el caso de la infección por SRLV, la respuesta de anticuerpos se produce frente a todas las proteínas virales, siendo los que se producen frente a proteínas de la envoltura los que tienen mayor capacidad de neutralizar el virus (Blacklaws, 2012). La respuesta de anticuerpos puede aparecer a las 2-4 semanas tras la infección, y tiende a fluctuar durante los primeros 6 meses. Éstos, se producen en un intento de controlar la infección inicial, pero pueden tardar hasta 2 años en aparecer (Narayan et al., 1981). En infecciones experimentales se ha apreciado que los anticuerpos fijadores de complemento son los primeros en detectarse, entre una semana y tres meses después de la inoculación del virus, mientras que los anticuerpos neutralizantes se detectan entre el primer y el quinto mes post-inoculación (Brahic and Haase, 1981; De Boer, 1970; Sihvonen, 1981). La mayoría de los anticuerpos neutralizantes se dirigen hacia la glicoproteína de superficie, aparecen de forma tardía y son de baja afinidad, por lo que se considera que no juegan un importante papel protector frente a la infección (Kennedy-Stoskopf and Narayan, 1986). La respuesta de anticuerpos puede contribuir a la progresión de la enfermedad en infecciones por SRLV ya que los animales asintomáticos presentan un título bajo de IgG2 específica de gp135, caracterizada por su capacidad de opsonización y activación de la fagocitosis de las partículas virales (Bird et al., 1995), mientras que los animales artríticos muestran niveles muy altos de IgG1 y una relación IgG1/IgG2 más alta que en animales asintomáticos (Trujillo et al., 2004). Estudios más recientes, han demostrado que la inmunidad humoral es eficaz para limitar la extensión del virus, detectándose anticuerpos neutralizantes en el fluido cerebroespinal coincidiendo con la desaparición de virus libre a los 3-4 meses postinfección (Andrésdóttir et al., 2002). En un estudio longitudinal de infección en corderos empleando la técnica de inmunotransferencia, se observó que la respuesta humoral tiene lugar preferentemente frente a las proteínas p25, gp135, p16 y p14 (Kajikawa et al., 1990). Por otro lado, en corderos de 4 meses de vida la producción de anticuerpos anti-p25 fue máxima a las 5 semanas post-infección, disminuyendo después progresivamente, mientras que la

producción de anticuerpos anti-transmembrana aumentó de forma progresiva a lo largo de todo el estudio (Juste et al., 1998). También se ha demostrado que los anticuerpos anti-Tm son detectados preferentemente en animales con signos clínicos (de Andrés et al., 2013).

Aunque es necesario realizar más investigaciones para comprender mejor el papel de los anticuerpos neutralizantes en el control de la infección por SRLV, es evidente que una respuesta mediada por anticuerpos no es suficiente para controlar la infección (González et al., 2005). De hecho, podrían proporcionar un marcador para una respuesta de tipo Th2, no protectora, o incluso, favorecer la infección tras una infección experimental (Reina et al., 2013).

A pesar del desarrollo de esta respuesta, la infección viral sigue su curso sin que la producción de anticuerpos pueda frenarla. Las diferentes estrategias de evasión que ha desarrollado el virus facilita la instauración de una infección persistente en presencia de anticuerpos, indicativos de infección, pero insuficientes para conferir protección. Una de éstas, es la ya mencionada estrategia de “caballo de Troya”, que permite la persistencia vírica silente en forma de provirus integrado en el genoma de los monocitos, su dispersión por todo el organismo y la evasión de la respuesta inmunitaria (Narayan et al., 1983). Otra estrategia es la variación antigénica del virus debida a mutaciones y recombinaciones genéticas, dando lugar a nuevos epitopos que los anticuerpos son incapaces de neutralizar (Arnarson et al., 2017; Hafliðadóttir et al., 2008; Narayan et al., 1977b, 1977a). La alta afinidad del virus por las células diana monocitos/macrófagos puede superar la capacidad de unión de los anticuerpos para la neutralización del virus (Kennedy-Stoskopf and Narayan, 1986). Por último, la infección de los precursores de los monocitos en la médula ósea podría desempeñar un papel de reservorio de células latentemente infectadas, favoreciendo así la persistencia de la infección (Gendelman et al., 1985).

Respuesta celular

La respuesta celular es probablemente la más eficaz para contribuir a la eliminación de los SRLV, pero se caracteriza por ser una respuesta transitoria con picos en diferentes fechas post-infección y ni siquiera se detecta en todos los animales infectados (Sihvonen, 1984). La aparición de la respuesta celular específica en infecciones experimentales se produce entre la primera y la cuarta semana tras la infección, dependiendo de la vía de inoculación, pero su intensidad recupera valores normales entre cuatro y doce semanas después (Griffin et al., 1978; Sihvonen, 1981).

Los linfocitos T, además de intervenir en la respuesta inmunitaria humoral, son las principales células en intervenir en la respuesta celular, dividiéndose en células inductoras (linfocitos T CD4+ o helper (Th) y en células efectoras (linfocitos T CD8+ o citotóxicos). Los primeros reciben la información necesaria para reaccionar de manera específica frente a los antígenos virales en la presentación antigénica. Dentro de estos linfocitos existen varias subpoblaciones con diferentes funciones que dependen de múltiples factores, como el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), el propio antígeno, la coestimulación o las citoquinas presentes en el momento de la presentación antigénica.

Al contrario de lo que ocurre en la infección con HIV-1, los SRLV no infectan linfocitos T CD4+, por lo que la conservación de dicha población celular durante la infección por SRLV permite el desarrollo y mantenimiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de SRLV. Sin embargo, la infección sí puede interferir en la proliferación de células T CD4+, reduciéndola en animales con afección clínica en comparación con cabras asintomáticas (Perry et al., 1995). En animales infectados se detecta un aumento significativo del recuento de linfocitos T CD8+ respecto al número de CD4+ en órganos diana, invirtiéndose la proporción normal entre estas dos poblaciones celulares. Este aumento puede deberse al incremento en la presentación de antígeno, que activa bien directamente, o bien por la acción de los linfocitos CD4+ Th1, la inducción de una respuesta citotóxica (Stonos et al., 2014). Sin embargo, al igual que ocurre con la respuesta humoral, a pesar de la activación de la respuesta celular, la infección sigue su curso en la mayoría de los animales. Algunos mecanismos inmunológicos que podrían explicar la persistencia de la infección incluyen la disminución de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II en macrófagos infectados (Jolly et al., 1997), observándose también una disminución de las moléculas coestimuladoras B7, anergia de los linfocitos T y bajos niveles de producción de IFN- γ , en ovejas con síntomas clínicos de la enfermedad (Reina et al., 2007). En general, esto sugiere que la infección por SRLV interfiere en el procesamiento y la presentación del antígeno y, por lo tanto, limita la capacidad de activación de las células T CD4+ y la inducción de respuestas CTL.

La respuesta celular específica tan solo consigue controlar la primera fase aguda de la infección, falla a la hora de eliminar el virus del organismo, y es particularmente débil a nivel sistémico en los animales con infección crónica (Cheevers et al., 2000).

Parámetros inmunológicos de la protección

La respuesta inmunitaria ejercida frente a la infección influye en la carga viral, la cual está relacionada con la aparición de signos clínicos y la gravedad de la enfermedad (Cheevers et al., 2001, 2000). Los animales que han desarrollado una fuerte inmunidad celular, presentan una infección persistente pero con baja carga viral y sintomatología clínica (Stonos et al., 2014), además, producen altos niveles de anticuerpos IgG2 específicos frente a la gp135 y una respuesta Th con alta producción de IFN- γ (Cheevers et al., 2001, 2000). Sin embargo, los animales con una fuerte respuesta humoral se caracterizan por la presencia de altos títulos de anticuerpos IgG1 y un predominio de células Th2 con poca producción de IL-4 (Cheevers et al., 2001; Stonos et al., 2014). La síntesis de anticuerpos específicos no es indicativa de una respuesta protectora en el caso de las infecciones virales, y especialmente en el caso de los lentivirus, debido a la alta variabilidad genética y antigénica que presentan. Sin embargo, su presencia es importante ya que pueden detectarse de por vida, debido al carácter crónico de la infección, siendo la base del diagnóstico de los SRLV. Además, estudios más recientes en HIV-1 indican que, aunque la respuesta de anticuerpos no es protectora por sí misma, es necesaria su conjunción con la celular para el control de la infección (Doria-Rose and Joyce, 2015).

En un mismo rebaño los individuos pueden mostrar patrones de susceptibilidad a la infección totalmente opuestos. Mientras algunos sufren la infección de manera inexorable y persistente, otros consiguen mantener la carga viral en valores que no supongan un desarrollo de la enfermedad (Cheevers et al., 2000; Crespo et al., 2016; Larruskain et al., 2013; Ravazzolo et al., 2006). Los estudios más recientes sugieren que la inmunidad innata tiene un papel esencial en el desarrollo de respuestas capaces de restringir la replicación viral.

5. Factores de susceptibilidad a la infección

La interacción entre el virus y el hospedador determina la resistencia o susceptibilidad a la infección. Existen diferencias importantes y palpables entre individuos, razas e incluso especies de rumiantes en cuanto a la susceptibilidad a la infección y al desarrollo de signos clínicos. De hecho, diferentes razas se han considerado resistentes, y en un mismo rebaño, no todos los animales muestran la misma carga viral (Crespo et al., 2016), ni los mismos signos clínicos (Leginagoikoa et al., 2006b), indicando la importancia de factores

individuales que garanticen una respuesta inmunitaria eficaz, rápida y equilibrada. Además, el genotipo de la estirpe viral infectante podría ser también un factor determinante de la susceptibilidad a la infección y la patología derivada. A continuación, se analizan algunos de los principales factores que determinan el impacto de la infección.

Manejo del rebaño

A pesar de que la relación entre las condiciones de manejo del rebaño y la seroprevalencia no ha sido muy estudiada a lo largo de los años, hay varios trabajos que muestran una correlación positiva entre el tamaño del rebaño y la seroprevalencia (Michiels et al., 2018; Pérez et al., 2010; Shuaib et al., 2010; Simard and Morley, 1991). Posiblemente esto se deba a que en rebaños más grandes se tiende a realizar un manejo más intensivo y con un mayor intercambio de animales, pudiendo así favorecer la infección. De hecho, numerosos estudios identifican el comercio de animales como una de las fuentes principales de la entrada del virus en un rebaño (Giammarioli et al., 2011; Shah et al., 2004a). Diferentes estudios realizados en España han mostrado que los animales criados en sistemas productivos más intensivos y con mayores periodos de estabulación tienen un mayor riesgo de seroconversión (Leginagoikoa et al., 2010, 2006b; Pérez et al., 2010).

La presencia en el rebaño de enfermedades “facilitadoras” de la infección por SRLV también es un factor que ha sido estudiado. Una de las que se describe más frecuentemente es la Adenomatosis Pulmonar Ovina (APO), que se caracteriza por un aumento de la producción y eliminación de secreciones pulmonares cargadas de macrófagos potencialmente infectados con SRLV (Woldemeskel and Tibbo, 2010). También se ha observado una correlación positiva entre seropositividad a SRLV y la presencia de parásitos pulmonares (Giangaspero et al., 1993). En un estudio realizado en España con ovejas coinfectadas con Scrapie y VMV se observó que las lesiones inducidas por VMV en mama, pulmón y folículos linfoides favorecen el depósito de PrPSc en estos órganos, hasta el momento no considerados diana en el Scrapie (Salazar et al., 2010). Es necesario realizar más estudios sobre las posibles interacciones con diferentes patógenos comunes en los rebaños ovi-caprinos que pueden favorecer o dificultar los procesos de infección, replicación y desarrollo de síntomas clínicos. A su vez, la infección por SRLV, debido a su carácter debilitador y a la influencia sobre la respuesta inmunitaria, puede facilitar la infección por otros patógenos.

El mantenimiento de rebaños mixtos de ovejas y cabras es otro factor a tener en cuenta. Hay diferentes estudios que sugieren que la probabilidad de infección por SRLV es mayor en rebaños mixtos con alto grado de contacto entre ambas especies, que en aquéllos de una sola especie (Junkuszew et al., 2016; Lago et al., 2012; Olech et al., 2009), sin embargo, otros autores no lo han podido confirmar (Michiels et al., 2018).

Especie y raza hospedadora

A pesar de que los lentivirus muestran una fuerte restricción por especie, existen casos en los que diferentes lentivirus se han adaptado a nuevas especies, o bien infectaban ya a ancestros comunes entre especies. Tras la demostración de la transmisión natural de los SRLV entre ovejas y cabras y su clasificación filogenética en genotipos (**Figura 4**) (Leroux et al., 1997; Pisoni et al., 2005; Shah et al., 2004a, 2004b), el aumento de datos revela que el espectro de las especies hospedadoras podría ser mayor de lo que se pensaba anteriormente (Minardi da Cruz et al., 2013; Olech et al., 2020).

Por ejemplo, EIAV es capaz de infectar caballos, pero también burros, aunque causando una enfermedad más leve (Cook et al., 2001). FIV es capaz de infectar diferentes especies de felinos y la transmisión entre gato montés y pumas se ha descrito más de una vez (Lee et al., 2017). El ejemplo de transmisión más estudiado es el salto de especie que dio lugar a la adaptación de estirpes de SIV al ser humano, ya que dos cepas de SIV, SIVcpz de chimpancé central y SIVsmm de mangabey, representan el reservorio de infección cruzada dando lugar a HIV-1 y HIV-2 (Hirsch et al., 1989; Huet et al., 1990). Los SRLV también podrían estar presentes en rumiantes silvestres (Minardi da Cruz et al., 2013). De hecho, la infección experimental de híbridos muflón y oveja es eficiente (Guiguen et al., 2000). Además, se ha detectado reacción serológica en ciervos y gamos de nuestro país, sin embargo, no se han podido identificar las estirpes circulantes. Algunas estirpes de SRLV se adaptan rápidamente *in vitro* a las células procedentes de ciervo, pero no así a las de gamo, que muestran resistencia intrínseca a la infección basada en la expresión de factores de restricción como APOBEC3 y/o teterina (Sanjosé et al., 2016). La transgresión de la barrera de especie sugiere la superación de los sistemas de restricción del hospedador a nivel celular.

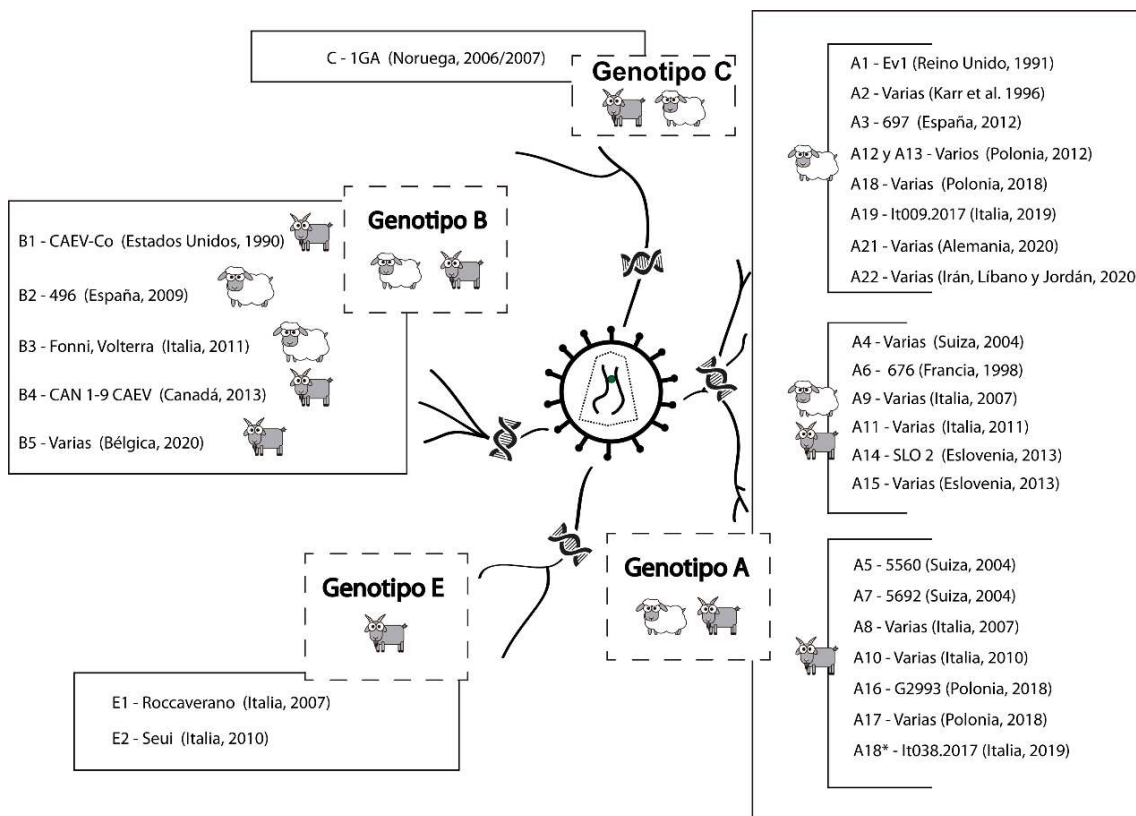


Figura 4. Esquema de las relaciones filogenéticas de los genotipos de SRLV en relación a la especie hospedadora.

También se han realizado diversos estudios para analizar dentro de una misma especie el efecto que tiene la raza en la susceptibilidad a la infección (Gates et al., 1978; Light et al., 1979). Los resultados obtenidos son heterogéneos y algunos autores barajan la posibilidad de que las diferencias en las prevalencias estén más relacionadas con las líneas familiares que con las razas en concreto (Houwens et al., 1989). También cabe considerar la presencia de SRLV divergentes o no descritos, como en el caso de la raza italiana Roccaverano, considerada resistente que, sin embargo, alberga y transmite de manera eficiente el genotipo E1 de SRLV (Grego et al., 2007). En Islandia, los cruces de Border × Leicester con ovinos islandeses presentaron mayor resistencia a la infección que las razas autóctonas (Pálsson, 1976). Sin embargo, en otro estudio realizado en un rebaño infectado de forma natural y compuesto por cuatro razas diferentes, se observaron prevalencias similares a lo largo de los 10 años que duró el estudio (Snowder et al., 1991). En el País Vasco se observó una mayor seroprevalencia de VMV en ovejas Latxa cara negra que en las Latxa cara rubia y los cruces con Rasa Aragonesa, Castellana y Manchega de aptitud cárnica (González, 1989). En un estudio en el que se midieron los niveles de provirus en ovejas de tres razas,

que se manejaron en las mismas condiciones, se observó una menor carga proviral en la raza Rambouillet que en la Columbia y Polypay, siendo esta diferencia más acusada en edades avanzadas entre los 5 y 6 años (Herrmann-Hoesing et al., 2008). Trabajos más recientes sugieren la existencia de un componente hereditario de resistencia a la enfermedad, ya que los animales nacidos de madres seronegativas tienen un menor riesgo de seroconvertir independientemente del modo de cría (Berriatua et al., 2003; Leginagoikoa et al., 2010).

Individuo

Muchos estudios demuestran que la seropositividad aumenta con la edad, (Al-Qudah et al., 2006; Gates et al., 1978; Light et al., 1979; Snowden et al., 1991) y aunque no hay un patrón definido de seroconversión asociado a la edad, muchos autores describen un aumento progresivo de la seroprevalencia al VMV hasta los 3-4 años (Berriatua et al., 2003; Keen et al., 1997). Sin embargo, se ha visto que todas las ovejas son susceptibles a la infección, independientemente de la edad (Cutlip et al., 1982; Gudnadóttir and Pálsson, 1965). La mayoría de autores lo asocian a que posiblemente los animales de más edad han tenido un mayor tiempo de exposición (Cutlip et al., 1992; Keen et al., 1997; Snowden et al., 1990). Otros autores han señalado que la descendencia de ovejas adultas seropositivas parece seroconvertir en mayor grado que la de las jóvenes seropositivas (Berriatua et al., 2003).

No se ha demostrado una relación entre el sexo y la susceptibilidad o resistencia a la infección por SRLV (Cutlip et al., 1992), sin embargo, en algunos estudios en los que sí se observaron diferencias, se asociaron al distinto manejo al que se someten a machos y hembras (Ayelet et al., 2001; Simard and Morley, 1991).

Recientemente, la selección genética de animales con resistencia natural a la infección por SRLV ha iniciado su desarrollo, a la vista de las diferencias existentes entre razas, rebaños o individuos en cuanto a la seroprevalencia o la carga proviral, que sugiere una fuerte implicación del componente genético en la susceptibilidad/resistencia de los individuos. Los estudios de asociación del genoma (*genome-wide association study*, GWAS) han abierto la posibilidad de aplicar programas de selección genética, describiendo una serie de genes candidatos asociados a la seropositividad de SRLV (Cecchi et al., 2019; Heaton et al., 2013, 2012; White et al., 2012) y la carga viral (Alshanbari et al., 2014).

Tropismo tisular

La existencia de distintos cuadros clínicos de la enfermedad y el hecho de que todos ellos no se manifiesten siempre, sugiere que existe un tropismo específico de órgano por parte del virus, o bien la presencia de una respuesta inmunitaria local capaz de controlar o exacerbar la infección en determinados órganos diana. Por ejemplo, podemos encontrar diferente susceptibilidad a la infección en los distintos estadios de diferenciación macrofágica, o la presencia de factores de restricción que interfieren directamente en la replicación viral.

No existe un consenso claro sobre la región genética responsable del tropismo tisular, pero las más estudiadas han sido LTR y *env*. La región promotora LTR contiene los sitios de unión a factores de transcripción, por tanto, es esencial para la replicación viral y podría controlar la especificidad celular (Barros et al., 2005; Óskarsson et al., 2007), ya que los factores de transcripción solo se encuentran en determinados tipos celulares. Algunos de estos sitios parecen necesarios para la biología del virus, ya que permanecen altamente conservados entre los aislados de campo, y se mantienen tras pases sucesivos en células en cultivo (Gomez-Lucia et al., 2013). Sin embargo, no siempre existe una correlación entre las diferencias de secuencia en LTR y el tropismo tisular de las estirpes (Murphy et al., 2010), lo que hace pensar que otras zonas del genoma viral están implicadas en dicho tropismo.

El reconocimiento del receptor celular por parte de la proteína viral Env es un punto claro de interacción entre el hospedador y el patógeno. Se ha descrito una diferencia del 11,7% en la secuencia de la proteína Env entre una estirpe obtenida de cerebro y un aislado de pulmón de ovinos de la misma raza con sintomatología nerviosa y pulmonar, respectivamente (Andrésdóttir et al., 1998). La presencia del receptor o receptores del virus en determinados tejidos determina en gran medida la capacidad de una estirpe para colonizar un órgano. Se ha descrito que los SRLV utilizan distintos receptores en células ovinas y caprinas (Hötzel and Cheevers, 2002) y que el no reconocimiento del receptor es la única barrera que impide la infección de células humanas por la estirpe EV1 (Mselli-Lakhal et al., 2000). Sin embargo, virus pseudotipados con la proteína Env de SRLV son capaces de entrar en células de pollo, hámster, humano, simio y codorniz, indicando que el receptor celular para los SRLV está ampliamente distribuido en distintas especies (Lyll et al., 2000). En este sentido, se ha descrito que existen factores intracelulares más allá de la unión envoltura-receptor capaces de bloquear la replicación viral (Lyll et al., 2000). Así, la entrada

del virus en la célula no tiene porqué estar asociada a una infección productiva, ya que la infección puede también restringirse en pasos posteriores a la entrada, principalmente por los mecanismos antivirales de la respuesta inmunitaria innata, como se ha explicado anteriormente. La misma o distintas estirpes podrían invadir distintos órganos y, debido a la presión ejercida por el sistema inmunológico, quedar aisladas evolucionando en cada uno de ellos de manera independiente, lo que se denomina compartimentalización, como se ha demostrado en HIV y FIV (Liu et al., 2006; T. Blackard, 2012) y también en SRLV (Pisoni et al., 2007; Ramírez et al., 2012).

Mecanismos de resistencia celular

En los monocitos el virus es capaz de integrarse pero no de generar una infección productiva, hasta que maduran a macrófagos (Gendelman et al., 1986). La expresión de factores de transcripción, como c-Fos y c-Jun, tras unirse a sitios concretos de la región promotora LTR del virus activan la replicación, dando lugar a una infección productiva. Por otro lado, se ha descrito que la restricción observada en monocitos podría deberse a la alta expresión de la proteína celular antiviral APOBEC3Z1, que es baja en macrófagos (de Pablo-Maiso et al., 2017a; Glaría, 2015; Peng et al., 2007).

La infección produce cambios importantes en la secreción de citoquinas por parte de las células diana alterando la polarización de macrófagos hacia M1 o M2. La expresión de IFN- γ estimula la activación clásica de macrófagos M1, en los que no se produce una infección productiva, mientras que la expresión de IL-4 favorece la activación anti-inflamatoria, permitiendo la replicación viral (Crespo et al., 2013). El mecanismo responsable de este patrón diferencial en la susceptibilidad de los macrófagos parece implicar a la proteína APOBEC3Z1 tanto en el caso de los SRLV como en el de HIV (Cassetta et al., 2013; de Pablo-Maiso et al., 2017a; Stavrou et al., 2014).

Asimismo, el tropismo celular depende en gran medida de la presencia de receptores específicos para los SRLV (Crespo et al., 2011), siendo el receptor de la manosa (MR) una vía de entrada importante en macrófagos y células de plexo coroideo *in vitro*. Además, en animales infectados por SRLV y con signos clínicos, la expresión de MR es mayor en los órganos que presentan lesiones más severas, por lo que la presencia de éste se asocia a la evolución de la enfermedad (Crespo et al., 2012).

6. Diagnóstico

La ausencia de tratamientos y estrategias de vacunación efectivas hacen del diagnóstico una de las principales herramientas para controlar la infección y sus consecuencias. Por la naturaleza lenta de la enfermedad causada por los SRLV, el diagnóstico basado en el análisis de los signos clínicos y el examen histopatológico resulta poco útil. Por ello, se recurre al análisis inmunológico y a la detección directa del virus o de sus secuencias genéticas. Actualmente ninguna prueba de diagnóstico se acepta como “*gold standard*”, pero sí hay varias técnicas serológicas comerciales consideradas válidas para el comercio internacional por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2008).

Cada uno de los métodos de diagnóstico presenta ventajas e inconvenientes, por lo que habrá que adoptar el más adecuado para cada circunstancia.

6.1 Diagnóstico clínico y anatomopatológico

Se basa en la detección de los signos clínicos que caracterizan la enfermedad. Sin embargo, el número de animales infectados que manifiestan la enfermedad es muy pequeño, subestimando la tasa de infección.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son consecuencia del infiltrado inflamatorio de carácter crónico que se produce en los órganos diana. La manifestación de estas formas patológicas viene determinada principalmente por el tropismo celular de la cepa infectiva, por la carga viral y por factores inmunológicos implicados en la susceptibilidad a la infección. La forma respiratoria de la enfermedad (disnea o dificultad respiratoria) es la más frecuente y resulta relativamente sencilla de detectar al realizar la necropsia; los pulmones sufren un incremento en su volumen y peso (forma acampanada) y presentan una consistencia gomosa. Los signos característicos de la forma nerviosa son la debilidad del tercio posterior, descoordinación motora o ataxia, y parálisis que normalmente conduce al postrado, aunque el animal continúa alerta y responde a estímulos externos. La forma mamaria, por el contrario, resulta difícil de identificar clínicamente ya que se observa en animales adultos (de entre 3 y 5 años) en los que es esperable un cierto endurecimiento de las mamas (Christodoulopoulos, 2006). La forma articular se ha considerado históricamente más propia de la especie caprina que de la ovina (Oliver et al., 1981), aunque existen descripciones recientes en nuestro país en ovinos (Pérez et al., 2015).

Es habitual que un mismo animal presente diferentes manifestaciones clínicas, de hecho, en un estudio anatomopatológico realizado en 74 ovejas seropositivas, el 37,8% presentaban lesiones tanto en mama como en pulmón (Lujan et al., 1991).

En todos los casos, es importante realizar un diagnóstico diferencial para confirmar que se trata de una infección por SRLV. En el caso de la forma nerviosa es importante descartar que los signos que observamos no sean por infecciones bacterianas inespecíficas, por intoxicaciones alimenticias o por otras enfermedades como Scrapie, Listeriosis, Cenurosis, encefalomielitis infecciosa, Aujeszky o necrosis cerebrocortical. En el caso de la mamitis y la artritis es importante descartar que provengan de una infección bacteriana. La forma pulmonar se debe distinguir de otros procesos respiratorios y enfermedades caquetizantes como el adenocarcinoma pulmonar ovino (APO), el adenocarcinoma nasal enzótico, el estertor nasal crónico ovino (ENCO) y de otras neumonías parasitarias, bacterianas y gangrenosas (Alvarez Miztegui, 2006).

A pesar de que se han encontrado formas nerviosas en corderos y cabritos menores de un año criados en estabulación intensiva (Benavides et al., 2007; Houwers et al., 1989), generalmente, los signos clínicos no se manifiestan hasta los 2 o 3 años de vida, a pesar de que hayan sido infectados a los pocos meses. Una vez los signos son aparentes, la esperanza de vida del animal no será superior a un año (Watt et al., 1994). Por tanto, es importante resaltar que, debido al largo periodo de incubación del virus y la baja relación entre animales infectados y animales con signos clínicos, que no suele exceder el 20% (Crawford and Adams, 1981; Woodard et al., 1982), el diagnóstico clínico carece de valor epidemiológico debido a su baja sensibilidad y especificidad. Esta lenta progresión de la enfermedad permite que el virus se disemine por todo el rebaño antes de que se detecten lesiones, de hecho, los síntomas clínicos no aparecen hasta que aproximadamente el 30% del rebaño es seropositivo a SRLV (Ritchie and Hosie, 2014). Por ello se utilizan métodos serológicos y/o moleculares para un diagnóstico preciso y temprano que permita controlar la infección.

6.2 Diagnóstico inmunológico

Tras el establecimiento de la infección, la producción de anticuerpos es constante y, aunque no es muy efectiva en la eliminación del virus, ofrece la posibilidad de detectar los animales infectados de manera indirecta. La seroconversión puede ocurrir semanas o meses después de la infección, y se mantiene, con algunas fluctuaciones, a lo largo de la vida del

animal resultando muy útil para el diagnóstico. La mayoría de los anticuerpos séricos se dirigen frente a la cápside, la nucleocápside y la envoltura viral, por lo que se han desarrollado distintas pruebas serológicas basadas en la detección de estos anticuerpos. Entre ellas, la seroneutralización (Sigurdardóttir and Thormar, 1964), la fijación del complemento (FC) (Gudnadóttir and Kristinsdóttir, 1967), la hemaglutinación pasiva (Karl and Thormar, 1971), la inmunofluorescencia indirecta (De Boer, 1970), la radioinmunoprecipitación (RIPA) (Gogolewski et al., 1985), el radioinmunoensayo (RIA) (Torfason et al., 1992), el Western blotting o inmunoblot (WB) (Houwers and Nauta, 1989), la inmunodifusión en gel de agarosa (AGID) (Winward et al., 1979) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) (Houwers et al., 1982). En la actualidad los métodos más utilizados son la AGID y el ELISA porque permiten analizar un gran número de muestras de forma rápida y barata.

Las técnicas de RIPA, RIA y WB se emplean tan solo para la confirmación ya que son costosas y entrañan cierta dificultad. El WB ha demostrado ser más sensible que la AGID (Heckert et al., 1992) y puede ser tanto o más sensible que el ELISA (Houwers and Nauta, 1989; Zaroni et al., 1989). La sensibilidad y especificidad de la AGID y del ELISA dependen de la cepa de virus usada en la preparación del antígeno y de la estirpe infectante. Los análisis de inmunotransferencia tipo WB y/o RIA son los estándares de comparación para establecer la sensibilidad y especificidad de las nuevas pruebas AGID y ELISA.

La AGID ha sido la técnica serológica más usada en el diagnóstico de la infección por SRLV hasta la aparición de los ELISAs de nueva generación. Esta técnica, descrita por primera vez por Cutlip y colaboradores en 1977 (Cutlip et al., 1977) y mejorada por Winward y colaboradores en 1979 (Winward et al., 1979), utiliza como antígeno el virus completo concentrado, procedente de sobrenadante de cultivos celulares y posteriormente desnaturalizado. La técnica se basa en la detección de anticuerpos frente a antígenos solubles de la proteína de superficie gp135 y de la cápside p25 (p28 en CAEV). Los sueros que contienen anticuerpos específicos generan dos bandas de precipitado correspondientes a cada una de las proteínas (Cutlip et al., 1979). La ventaja de la AGID es su alta especificidad, próxima al 100%, y como inconvenientes presenta su baja sensibilidad, estimada en un 80,9% (Winward et al., 1979), la subjetividad en la interpretación de los resultados, y la larga duración del test ya que deben realizarse dos lecturas a 24 y 48 horas.

Hay numerosas publicaciones que describen diferentes procedimientos ELISA para detectar la infección por SRLV. Los más empleados son los ELISAs indirectos (ELISAI) que utilizan anticuerpos marcados con una enzima que reaccionan con el suero problema, de tal forma que al añadir el sustrato generan una reacción coloreada que se puede medir por espectrofotometría. Éstos usan como antígeno un virus completo, proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos (de Andrés et al., 2005). También se han descrito ELISAs de competición (ELISAc) (Feverero et al., 1999), que utilizan anticuerpos monoclonales. Se usan con menos frecuencia y se basan en la competencia entre los anticuerpos del suero y los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas del virus. Los ELISAs disponibles para detectar la infección por SRLV han evolucionado a lo largo de la historia y se han catalogado como ELISAs de primera, segunda o tercera generación en función de las características de los conjugados y antígenos utilizados. Los de primera generación utilizan preparaciones de virus procedentes de sobrenadantes de cultivos virales altamente purificados, y como conjugado, sueros policlonales (Celer et al., 1998; Houwers et al., 1982; Vitu et al., 1982; Zaroni et al., 1994). Al coexistir proteínas celulares copurificadas con las virales es habitual la aparición de falsos positivos. Esto podría resolverse disminuyendo la cantidad de muestra, pero provoca una disminución de la sensibilidad del test dando lugar a falsos negativos (Pépin et al., 1998). Los de segunda generación se basan en el empleo de anticuerpos monoclonales como conjugado (Houwers and Schaake, 1987) y de antígenos de gran pureza, incluidos la p25, la glicoproteína gp46 y la glicoproteína externa de la envoltura gp135, obtenidos mediante técnicas de recombinación del DNA en cultivos bacterianos de *Escherichia coli* (Keen et al., 1995; Kwang and Cutlip, 1992; Power et al., 1995; Reyburn et al., 1992; Zaroni et al., 1991). Generalmente estos ELISAs son más sensibles y específicos que los que utilizan virus enteros (Pépin et al., 1998). Por último, los de tercera generación se basan en el uso de oligopéptidos sintéticos que presentan una mayor pureza estructural mejorando considerablemente la especificidad, pero sin embargo su sensibilidad puede verse reducida. Para evitar esta limitación, frecuentemente se incluyen además proteínas recombinantes de la cápsida viral. Entre las opciones comerciales encontramos protocolos ELISA que emplean estos péptidos sintéticos en combinación o no con proteínas recombinantes (**Tabla 4**).

Tabla 4. Relación de los diferentes ELISAs comerciales disponibles. Se especifica el nombre comercial, el antígeno y genotipo que utilizan y el tipo de muestra a analizar con su correspondiente dilución.

Marca comercial	Antígeno-Genotipo	Muestra y dilución
Elitest-MVV/CAEV (Hyphen Biomed)	Proteína recombinante de Gag y péptido sintético de Env (Genotipo A)	Suero (1:500) Leche (1:10)
Eradikit™ SRLV Screening Kit (IN3 DIAGNOSTIC)	Mezcla de antígenos de la región <i>gag</i> y <i>env</i> (Genotipos A, B y E)	Suero (1:20)
INgezim MAEDI SCREENING (INGENASA)	Anticuerpo monoclonal y 2 péptidos de Env (VMV y CAEV)	Suero (1:20)
ID Screen® MVV/CAEV Indirect (ID.VET)	Péptidos de Tm y Gag (VMV y CAEV)	Suero, Plasma y Leche (1:20)
SMALL RUMINANT LENTIVIRUS ANTIBODY TEST KIT, cELISA (VMRD)	Anticuerpo monoclonal de Env (Genotipo B).	Suero (Sin diluir)
PrioCHECK™ MAEDI-VISNA & CAEV Ab Serum Kit (Thermo Fisher Scientific)	Anticuerpos de Env (CAEV o VMV)	Suero (1:2)
IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Screening Test and Verification Test (IDEXX Francia)	Proteína recombinante de Gag y péptido de Env	Suero y Plasma (1:10)
CAEV/MVV Total Ab Test (IDEXX Suiza)	Virus completo	Suero y Plasma (1:10)

Tras la infección experimental con SRLV se ha observado una escasa sensibilidad de los test serológicos en las primeras fases de la infección, que se conoce como seroconversión retardada o *delayed seroconversion* (Lacerenza et al., 2006). La heterogeneidad de los epitopos inmunodominantes del antígeno de la cápside que se utilizan en los test serológicos podría afectar a la sensibilidad de los mismos (Grego et al., 2002), por lo que el desarrollo de ELISAs con antígenos específicos de la cepa predominante en una determinada zona o región podría ser de utilidad en programas de control (Grego et al., 2002; Reina et al., 2009b). Esta heterogeneidad podría ser favorable a la hora de caracterizar el genotipo del virus presente en un brote de la enfermedad o el circulante en un rebaño concreto (Olech et al., 2012). Así, es importante la correcta elección de los antígenos del test según la finalidad del procedimiento.

Se asume que tras la infección la presencia de anticuerpos en el suero es constante, sin embargo, se han descrito respuestas humorales intermitentes (Rimstad et al., 1993). Tras el aumento considerable del nivel de anticuerpos en la seroconversión, dicho nivel puede bajar hasta valores en los que los anticuerpos son prácticamente indetectables y posteriormente se puede producir un nuevo aumento relacionado con reinfecciones o con cambios en el subtipo de anticuerpos (IgM a IgG). Por otro lado, al desarrollarse la fase clínica de la enfermedad, puede producirse una pérdida de la respuesta humoral (Torfason et al., 1992).

A pesar de que la determinación del estatus infeccioso de la cabaña es relevante para poder controlar la infección, en algunos casos o áreas concretas el diagnóstico individual puede resultar económicamente inviable. Por ello se han desarrollado estrategias para detectar anticuerpos en mezclas de sueros (Brinkhof and Van Maanen, 2007), leche de tanque (Brinkhof et al., 2010) o muestras de semen (Ramírez et al., 2009), ventajoso en centros de inseminación con machos de alto valor genético (Reina et al., 2011).

Por tanto, los métodos serológicos son ampliamente utilizados por su bajo coste y fácil manejo, pero pueden fallar a la hora de detectar todos los animales infectados. Por ello, se han desarrollado métodos de diagnóstico directos capaces de detectar la presencia del virus. Actualmente, tanto la técnica AGID como ELISA se describen en el código sanitario para los animales terrestres de la OIE como pruebas diagnósticas de referencia para Maedi Visna. Sin embargo, la comunidad científica considera el ELISA como el test serológico más sensible y gracias a su elevada reproducibilidad, objetividad en la lectura y rapidez, es la técnica más utilizada en el diagnóstico de los SRLV (de Andrés et al., 2005).

6.3 Diagnóstico viral

Los métodos basados en la detección directa del virus se pueden clasificar en función del material que detectan. La detección de **la partícula viral completa** se lleva a cabo mediante el aislamiento vírico y la microscopía electrónica, sus **proteínas estructurales** pueden ser detectadas mediante inmunohistoquímica (IHQ) y su **material genético** se detecta mediante la técnica de PCR.

Detección de la partícula viral:

El aislamiento vírico se puede realizar a partir de explantes de tejido de los propios animales infectados, o de co-cultivo de fluidos y/o células infectadas sobre células adherentes permisivas a la infección, en las que se observa el efecto citopático, que consiste en la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios) tras un periodo de incubación que va desde cuatro días hasta 2-3 semanas (Sihvonen, 1984, 1980).

En algunos casos no resulta posible observar el CPE, lo cual puede deberse a que la cepa viral no induce dicho efecto o que permanece latente (Chebloune et al., 1996). Además, debido a que los SRLV no se producen en grandes cantidades en ningún órgano diana, es importante elegir bien la muestra (biopsia o suspensión de células infectadas), así como las células indicadoras que, tras la infección dan lugar a una infección productiva con la consiguiente aparición de CPE y la liberación de viriones al sobrenadante.

Estos viriones se pueden detectar de manera indirecta mediante la cuantificación de la actividad enzimática de la Rt en sobrenadantes de cultivos celulares o en muestras biológicas. Se puede determinar mediante el uso de un kit comercial, basado en una técnica ELISA altamente sensible que utiliza un formato de placa de 96 pocillos (HS-Lenti Cavidí), o mediante RT-PCR en tiempo real. En la cuantificación de la actividad Rt por PCR cuantitativa basada en SYBR Green (SG-PERT) se agrega un RNA exógeno al sobrenadante viral y la actividad de la Rt se estima determinando la cantidad de RNA que se retrotranscribe en cDNA (Pizzato et al., 2009). Este ensayo se utiliza para la detección de contaminantes retrovirales en productos biológicos y constituye una alternativa atractiva para la determinación rutinaria de retrovirus y lentivirus en el laboratorio (Vermeire et al., 2012).

La metodología de aislamiento viral se ha basado tradicionalmente en este procedimiento, sin embargo, resultados recientes sugieren que estirpes de SRLV con baja patogenicidad, o simplemente con una capacidad reducida para dar lugar a sincitios, cuestionan dicha técnica (Colitti et al., 2019). Por ello, los autores desarrollaron un método rápido y efectivo para la caracterización del genoma completo, el cual consiste en cultivar macrófagos derivados de bazo, monitorizarlos para detectar la presencia de actividad Rt y extraer el RNA de los sobrenadantes de los cultivos para posteriormente secuenciarlo en su totalidad a través de Illumina MiSeq. Esta metodología abre la puerta a la caracterización de nuevos genotipos no patogénicos que hasta el momento podrían haber pasado desapercibidos.

Detección de proteínas estructurales del virus:

La inmunohistoquímica (IHQ) está basada en la detección de antígenos en tejidos por la unión de anticuerpos específicos marcados mediante fluorocromos o con enzimas como la peroxidasa. La IHQ permite localizar antígenos virales en distintas poblaciones celulares asociadas a la infección, contribuyendo al estudio de la patogenia de la enfermedad, como en las células epiteliales de la glándula mamaria (Bolea et al., 2006). A pesar de ello, es una técnica cara, laboriosa y puede presentar reacciones inespecíficas (principalmente al usar anticuerpos policlonales) y, por tanto, su uso queda restringido a estudios experimentales (Álvarez, 2005).

Detección del material genético del virus:

La aplicación de técnicas de biología molecular, como la PCR, (Mullis, 1994) al diagnóstico ha supuesto un gran éxito por su capacidad para detectar directamente material genético del virus, tanto el que se encuentra en la célula infectada en forma de provirus, como el libre en forma de virión. La PCR convencional se basa en la amplificación de fragmentos de DNA utilizando oligonucleótidos sintéticos específicos de la secuencia diana, llamados *primers*, con la ayuda de la enzima Taq polimerasa y una serie de ciclos a diferentes temperaturas que permiten generar un número exponencial de copias, suficientes para poder ser detectadas con facilidad en un gel de agarosa teñido con un intercalante de DNA (Sambrook et al., 1989). La mayoría de los estudios emplean como diana el DNA de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), aunque también se han realizado estudios con el DNA extraído de leche, calostro, semen y líquido sinovial (Extramiana et al., 2002; Leroux et al., 1997; Rimstad et al., 1993). Para el diagnóstico, los *primers* se suelen diseñar en zonas conservadas del genoma y, para realizar estudios filogenéticos es habitual diseñarlos en zonas variables. En la bibliografía podemos encontrar *primers* diseñados a lo largo de todo el genoma viral, mostrando diferencias en sensibilidad y especificidad (Rosati et al., 1995; Travassos et al., 1999). Para aumentar al máximo la sensibilidad de los ensayos se han desarrollado PCRs dobles y/o anidadas (Chassalevris et al., 2020) y además, se puede combinar con el uso de *primers* degenerados, que permitiría solventar el problema de la heterogeneidad en las secuencias genómicas de los SRLV (Dolfini et al., 2015). Por otro lado, la PCR en tiempo real (qPCR) emplea sondas o intercalantes fluorescentes para cuantificar los productos de amplificación a medida que se va sintetizando el DNA en la reacción, y no se limita a analizar el producto final como la PCR

convencional. La PCR en tiempo real permite la detección de la infección en fases más tempranas, aproximadamente 15 días tras la infección, frente a los 40-60 días necesarios para análisis serológicos (Herrmann-Hoesing et al., 2007; Li et al., 2013). Esta técnica presenta dos inconvenientes principales, por un lado, la alta variabilidad genética de los SRLV, que dificulta el diseño de los *primers* específicos con capacidad para anclarse en la secuencia escogida y dar lugar a una reacción en un amplio abanico de muestras y, por otro, la baja carga viral descrita en las infecciones por SRLV, ya que se considera que sólo 1 de cada 10^6 leucocitos portan en su genoma secuencias de SRLV (Haase, 1986). Para poder detectar el material genético del virus no integrado, es decir, del virión, es necesario realizar un proceso de retrotranscripción del RNA a cDNA, pasándose a denominar la técnica “PCR transcriptasa inversa (RT-PCR)” (Extramiana et al., 2002).

Numerosos estudios apuntan a que, por regla general, el diagnóstico serológico, sobre todo mediante ELISA, es más sensible que el diagnóstico por PCR (Muz et al., 2013), sin embargo, la PCR puede detectar animales infectados que aún no hayan seroconvertido (Zanoni et al., 1996). Por tanto, se sugiere que el diagnóstico no debería estar restringido a un solo test, sino que la combinación del ELISA y la PCR puede ser una estrategia adecuada que mejore su efectividad (Brinkhof et al., 2010; Modolo et al., 2009), ya que no hay un “gold standard”.

7. Importancia de la infección

7.1 Distribución

Tras reportarse por primera vez la infección por VMV en Islandia, la enfermedad ha sido identificada en ovejas de todo el mundo, a excepción de Australia y Nueva Zelanda, que están declaradas libres de VMV, pero no así de CAEV (Kalogianni et al., 2020; López and Martinson, 2017).

Un metanálisis de los últimos 40 años (1981-2020) que hace referencia a datos de prevalencia de SRLV en la cabaña ovina indica que Europa es el continente en el que más estudios se han realizado y, es el que mayor prevalencia individual presenta (40,9 %). África, Asia y Norteamérica presentan unos valores de entre 16,7% y 21,8 %, mientras que,

Sudamérica y América central muestran una menor prevalencia individual (1,7%), que es proporcional a la del rebaño (**Figura 5**) (de Miguel et al., 2021).

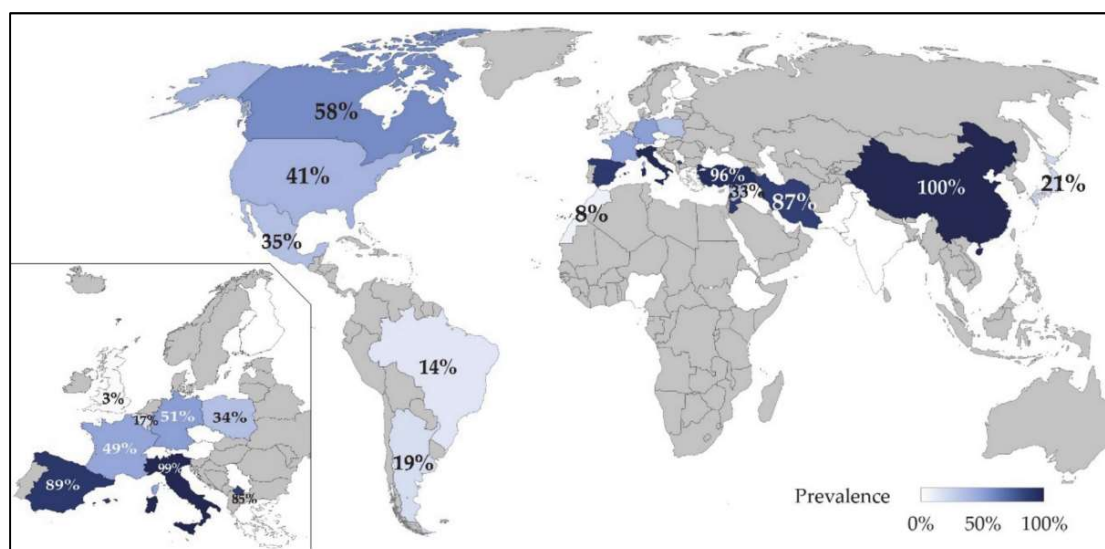


Figura 5. Prevalencia (%) mundial de los SRLV a nivel de rebaño en ganado ovino. En la esquina inferior izquierda se recuadran los países europeos ampliados. Figura extraída de (de Miguel et al., 2021).

En Europa, estudios recientes en Polonia, España y Suiza, reportan valores de seroprevalencia del 72, 53 y 9%, respectivamente (Kaba et al., 2013; Lago Rodríguez, 2012; Michiels et al., 2018; Schaller et al., 2000). En los países mediterráneos con un sector ovino desarrollado como en España, Italia y Grecia, las observaciones de campo sugieren una elevada extensión de la infección, pudiéndose considerar endémica (Christodoulopoulos, 2006). La realización de estos estudios requiere de una financiación que en la mayoría de los casos no está disponible, y los que se realizan, se limitan principalmente a la estimación de seroprevalencias a pequeña escala y en regiones concretas (Kalogianni et al., 2020).

En España, el VMV fue descrito por primera vez en 1983, en un estudio sobre las enfermedades respiratorias crónicas más frecuentes que afectaban al ganado ovino de raza Latxa del País Vasco (Badiola et al., 1983), en el que se detectó una prevalencia de animales infectados del 31,95% (Gonzalez et al., 1984). Posteriormente, se describió la infección en el 100% de los rebaños muestreados, con un 47% de prevalencia media por rebaño (Juste et al., 1987). En un estudio más amplio se obtuvieron cifras del 99,2% de los rebaños y del 52,4% de los animales (González, 1989). A raíz de ahí, se han realizado numerosos estudios en varias comunidades autónomas, demostrándose que la infección está extendida por

toda la geografía peninsular tanto en ovinos como en caprinos, aunque con diferentes niveles de prevalencia, obteniéndose en general valores medios-altos (**Tabla 5**). Las únicas comunidades sin datos publicados son Cantabria, Extremadura, La Rioja y las Islas Canarias. Los trabajos más recientes apuntan a la circulación de genotipos de SRLV en la isla de Mallorca (de Pablo-Maiso et al., 2017), previamente descritos en el Mediterráneo (Bertolotti et al., 2011), lo que podría indicar un origen ancestral común relacionado con el comercio de animales.

La Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, ha afirmado que los datos recogidos en el año 2018 de los rebaños de la raza Assaf inscritos en su programa de control, indican una prevalencia media del 65%, no habiendo ninguna explotación con menos del 10%, mientras que la prevalencia media de otras razas como la Churra se encuentra en torno al 15% (<https://oviespana.com/>). En Navarra se realizó un estudio en los años 2000, en el que se analizaron un total de 580 ovinos de 4 a 5 años por ELISA mostrando una seroprevalencia del 39% y el 51,67% en las razas Latxa Navarra y Raza Navarra, respectivamente (Glaría et al., 2003).

Tabla 5. Estudios de seroprevalencia frente a los SRLV realizados en España. Se muestra la comunidad autónoma, el periodo, el número de animales y rebaños, la prevalencia individual y del rebaño (%) y el método diagnóstico con su correspondiente referencia bibliográfica.

Comunidad	Referencia	Año	Número		Prevalencia (%)		Método diagnóstico
			Animales	Rebaños	Individual	Rebaño	
Galicia	(Lago Rodríguez, 2012)	2007 - 2009	15155	55	20	49	ELISA
				23	36	61	
Asturias	(Espí et al., 2001)	ND	900	ND	24	ND	ELISA
Castilla y León	(Sotelo et al., 1995)	ND	ND	ND	66	96	AGID
	(Reviriego, 1998)	ND	ND	ND	15	30	AGID
	(Leginagoikoa et al., 2006b)	2003 - 2004	3974	10	77	100	ELISA
Castilla la Mancha	(de la Cruz et al., 1994)	ND	117	6	ND	12	AGID
	(Leginagoikoa et al., 2006b)	2003 - 2004	1360	23	5	26	ELISA
Madrid	(García et al., 1994)	ND	ND	ND	25	43	ND
	(Barquero et al., 2011)	1998 - 2000	250	10	72	100	ELISA/PCR
Andalucía	(Artigas et al., 1999)	ND	ND	64	ND	31	ELISA
	(Barrero Domínguez et al., 2017)	ND	ND	ND	23	88	ELISA
Murcia	(León and Prats, 1996)	ND	ND	ND	14	22	AGID
Cataluña	(Alba et al., 2008)	2004 - 2005	5120	241	58	90	ELISA
Valencia	(Martínez-Navalón et al., 2013)	2005 - 2008	4543	22	18	77	ELISA
País Vasco	(González, 1989)	ND	ND	ND	ND	32	AGID
	(Juste et al., 1998)	ND	ND	ND	47	100	AGID
	(Leginagoikoa et al., 2006b)	2003 - 2004	1570	5	25	100	ELISA
Navarra	(Ameztoy et al., 1998)	ND	ND	ND	26	89	ELISA
	(Glaría et al., 2003)	2000	580	58	39-52	100	ELISA
Islas Baleares	(de Pablo-Maiso et al., 2017b)	2014-2015	277	11	9-40	82	ELISA
	(Lujan et al. 1993)	ND	ND	ND	39-45	95-98	ND
Aragón	(Abril et al., 1994)	ND	ND	36	ND	ND	ELISA
	(Abril et al., 2004)	ND	ND	ND	15-53	ND	AGID/ELISA
	(Biescas et al., 2004)	2002-2003	ND	ND	56	100	ELISA
	(Pérez et al., 2010)	ND	ND	ND	52,8	100	ELISA

ND: No disponible. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), AGID (Agar Gel Immunodiffusion Assay).

Estos estudios realizados desde principios de los años ochenta demuestran que la infección está ampliamente extendida y con una elevada prevalencia en los rebaños, siendo

probablemente, una de las enfermedades infecciosas más comunes en el ganado ovino adulto en España.

7.2 Impacto económico

Como hemos visto anteriormente, la infección por SRLV tiene una elevada incidencia en nuestro país, suponiendo pérdidas económicas destacables y pudiendo ser considerada como la enfermedad de origen infeccioso de mayor prevalencia en el ganado ovino de producción lechera intensiva (Benavides et al., 2013; Polledo et al., 2013).

La enfermedad es de carácter lento, progresivo y poco evidente, ya que desde que un animal se infecta hasta que muestra signos clínicos pueden pasar años; de hecho, no se evidencian hasta que aproximadamente el 30% del rebaño está infectado (Ritchie and Hosie, 2014). Si bien la muerte de los animales infectados no es común, el descenso productivo de los mismos puede conllevar un desvieje anticipado, mermando así la rentabilidad económica de las explotaciones. Además, los animales infectados pueden ser más susceptibles a otras infecciones que causan pérdidas más evidentes.

A lo largo de los años, y en diferentes estudios, se han analizado las pérdidas productivas asociadas a la muerte, al desvieje prematuro de los animales, al aumento de la tasa de reposición y a otros parámetros productivos como son la cantidad o la calidad de leche, el peso de los corderos al nacer y al destete, y el tamaño de la camada entre otros. Los datos muestran resultados discordantes, ya que existe una compleja interacción entre el virus, el hospedador y el ambiente, lo cual dificulta el estudio de las pérdidas y su cuantificación económica (Peterhans et al., 2004). Los principales factores que influyen en la fiabilidad de este tipo de estudios son el curso lento de la enfermedad, las limitaciones de las estrategias de diagnóstico, los factores genéticos del hospedador y del virus, y la presencia de infecciones concomitantes.

Teniendo en cuenta lo anterior, las pérdidas económicas causadas por la infección de SRLV se pueden asociar a diferentes parámetros.

Aumento de la mortalidad y disminución de la vida media productiva

Durante el brote sufrido en Islandia a mediados del siglo pasado, se describió una mortalidad de entorno al 20-30% (Sigurdardóttir and Thormar, 1964; Sigurdsson et al., 1952). En 2004, Peterhans y colaboradores afirmaron que la mortalidad suele ser baja en

zonas enzoóticas, donde la infección está fuertemente relacionada con la existencia de otras enfermedades concurrentes, el sistema de producción, la nutrición de los animales y otros factores ambientales, pero puede aumentar en zonas en las que no haya una interacción virus-hospedador anterior (Peterhans et al., 2004). Por otro lado, las ovejas infectadas pueden presentar una pérdida progresiva de peso, aumentando así el riesgo de desvieje prematuro (Bulgin, 1990; Dohoo et al., 1987; Keen et al., 1997; Radostits et al., 2000). De esta manera, los animales con evidentes signos clínicos se eliminan un año antes (Anderson et al., 1985). En un estudio llevado a cabo en dos rebaños de raza Assaf situados en la región noroeste de España, se determinó que la infección por SRLV era, sola o en combinación con otras enfermedades, la enfermedad con mayor prevalencia y la principal causa de pérdidas directas por muerte o sacrificio de animales (Benavides et al., 2013). Recientemente, se ha realizado un estudio de las principales patologías asociadas al desecho del ganado ovino de Aragón en el que señala al VMV como la principal causa (Cuello Vitales, 2018).

Disminución de parámetros productivos

Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto que tiene la infección por SRLV en los parámetros productivos de los rebaños y, por tanto, en la rentabilidad económica de las explotaciones. En este apartado es importante diferenciar entre los rebaños de aptitud lechera (**Tabla 6**) y los de aptitud cárnica (**Tabla 7**).

La rentabilidad económica de las explotaciones lecheras depende principalmente de la cantidad de leche producida y la calidad de la misma. Dentro de la calidad de la leche, los parámetros que especialmente se tienen en cuenta son el extracto quesero, que viene determinado por el porcentaje de grasa y proteína de la leche, el recuento de bacterias y de células somáticas (RCS) y la presencia de inhibidores (antibióticos). La industria láctea fija al ganadero un precio base por cada litro de leche entregado y lo multiplica por el extracto quesero. Posteriormente se aplican una serie de bonificaciones y/o penalizaciones en función de otros parámetros de calidad como son el recuento de bacterias y de células somáticas. Para determinar la calidad y, por tanto el precio, cada mes se recogen varias muestras de leche del tanque y se mandan a analizar a un laboratorio externo. Uno de los aspectos que más preocupa a los ganaderos es el de tener un elevado recuento de células somáticas, ya que está fuertemente penalizado, por ejemplo; las penalizaciones para el año 2021 por un RCS superior a las 1250 (x1000células/mL) puede suponer una disminución del

precio desde 0,012 hasta 0,03 euros por litro, y la bonificación por obtener unos recuentos inferiores a 500 (x1000células/mL) puede repercutir en el precio de la leche hasta en 0,03 euros/litro.

Algunos autores proponen que la disminución en la producción lechera puede no deberse únicamente a lesiones en las mamas, sino a una disminución de la tasa metabólica producida por la propia infección (Christodouloupoulos, 2006), la mastitis es una de las formas de presentación más común en las infecciones por SRLV, lo que parece conllevar una disminución de la producción láctea y un mayor recuento de células somáticas.

En las explotaciones de aptitud cárnica la rentabilidad económica está determinada principalmente por el número y el peso de los corderos vendidos. Por ello, los diferentes estudios realizados han tenido en cuenta principalmente los siguientes parámetros: tamaño de la camada (número de corderos por parto), peso de los corderos al nacer y al destete, y la ganancia media diaria (GMD). Además, la infección por VMV puede causar un síndrome de agotamiento, asociado a una reducción de los índices reproductivos en ovino (Gates et al., 1977).

Aparte de la escasez y controversia de los estudios que evalúan el efecto de la infección sobre los parámetros productivos, la mayoría presentan un factor limitante común a la hora de clasificar los animales positivos y negativos, debido a que utilizan un único test diagnóstico con una base antigénica monoestirpe (de Miguel et al., 2021). Sin embargo, a pesar de no existir un consenso claro en cuanto a las pérdidas originadas por la infección, sí existe acuerdo en que la rentabilidad económica se ve mermada en aquellos rebaños con una significativa tasa de animales infectados por SRLV.

Tabla 6. Resumen de los diferentes estudios realizados sobre la incidencia de la infección por SRLV en las pérdidas productivas en rebaños de aptitud lechera.

Referencia	Especie	Nº Animales	Prevalencia (%)	Diagnóstico		Parámetros afectados	Parámetros no afectados
				Muestra	Técnica		
(Turin et al., 2005)	Caprino	31	85	Suero	ELISA WB	Litros RCS Grasa Proteína	Lactosa
(Lipecka et al., 2010)	Ovino	65	55,4		ELISA	Litros Grasa Proteína Lactosa	
(Leitner et al., 2010)	Caprino	248			ELISA	Litros (1ª lactación)	Litros (2-4ª lactación)
(Kaba et al., 2012)	Caprino	177	36,6	Suero	ELISA	Grasa Proteína Lactosa	Litros RCS
(Barquero et al., 2013)	Ovino Caprino	62 28	8 65,5	Leche	ELISA		Litros RCS Grasa Proteína Lactosa
(Martínez-Navalón et al., 2013)	Caprino	4543	18	Suero	ELISA	Litros Extracto seco RCS Grasa Lactosa	
(Nowicka et al., 2015)	Caprino	247	28,75	Suero	ELISA	Litros	RCS Grasa Proteína
(Pławińska-Czarnak et al., 2014)	Caprino	24	50	Suero	ELISA	Litros RCS	
(Juste et al., 2020)	Ovino	2146	Media-Alta		ELISA	Litros Duración de lactación Tamaño de camada	
(Ploumi et al., 2001)	Ovino	378	47	Suero	ELISA	Litros	

RCS (Recuento de células somáticas), ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), AGID (Agar Gel Immunodiffusion Assay).

Tabla 7. Resumen de los diferentes estudios realizados sobre la incidencia de la infección por SRLV en las pérdidas productivas en rebaños de aptitud cárnica.

Referencia	Especie	Nº Animales	Prevalencia (%)	Diagnóstico		Parámetros afectados	Parámetros no afectados
				Muestra	Técnica		
(Dohoo et al., 1987)	Ovino	1445	7,7-65,8	Suero	AGID	Fertilidad	Tamaño camada Peso nacimiento Peso al destete
(Greenwood, 1995)	Caprino	200	70	Suero	ELISA y AGID	Fertilidad Peso nacimiento	Mortalidad neonatal Duración de gestación
(Dungu et al., 2000)	Ovino	90	55,6	Suero	2 ELISAs		Tamaño camada Ganancia media diaria
(Arsenault et al., 2003)	Ovino	1734	29	Suero	ELISA		Tamaño camada Peso nacimiento
(Nalbert et al., 2019)	Caprino	77	62,3	Suero	3 ELISAs		Tamaño camada Peso nacimiento

ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), AGID (*Agar Gel Immunodiffusion Assay*).

7.3 Prevención y control

Las vacunas frente a los SRLV están en vías de desarrollo desde finales de los 80, cuando varios intentos de vacunación con virus atenuados fallaron a la hora de proteger frente a la infección y en algunos casos incluso se incrementó la patogenicidad (Cutlip et al., 1987; McGuire et al., 1986). En la actualidad no existe ninguna vacuna ni tratamientos comerciales capaces de controlar la infección por SRLV. Por ello, las únicas medidas que se pueden llevar a cabo son aquellas encaminadas a prevenir y controlar la enfermedad, es decir, evitar la transmisión de la infección mediante la eliminación de animales infectados y realizando la reposición con animales no infectados.

Estas pautas clásicas se han puesto en práctica en diferentes programas de control, obteniéndose resultados variables. Sin embargo, en toda Europa, especialmente la cuenca Mediterránea, incluyendo España, es difícil encontrar rebaños declarados libres de la infección (Pérez et al., 2010) y su extensión depende mayoritariamente de los estudios de seroprevalencia que se lleven a cabo (de Miguel et al., 2021).

I. Normativa

La normativa de nuestro país entró en vigor el 1 de octubre de 2004 a través del Real Decreto 1941/2004, de 27 de septiembre, por el que se establecen las normas de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios y las importaciones de terceros países de animales de las especies ovina y caprina. Mediante este Real Decreto se incorporó a nuestro ordenamiento jurídico la Directiva 2003/50/CE del Consejo de la Unión Europea, de 11 de junio de 2003, por la que se modifica la anterior Directiva 91/68/CEE en lo que respecta a la intensificación de los controles sobre los movimientos de ovinos y caprinos. Esta normativa establece los requisitos para los intercambios intracomunitarios de animales ovinos y caprinos destinados a abasto, engorde y reproducción. En el caso de los animales de reproducción se establece que deben haber sido adquiridos en una explotación o haber tenido contacto sólo con animales de una explotación en la que no se hayan detectado clínicamente las siguientes enfermedades: agalaxia contagiosa del carnero y agalaxia contagiosa de la cabra en el curso de los últimos seis meses; paratuberculosis o linfadenitis caseosa durante los últimos 12 años, y la adenomatosis pulmonar, el Maedi Visna o la artritis encefalitis viral caprina durante los tres últimos años. No obstante, ese plazo quedará reducido a 12 meses si los animales infectados de VMV o CAEV han sido sacrificados y los demás animales han dado reacción negativa a dos pruebas reconocidas con arreglo al procedimiento comunitario previsto, o que, sin perjuicio del cumplimiento de los requisitos para las demás enfermedades, aporte garantías, para una o más de las enfermedades citadas en el marco de un programa aprobado. En 2014 entró en vigor el Real Decreto 256/2014, de 20 de junio, por el que el Maedi Visna y la artritis encefalitis caprina pasan a ser considerados de declaración obligatoria en nuestro país.

La normativa actual limita la exportación o importación de animales en los que se haya detectado clínicamente la enfermedad producida por los SRLV y de este modo velan por evitar la entrada de animales infectados al rebaño. Sin embargo, la enfermedad se hace visible en muy pocos animales y sólo en rebaños en los que la seroprevalencia es alta (Ogden et al., 2019). Lo cual nos indica que en el caso de realizarse una compra de animales, estos deberían proceder de rebaños no solamente declarados libres de la enfermedad, sino también de la infección, de tal modo que solo se incorporen al rebaño animales negativos, asegurándose así el éxito de las estrategias de control aplicadas. En esta línea, la OIE recomienda que las autoridades veterinarias de los países importadores deben exigir la

presentación de un certificado veterinario internacional que acredite que los animales no manifestaron ningún signo clínico de Maedi Visna el día del embarque, que los animales mayores de un año de edad resultaron negativos en una prueba de diagnóstico para la detección de Maedi Visna efectuada durante los 30 días anteriores al embarque y, por último, que el Maedi Visna no se diagnosticó clínica ni serológicamente en los ovinos y caprinos presentes en los rebaños de origen durante los tres últimos años y no se introdujo, en dichos rebaños, ningún ovino ni caprino de condición sanitaria inferior durante ese periodo (<http://www.oie.int/>, 2019).

II. Estrategias de control

La normativa referente a la importación/exportación de ovinos y caprinos para la reposición supone un avance importante en el control de los SRLV, pero el primer paso para llevar a cabo con éxito cualquier estrategia de control debe ser la correcta clasificación sanitaria del rebaño. La prevalencia inicial de la infección va a ser un gran determinante en la estrategia a seguir, ya que cada programa de control debe ajustarse a las condiciones y necesidades intrínsecas de cada rebaño. En este punto inicial cobra una gran importancia la eficiencia de las técnicas empleadas para el diagnóstico, ya que pueden llegar a comprometer la viabilidad del programa. A pesar de que el mundo científico recomienda emplear como técnica diagnóstica la combinación del ELISA junto a técnicas moleculares de PCR (Kalogianni et al., 2020), la OIE sigue incluyendo el AGID, hasta un 30% menos sensible, como técnica válida para diagnosticar la infección por SRLV. De hecho, recientemente se ha analizado el sesgo existente entre los resultados científicos y las recomendaciones de la OIE (de Miguel et al., 2021).

Tras conocer la seroprevalencia inicial del rebaño y clasificarla en alta, intermedia o baja, se debe elegir una estrategia de control específica, adaptada a la seroprevalencia, al sistema de cría y la gestión de la explotación.

Una de las primeras estrategias empleadas en la erradicación de la enfermedad fue la del reemplazo total del rebaño infectado por ganado libre de la infección. Esta estrategia resultó muy efectiva en el brote epidémico de Islandia ya que en ese momento no existían métodos de diagnóstico fiables. Se llevó a cabo el sacrificio completo de todos los rebaños que tuvieran algún animal enfermo, lo que se conoce como vacío sanitario, y la reposición se hizo con animales procedentes de áreas no afectadas (Pálsson, 1990). A pesar de que fue efectiva, es una estrategia poco viable en países como España, donde la infección está

ampliamente diseminada con elevadas prevalencias intra-rebaño (Luján et al., 1993), resultando muy difícil obtener animales suficientes para la reposición (De Boer et al., 1978) y, provocando a su vez, la pérdida de determinadas líneas de alto valor genético (Houwers, 1990).

Una variante de la estrategia anterior es el sacrificio de los animales seropositivos, de gran utilidad en aquellos rebaños que presentan una baja seroprevalencia. Para llevarlo a cabo es necesario realizar controles serológicos periódicos. Su eficacia ha sido probada en estudios experimentales (de Boer and Houwers, 1979) y de campo (Cutlip and Lehmkuhl, 1986; Houwers et al., 1984). Así, es posible eliminar el VMV de un rebaño en 6-7 años o incluso acelerar el proceso en el caso de eliminar también la progenie de las ovejas seropositivas (Houwers et al., 1984).

Una medida menos drástica, que se podría realizar en rebaños en los que el porcentaje de seroconversión es similar o menor al de desvieje, es la de realizar un desvieje selectivo de animales adultos seropositivos. Esto podría evitar el aumento en el porcentaje de eliminación y hacer la cría con corderas de madres seronegativas, preferiblemente mayores de 3 años de edad (Berriatua et al., 2003). De este modo, quizás se seleccionen líneas genéticas más resistentes a la infección, ya que, además de evitar la transmisión por la vía lactogénica, los corderos nacidos de madres seronegativas tienen menor probabilidad de seroconvertir a lo largo de su vida (Berriatua et al., 2003; Leginagoikoa et al., 2010). Sin embargo, esta estrategia no es recomendable en aquellos rebaños con elevadas prevalencias en los que no es viable la eliminación de todos los animales infectados. En estos casos, la creación de un rebaño paralelo con animales no infectados separado físicamente del rebaño original infectado ha resultado efectiva. El nuevo rebaño debe abastecerse de corderas no infectadas, para lo que es necesario separarlas al nacer de la madre y criarlas con calostro y leche libre de SRLV (Houwers, 1990). Esta estrategia posibilita el mantenimiento de líneas genéticas interesantes y no conlleva el sacrificio de animales con buenos datos productivos. Sin embargo, es un método muy laborioso para el ganadero ya que, además de disponer de dos instalaciones habilitadas para cada rebaño, debe gestionar dos rebaños separados durante al menos tres o cuatro años.

Otra estrategia eficaz se basa en la cría de corderos con calostro y leche libres de SRLV. Con esta pauta de manejo se evita la infección de las corderas de reposición a través del calostro y la leche procedente de madres infectadas (vía lactogénica). Para ello, las corderas

deben ser separadas de sus madres nada más nacer y ser alimentadas a través de calostro y leche artificial o bien pasteurizarlo en la propia explotación (Adams et al., 1983; Pérez et al., 1994). Se ha descrito la efectividad de este método en la prevención de la infección en corderas y cabritas (Houwens et al., 1983; Rowe et al., 1992), pero es importante tener en cuenta que el encalostamiento artificial o pasteurizado supone un gran esfuerzo económico y de manejo para el ganadero y resulta difícil de implementar en explotaciones de ovino de carne. También es importante resaltar que esta estrategia de control no es efectiva si no se complementa con la prevención de la transmisión horizontal (Álvarez, 2005; Berriatua et al., 2003).

Por último, algunos autores proponen realizar una selección genética de animales resistentes a SRLV. El hecho de que, la descendencia de madres seronegativas adultas de más de cuatro años presenten menor riesgo de seroconversión sugiere la existencia de un componente heredable de resistencia y susceptibilidad a la infección (Álvarez, 2005; Berriatua et al., 2003). En un estudio en el que se analizaron más de 50.000 marcadores, se identificó una mutación (E35K) en la proteína transmembrana 154 (TMEM154) asociada significativamente a la resistencia a la infección por SRLV. Se desconoce la función de esta proteína, pero su expresión en células B y monocitos sugiere que podría tener un papel inmunológico importante. En 2012 se llevó a cabo un estudio con 2800 ovejas en el que se determinó que animales con el alelo E35, que codifica un residuo de glutamato en la posición 35, tenían un riesgo de infección casi tres veces mayor. Y, por el contrario, se ha visto en ciertas razas ovinas de América del Norte, Alemania y de Asia que aquellas ovejas homocigotas que codifican un residuo de lisina en la posición 35 (K35), tienen un menor riesgo de infección. Estos resultados lo convierten en un buen candidato como marcador de selección genética (Heaton et al., 2012), sin embargo, se ha observado que distintos genotipos de SRLV se han adaptado a infectar ovejas con los genotipos E35 o K35 de manera específica (Sider et al., 2013). La mutación de aminoácidos en E35K del exón 2 de TMEM154 es actualmente el marcador más prometedor para la selección de animales resistentes a la infección por SRLV en diferentes poblaciones ovinas. Sin embargo, estos resultados deben ser validados con un mayor número de razas y muestras, considerándose otros parámetros de susceptibilidad, como pueden ser la carga proviral y los diferentes genotipos del virus. Además, se debe evaluar la implicación del alelo EK35 en otros rasgos funcionales y productivos (Eltanany, 2019). A excepción de los estudios mencionados, hay poca

información sobre la composición del haplotipo TMEM154 en diferentes razas productivas y su asociación con la susceptibilidad a la infección por SRLV.

Estudios similares han asociado la resistencia a SRLV a otros marcadores que podrían ser incluidos en los test de selección, como por ejemplo DPPA2/DPPA4 o SYTL3 (White et al., 2012), TLR9 (Sarafidou et al., 2013), CCR5 (White et al., 2009), TMEM38A (White et al., 2012), ZNF (White et al., 2014) y MHC-II (Larruskain et al., 2010).

Las diferentes estrategias de control a llevar a cabo en cada una de las situaciones, deberían estar recogidas en los programas de control establecidos por las autoridades bien a nivel autonómico o estatal.

III. Programas de control

Los trabajos realizados hasta la fecha revelan que el establecimiento de un programa de control y erradicación de los SRLV tendría un notable impacto en las explotaciones de ovino y caprino; así en muchos países ya se han implementado programas de control obligatorios o voluntarios que permiten únicamente el movimiento de animales desde explotaciones libres de la enfermedad.

Algunos de los países que han desarrollado programas de erradicación son los siguientes: Estados Unidos y Canadá (Menzies and Simard, 2001; Menzies, 2006), Finlandia (Sihvonen et al., 2000), Noruega (Nagel-Alne et al., 2014), Bélgica (Briont and Deluyker, 1985), Suecia (Valsson et al., 2001), Irlanda (Güven, 1985), Holanda (Houwers et al., 1987), Dinamarca (Hoff-Jorgensen, 1985), Francia (Remond and Larenaudie, 1985) y Suiza (Scheer-Czechowski et al., 2000). La mayoría de estos programas presentan cuatro medidas comunes: la realización de pruebas serológicas de todos los animales mayores de 6 meses, la segregación o sacrificio de los animales seropositivos y su desecendencia, la repetición del testaje serológico cada 6 ó 12 meses y, por último, la procedencia de la reposición únicamente de animales seronegativos.

En España todavía no se ha diseñado un programa nacional obligatorio de vigilancia de SRLV pero sí existen programas a nivel regional y de asociaciones ganaderas. En la región de Aragón, Ferrer consiguió reducir considerablemente la prevalencia de la enfermedad en rebaños extensivos y semi-extensivos de Rasa Aragonesa mediante la aplicación de dos medidas: obtención de la cría a partir de madres seronegativas y desvieje selectivo de aquellos animales con signos clínicos de enfermedad (neumonía crónica o agalaxia) (Ferrer, 1996). En esta misma región, durante los años 2002 y 2007, se llevó a cabo otro programa

de control en el que participaron aproximadamente el 10% de los rebaños aragoneses. Tras implementar las diferentes medidas, consiguieron el primer rebaño de España libre de Maedi Visna, y con los años, el número de rebaños certificados libres ha ido aumentando (Pérez et al., 2010). Actualmente, Castilla y León es la única comunidad autónoma española que dispone de un programa de control oficial frente a esta enfermedad. Iniciado en 2007, se trata de un programa voluntario, aunque es obligatorio para los ganaderos que envían animales a los centros de testaje. En el 2019, mediante la ORDEN AYG/287/2019, de 28 de febrero, por la que se establecen las normas que han de regular la segunda fase del programa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Maedi Visna/Artritis Encefalitis Caprina en la Comunidad de Castilla y León, se han introducido novedades al Programa Sanitario, incorporando nuevas herramientas tecnológicas en la detección de estas enfermedades, incluyendo el diagnóstico molecular, la elección voluntaria de los ganaderos para sacrificar animales positivos y la posibilidad de obtener una indemnización si optaran por esta vía.

Existen muy pocos estudios que analicen la eficacia de los planes de control a nivel regional o nacional. La evaluación de uno de ellos, desarrollado en Canadá con rebaños dedicados a la producción de corderos para sacrificio y cría, ha determinado que su aplicación resulta altamente rentable en aquellos rebaños que venden las corderas para cría, ya que la calificación oficial de libre de la enfermedad supone grandes beneficios, principalmente por el incremento en el precio de venta. En aquellos rebaños que se dedican a la venta de corderos para sacrificio, se ha estimado que la aplicación de dicho control solo sería rentable si la seroprevalencia fuera superior al 10%. Los planes de control basados en la eliminación de todos los animales infectados pueden resultar efectivos para erradicar la enfermedad pero supone un gran esfuerzo económico para el ganadero. Teniendo en cuenta que en nuestro país los rebaños presentan prevalencias medias-altas, los planes de control deberían contemplar medidas menos drásticas y que no comprometan la rentabilidad de las explotaciones.

La falta de consenso en las pérdidas productivas derivadas de la infección con lentivirus, junto con el desconocimiento, tanto de productores como de veterinarios, de la seroprevalencia de algunas regiones, además de las limitaciones del diagnóstico serológico comercial, desanima a instituciones y asociaciones de criadores a implementar programas de control. Por tanto, ya que el control de los SRLV no solo es necesario desde el punto de

vista sanitario, sino que también resulta rentable desde el punto de vista económico, es necesario evaluar tanto productiva como económicamente el impacto de la infección en los diferentes sistemas productivos de nuestro país (Benavides et al., 2018).

8. Vacunación

8.1 El uso de vacunas en medicina veterinaria

La eficacia de las vacunas ha sido probada a lo largo de los años contribuyendo a reducir la incidencia y prevalencia de muchas enfermedades humanas y animales, e incluso, han conseguido la erradicación de algunas como la viruela en humanos o la peste en el ganado bovino (Greenwood, 2014; Roeder, 2011; Strassburg, 1982).

La vacunación es un procedimiento clave en el control de enfermedades animales con importantes implicaciones zoonóticas, como la rabia o la tuberculosis (Garrido et al., 2011; Lütticken et al., 2007; Meeusen et al., 2007; Pastoret and Jones, 2005). Su uso ha contribuido significativamente al mantenimiento de un estado saludable en los animales de compañía (Day et al., 2015; Horzinek, 2010), al control de enfermedades infecciosas epizooticas en especies silvestres que pueden transmitir las infecciones a otros animales domésticos y a humanos (Chambers et al., 2017; Freuling et al., 2013; Garrido et al., 2011), y ha hecho posible la producción intensiva de animales. Por ello, las vacunas son un elemento clave en el mantenimiento del concepto llamado “*One Health*”, una estrategia mundial para aumentar la comunicación y la colaboración interdisciplinar en el cuidado de la salud de las personas, los animales y el medio ambiente, entendiendo que todas están ligadas entre sí.

En nuestro país, las vacunas más utilizadas en el ganado ovino-caprino son las que actúan frente a agentes abortivos (*Chlamydia abortus*, *Salmonella spp*, y *Brucella ovis*), enfermedades clostridiales (principalmente enterotoxemia) y enfermedades respiratorias causadas por diferentes miembros de la familia de la *Pasteurellaceae* (Lacasta et al., 2015). Otras enfermedades que también pueden controlarse mediante la vacunación en ciertas circunstancias, son aquellas que afectan las glándulas mamarias (agalaxia contagiosa), Colibacilosis, Paratuberculosis (enfermedad de Johne), Ectima Contagioso, Linfadenitis Caseosa y/o Pederio. Las vacunas específicas incluidas en cada programa dependen de las necesidades sanitarias reales del área y la situación del rebaño. En periodos específicos, se

pueden agregar a estos programas vacunas contra enfermedades emergentes o re-emergentes; por ejemplo, durante los últimos 20 años se han implementado en nuestro país varias campañas de vacunación obligatoria contra lengua azul (de Diego et al., 2014), la última de ellas recientemente (ORDEN APA/1251/2020, de 21 de Diciembre). Es probable que otras enfermedades que afecten a pequeños rumiantes aparezcan en España en los próximos años (Baazizi et al., 2017; Sánchez-Vizcaíno et al., 2013), lo que requerirá nuevas campañas y estrategias de vacunación para poder controlarlas.

Las prácticas de manejo sanitario detalladas anteriormente significan que un solo animal puede recibir entre dos y cuatro vacunas al año, e incluso más, dependiendo de los problemas de salud particulares de un determinado rebaño, o la implementación de campañas de vacunación obligatoria contra infecciones emergentes en momentos específicos. Por tanto, una sola oveja puede recibir entre 14 y 28 vacunas a lo largo de los siete años de su vida útil, o incluso puede ser mayor en un momento dado debido a la aplicación de más vacunas y/u otros productos sanitarios, como los tratamientos antihelmínticos (Lacasta et al., 2015).

8.2 Adyuvantes: mecanismos de acción y tipos

Uno de los constituyentes más importantes de las vacunas es el adyuvante, siendo éste cualquier sustancia que se agrega a la preparación de la vacuna y mejora la inmunogenicidad contra el antígeno (Coffman et al., 2010; Leroux-Roels, 2010). De hecho, ciertas vacunas, como las que se basan en virus inactivados o proteínas, no funcionarían correctamente sin el adyuvante adecuado debido a la baja inmunogenicidad de las proteínas virales. Los primeros pasos en el desarrollo de los adyuvantes de las vacunas fueron dados por el veterinario francés Gaston Ramon (Ramon, 1924) y desde entonces, la investigación sobre los adyuvantes se ha vuelto cada vez más sofisticada. En los últimos años, el estudio y desarrollo de adyuvantes efectivos y seguros se ha convertido en uno de los principales pilares del desarrollo de vacunas humanas y veterinarias (Burakova et al., 2018; Coffman et al., 2010).

Las vacunas vivas y atenuadas generalmente no requieren adyuvantes pero pueden causar problemas de seguridad como resultado de la reactivación del agente infeccioso (Warren-Gash et al., 2017), como ya sucedió en el caso de lengua azul (Hughes et al., 1991). En medicina veterinaria, la mayoría de los adyuvantes utilizados se aplican en estrategias

de inmunización basadas en vacunas inactivadas o en subunidades, poco inmunogénicas pero más seguras (Foged, 2011).

Mecanismos de acción de los adyuvantes

En la mayoría de los casos, los adyuvantes causan cierto grado de daño celular que conduce al reclutamiento de células inflamatorias al punto de inyección con una posterior activación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Calabro et al., 2011). Los adyuvantes pueden presentar diferentes mecanismos de acción y se dividen principalmente en señales de peligro, efecto de depósito transitorio y activación/maduración de células presentadoras de antígeno (APCs). Los adyuvantes que actúan por el mecanismo de **señales de peligro** imitan el efecto de los PAMPs o DAMPs al incluir componentes que activan los PRRs o causan cierto grado de daño celular. El mecanismo del **efecto de depósito transitorio** se basa en la sedimentación de antígeno en el punto de inoculación, liberándose lentamente, lo que garantiza su absorción por las APCs y, en consecuencia, una estimulación continua del sistema inmunitario (Awate et al., 2013). Por último, se encuentran los que actúan mediante la **activación/maduración de APCs** reclutadas en el punto de inoculación. Estas células son especialmente importantes porque participan en las tres señales necesarias para una respuesta inmunitaria completamente desarrollada: presentan el antígeno a los linfocitos T, modifican y determinan el tipo de respuesta final por co-estimulación y producen las citoquinas necesarias para el reclutamiento de otras células inmunitarias. De esta manera, los adyuvantes pueden determinar el tipo de respuesta inducida (Th1, Th2 o Th17). A través de estas señales, las células T se activan, experimentan una expansión clonal y se convierten en células T efectoras (linfocitos T citotóxicos), o producen más citoquinas que inducen la maduración de otras células inmunitarias (linfocitos T auxiliares), que son capaces, a su vez, de estimular la expansión clonal y diferenciación de los linfocitos B que producirán los anticuerpos. Mediante este mecanismo, los adyuvantes aumentan la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos y por células. Esto reduce notablemente el tiempo necesario para que se produzca una respuesta completa, el número de inmunizaciones necesarias y la cantidad de antígeno que debe incluirse en la preparación vacunal (Gerdt, 2015). Dependiendo de sus propiedades físico-químicas e inmunogénicas, un mismo adyuvante puede actuar simultáneamente a través de diferentes mecanismos. Algunos adyuvantes basados en sales minerales pueden

inducir tanto un efecto de depósito transitorio como una señal de peligro (Gupta et al., 1995; Toussi and Massari, 2014).

La continua investigación y conocimiento sobre la respuesta innata y adaptativa está promoviendo el desarrollo de nuevos adyuvantes que contemplan nuevos mecanismos de acción, y probablemente tengan una gran relevancia en el futuro (Soares et al., 2018; Yu et al., 2017).

Tipos de adyuvantes

La lista de adyuvantes aprobados en medicina veterinaria es mucho más amplia que en la humana (Macy, 1997; Spickler and Roth, 2003) ya que, debido a problemas de seguridad, algunos compuestos están prohibidos para su uso en vacunas humanas. También se producen combinaciones de adyuvantes, generándose compuestos con propiedades únicas de inmunopotenciación y de liberación del antígeno (Burakova et al., 2018; Heegaard et al., 2016).

En función de su mecanismo de acción predominante, se puede hablar de dos grupos principales de adyuvantes, los **inmunoestimuladores** (saponinas, agonistas de receptores *Toll-like* [TLR] o citoquinas) y los agentes con **efecto de depósito transitorio** (emulsiones, micropartículas y sales minerales).

Inmunoestimuladores:

Las saponinas presentan actividad inmunoactiva y están formadas por varios residuos de glucósidos hidrófilos unidos a un derivado de triterpeno lipofílico. El adyuvante basado en saponina más conocido es el Quil-A (Quillaja saponaria), solo o en combinación con colesterol y fosfolípidos en complejos inmunoestimulantes (Kensil, 1996). Son capaces de estimular las células T CD4+ y CD8+, y ayudan en la fagocitosis de antígenos mediante las APCs. Se están obteniendo resultados prometedores en ensayos de vacunas con estos adyuvantes (Orbegozo-Medina et al., 2018), e incluso ya se emplean en vacunas autorizadas como en el caso de vacunas contra la gripe equina (Paillot, 2014).

A pesar de que la utilización de agonistas de TLR en vacunas veterinarias aún es limitado, hay varios componentes con actividad TLR que tienen licencia para su uso como, por ejemplo, el *Monophosphoryl lipid A*, componente de los lipopolisacáridos bacterianos (Steinhagen et al., 2011), la lipoproteína bacteriana, la flagelina (Hajam et al., 2013) o la lipoproteína de membrana OprI de *Pseudomonas aeruginosa* (Rau et al., 2006).

Las citoquinas son compuestos inmunoactivos que tienen un papel importante en la señalización celular y la activación de las células T (Dinarelli, 2007). En los últimos años se están incorporando al diseño de vacunas, por ejemplo, IFN- γ , IL-18 e IL-7 se han probado con éxito en varias vacunas veterinarias (Fan et al., 2016; Hung et al., 2010; Huo et al., 2016). En el caso de los VMV la incorporación de IFN γ en una vacuna DNA aplicada en mucosas resultó no tener efecto significativo sobre la protección (González et al., 2005). Sin embargo, en el caso de CAEV la incorporación de IFN γ empleando una estrategia similar pero aplicada en la piel, ofreció mejores resultados. Aunque no son propiamente citoquinas, las moléculas coestimuladoras, encargadas de aportar la segunda señal en la presentación antigénica, se han empleado como adyuvantes inmunológicos para evitar la potencial anergia T inducida por los SRLV (Reina et al., 2007). Curiosamente el grupo inmunizado con moléculas coestimuladoras B7 presentó unos porcentajes de protección del 50% (de Andrés et al., 2009).

Agentes con efecto de depósito transitorio:

Las emulsiones están formadas por la mezcla de dos líquidos inmiscibles (aceite y agua), en la que uno de los compuestos forma pequeñas gotas que se dispersan en el otro. El antígeno queda atrapado en una de las fases, lo que garantiza su lenta liberación tras la administración.

Los polímeros son compuestos utilizados para una liberación controlada de antígeno (Ferreira et al., 2013). Estos compuestos siguen siendo adyuvantes muy prometedores que pueden inducir un tipo de respuesta mediada por células y son muy interesantes para los patógenos virales (Burakova et al., 2018).

Dentro del grupo de las sales minerales se incluyen las sales de aluminio (Al) y el fosfato de calcio. Estos compuestos inducen altos títulos de IgG e IgE, así como la activación de eosinófilos, a través de una respuesta inmunitaria tipo Th2. Esto los hace buenos candidatos para el diseño de vacunas frente a infecciones con patógenos extracelulares (algunas bacterias y parásitos), pero menos efectivas para los intracelulares (virus y algunas bacterias) (Gupta et al., 1995). En 1926 Alexandre T. Glenn y colaboradores descubrieron que inyectar toxoide diftérico precipitado con una sal de aluminio provocaba un aumento significativo en la respuesta inmunitaria en conejos de laboratorio y conejillos de indias (Glenn et al., 1926), y desde entonces, las sales de Al se han utilizado ampliamente en

productos para la inmunización humana y veterinaria, convirtiéndose posiblemente en el adyuvante más utilizado debido a su inigualable eficacia y coste económico (Gotos and Lutyńska, 2015; Lindblad, 2004). Los adyuvantes de Al se han utilizado durante varias décadas sin que se conozca el mecanismo exacto de funcionamiento. En un inicio se postuló que las sales de Al funcionaban mediante el efecto de depósito de larga duración, lo que permitía la presentación continua de antígenos (Marrack et al., 2009). Más de 50 años después, varios investigadores han demostrado que la teoría del efecto de depósito fue una explicación simplista (Hutchison et al., 2012) y, especialmente en los últimos 20 años, la investigación de los adyuvantes de Al ha aumentado dando lugar a un mayor conocimiento sobre su modo de acción (HogenEsch et al., 2018). La citotoxicidad directa de las sales de Al conduce a la liberación de DAMPs, como el ácido úrico, que se convierte rápidamente en cristales de urato monosódico (MSU), que al igual que las sales de Al son fagocitados por células residentes (Eisenbarth et al. 2008). Estos compuestos fagocitados inducen la desestabilización lisosomal y la liberación de catepsina B (Jacobson 2013) que activa el inflammasoma NLRP3, lo que conlleva a la activación de la caspasa-1 y la posterior producción de IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Li et al 2007, Li et al 2008, Sokolovska 2007).

8.3 Efectos adversos de la vacunación

A pesar de que las vacunas veterinarias son productos altamente regulados y controlados, su uso puede dar lugar a la aparición de diversas reacciones adversas consideradas leves y de baja ocurrencia (Moore and HogenEsch, 2010; Moore et al., 2007, 2005b, 2005a; Ohmori et al., 2002; Tung et al., 2015; Valli, 2015).

Los diferentes efectos adversos de la vacunación en medicina veterinaria se pueden clasificar en (Martinod, 1995):

I. Reacciones en el lugar de inoculación:

Posiblemente estos son los efectos notificados con mayor frecuencia y suelen consistir en reacciones inflamatorias locales que muestran áreas de hinchazón, edema, abscesos estériles o granulomas. Generalmente se relacionan con el uso de vacunas que contienen adyuvantes, y en especial, con aquellas cuyo adyuvante está basado en emulsión y sales de aluminio (Aucouturier et al., 2001; Cox and Coulter, 1997; Day, 2007; Macy, 1997; Mutoloki et al., 2006; O'Toole et al., 1995; Sesardic, 2006; Spickler and Roth, 2003; Straw et al., 1990).

En gatos, estas reacciones han sido implicadas en el desarrollo de sarcomas en el lugar de la inyección, y varios estudios han relacionado componentes como el adyuvante de Al o los antígenos del virus de la leucemia felina con el desarrollo de sarcomas. De hecho, las vacunas que contienen adyuvantes se consideran uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de estos tumores en gatos (Hartmann et al., 2015).

II. Reacciones sistémicas:

Estas reacciones leves, transitorias e inespecíficas también se notifican con frecuencia tras la aplicación de una vacuna (Gaskell et al., 2002; Newton et al., 2005; Ramsay et al., 2005; Soos, 1987; Yeruham et al., 1994); de hecho, el aumento transitorio de la temperatura corporal es común y se indica en las etiquetas de las vacunas como efecto adverso esperado. Se han reportado abortos y/o reducción temporal de la fertilidad debido a un aumento de la temperatura corporal en vacas (Nusinovici et al., 2011), mientras que otros efectos pueden incluir vómitos o signos neurológicos inespecíficos (Martinod, 1995). En cualquier caso, la naturaleza leve y transitoria de estos efectos asegura que generalmente se consideren consecuencias aceptables de la vacunación, especialmente considerando los efectos de las enfermedades que pretenden contrarrestar (Nusinovici et al., 2011).

III. Reacciones alérgicas:

En los animales pueden producirse reacciones de hipersensibilidad frente al antígeno u otros componentes de las vacunas, y se pueden diferenciar cuatro tipos. La hipersensibilidad de tipo I, se debe a la introducción de IgE y puede provocar anafilaxia, una reacción alérgica grave que puede poner en riesgo la vida y que se reporta con relativa frecuencia como reacción adversa a las vacunas caninas (Greene and Levy, 2011). La de tipo II se refiere a las reacciones mediadas por anticuerpos y pueden ocurrir cuando las vacunas contienen antígenos frente a células y estructuras propias, ya que el animal puede desarrollar anticuerpos contra estas estructuras y reaccionar contra ellas cuando se distribuyen por todo el cuerpo. Se ha propuesto que este tipo de reacción desempeña un papel en la enfermedad renal crónica felina (Brown et al., 2016). La hipersensibilidad de tipo III se refiere a reacciones de tipo inmunocomplejo y puede ocurrir cuando los anticuerpos circulantes contra el antígeno de la vacuna están presentes en el momento de la vacunación o cuando un animal vacunado se infecta y los anticuerpos inducidos por la vacuna se encuentran con el agente de replicación (antígeno). Un ejemplo bien conocido es la inducción de uveítis anterior y edema corneal en perros vacunados contra adenovirus

caninos (Curtis and Barnett, 1983). La de tipo IV se refiere a las reacciones de tipo retardado que implican la estimulación de linfocitos específicos de antígeno y su replicación en el punto de inyección, producción de citocinas y migración de macrófagos u otros leucocitos al lugar de inyección. Este tipo de hipersensibilidad puede influir en las reacciones granulomatosas observadas en el punto de inyección, tras la administración de determinadas vacunas (Lauren et al., 2016).

IV. **Alteraciones del sistema inmunológico:**

La autoinmunidad y la inmunosupresión son dos alteraciones del sistema inmunológico que se han observado tras el uso de vacunas varias veces en el pasado. La prevalencia de enfermedades autoinmunes en animales de compañía ha aumentado en los últimos 30 años y se ha relacionado con los procedimientos de vacunación (Dodds, 1999; Gershwin, 2018). El ejemplo más reciente y dramático de autoinmunidad inducida por vacunas fue el caso de la pancitopenia neonatal bovina (BNP), en el que una vacuna específica contra la diarrea vírica bovina (BVD) se asoció con un aumento de casos de terneros recién nacidos que mostraban graves trastornos de la coagulación y de la médula ósea, así como hemorragia generalizada y muerte (Boes and Durham, 2017). Se demostraron aloanticuerpos contra MHC I bovino y plaquetas, granulocitos y monocitos inmaduros en la médula ósea (Assad et al., 2012; Deutskens et al., 2011). Sorprendentemente, esta enfermedad fue inducida por aloanticuerpos generados por las madres vacunadas y transmitida a los terneros por el calostro (Bell et al., 2013; Benedictus et al., 2015; Bridger et al., 2011). Este hecho puso de relieve los riesgos del uso de líneas celulares alogénicas para la producción de vacunas, lo que puede conducir al desarrollo de reacciones autoinmunes (Benedictus and Bell, 2017). Por otro lado, se ha informado que algunas vacunas vivas modificadas (*Modified Live Vaccines*, MLV) inducen inmunosupresión al suprimir la respuesta de los linfocitos a los mitógenos (Datz, 2010). En perros, se ha demostrado que un virus de la leucemia en ratones multivalente combinado contra el adenovirus canino y el virus del moquillo canino puede inducir la supresión de la blastogénesis de los linfocitos periféricos (Phillips et al., 1989); así mismo, se ha observado un efecto similar en un MLV contra el parvovirus canino (Mastro et al., 1986). En bovinos se ha demostrado que una cepa de la vacuna BVD suprime la función de los neutrófilos (Roth and Kaeberle, 1983).

Dentro de las alteraciones del sistema inmunológico se encuentra también la sobreinmunización, que puede ser definida como la hiperestimulación del sistema inmunológico

por una carga excesiva de vacuna que puede causar una amplia gama de efectos secundarios (Tsumiyama et al., 2009). Se ha visto que el uso repetitivo e intensivo de vacunas es la causa más común (Dodds, 1999) y, de hecho, la autoinmunidad vinculada a la sobreestimulación del sistema inmunológico por el uso de vacunas veterinarias se ha revisado recientemente en el contexto de la predisposición genética (Gershwin, 2018).

V. Patogenicidad residual e inactivación inadecuada:

La patogenicidad residual de los agentes utilizados en vacunas atenuadas siempre es preocupante, pero es poco común en las vacunas comerciales aprobadas. Se ha visto que se puede producir una infección por herpesvirus bovino-1 (*Bovine Herpesvirus 1*, BHV-1) tras la vacunación del ganado con vacunas ineficazmente atenuadas contra la rinotraqueítis bovina y la influenza (Bryan et al., 1994). También se han observado síntomas respiratorios en aves de corral tras la administración de una vacuna frente a la laringotraqueítis infecciosa (Picault et al., 1982).

VI. Contaminación de las vacunas:

Se ha informado ocasionalmente de la contaminación de componentes destinados a la producción de vacunas veterinarias con agentes biológicamente activos (Bolin et al., 1994; Makoschey et al., 2003). Tras la campaña de vacunación llevada a cabo el 2008 frente al virus de la lengua azul (*Blue Tongue Virus*, BTV), se observó en Francia un aumento de animales seropositivos a SRLV en rebaños que habían sido declarados libres. Valas y colaboradores (Valas et al., 2011) demostraron que la interferencia con las pruebas serológicas eran debidas a la inducción de la respuesta inmunitaria contra proteínas contaminantes no específicas derivadas de células utilizadas en la producción de la vacuna. Los niveles de pureza bajos de antígenos en la producción de vacunas pueden potencialmente resultar en la introducción accidental de agentes indeseables. Otro ejemplo de contaminación de vacunas es el que ha sido reportado recientemente en nuestro país, una vacuna utilizada frente al Ectima Contagioso del ganado ovino estaba contaminada con un pestivirus que ha provocado abortos en el 72,7% de las ovejas vacunadas (Asín et al., 2020).

VII. Recombinación genética:

Los organismos sometidos a modificación genética están comenzando a aplicarse en vacunas veterinarias y humanas, y constituyen un campo de investigación muy activo (Naim,

2013; Nascimento and Leite, 2012). Un ejemplo claro de aplicación reciente son las vacunas diseñadas por la Universidad de Oxford (AstraZeneca) y la compañía Johnson & Johnson (Janssen Inc.) para la lucha contra la pandemia COVID-19 causada por el SARS-CoV-2, basadas en vectores adenovirales de chimpancé que contienen el gen del antígeno de superficie del SARS-CoV-2 (Sadoff et al., 2021; Voysey et al., 2021). Es importante tener en cuenta que algunos de los sistemas biológicos utilizados en la producción de estas vacunas pueden revertir a la virulencia, adquiriendo genes eliminados mediante recombinación con cepas naturales (Henderson et al., 1990; Martinod, 1995).

VIII. Síndrome ASIA:

Algunos de los efectos adversos de las vacunas se han recogido de manera análoga a la medicina humana (Perricone et al., 2013; Shoenfeld and Agmon-Levin, 2011), bajo la denominación de síndrome ASIA ovino (*Autoimmune Syndrome Induced by Adjuvants*) (Luján et al., 2013, 2012). En 2008, tras la campaña de vacunación frente a la lengua azul, los ganaderos, veterinarios e investigadores detectaron la aparición repentina de un proceso neurológico y caquético inexplicable. El proceso incluyó una serie de observaciones clínicas como trastornos de comportamiento, signos neurológicos agudos y crónicos, junto con lesiones neurodegenerativas progresivas y pérdida severa de depósitos de grasa, lo que condujo a la caquexia extrema (Asín et al., 2018). Los resultados de dos informes oficiales no pudieron establecer una explicación, pero sí descartaron todas las principales enfermedades ovinas que podrían explicar el proceso en las ovejas afectadas (Pujols et al., 2009; Sánchez-Vizcaíno, 2009). Posteriormente se publicaron dos estudios de investigación independientes que vinculan los procedimientos de vacunación y las manifestaciones patológicas observadas en las ovejas (González et al., 2010; Luján et al., 2013). Estudios recientes apuntan a que la inoculación repetida de productos que contienen aluminio podría explicar algunos de los signos clínicos observados en el síndrome ASIA ovino (Asín et al., 2019).

El síndrome ASIA ovino se presenta en dos fases o formas, una aguda y otra crónica. La fase aguda está asociada temporalmente con el evento de vacunación, con un rango de dos a seis días entre la vacunación y el desarrollo de los signos clínicos. Por lo general, produce una morbilidad de menos del 1% de los animales y la mortalidad puede ser aún menor. Los animales afectados presentan signos clínicos nerviosos severos como desorientación, apatía, letargo, bruxismo, ceguera transitoria, convulsiones y postración. La mayoría de los

animales aparentemente se recuperan después de dos o tres días, mientras que una pequeña proporción puede llegar a morir. En el examen post mortem, no se observan cambios importantes significativos, pero a nivel histopatológico se puede detectar meningoencefalitis severa, que consiste en infiltrados inflamatorios mixtos en las meninges y vasos sanguíneos del cerebro y la médula espinal. La fase crónica muestra las consecuencias más graves, ya que puede observarse en una gran proporción de animales de un rebaño determinado incluso meses después de la vacunación, en especial bajo ciertas situaciones de estrés. La fase crónica no siempre se produce tras la fase aguda en el mismo animal, lo que significa que las ovejas que no desarrollan una reacción aguda a la vacuna pueden verse afectadas por la fase crónica en una etapa posterior. Esta fase generalmente se desencadena por un estímulo externo, como las bajas temperaturas, el parto en períodos no naturales como el invierno, la mala nutrición o cualquier otra situación estresante. En el examen post mortem, los animales muestran caquexia extrema, con un agotamiento de depósitos de grasa, ascitis, hidrotórax, hidropericardio y atrofia del músculo esquelético.

8.4 Granulomas post-vacunales

El desarrollo de reacciones adversas en el lugar de inoculación se encuentra entre los efectos más comúnmente reportados. En humanos se han observado reacciones persistentes en forma de nódulos pruriginosos tras el suministro de vacunas que contenían sales de aluminio, y han sido identificados como granulomas (Chong et al., 2006; Erdohazi and Newman, 1971; Fawcett and Smith, 1984). Se considera que la prevalencia de dichas reacciones puede estar subestimada (Bergfors et al., 2014).

En biopsias caninas y felinas, la aparición de granulomas en el sitio de inyección asociados a la vacuna con partículas adyuvantes de Al es un fenómeno muy común (Lee Gross et al., 2005). En los gatos, la aparición de estas reacciones inflamatorias crónicas se ha asociado con la aparición de sarcomas en el sitio de inyección (Hendrick and Goldschmidt, 1991; Kass et al., 1993). También se ha informado de tumores similares en perros y hurones (Munday et al., 2003; Vascellari et al., 2003). El aluminio se encontró dentro de los macrófagos en los bordes de los tumores felinos (Hendrick et al., 1992) y, por lo tanto, las vacunas que contenían adyuvantes se consideraron el principal factor implicado en el desarrollo de tales sarcomas, y por ello la afección se denominó "sarcoma asociado a la vacuna felina" (Hartmann et al., 2015). Posteriormente, varios estudios sugirieron que las vacunas sin adyuvantes, otros productos inyectables (Esplin et al., 1999; Gagnon, 2000; Kass

et al., 2003), o incluso materiales inertes como microchips o suturas (Buracco et al., 2002; Carminato et al., 2011) también se asociaban con la aparición de sarcomas en el sitio de inyección, por lo que la condición se renombró como "sarcoma de sitio de inyección felino" (*Feline Infection Site Sarcoma*, FISS). Tras estos descubrimientos, en Suiza se introdujo en 2007 una vacuna sin adyuvante contra el virus de la leucemia felina y los datos han demostrado que, se ha reducido de manera significativa la aparición de FISS (Graf et al., 2018). Recientemente se ha propuesto un efecto directo en la promoción e iniciación tumoral desencadenada por adyuvantes basados en aluminio mediante el uso de fibroblastos felinos o cultivos de células híbridas de ovario de hámster chino, aunque este vínculo debe estudiarse en mayor profundidad (AbdelMageed et al., 2018).

Estos granulomas en el sitio de inyección asociados con el aluminio también han sido reportados en primates no humanos (Chamanza, 2012), cerdos (Valtulini et al., 2005), bovinos (Marcato, 1990) y ovejas (Asín et al., 2019; Spickler and Roth, 2003; Woodward, 2009). En todas estas especies, los granulomas se consideran un efecto secundario casual y anecdótico, sin más implicaciones que un efecto perjudicial en el valor comercial de la carne derivada de las áreas de inyección.

En general, es razonable sugerir que la aparición de un granuloma en el punto de inyección es un evento universal e invariable en la mayoría de las especies animales. Los granulomas pueden considerarse un efecto deseable y necesario para el buen funcionamiento de este tipo de vacunas, pero aún no se han estudiado los efectos clínico-patológicos a largo plazo de su presencia. Además, la gran abundancia de macrófagos en los granulomas podría favorecer la replicación de patógenos macrofagotrópicos.

REFERENCIAS

- AbdelMageed, M.A., Foltopoulou, P., McNiell, E.A., 2018. Feline vaccine-associated sarcomagenesis: Is there an inflammation-independent role for aluminium? *Vet. Comp. Oncol.* 16, E130–E143. <https://doi.org/10.1111/vco.12358>
- Abril, F., Alpuente, P., Ramo, A., Ruz, J., Adeva, R., 2004. Estudio serológico del Visna-Maedi en las razas ovinas: Rasa Aragonesa, Ojinegra, Cartera y Maellana, en la provincia de Teruel y comparación de las pruebas de diagnóstico serológico entre IDGA y ELISA., in: SEOC (Ed.), XXIX Jornadas Científicas VIII Internacionales de La Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Lleida.
- Abril, F., Lozano-Tena, M., Martínez-Orte, E., 1994. Estudio epidemiológico de la enfermedad Visna-Maedi en el ganado ovino. *Mundo Ganad.* 46–50.
- Adams, D.S., Klevjer-Anderson, P., Carlson, J.L., McGuire, T.C., Gorhan, J.R., 1983. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1670–1675.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Al-Qudah, K., Al-Majali, A.M., Ismail, Z.B., 2006. Epidemiological studies on caprine arthritis-encephalitis virus infection in Jordan. *Small Rumin. Res.* 66, 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.09.020>
- Alba, A., Allepuz, A., Serrano, E., Casal, J., 2008. Seroprevalence and spatial distribution of maedi-visna virus and pestiviruses in Catalonia (Spain). *Small Rumin. Res.* 78, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.05.004>
- Ali Al Ahmad, M.Z., Fieni, F., Martignat, L., Chatagnon, G., Baril, G., Bouvier, F., Chebloune, Y., 2005. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology* 64, 1656–1666. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.005>
- Alshanbari, F.A., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Herrmann-Hoesing, L.M., Highland, M.A., Lewis, G.S., White, S.N., 2014. Mutations in *Ovis aries TMEM154* are associated with lower small ruminant lentivirus proviral concentration in one sheep flock. *Anim. Genet.* 45, 565–571. <https://doi.org/10.1111/age.12181>
- Alvarez Miztegui, V., 2006. Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de la raza Latxa del País Vasco. Universidad de León.
- Álvarez, V., 2005. Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de raza latxa del país vasco. Universidad de León.
- Álvarez, V., Daltabuit-Test, M., Arranz, J., Leginagoikoa, I., Juste, R.A., Amorena, B., de Andrés, D., Luján, L.L., Badiola, J.J., Berriatua, E., 2006. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res. Vet. Sci.* 80, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.008>
- Ameztoy, J., Santamaría, C., Muñoz, P., 1998. Seroprevalencia de maedi-visna en explotaciones ovinas del centro y sur de Navarra. *Med. Vet.* 15, 28–31.
- Anderson, B.C., Bulgin, M.S., Adams, S., Duellke, B., 1985. Firm udder in periparturient ewes with lymphocytic accumulations, retrovirus infection, and milk unavailable at the teat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186, 391–393.
- Andrésdóttir, V., Skraban, R., Matthíasdóttir, S., Lutley, R., Agnarsdóttir, G., Thorsteinsdóttir, H., 2002. Selection of antigenic variants in maedi-visna virus infection. *J. Gen. Virol.* 83, 2543–2551. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2543>
- Andrésdóttir, V., Tang, X., Agnarsdóttir, G., Andrésón, Ó.S., Georgsson, G., Skraban, R., Torsteinsdóttir, S., Rafnar, B., Benediksdóttir, E., Matthíasdóttir, S., Árnadóttir, S., Högnadóttir, S., Pálsson, P.A., Pétursson, G., 1998. Biological and genetic differences between lung- and brain-derived isolates of maedi-visna virus. *Virus Genes* 16, 281–293. <https://doi.org/10.1023/A:1008030706308>
- Apetrei, C., Robertson, D.L., Marx, P.A., 2004. The history of SIVs and AIDS: Epidemiology, phylogeny and biology of isolates from naturally SIV infected non-human primates (NHP) in Africa. *Front. Biosci.* 9, 225–254. <https://doi.org/10.2741/1154>
- Ariza, M.E., Glaser, R., Williams, M. V., 2014. Human herpesviruses-1 encoded dUTPases: A family of proteins that modulate dendritic cell function and innate immunity. *Front. Microbiol.* 5, 504. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00504>
- Arnarson, H., Pálsson, A., Gudnadóttir, M., Andrésdóttir, V., 2017. Maedi-visna virus persistence: Antigenic variation and latency. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 55, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.08.003>
- Arsenault, J., Dubreuil, P., Girard, C., Simard, C., Bélanger, D., 2003. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Prev. Vet. Med.* 59, 125–137. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00086-2)
- Artigas, C., Vendrell, J., Mejías, J., 1999. Estudio seroepidemiológico frente a Chlamydiosis, Visna Maedi y Toxoplasmosis en 64 rebaños de la sierra norte de Sevilla, in: SEOC (Ed.), XXIV Jornadas Científicas, III

- Internacionales de La Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia.(SEOC). Soria.
- Asadpour, R., Paktinat, S., Ghassemi, F., Jafari, R., 2014. Study on Correlation of Maedi-Visna Virus (MVV) with Ovine Subclinical Mastitis in Iran. *Indian J. Microbiol.* 54, 218–222. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0440-x>
- Asín, J., Hilbe, M., Miguel, R., Rodríguez-Largo, A., Lanau, A., Akerman, A., Stalder, H., Schweizer, M., Luján, L., 2020. An outbreak of abortions, stillbirths and malformations in a Spanish sheep flock associated with a bovine viral diarrhoea virus 2-contaminated orf vaccine. *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13619. <https://doi.org/10.1111/tbed.13619>
- Asín, J., Molín, J., Pérez, M., Pinczowski, P., Gimeno, M., Navascués, N., Muniesa, A., de Blas, I., Lacasta, D., Fernández, A., de Pablo, L., Mold, M., Exley, C., de Andrés, D., Reina, R., Luján, L., 2019. Granulomas Following Subcutaneous Injection With Aluminum Adjuvant-Containing Products in Sheep. *Vet. Pathol.* 56, 418–428. <https://doi.org/10.1177/0300985818809142>
- Asín, J., Pérez, M., Pinczowski, P., Gimeno, M., Luján, L., 2018. From the bluetongue vaccination campaigns in sheep to overimmunization and ovine ASIA syndrome. *Immunol. Res.* 66, 777–782. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9059-7>
- Assad, A., Amann, B., Friedrich, A., Deeg, C.A., 2012. Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes of all maturation stages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 147, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.04.012>
- Aucouturier, J., Dupuis, L., Ganne, V., 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19, 2666–2672. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00498-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00498-9)
- Awate, S., Babiuk, L.A., Mutwiri, G., 2013. Mechanisms of Action of Adjuvants. *Front Immunol* 4, 114.
- Ayelet, G., Roger, F., Tibbo, M., Tembely, S., 2001. Survey of maedi-visna (MV) in Ethiopian highland sheep. *Vet. J.* 161, 208–210.
- Baazizi, R., Mahapatra, M., Clarke, B.D., Ait-Oudhia, K., Khelef, D., Parida, S., 2017. Peste des petits ruminants (PPR): A neglected tropical disease in Maghreb region of North Africa and its threat to Europe. *PLoS One* 12, e0175461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175461>
- Badiola, J., González, L., 1990. Maedi-Vsina. *OVIS*.
- Badiola, J., Gonzalez, L., Gelabert, J., 1983. Demonstration of Maedi Visna in Spain.
- Barquero, N., Arjona, A., Domenech, A., Toural, C., de las Heras, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Gomez-Lucia, E., 2011. Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Vet. Rec.* 168, 20–20. <https://doi.org/10.1136/vr.c4951>
- Barquero, N., Gomez-Lucia, E., Arjona, A., Toural, C., Las Heras, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Doménech, A., 2013. Investigation of risk factors associated with infections caused by small ruminant lentiviruses. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 57, 473–478. <https://doi.org/10.2478/bvip-2013-0082>
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautquet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (80-). 220, 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
- Barrero Domínguez, B., Luque, I., Maldonado, A., Huerta, B., Sánchez, M., Gomez Laguna, J., Astorga, R., 2017. Seroprevalence and risk factors of exposure to caprine arthritis-encephalitis virus in southern Spain. *Vet. Rec.* 180, 226–226. <https://doi.org/10.1136/vr.104014>
- Barros, S.C., Andrésdóttir, V., Fevereiro, M., 2005. Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch. Virol.* 150, 201–213. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0436-2>
- Barros, S.C., Ramos, F., Duarte, M., Fagulha, T., Cruz, B., Fevereiro, M., 2004. Genomic characterization of a slow/low maedi visna virus. *Virus Genes* 29, 199–210. <https://doi.org/10.1023/B:VIRU.0000036380.01957.37>
- Bell, C.R., Rocchi, M.S., Dagleish, M.P., Melzi, E., Ballingall, K.T., Connelly, M., Kerr, M.G., Scholes, S.F.E., Willoughby, K., 2013. Reproduction of bovine neonatal pancytopenia (BNP) by feeding pooled colostrum reveals variable alloantibody damage to different haematopoietic lineages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.002>
- Benavides, J., Ferreras, M. del C., Pérez Pérez, V., 2018. Maedi Visna: impacto económico y control de la enfermedad, in: *Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (Ed.), XLIII Congreso Nacional y XIX Internacional de La Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*.
- Benavides, J., Fuertes, M., García-Pariente, C., Ferreras, M.C., Marín, J.F.G., Pérez, V., 2006a. Natural Cases of Visna in Sheep with Myelitis as the Sole Lesion in the Central Nervous System. *J. Comp. Pathol.* 134, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.11.003>
- Benavides, J., Fuertes, M., García-Pariente, C., Otaola, J., Delgado, L., Giraldez, J., García Marín, J.F., Carmen Ferreras, M., Pérez, V., 2013. Impact of maedi-visna in intensively managed dairy sheep. *Vet. J.* 197, 607–

612. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2013.03.031>
- Benavides, J., García-Pariente, C., Carmen Ferreras, M., Fuertes, M., Francisco García-Marín, J., Pérez, V., 2007. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Vet. J.* 174, 655–658. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.014>
- Benavides, J., García-Pariente, C., Fuertes, M., Ferreras, M.C., García-Marín, J.F., Juste, R.A., Pérez, V., 2009. Maedi-Visna: the Meningoencephalitis in Naturally Occurring Cases. *J. Comp. Pathol.* 140, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.07.010>
- Benavides, J., Gómez, N., Gelmetti, D., Ferreras, M.C., García-Pariente, C., Fuertes, M., García-Marín, J.F., Pérez, V., 2006b. Diagnosis of the nervous form of maedi-visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y León, Spain. *Vet. Rec.* 158, 230–235. <https://doi.org/10.1136/vr.158.7.230>
- Benedictus, L., Bell, C.R., 2017. The risks of using allogeneic cell lines for vaccine production: the example of Bovine Neonatal Pancytopenia. *Expert Rev. Vaccines* 16, 65–71. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1249859>
- Benedictus, L., Luteijn, R.D., Otten, H., Jan Lebbink, R., Van Kooten, P.J.S., Wiertz, E.J.H.J., Rutten, V.P.M.G., Koets, A.P., 2015. Pathogenicity of Bovine Neonatal Pancytopenia-associated vaccine-induced alloantibodies correlates with Major Histocompatibility Complex class I expression. *Sci. Rep.* 5, 12748. <https://doi.org/10.1038/srep12748>
- Bergfors, Elisabet, Hermansson, Göran, Nyström Kronander, U., Falk, Lars, Valter, Lars, Trollfors, Birger, Bergfors, E., Hermansson, G., Falk, L., Valter, L., Trollfors, B., 2014. How common are long-lasting, intensely itching vaccination granulomas and contact allergy to aluminium induced by currently used pediatric vaccines? A prospective cohort study. *Eur J Pediatr* 173, 1297–1307. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2318-2>
- Berriatua, E., Álvarez, V., Extramiana, B., González, L., Daltabuit, M., Juste, R., 2003. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* 60, 265–279. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00163-6)
- Bertolotti, L., Mazzei, M., Puggioni, G., Carrozza, M.L., dei Giudici, S., Muz, D., Juganaru, M., Patta, C., Tolari, F., Rosati, S., 2011. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the mediterranean basin. *J. Gen. Virol.* 92, 1923–1929. <https://doi.org/10.1099/vir.0.032334-0>
- Biescas, E., 2006. Contribución al estudio serológico, lesional, diagnóstico y preventivo del Maedi Visna ovino. Universidad de Zaragoza.
- Biescas, E., Lujan, L., Cáncer, J., Perez, M., Bolea, R., Bernal, M., Abril, F., Malo, J., Badiola, J., 2004. Campaña de sondeo serológico y control del Maedi-Visna en Aragón: resultados 2002-2003, in: XXIX Jornadas Científicas VIII Internacionales de La Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia.(SEOC). Lleida.
- Bird, P., Reyburn, H.T., Blacklaws, B.A., Allen, D., Nettleton, P., Yirrel, D.L., Watt, N., Sargan, D., McConnell, I., 1995. The restricted IgG1 antibody response to maedi visna virus is seen following infection but not following immunization with recombinant gag protein. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 274–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03777.x>
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Davidson, N.O., Cho, S.J., Malim, M.H., 2004. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr. Biol.* 14, 1392–1396. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.057>
- Blacklaws, B., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N., de Andres, D., Klein, D., Harkiss, G., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 101, 199–208. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.04.006>
- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.003>
- Boes, K.M., Durham, A.C., 2017. Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System, in: *Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult*. Elsevier Inc., pp. 724-804.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00013-8>
- Bolea, R., Monleón, E., Carrasco, L., Vargas, A., de Andrés, D., Amorena, B., Badiola, J.J., Luján, L., 2006. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Vet. Res.* 37, 133–144. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005048>
- Bolin, S.R., Black, J.W., Frey, M.L., Katz, J.B., Ridpath, J.F., Roblin, R.O., 1994. Detection of a cell line contaminated with hog cholera virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205, 742–745.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., Stark, G.R., 2007. Interferons at age 50: Past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd2422>
- Bouzar, A.B., Guiguen, F., Morin, T., Villet, S., Fornazero, C., Garnier, C., Gallay, K., Gounel, F., Favier, C., Durand, J., Balleydier, S., Mornex, J.F., Narayan, O., Chebloune, Y., 2003. Specific G2 arrest of caprine cells infected with a caprine arthritis encephalitis virus expressing vpr and vpx genes from simian immunodeficiency virus. *Virology* 309, 41–52. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00014-X)
- Brahic, M., Haase, A.T., 1981. Lentivirinae: maedi/visna virus group infections. *Comparative diagnosis viral Dis.*

- 4, 619–43.
- Bridger, P.S., Bauerfeind, R., Wenzel, L., Bauer, N., Menge, C., Thiel, H.J., Reinacher, M., Doll, K., 2011. Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.01.001>
- Brinkhof, J., Van Maanen, C., 2007. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1210–1214. <https://doi.org/10.1128/CVI.00282-06>
- Brinkhof, J.M.A., Moll, L., van Maanen, C., Houwers, D.J., 2010. 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.* 88, 41–43. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.05.014>
- Briont, P., Deluyker, H., 1985. Control programme for maedi/visna in Belgium., in: Communities, J.S. and R.H.-J.L.C. of the E. (Ed.), *Slow Viruses in Sheep, Goats and Cattle: In Particular Maedi Visna, Jaagsiekte, and in Caprines, Arthritis, Encephalitis and Pneumonitis: Proceedings of Two Workshops.*
- Brodie, S.J., Pearson, L.D., Snowden, G.D., DeMartini, J.C., 1993. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Arch. Virol.* 130, 413–428. <https://doi.org/10.1007/BF01309670>
- Broughton-Neiswanger, L.E., White, S.N., Knowles, D.P., Mousel, M.R., Lewis, G.S., Herndon, D.R., Herrmann-Hoesing, L.M., 2010. Non-maternal transmission is the major mode of ovine lentivirus transmission in a ewe flock: A molecular epidemiology study. *Infect. Genet. Evol.* 10, 998–1007. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.06.007>
- Brown, C.A., Elliott, J., Schmiedt, C.W., Brown, S.A., 2016. Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogenesis. *Vet. Pathol.* 53, 309–326. <https://doi.org/10.1177/0300985815622975>
- Bruett, L., Barber, S.A., Clements, J.E., 2000. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology* 271, 132–141. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0309>
- Bryan, L.A., Fenton, R.A., Misra, V., Haines, D.M., 1994. Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. *Can. Vet. J.* 35, 223–228.
- Bulgin, M.S., 1990. Ovine progressive pneumonia, caprine arthritis-encephalitis, and related lentiviral diseases of sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30841-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30841-0)
- Buracco, P., Martano, M., Morello, E., Ratto, A., 2002. Vaccine-associated-like Fibrosarcoma at the Site of a Deep Nonabsorbable Suture in a Cat. *Vet. J.* 163, 105–107. <https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0617>
- Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J.R., Shi, J., 2018. Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunol.* <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>
- Cadoré, J.L., Greenland, T., Cordier, G., Guiguen, F., Mornex, J.F., 1996. Histogenesis of the pulmonary lesions in the course of visna maedi virus-induced pneumonia, *Veterinary Research.*
- Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B.C., Pacitto, A., Cortese, M., O'Hagan, D.T., De Gregorio, E., Seubert, A., Wack, A., 2011. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29, 1812–1823. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.090>
- Carminato, A., Vascellari, M., Marchioro, W., Melchiotti, E., Mutinelli, F., 2011. Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Vet. Dermatol.* 22, 565–569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.00975.x>
- Carre, H., Vallee, H., 1906. Recherches cliniques et experimentales sur oanemie pernicieuse du cheval. *Rev.Gen.Med.Vet* 8, 593.
- Carre, H., Vallee, H., 1904. Sur la natur infectieuse de l'anemie du cheval. *CR Acad.Sci.*, 139, 331–333.
- Carrozza, M.L., Mazzei, M., Bandecchi, P., Arispici, M., Tolari, F., 2003. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *J. Virol. Methods* 107, 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00208-2)
- Cassetta, L., Kajaste-Rudnitski, A., Coradin, T., Saba, E., Della Chiara, G., Barbagallo, M., Graziano, F., Alfano, M., Cassol, E., Vicenzi, E., Poli, G., 2013. M1 polarization of human monocyte-derived macrophages restricts pre and postintegration steps of HIV-1 replication. *AIDS* 27, 1847–1856. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328361d059>
- Cecchi, F., Dadousis, C., Bozzi, R., Fratini, F., Russo, C., Bandecchi, P., Cantile, C., Mazzei, M., 2019. Genome scan for the possibility of identifying candidate resistance genes for goat lentiviral infections in the Italian Garfagnina goat breed. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 729–733. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1728-y>
- Celer, V., Celer, V., Němcová, H., Zanoni, R.G., Peterhans, E., 1998. Serologic Diagnosis of Ovine Lentiviruses by Whole Virus ELISA and AGID Test. *J. Vet. Med. Ser. B* 45, 183–188. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1998.tb00781.x>

- Chamanza, R., 2012. Non-human primates: cynomolgus (*Macaca fascicularis*) and rhesus (*Macaca mulatta*) macaques and the common marmoset (*Callithrix jacchus*). In: Background Lesions in Laboratory Animals: A Color Atlas., 1st Edit. ed.
- Chambers, M.A., Aldwell, F., Williams, G.A., Palmer, S., Gowtage, S., Ashford, R., Dalley, D.J., Davé, D., Weyer, U., Salguero, F.J., Nunez, A., Nadian, A.K., Crawshaw, T., Corner, L.A.L., Lesellier, S., 2017. The Effect of Oral Vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG on the Development of Tuberculosis in Captive European Badgers (*Meles meles*). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00006>
- Chassalevris, T., Chaintoutis, S.C., Apostolidi, E.D., Giadinis, N.D., Vlemmas, I., Brellou, G.D., Dovas, C.I., 2020. A highly sensitive semi-nested real-time PCR utilizing oligospermine-conjugated degenerate primers for the detection of diverse strains of small ruminant lentiviruses. *Mol. Cell. Probes* 51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101528>
- Chebloune, Y., Sheffer, D., Karr, B.M., Stephens, E., Narayan, O., 1996. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 222, 21–30. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0394>
- Cheevers, W.P., Beyer, J.C., Hötzel, I., 2001. Plasmid DNA encoding caprine interferon gamma inhibits antibody response to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) surface protein encoded by a co-administered plasmid expressing CAEV env and tat genes. *Vaccine* 19, 3209–3215. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00006-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00006-8)
- Cheevers, W.P., Hötzel, I., Beyer, J.C., Kumpula-Mcwhirter, N., 2000. Immune response to caprine arthritis-encephalitis virus surface protein induced by coimmunization with recombinant vaccinia viruses expressing the caprine arthritis-encephalitis virus envelope gene and caprine interleukin-12. *Vaccine* 18, 2494–2503. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00043-8)
- Chong, H., Brady, K., Metze, D., Calonje, E., 2006. Persistent nodules at injection sites (aluminium granuloma)-clinicopathological study of 14 cases with a diverse range of histological reaction patterns. *Histopathology* 48, 182–188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02312.x>
- Christodoulouopoulos, G., 2006. Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries, in: *Small Ruminant Research*. Elsevier, pp. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.046>
- Clawson, M.L., Redden, R., Schuller, G., Heaton, M.P., Workman, A., Chitko-McKown, C.G., Smith, T.P., Leymaster, K.A., 2015. Genetic subgroup of small ruminant lentiviruses that infects sheep homozygous for TMEM154 frameshift deletion mutation A4Δ53. *Vet. Res.* 46, 22. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0162-7>
- Coffin M., J., 1996. Retroviariade: the viruses and their replication. *Fields Virol.* 1767–1874.
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
- Colitti, B., Coradduzza, E., Puggioni, G., Capucchio, M.T., Reina, R., Bertolotti, L., Rosati, S., 2019. A new approach for small ruminant lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212585>
- Cook, S.J., Cook, R.F., Montelaro, R.C., Isel, C.J., 2001. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet. Microbiol.* 79, 93–109. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00348-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00348-5)
- Cork, L.C., Hadlow, W.J., Crawford, T.B., Gorham, J.R., Piper, R.C., 1974. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect. Dis.* 129, 134–141. <https://doi.org/10.1093/infdis/129.2.134>
- Cortez-Romero, C., Fieni, F., Russo, P., Pepin, M., Roux, C., Pellerin, J., 2011. Presence of Maedi Visna Virus (MVV)-Proviral DNA in the Genital Tissues of Naturally Infected Ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 46, e1–e6. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01608.x>
- Cottureau, P., Laval, A., Jeanpert, A., 1977. Maedi identification in the East of France (Sheep chronic progressive pneumonia, Texel race, Zwoegerziekte). *Bull. l'Academie Vet. Fr.*
- Cox, J.C., Coulter, A.R., 1997. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248–256.
- Crane, S.E., Buzy, J., Clements, J.E., 1991. Identification of cell membrane proteins that bind visna virus. *J. Virol.* 65.
- Crawford, T.B., Adams, D.S., 1981. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178, 713–719.
- Crawford, T.B., Adams, D.S., Cheevers, W.P., Cork, L.C., 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* (80-.). 207, 997–999. <https://doi.org/10.1126/science.6153243>
- Crespo, H., Bertolotti, L., Juganaru, M., Glaria, I., De Andrés, D., Amorena, B., Rosati, S., Reina, R., 2013. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet. Res.* 44, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-83>
- Crespo, H., Bertolotti, L., Proffitti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Acutis, P.L., de Andrés, D., Reina, R., Rosati, S., 2016. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Vet. Microbiol.*

- 192, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.008>
- Crespo, H., Jáuregui, P., Glaría, I., Sanjosé, L., Polledo, L., García-Marín, J.F., Luján, L., De Andrés, D., Amorena, B., Reina, R., 2012. Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Vet. Res.* 43, 43. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-43>
- Crespo, H., Reina, R., Glaría, I., Ramírez, H., De Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomares, L., Amorena, B., De Andrés, D.F., 2011. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet. Res.* 42, 28. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-28>
- Cuello Vitales, S., 2018. Estudio de las principales patologías asociadas al desecho del ganado ovino de Aragón. Universidad de Zaragoza.
- Curtis, R., Barnett, K., 1983. The “blue eye” phenomenon. *Vet. Rec.* 112, 347–353. <https://doi.org/10.1136/vr.112.15.347>
- Cutlip, R.C., Jackson, T.A., Laird, G.A., 1977. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1081–1084.
- Cutlip, R.C., Jackson, T.A., Lehmkuhl, H.D., 1979. Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. *Am. J. Vet. Res.* 40, 1370–1374.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., 1986. Eradication of ovine progressive pneumonia from sheep flocks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188, 1026–1027.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Brogden, K.A., Schmerr, M.J.F., 1987. Failure of experimental vaccines to protect against infection with ovine progressive pneumonia (maedi-visna) virus. *Vet. Microbiol.* 13, 201–204. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(87\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0378-1135(87)90082-4)
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Sacks, J.M., Weaver, A.L., 1992. Seroprevalence of ovine progressive pneumonia virus in sheep in the United States as assessed by analyses of voluntarily submitted samples. *Am. J. Vet. Res.* 53, 976–979.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Schmerr, M.J.F., Brogden, K.A., 1988. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet. Microbiol.* 17, 237–250. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90068-5)
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Whipp, S.C., McClurkin, A.W., 1982. Effects on ovine fetuses of exposure to ovine progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.* 43, 82–85.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Wood, R.L., Brogden, K.A., 1985. Arthritis associated with ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 46, 65–68.
- Datz, C.A., 2010. Noninfectious Causes of Immunosuppression in Dogs and Cats. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.004>
- Dawson, M., 1987. Pathogenesis of maedi-visna. *Vet. Rec.* <https://doi.org/10.1136/vr.120.19.451>
- Dawson, M., 1980. Maedi/visna: a review. *Vet Rec* 106, 212–216.
- Day, M.J., 2007. Vaccine Safety in the Neonatal Period. *J. Comp. Pathol.* 137, S51–S56. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.04.019>
- Day, M.J., Karkare, U., Schultz, R.D., Squires, R., Tsujimoto, H., 2015. Recommendations on vaccination for Asian small animal practitioners: a report of the WSAVA Vaccination Guidelines Group. *J. Small Anim. Pract.* 56, 77–95. <https://doi.org/10.1111/jsap.12272>
- de Andrés, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 107, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.012>
- de Andrés, X., Ramírez, H., Bertolotti, L., San Román, B., Glaría, I., Crespo, H., Jáuregui, P., Minguijón, E., Juste, R., Leginagoikoa, I., Pérez, M., Luján, L., Badiola, J.J., Polledo, L., García-Marín, J.F., Riezu, J.I., Borrás-Cuesta, F., de Andrés, D., Rosati, S., Reina, R., Amorena, B., 2013. An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.017>
- de Andrés, X., Reina, R., Ciriza, J., Crespo, H., Glaría, I., Ramírez, H., Grilló, M.J., Pérez, M.M., Andrésdóttir, V., Rosati, S., Suzan-Monti, M., Luján, L., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., de Andrés, D., Amorena, B., 2009. Use of B7 costimulatory molecules as adjuvants in a prime-boost vaccination against Visna/Maedi ovine lentivirus. *Vaccine* 27, 4591–4600. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.080>
- De Boer, G.F., 1970. Antibody Formation in Zwoegerziekte, a Slow Infection in Sheep. *J. Immunol.* 104.
- de Boer, G.F., Houwers, D.J., 1979. Epizootiology of Maedi/Visna in Sheep, in: *Aspects of Slow and Persistent Virus Infections*. Springer Netherlands, pp. 198–221. https://doi.org/10.1007/978-94-009-9339-6_12
- De Boer, G.F., Terpstra, C., Houwers, D.J., 1978. Studies of Zwoegerziekte (maedi) in the Netherlands, a review. *Bull. Off. Epizoot.*
- de Diego, A.C.P., Sánchez-Cordón, P.J., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2014. Bluetongue in Spain: From the First Outbreak to 2012. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.12068>
- De Kock, G., 1929. Are lesions of jaagsiekte in sheep of the nature of neoplasm? *Fifteenth Annu. Rep. Dir. Vet. Serv. Union South Africa* 611–641.
- de la Concha-Bermejillo, A., 1997. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13, 13–34. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30362-5](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30362-5)

- de la Cruz, M., Serrano, E., Montoro, V., Marco, J., Romeo, M., Baselga, R., Albizu, I., Amorena, B., 1994. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid-late lactation. *Small Rumin. Res.* 14, 175–180. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(94\)90108-2](https://doi.org/10.1016/0921-4488(94)90108-2)
- de Miguel, R., Arrieta, M., Rodríguez-Largo, A., Echeverría, I., Resendiz, R., Pérez, E., Ruiz, H., Pérez, M., de Andrés, D., Reina, R., de Blas, I., Luján, L., 2021. Worldwide Prevalence of Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Animals* 11, 784. <https://doi.org/10.3390/ani11030784>
- de Pablo-Maiso, L., Glaria, I., Crespo, H., Nistal-Villán, E., Andrésdóttir, V., de Andrés, D., Amorena, B., Reina, R., 2017a. Characterization of Ovine A3Z1 Restriction Properties against Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs). *Viruses* 9, 345. <https://doi.org/10.3390/v9110345>
- de Pablo-Maiso, L., Gómez-Arrebola, C., Bertolotti, L., Rosati, S., Farriols, R., de Andrés Cara, D., Reina, R., 2017b. Epidemiología molecular y distribución geográfica de SRLV en el Mediterráneo, in: ITEA-XVII Jornadas Sobre Producción Animal. Zaragoza, pp. 764–766.
- Desrosiers, R.C., Lifson, J.D., Gibbs, J.S., Czajak, S.C., Howe, A.Y.M., Arthur, L.O., Johnson, R.P., 1998. Identification of Highly Attenuated Mutants of Simian Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* 72, 1431–1437. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.2.1431-1437.1998>
- Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C.M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., Thiel, H.J., Rumenapf, T., 2011. Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Vet. Res.* 42, 97. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-97>
- Dinarello, C.A., 2007. Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.* 37, S34–S45. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>
- Dodds, W.J., 1999. More bumps on the vaccine road. *Adv. Vet. Med.* 41, 715.
- Dohoo, I.R., Heaney, D.P., Stevenson, R.G., Samagh, B.S., Rhodes, C.S., 1987. The effects of maedi-visna virus infection on productivity in ewes. *Prev. Vet. Med.* 4, 471–484. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(87\)90032-8](https://doi.org/10.1016/0167-5877(87)90032-8)
- Dolfini, T., Conrad, L.F., Flores, I.V.C., Ravazzolo, A.P., 2015. Comparison of primer pairs: Greater degeneracy improves small ruminant lentivirus (SRLVs) detection by seminested PCR. *Small Rumin. Res.* 123, 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.10.007>
- Doria-Rose, N.A., Joyce, M.G., 2015. Strategies to guide the antibody affinity maturation process. *Curr. Opin. Virol.* <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.04.002>
- Dukes, T.W., Greig, A.S., Corner, A.H., 1979. Maedi-visna in Canadian sheep. *Can. J. Comp. Med.* 43, 313–320.
- Dungu, B., Vorster, J., Bath, G.F., Verwoerd, D.W., 2000. The effect of a natural maedi-visna virus infection on the productivity of South African sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 67, 87–96.
- Eckstrand, C.D., Sparger, E.E., Murphy, B.G., 2017. Central and peripheral reservoirs of feline immunodeficiency virus in cats: A review. *J. Gen. Virol.* <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000866>
- Eltanany, M.A., 2019. Analysing association of TMEM154, CCR5 and ZNF389 variants with Maedi-Visna resistance in German sheeps. *Egypt. J. Genet. Cytol.* 48, 271–294.
- Erdohazi, M., Newman, R.L., 1971. Aluminium Hydroxide Granuloma. *Br. Med. J.* 3, 621–623. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5775.621>
- Espí, A., Prieto, J.M., Álvarez, M., 2001. Situación sanitaria del ovino en Asturias: seroprevalencia de la Enfermedad de la Frontera, Maedi-Visna, Aborto Enzoótico, Agalaxia Contagiosa, Fiebre Q y Leptospirosis., in: XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de La Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Sevilla, pp. 708–713.
- Esplin, D., Bigelow, M., McGill, L., Wilson, S., 1999. Fibrosarcoma at the site of a Lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc Newsl.* 23, 8–9.
- Extramiana, A.B., González, L., Cortabarría, N., García, M., Juste, R.A., 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rumin. Res.* 44, 109–118. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00044-5)
- Fan, Y.H., Lin, Y.L., Hwang, Y.C., Yang, H.C., Chiu, H.C., Chiou, S.H., Jong, M.H., Chow, K.C., Lin, C.C., 2016. T-cell factor-4 and MHC upregulation in pigs receiving a live attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine strain with interferon-gamma adjuvant. *Vet. J.* 216, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.07.009>
- Fawcett, H.A., Smith, N.P., 1984. Injection-Site Granuloma due to Aluminum. *Arch. Dermatol.* 120, 1318–1322. <https://doi.org/10.1001/archderm.1984.01650460058020>
- Ferreira, S.A., Gama, F.M., Vilanova, M., 2013. Polymeric nanogels as vaccine delivery systems. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.06.001>
- Ferrer, L.M., 1996. Control del maedi/visna en explotaciones ovinas extensivas con elevada prevalencia. Universidad de Zaragoza.
- Fevereiro, M., Barros, S., Fagulha, T., 1999. Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *J. Virol. Methods* 81, 101–108. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00061-0)
- Foged, C., 2011. Subunit vaccines of the future: The need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. *Ther. Deliv.* <https://doi.org/10.4155/tde.11.68>

- Freuling, C.M., Hampson, K., Selhorst, T., Schröder, R., Meslin, F.X., Mettenleiter, T.C., Müller, T., 2013. The elimination of fox rabies from Europe: Determinants of success and lessons for the future. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0142>
- Fu, Y., Lu, D., Su, Y., Chi, H., Wang, J., Huang, J., 2020. The Vif protein of caprine arthritis encephalitis virus inhibits interferon production. *Arch. Virol.* 165, 1557–1567. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04637-z>
- Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A., Sodroski, J., 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* 66.
- Gagnon, A., 2000. Drug injection-associated fibrosarcoma in a cat. *Feline Pr.* 28, 18–21.
- García, I., Vega, G., Asensio, A., Agundo, R., de la Fuente, R., 1994. A serological survey of MVV in Comunidad de Madrid., in: 3^o European Society for Veterinary Virology (ESVV) Congress. Interlaken (Suiza).
- Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Boadella, M., Lyashchenko, K.P., Romero, B., Geijo, M.V., Ruiz-Fons, F., Aranaz, A., Juste, R.A., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2011. Protection against Tuberculosis in Eurasian Wild Boar Vaccinated with Heat-Inactivated Mycobacterium bovis. *PLoS One* 6, e24905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024905>
- Gaskell, R.M., Gettinby, G., Graham, S.J., Skilton, D., 2002. Veterinary Products Committee working group report on feline and canine vaccination. *Vet. Rec.* 150, 126–134.
- Gates, N., Everson, D., Hulet, C., 1977. Effects of thin ewe syndrome on reproductive efficiency. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171, 1266–1267.
- Gates, N.L., Winward, L.D., Gorham, J.R., Shen, D.T., 1978. Serologic survey of prevalence of ovine progressive pneumonia in Idaho range sheep. Prevalence and effect of subclinical ovine progressive pneumonia virus infection on ewe wool and lamb production. *J Am Vet Med Assoc* 173, 475–484.
- Gendelman, H.E., Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Kennedy, P.G., Ghotbi, Z., Clements, J.E., Stanley, J., Pezeshkpour, G., 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.* 58.
- Gendelman, H.E., Narayan, O., Molineaux, S., Clements, J.E., Ghotbi, Z., 1985. Slow, persistent replication of lentiviruses: Role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7086–7090. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.7086>
- Gerdtts, V., 2015. Adjuvantien für veterinäripfstoffe – Typen und wirkweise. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 128, 456–463. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-128-456>
- Gershwin, L.J., 2018. Adverse Reactions to Vaccination: From Anaphylaxis to Autoimmunity. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.005>
- Giammarioli, M., Bazzucchi, M., Puggioni, G., Brajon, G., Dei Giudici, S., Taccori, F., Feliziani, F., De Mia, G.M., 2011. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes* 43, 380–384. <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0653-1>
- Giangaspero, M., Gruner, L., Nishikawa, H., Tabbaa, D., Vacirca, G., 1993. Lungworms, Maedi Visna and mixed infections with respiratory viruses in Syrian Awassi sheep. *Vet. Res. Commun.* 17, 371–374. <https://doi.org/10.1007/BF01839387>
- Gjerset, B., Storset, A.K., Rimstad, E., 2006. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: Characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81201-0>
- Glaría, I., 2015. Base genética del tropismo de lentivirus de pequeños rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3.
- Glaría, I., Reina, R., Crespo, H., de Andrés, X., Ramírez, H., Biescas, E., Pérez, M.M., Badiola, J., Luján, L., Amorena, B., de Andrés, D., 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet. Microbiol.* 138, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.002>
- Glaría, I., Reina, R., García, I., Mora, M.I., Luján, L., Badiola, J., ASLANA., Instituto Lactológico de Lekunberri., ANGRA., ITG Ganadero., de Andrés, D., Amorena, B., 2003. Diagnóstico de la infección por el virus Maedi Visna, mediante ELISA en suero y leche individual y de tanque, en ovinos Latxa Navarra y comparación de seroprevalencia con Raza Navarra, in: ITEA-X Jornadas Sobre Producción Animal. pp. 408–410.
- Glaría, I., Reina, R., Ramírez, H., de Andrés, X., Crespo, H., Jauregui, P., Salazar, E., Luján, L., Pérez, M.M., Benavides, J., Pérez, V., Polledo, L., García-Marín, J.F., Riezu, J.I., Borrás, F., Amorena, B., de Andrés, D., 2012. Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Vet. Microbiol.* 155, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.027>
- Glenny, A.T., Pope, C.G., Waddington, H., Wallace, U., 1926. Immunological notes. XVII-XXIV. *J. Pathol. Bacteriol.* 29, 31–40. <https://doi.org/10.1002/path.1700290106>
- Gogolewski, R.P., Adams, D.S., McGuire, T.C., Banks, K.L., Cheevers, W.P., 1985. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 66, 1233–1240. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-6-1233>
- Gołos, A., Lutyńska, A., 2015. Aluminium-adjuvanted vaccines—a review of the current state of knowledge. *Przegl*

- Epidemiol, 69, 731–734.
- Gomez-Lucia, E., Rowe, J., Collar, C., Murphy, B., 2013. Diversity of caprine arthritis-encephalitis virus promoters isolated from goat milk and passaged in vitro. *Vet. J.* 196, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.10.023>
- Gomez-Lucia, E., Sanjosé, L., Crespo, O., Reina, R., Glaria, I., Ballesteros, N., Amorena, B., Doménech, A., 2014. Modulation of the long terminal repeat promoter activity of small ruminant lentiviruses by steroids. *Vet. J.* 202, 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.08.003>
- González, B., Reina, R., García, I., Andrés, S., Glaria, I., Alzueta, M., Mora, M.I., Jugo, B.M., Arrieta-Aguirre, I., de la Lastra, J.M.P., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Esteban, M., Grilló, M.J., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., Chebloune, Y., Luján, L., de Andrés, D., Amorena, B., 2005. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine* 23, 4342–4352. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.03.032>
- González, J.M., Figueras, L., Ortega, M.E., Lozano, M., de Arcaute, M.R., Royo, R., Cebrián, L.M., Ferrer, L.M., Farinas, F., de Jalon, J.A., De las Heras, M., 2010. Possible adverse reactions in sheep after vaccination with inactivated BTV vaccines. *Vet Rec* 166, 757–758.
- González, L., 1989. El Maedi o Neumonía Progresiva en el conjunto de las enfermedades respiratorias crónicas del ganado ovino en la comunidad autónoma vasca. Universidad de Zaragoza.
- Gonzalez, L., Gelabert, J.L., Badiola, J.J., 1984. Progressive pneumonia (MAEDI) in sheep of the Basque Country [Spain]. *Med. Vet.*
- Graf, R., Guscetti, F., Welle, M., Meier, D., Pospischil, A., 2018. Feline Injection Site Sarcomas: Data from Switzerland 2009–2014. *J. Comp. Pathol.* 163, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.06.008>
- Greene, C.E., Levy, J.K., 2011. Immuno profilaxis. In: *Infectious Diseases of Dogs and Cats.*, 4th Edit. ed.
- Greenwood, B., 2014. The contribution of vaccination to global health: Past, present and future. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0433>
- Greenwood, P.L., 1995. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.* 22, 71–87. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(94\)00399-4](https://doi.org/10.1016/0167-5877(94)00399-4)
- Grego, E., Bertolotti, L., Quasso, A., Profiti, M., Lacerenza, D., Muz, D., Rosati, S., 2007. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J. Gen. Virol.* 88, 3423–7. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83292-0>
- Grego, E., Lacerenza, D., Arias, R., Profiti, M., Rosati, S., 2009. Serological characterization of the new genotype E of small ruminant lentivirus in Roccaverano goat flocks. *Vet. Res. Commun.* 33, 137–140.
- Grego, E., Profiti, M., Giammarioli, M., Giannino, L., Rutili, D., Woodall, C., Rosati, S., 2002. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 828–32. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.4.828-832.2002>
- Griffin, D.E., Narayan, O., Adams, R.J., 1978. Early immune responses in visna, a slow viral disease of sheep. *J. Infect. Dis.* 138, 340–350.
- Grossi, P., Giudice, C., Bertolotti, I., Cioccarelli, G., Brocchi, E., Cammarata, G., Gelmetti, D., 2005. Immunohistochemical detection of the p27 capsid protein of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in bone-marrow cells of seropositive goats. *J. Comp. Pathol.* 133, 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.01.009>
- Gudnadóttir, M., 1974. Visna-maedi in sheep. *Prog. Med. Virol.* 18, 336–349.
- Gudnadóttir, M., Kristinsdóttir, K., 1967. Complement-Fixing Antibodies in Sera of Sheep Affected with Visna and Maedi. *J. Immunol.* 98.
- Gudnadóttir, M., Pálsson, P.A., 1965. Host-Virus Interaction in Visna Infected Sheep. *J. Immunol.* 95.
- Guiguen, F., Mselli-Lakhal, L., Durand, J., Du, J., Favier, C., Fornazero, C., Grezel, D., Balleddier, S., Hausmann, E., Chebloune, Y., 2000. Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 61, 456–461. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.456>
- Gupta, R.K., Rost, B.E., Relyveld, E., Siber, G.R., 1995. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. *Pharm. Biotechnol.* 6, 229–248. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1823-5_8
- Guven, M.N., 1985. Maedi-visna eradication programme in Ireland., in: Communities, M.S. and R.H.-J.L.C. of the E. (Ed.), *Slow Viruses in Sheep, Goats and Cattle: In Particular Maedi Visna, Jaagsiekte, and in Caprines, Arthritis, Encephalitis and Pneumonitis: Proceedings of Two Workshops.*
- Haase, A.T., 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 322, 130–136. <https://doi.org/10.1038/322130a0>
- Haase, A.T., Stowring, L., Narayan, O., Griffin, D., Price, D., 1977. Slow persistent infection caused by visna virus: Role of host restriction. *Science* (80-.). 195, 175–177. <https://doi.org/10.1126/science.188133>
- Haflidadóttir, B.S., Matthíasdóttir, S., Agnarsdóttir, G., Torsteinsdóttir, S., Pétursson, G., Andrésón, Ó.S., Andrésdóttir, V., 2008. Mutational analysis of a principal neutralization domain of visna/maedi virus envelope glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 89, 716–721. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83410-0>
- Hajam, I.A., Dar, P.A., ChandraSekar, S., Nanda, R.K., Kishore, S., Bhanuprakash, V., Ganesh, K., 2013. Co-

- administration of flagellin augments immune responses to inactivated foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen. *Res. Vet. Sci.* 95, 936–941. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.07.021>
- Harmache, A., Bouyac, M., Audoly, G., Hieblot, C., Peveri, P., Vigne, R., Suzan, M., 1995. The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J. Virol.* 69.
- Hartmann, K., Day, M.J., Thiry, E., Lloret, A., Frymus, T., Addie, D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M.C., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Truyen, U., Möstl, K., 2015. Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 17, 606–613. <https://doi.org/10.1177/1098612X15588451>
- Hasegawa, M.Y., Custódio de Souza Hunold Lara, M. do C., Monteforte Cassaro Villa Lobos, E., Carrillo Gaeta, N., Hayashi, M., Shirayama, L., Soares de Castro, R., Gregory, L., 2017. An experimental study on the vertical transmission of caprine arthritis-encephalitis virus from naturally infected females to their offspring. *Small Rumin. Res.* 149, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.01.010>
- Heaton, M.P., Clawson, M.L., Chitko-Mckown, C.G., Leymaster, K.A., Smith, T.P.L., Harhay, G.P., White, S.N., Herrmann-Hoesing, L.M., Mousel, M.R., Lewis, G.S., Kalbfleisch, T.S., Keen, J.E., Laegreid, W.W., 2012. Reduced Lentivirus Susceptibility in Sheep with TMEM154 Mutations. *PLoS Genet.* 8, e1002467. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002467>
- Heaton, M.P., Kalbfleisch, T.S., Petrik, D.T., Simpson, B., Kijas, J.W., Clawson, M.L., Chitko-McKown, C.G., Harhay, G.P., Leymaster, K.A., 2013. Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. *PLoS One* 8, e55490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055490>
- Heckert, R.A., McNab, W.B., Richardson, S.M., Briscoe, M.R., 1992. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Can. J. Vet. Res.* 56, 237–241.
- Heegaard, P.M.H., Fang, Y., Jungersen, G., 2016. Novel adjuvants and immunomodulators for veterinary vaccines, in: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 63–82. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3008-1_5
- Henderson, L.M., Katz, J.B., Erickson, G.A., Mayfield, J.E., 1990. In vivo and in vitro genetic recombination between conventional and gene-deleted vaccine strains of pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1656–1662.
- Hendrick, M.J., Goldschmidt, M.H., 1991. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*
- Hendrick, M.J., Goldschmidt, M.H., Shofer, F.S., Wang, Y.-Y., Somlyo, A.P., 1992. Postvaccinal Sarcomas in the Cat: Epidemiology and Electron Probe Microanalytical Identification of Aluminum. *Cancer Res.* 52.
- Herrmann-Hoesing, L.M., 2010. Diagnostic Assays Used to Control Small Ruminant Lentiviruses. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 843–855. <https://doi.org/10.1177/104063871002200602>
- Herrmann-Hoesing, L.M., Noh, S.M., White, S.N., Snekvik, K.R., Truscott, T., Knowles, D.P., 2009. Peripheral ovine progressive pneumonia provirus levels correlate with and predict histological tissue lesion severity in Naturally Infected Sheep. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 551–557. <https://doi.org/10.1128/CVI.00459-08>
- Herrmann-Hoesing, L.M., White, S.N., Lewis, G.S., Mousel, M.R., Knowles, D.P., 2007. Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1274–1278. <https://doi.org/10.1128/CVI.00095-07>
- Herrmann-Hoesing, L.M., White, S.N., Mousel, M.R., Lewis, G.S., Knowles, D.P., 2008. Ovine progressive pneumonia provirus levels associate with breed and Ovar-DRB1. *Immunogenetics* 60, 749–758. <https://doi.org/10.1007/s00251-008-0328-9>
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., Johnson, P.R., 1989. An African primate lentivirus (SIVsmclosely related to HIV-2. *Nature* 339, 389–392. <https://doi.org/10.1038/339389a0>
- Hoff-Jorgensen, R., 1985. Control programme for lenti-virus infections in Danish sheep and goats, in: *Communities, J.S. and R.H.-J.L.C. of the E. (Ed.), Slow Viruses in Sheep, Goats and Cattle: In Particular Maedi Visna, Jaagsiekte, and in Caprines, Arthritis, Encephalitis and Pneumonitis: Proceedings of Two Workshops.*
- Hoff-Jorgensen, R., 1978. Maedi-visna in Danish sheep. *Bull. Off. Epizoot.*
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A.B., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* (80-.). <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>
- HogenEsch, H., O'Hagan, D.T., Fox, C.B., 2018. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *npj Vaccines.* <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>
- Horzinek, M.C., 2010. Vaccination Protocols for Companion Animals: The Veterinarian's Perspective. *J. Comp. Pathol.* 142, S129–S132. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.11.001>
- Hötzel, I., Cheevers, W.P., 2002. Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: Host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology* 301, 21–31. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1575>
- Houwers, D.J., 1990. Economic Importance, Epidemiology and Control, in: *Springer, Boston, M. (Ed.), Maedi-*

- Visna and Related Diseases. Springer, Boston, MA, pp. 83–117. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1613-8_6
- Houwers, D.J., Gielkens, A.L.J., Schaake, J., 1982. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet. Microbiol.* 7, 209–219. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(82\)90035-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(82)90035-9)
- Houwers, D.J., König, C.D., Bakker, J., de Boer, M.J., Pekelder, J.J., Sol, J., Vellema, P., de Vries, G., 1987. Maedi-visna control in sheep. III: Results and evaluation of a voluntary control program in The Netherlands over a period of four years. *Vet. Q.* 9 Suppl 1. <https://doi.org/10.1080/01652176.1987.9694136>
- Houwers, D.J., König, C.D.W., de Boer, G.F., Schaake, J., 1983. Maedi-visna control in sheep I. Artificial rearing of colostrum-deprived lambs. *Vet. Microbiol.* 8, 179–185. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(83\)90064-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(83)90064-0)
- Houwers, D.J., Nauta, I.M., 1989. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Vet. Microbiol.* 19, 127–139. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(89\)90078-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(89)90078-3)
- Houwers, D.J., Schaake, J., 1987. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J. Immunol. Methods* 98, 151–154. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90449-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90449-2)
- Houwers, D.J., Schaake, J., de Boer, G.F., 1984. Maedi-visna control in sheep II. Half-yearly serological testing with culling of positive ewes and progeny. *Vet. Microbiol.* 9, 445–451. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(84\)90065-8](https://doi.org/10.1016/0378-1135(84)90065-8)
- Houwers, D.J., Visscher, A.H., Defize, P.R., 1989. Importance of ewe/lamb relationship and breed in the epidemiology of maedi-visna virus infections. *Res. Vet. Sci.* 46, 5–8. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)31108-1](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)31108-1)
- <http://www.oie.int/> [WWW Document], 2019. URL http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_maedi_visna.pdf - (accessed 4.19.21).
- <https://www.oie.int>, n.d. OIE World Animal Health Information System Available online [WWW Document]. URL https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines (accessed on Dec 17, 2020).
- Huet, T., Cheyrier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., Wain-Hobson, S., 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345, 356–359. <https://doi.org/10.1038/345356a0>
- Hughes, C.S., Williams, R.A., Gaskell, R.M., Jordan, F.T.W., Bradbury, J.M., Bennett, M., Jones, R.C., 1991. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. *Arch. Virol.* 121, 213–218. <https://doi.org/10.1007/BF01316755>
- Hung, L.H., Li, H.P., Lien, Y.Y., Wu, M.L., Chaung, H.C., 2010. Adjuvant effects of chicken interleukin-18 in avian Newcastle disease vaccine. *Vaccine* 28, 1148–1155. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.042>
- Huo, S., Zuo, Y., Li, N., Li, X., Zhang, Y., Wang, L., Liu, H., Zhang, J., Cui, D., He, P., Xu, J., Li, Y., Zhu, X., Zhong, F., 2016. Chicken IL-7 as a potent adjuvant enhances IBDV VP2 DNA vaccine immunogenicity and protective efficacy. *Vet. Microbiol.* 193, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.016>
- Hutchison, S., Benson, R.A., Gibson, V.B., Pollock, A.H., Garside, P., Brewer, J.M., 2012. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J.* 26, 1272–1279. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184556>
- Jolly, P.E., Gangopadhyay, A., Chen, S., Reddy, P.G., Weiss, H.L., Sapp, W.J., 1997. Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthritis encephalitis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56, 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05726-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05726-1)
- Juganaru, M., Reina, R., Bertolotti, L., Stella, M.C., Profiti, M., Armentano, M., Bollo, E., Amorena, B., Rosati, S., 2010. In vitro properties of small ruminant lentivirus genotype E. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.031>
- Juganaru, M., Reina, R., Bertolotti, L., Stella, M.C., Profiti, M., Armentano, M., Bollo, E., Amorena, B., Rosati, S., 2011. In vitro properties of small ruminant lentivirus genotype E. *Virology* 410, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.031>
- Junkuszew, A., Dudko, P., Bojar, W., Olech, M., Osiński, Z., Gruszecki, T.M., Kania, M.G., Kuźmak, J., Czerski, G., 2016. Risk factors associated with small ruminant lentivirus infection in eastern Poland sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* 127, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.03.011>
- Juste, R., Kwang, J., Concha-Bermejillo, A. de la, 1998. Dynamics of cell-associated viremia and antibody response during the early phase of lentivirus. *Am J Vet Res* 59, 563–568.
- Juste, R.A., Gelaber, J.L., de Ocariz, C.S., 1987. Epidemiological aspects of some latxa breed sheep diseases in the Basque Autonomous Community I.-Methodology and chronic diseases (Maedi and Paratuberculosis), in: ITEA. pp. 230–232.
- Juste, R.A., Villoria, M., Leginagoikoa, I., Ugarte, E., Minguijon, E., 2020. Milk production losses in Latxa dairy sheep associated with small ruminant lentivirus infection. *Prev. Vet. Med.* 176, 104886. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104886>
- Kaba, J., Czopowicz, M., Ganter, M., Nowicki, M., Witkowski, L., Nowicka, D., Szaluś-Jordanow, O., 2013. Risk factors associated with seropositivity to small ruminant lentiviruses in goat herds. *Res. Vet. Sci.* 94, 225–

227. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.018>
- Kaba, J., Strzałkowska, N., Józwick, A., Krzyzewski, J., Bagnicka, E., 2012. Twelve-year cohort study on the influence of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 95, 1617–1622. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4680>
- Kajikawa, O., Lairmore, M.D., DeMartini, J.C., 1990. Analysis of antibody responses to phenotypically distinct lentiviruses. *J. Clin. Microbiol.* 28.
- Kalogianni, A.I., Bossis, I., Ekateriniadou, L. V., Gelasakis, A.I., 2020. Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review. *Animals* 10, 616. <https://doi.org/10.3390/ani10040616>
- Kane, J.R., Stanley, D.J., Hultquist, J.F., Johnson, J.R., Mietrach, N., Binning, J.M., Jónsson, S.R., Barelier, S., Newton, B.W., Johnson, T.L., Franks-Skiba, K.E., Li, M., Brown, W.L., Gunnarsson, H.I., Adalbjornsdóttir, A., Fraser, J.S., Harris, R.S., Andrésdóttir, V., Gross, J.D., Krogan, N.J., 2015. Lineage-Specific Viral Hijacking of Non-canonical E3Ubiquitin Ligase Cofactors in the Evolution of Vif Anti-APOBEC3 Activity. *Cell Rep.* 11, 1236–1250. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.038>
- Karl, S.C., Thormar, H., 1971. Antibodies Produced by Rabbits Immunized with Visna Virus. *Infect. Immun.* 4.
- Karr, B.M., Chebloune, Y., Leung, K., Narayan, O., 1996. Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology* 225, 1–10. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0569>
- Kass, P.H., Barnes, W.G., Spangler, W.L., Chomel, B.B., Culbertson, M.R., 1993. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 396–405.
- Kass, P.H., Spangler, W.L., Hendrick, M.J., McGill, L.D., Esplin, D.G., Lester, S., Slater, M., Meyer, E.K., Boucher, F., Peters, E.M., Gobar, G.G., Htoo, T., Decile, K., 2003. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 1283–1292. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.1283>
- Keen, J., Kwang, J., Rosati, S., 1995. Comparison of ovine lentivirus detection by conventional and recombinant serological methods. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47, 295–309. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)05394-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)05394-8)
- Keen, J.E., Hungerford, L.L., Littledike, E.T., Wittum, T.E., Kwang, J., 1997. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity. *Prev. Vet. Med.* 30, 155–169. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(96\)01101-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01101-4)
- Kennedy-Stoskopf, S., Narayan, O., 1986. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanism of action and possible role in virus persistence. *J. Virol.* 59.
- Kensil, C.R., 1996. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13, 1–55.
- Koens, H., 1943. De “Zwoegers” op Texel. Utrecht.
- Kristbjörnsdóttir, H.B., Andrésdóttir, V., Svansson, V., Torsteinsdóttir, S., Matthíasdóttir, S., Andrésón, Ó.S., 2004. The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Virology* 318, 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.044>
- Krogsrud, J., Udnnes, H., 1978. Maedi (Progressive Interstitial Pneumonia in sheep). Diagnosis, epizootiology, prevention and control programme in Norway. *Bull. Off. Epizoot.*
- Kuhar, U., Barlič-Maganja, D., Grom, J., 2013. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses detected in Slovenia. *Vet. Microbiol.* 162, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.024>
- Kwang, J., Cutlip, R., 1992. Analysis of antibody response to ovine lentivirus by using viral gene products expressed in a prokaryotic system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 20–27. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)92344-W](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)92344-W)
- L’Homme, Y., Leboeuf, A., Arsenault, J., Fras, M., 2015. Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). *Virology* 475, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.006>
- Laakso, M.M., Lee, F.-H., Haggarty, B., Agrawal, C., Nolan, K.M., Biscone, M., Romano, J., Jordan, A.P.O., Leslie, G.J., Meissner, E.G., Su, L., Hoxie, J.A., Doms, R.W., 2007. V3 Loop Truncations in HIV-1 Envelope Impart Resistance to Coreceptor Inhibitors and Enhanced Sensitivity to Neutralizing Antibodies. *PLoS Pathog.* 3, e117. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030117>
- Lacasta, D., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., González, J.M., Ortín, A., Fthenakis, G.C., 2015. Vaccination schedules in small ruminant farms. *Vet. Microbiol.* 181, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.018>
- Lacerenza, D., Giammaroli, M., Grego, E., Marini, C., Profiti, M., Rutili, D., Rosati, S., 2006. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.016>
- Lago, N., López, C., Panadero, R., Cienfuegos, S., Pato, J., Prieto, A., Díaz, P., Mourazos, N., Fernández, G., 2012. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. *Prev. Vet. Med.* 103, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.09.019>
- Lago Rodríguez, N., 2012. Maedi Visna en el ganado ovino de carne de Galicia: análisis de factores de riesgo

- como aproximación a su control. Universidade de Santiago de Compostela.
- Larruskain, A., Bernales, I., Luján, L., de Andrés, D., Amorena, B., Jugo, B.M., 2013. Expression analysis of 13 ovine immune response candidate genes in Visna/Maedi disease progression. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.02.003>
- Larruskain, A., Minguíjón, E., García-Etxebarria, K., Moreno, B., Arostegui, I., Juste, R.A., Jugo, B.M., 2010. MHC class II DRB1 gene polymorphism in the pathogenesis of Maedi-Visna and pulmonary adenocarcinoma viral diseases in sheep. *Immunogenetics* 62, 75–83. <https://doi.org/10.1007/s00251-009-0419-2>
- LaRue, R.S., Lengyel, J., Jónsson, S.R., Andrésdóttir, V., Harris, R.S., 2010. Lentiviral Vif Degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H Protein of Its Mammalian Host and Is Capable of Cross-Species Activity. *J. Virol.* 84, 8193–8201. <https://doi.org/10.1128/jvi.00685-10>
- Lauren, C.T., Belsito, D. V., Morel, K.D., LaRussa, P., 2016. Case report of subcutaneous nodules and sterile abscesses due to delayed type hypersensitivity to aluminum-containing vaccines. *Pediatrics* 138. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-1690>
- Lee Gross, T.I., Ihrke, P.J., Wlader, E.J., Affolter, V.K., 2005. Diseases of the panniculus. In: *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*, 2nd Edit., ed.
- Lee, J., Malmberg, J.L., Wood, B.A., Hladky, S., Troyer, R., Roelke, M., Cunningham, M., McBride, R., Vickers, W., Boyce, W., Boydston, E., Series, L., Riley, S., Crooks, K., VandeWoude, S., 2017. Feline Immunodeficiency Virus Cross-Species Transmission: Implications for Emergence of New Lentiviral Infections. *J. Virol.* 91, 2134–2150. <https://doi.org/10.1128/jvi.02134-16>
- Leginagoikoa, I., Daltabuit-Test, M., Álvarez, V., Arranz, J., Juste, R.A., Amorena, B., de Andrés, D., Luján, L.L., Badiola, J.J., Berriatua, E., 2006a. Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. *Res. Vet. Sci.* 80, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.003>
- Leginagoikoa, I., Juste, R.A., Barandika, J., Amorena, B., De Andrés, D., Luján, L., Badiola, J., Berriatua, E., 2006b. Extensive rearing hinders Maedi-Visna Virus (MVV) infection in sheep. *Vet. Res.* 37, 767–778. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006034>
- Leginagoikoa, I., Minguíjón, E., Juste, R.A., Barandika, J., Amorena, B., de Andrés, D., Badiola, J.J., Luján, L., Berriatua, E., 2010. Effects of housing on the incidence of visna/maedi virus infection in sheep flocks. *Res. Vet. Sci.* 88, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.11.006>
- Leitner, G., Krifucks, O., Weisblit, L., Lavi, Y., Bernstein, S., Merin, U., 2010. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet. J.* 183, 328–331. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.12.001>
- León, L., Prats, J., 1996. Encuesta serológica de la infección por el virus Maedi/Visna en la población ovina de Moratalla (Murcia), in: *SEOC (Ed.), XXI Jornadas Científicas de La Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Logroño*, pp. 119–27.
- Leroux-Roels, G., 2010. Unmet needs in modern vaccinology. Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>
- Leroux, C., Chastang, J., Greenland, T., Mornex, J.F., 1997. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 142, 1125–1137.
- Li, Y., Zhou, F., Li, X., Wang, J., Zhao, X., Huang, J., 2013. Development of TaqMan-based qPCR method for detection of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *Springer* 158, 2135–2141. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1728-1>
- Light, M.R., Schipper, I.A., Molitor, T.W., Tilton, J.E., Slinger, W.D., 1979. Progressive Pneumonia in Sheep: Incidence of Natural Infection and Establishment of Clean Flocks. *J. Anim. Sci.* 49, 1157–1160. <https://doi.org/10.2527/jas1979.4951157x>
- Lindblad, E.B., 2004. Aluminium adjuvants - In retrospect and prospect. *Vaccine* 22, 3658–3668. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.032>
- Lipecka, C., Szymanowska, A., Szymanowski, M., Junkuszew, A., Gruszecki, T.M., Kuzmak, J., Olech, M., 2010. Milk yield and quality in sheep with maedi-visna virus. *Rocz. Nauk. Pol. Tow. Zootech.* 6, 51–61.
- Liu, P., Hudson, L.C., Tompkins, M.B., Vahlenkamp, T.W., Meeker, R.B., 2006. Compartmentalization and evolution of feline immunodeficiency virus between the central nervous system and periphery following intracerebroventricular or systemic inoculation. *J. Neurovirol.* 12, 307–321. <https://doi.org/10.1080/13550280600889575>
- Loman, D., 1862. Het Texels schaap. *Mag. voor Landbouw en Kruidkd.* II, 66–70.
- López, A., Martinson, S.A., 2017. Respiratory System, Mediastinum, and Pleurae, In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th ed. ed.
- Lucam, F., 1942. La “bouhite” ou “lymphomatose pulmonaire maligne du Mouton.” *Recl. Med. Vet.* 118, 273.
- Luján, L., Badiola, J.J., García Marín, J.F., Moreno, B., Vargas, M.A., Fernández de Luco, D., Pérez, V., 1993. Seroprevalence of maedi-visna infection in sheep in the north-east of Spain. *Prev. Vet. Med.* 15, 181–190. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(93\)90112-7](https://doi.org/10.1016/0167-5877(93)90112-7)

- Luján, L., Begara, I., Watt, N.J., 1994. Ovine Lentivirus (Maedi-visna Virus) Protein Expression in Sheep Alveolar Macrophages. *Vet. Pathol.* 31, 695–703. <https://doi.org/10.1177/030098589403100610>
- Lujan, L., Garcia Marin, J., Fernandez de Luco, D., Vargas, A., Badiola, J., 1991. Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with maedi-visna infection. *Vet. Rec.* 129, 51–54. <https://doi.org/10.1136/vr.129.3.51>
- Luján, L., Pérez, M., de Andrés, D., Reina, R., 2019. Pulmonary lentivirus infection in sheep. *Small Rumin. Res.* 181, 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.05.006>
- Luján, L., Pérez, M., Salazar, E., Álvarez, N., Gimeno, M., Pinczowski, P., Irusta, S., Santamaría, J., Insausti, N., Cortés, Y., Figueras, L., Cuartielles, I., Vila, M., Fantova, E., Chapullé, J.L.G., 2013. Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep. *Immunol. Res.* 56, 317–324. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8404-0>
- Luján, L., Pérez, M., Salazar, E., Gimeno, M., Pinczowski, P., Álvarez, N., Fantova, E., Vila, M., Gracia Chapullé, J.L., 2012. An Ovine Neurodegenerative Syndrome Associated with Repetitive Administration of Vaccines. *J. Comp. Pathol.* 146, 60. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.11.062>
- Lütticken, D., Segers, R.P., Visser, N., 2007. Veterinary vaccines for public health and prevention of viral and bacterial zoonotic diseases. *Rev. Sci. Tech.* 26, 165–177. <https://doi.org/10.20506/rst.26.1.1734>
- Lyall, J.W., Solanky, N., Tiley, L.S., 2000. Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *J. Gen. Virol.* 81, 2919–2927. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-2919>
- Macy, D.W., 1997. Vaccine adjuvants. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.* 12, 206–211. [https://doi.org/10.1016/S1096-2867\(97\)80034-5](https://doi.org/10.1016/S1096-2867(97)80034-5)
- Makoschey, B., Gelder, P.T.J.A.V., Keijsers, V., Goovaerts, D., 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals* 31, 203–208. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00058-7)
- Marcato, P.S., 1990. Anatomía e histología patológica especial de los mamíferos domésticos, 2nd ed. ed.
- Marrack, P., McKee, A.S., Munks, M.W., 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/nri2510>
- Marsh, H., 1923. Progressive pneumonia in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 62, 458–473.
- Martínez-Navalón, B., Peris, C., Gómez, E.A., Peris, B., Roche, M.L., Caballero, C., Goyena, E., Berriatua, E., 2013. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet. J.* 197, 311–317. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2012.12.020>
- Martinod, S., 1995. Risk assessment related to veterinary biologicals : side-effects in target animals. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* 14, 979–989. <https://doi.org/10.20506/rst.14.4.886>
- Mastro, J.M., Axthelm, M., Mathes, L.E., Krakowka, S., Ladiges, W., Olsen, R.G., 1986. Repeated suppression of lymphocyte blastogenesis following vaccinations of CPV-immune dogs with modified-live CPV vaccines. *Vet. Microbiol.* 12, 201–211. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(86\)90049-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90049-0)
- McGuire, T.C., Adams, D.S., Johnson, G.C., Klevjer-Anderson, P., Barbee, D.D., Gorham, J.R., 1986. Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats. *Am. J. Vet. Res.* 47, 537–540.
- Meeusen, E.N.T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P., Jungersen, G., 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 489–510. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-07>
- Mendiola, W.P.S., Tórtora, J.L., Martínez, H.A., García, M.M., Cuevas-Romero, S., Cerriteño, J.L., Ramírez, H., 2019. Genotyping Based on the LTR Region of Small Ruminant Lentiviruses from Naturally Infected Sheep and Goats from Mexico. *Biomed Res. Int.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4279573>
- Menzies, P., Simard, C., 2001. Maedi Visna Flock Status Pilot Project [WWW Document]. URL www.uoguelph.ca/~pmenzies/mv/mv.PDF
- Menzies, P.I., 2006. The Ontario Sheep Health Program: A structured health management program for intensively reared flocks, in: *Small Ruminant Research*. Elsevier, pp. 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.033>
- Michiels, R., Adjadj, N.R., De Regge, N., 2020. Phylogenetic Analysis of Belgian Small Ruminant Lentiviruses Supports Cross Species Virus Transmission and Identifies New Subtype B5 Strains. *Pathogens* 9, 183. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030183>
- Michiels, R., Van Mael, E., Quinet, C., Welby, S., Cay, A.B., De Regge, N., 2018. Seroprevalence and risk factors related to small ruminant lentivirus infections in Belgian sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 151, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.12.014>
- Mikula, I., Mikula, I., 2011. Characterization of ovine Toll-like receptor 9 protein coding region, comparative analysis, detection of mutations and maedi visna infection. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 182–92. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.09.008>
- Mikula, I., Pastoreková, S., Mikula, I., 2010. Toll-like receptors in immune response to the viral infections. *Acta Virol.* 54, 231–45.
- Minardi da Cruz, J., Singh, D., Lamara, A., Chebloune, Y., 2013. Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) Break the

- Species Barrier to Acquire New Host Range. *Viruses* 5, 1867–1884. <https://doi.org/10.3390/v5071867>
- Modolo, J.R., Stachissini, A.V.M., Padovani, C.R., Araujo, J.P., Castro, R.S., Ravazzolo, A.P., Leite, B.L.S., 2009. PCR associated with agar gel immunodiffusion assay improve caprine arthritis-encephalitis (CAEV) control. *Small Rumin. Res.* 81, 18–20. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.10.005>
- Molaei, V., Bazzucchi, M., De Mia, G.M., Otarod, V., Abdollahi, D., Rosati, S., Lühken, G., 2020. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Sci. Rep.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58990-9>
- Moore, G., HogenEsch, H., 2010. Adverse Vaccinal Events in Dogs and Cats. *Vet. Clin. NA Small Anim. Pract.* 40, 393–407. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.002>
- Moore, G.E., DeSantis-Kerr, A.C., Guptill, L.F., Glickman, N.W., Lewis, H.B., Glickman, L.T., 2007. Adverse events after vaccine administration in cats: 2,560 Cases (2002-2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231, 94–100. <https://doi.org/10.2460/javma.231.1.94>
- Moore, G.E., Glickman, N.W., Ward, M.P., Engler, K.S., Lewis, H.B., Glickman, L.T., 2005a. Incidence of and risk factors for adverse events associated with distemper and rabies vaccine administration in ferrets. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 909–912. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.909>
- Moore, G.E., Guptill, L.F., Ward, M.P., Glickman, N.W., Faunt, K.K., Lewis, H.B., Glickman, L.T., 2005b. Adverse events diagnosed within three days of vaccine administration in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 1102–1108. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1102>
- Mselli-Lakhal, L., Favier, C., Leung, K., Guiguen, F., Grezel, D., Miossec, P., Mornex, J.-F., Narayan, O., Querat, G., Chebloune, Y., 2000. Lack of Functional Receptors Is the Only Barrier That Prevents Caprine Arthritis-Encephalitis Virus from Infecting Human Cells. *J. Virol.* 74, 8343–8348. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8343-8348.2000>
- Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Du, J., Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Balleydier, S., Mornex, J.F., Chebloune, Y., 1999. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology* 259, 67–73.
- Mullis, K.B., 1994. PCR and Scientific Invention: The Trial of DuPont vs. Cetus, in: *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser Boston, pp. 427–441. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0257-8_35
- Munday, J.S., Stedman, N.L., Richey, L.J., 2003. Histology and immunohistochemistry of seven ferret vaccination-site fibrosarcomas. *Vet. Pathol.* 40, 288–293. <https://doi.org/10.1354/vp.40-3-288>
- Murphy, B., Hillman, C., Castillo, D., Vapniarsky, N., Rowe, J., 2012. The presence or absence of the gamma-activated site determines IFN gamma-mediated transcriptional activation in CAEV promoters cloned from the mammary gland and joint synovium of a single CAEV-infected goat. *Virus Res.* 163, 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.001>
- Murphy, B., Jasmer, D.P., White, S.N., Knowles, D., 2007. Localization of a TNF-activated transcription site and interactions with the gamma activated site within the CAEV U3 70 base pair repeat. *Virology* 364, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.02.020>
- Murphy, B., McElliott, V., Vapniarsky, N., Oliver, A., Rowe, J., 2010. Tissue tropism and promoter sequence variation in caprine arthritis encephalitis virus infected goats. *Virus Res.* 151, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.002>
- Murphy, F., Gibbs, E., Horzinek, M., Studdert, M., 1999. *Veterinary virology: Academic press.*
- Mutoloki, S., Reite, O.B., Brudeseth, B., Tverdal, A., Evensen, Ø., 2006. A comparative immunopathological study of injection site reactions in salmonids following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. *Vaccine* 24, 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.070>
- Muz, D., Oğuzoğlu, T.Ç., Rosati, S., Reina, R., Bertolotti, L., Burgu, I., 2013. First molecular characterization of visna/maedi viruses from naturally infected sheep in Turkey. *Arch. Virol.* 158, 559–570. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1518-1>
- Nagel-Alne, G.E., Asheim, L.J., Hardaker, J.B., Sølverød, L., Lindheim, D., Valle, P.S., 2014. The norwegian healthier goats programme - A financial cost-benefit analysis. *Prev. Vet. Med.* 114, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.02.002>
- Naim, H.Y., 2013. Applications and challenges of multivalent recombinant vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 457–461. <https://doi.org/10.4161/hv.23220>
- Nalbert, T., Czopowicz, M., Szaluś-Jordanow, O., Witkowski, M., Witkowski, L., Stoniewska, D., Reczyńska, D., Bagnicka, E., Kaba, J., 2019. 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.* 165, 71–75. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2019.02.011>
- Narayan, O., Clements, J.E., Griffin, D.E., Wolinsky, J.S., 1981. Neutralizing antibody spectrum determines the antigenic profiles of emerging mutants of visna virus. *Infect. Immun.* 32.
- Narayan, O., Griffin, D.E., Chase, J., 1977a. Antigenic shift of visna virus in persistently infected sheep. *Science* (80-). 197, 376–378. <https://doi.org/10.1126/science.195339>
- Narayan, O., Griffin, D.E., Silverstein, A.M., 1977b. Slow Virus Infection: Replication and Mechanisms of Persistence of Visna Virus in Sheep. *J. Infect. Dis.* 135, 800–806. <https://doi.org/10.1093/infdis/135.5.800>

- Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Sheffer, D., Griffin, D.E., Clements, J.E., 1983. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect. Immun.* 41.
- Narayan, O., Zink, M.C., Gorrell, M., McEntee, M., Sharma, D., Adams, R., 1992. Lentivirus induced arthritis in animals, in: *Journal of Rheumatology*. pp. 25–32.
- Nascimento, I.P., Leite, L.C.C., 2012. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>
- Newton, R., Waller, A., King, A., 2005. Investigation of suspected adverse reactions following strangles vaccination in horses. *Vet. Rec.* 156, 291–292.
- Nowicka, D., Czopowicz, M., Bagnicka, E., Rzewuska, M., Strzalkowska, N., Kaba, J., 2015. Influence of small ruminant lentivirus infection on cheese yield in goats. *J. Dairy Res.* 82, 102.
- Nusinovici, S., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., Fourichon, C., 2011. A side effect of decreased fertility associated with vaccination against bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 101, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.05.011>
- O'Toole, D., McAllister, M.M., Griggs, K., 1995. Iatrogenic compressive lumbar myelopathy and radiculopathy in adult cattle following injection of an adjuvanted bacterin into loin muscle: Histopathology and ultrastructure. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 7, 237–244. <https://doi.org/10.1177/104063879500700212>
- Ogden, N., Davies, P., Lovatt, F., 2019. Dealing with maedi visna in UK sheep flocks. *In Pract.* 41, 321–328. <https://doi.org/10.1136/inp.l4838>
- Ohmori, K., Masuda, K., Sakaguchi, M., Kaburagi, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2002. A Retrospective Study on Adverse Reactions to Canine Vaccines in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 851–853. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.851>
- Olech, M., Croise, B., Kuźmak, J., Valas, S., 2009. Evidence for interspecies transmission of small ruminant lentiviruses in sheep and goats in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy* 53, 165–168.
- Olech, M., Murawski, M., Kuźmak, J., 2019. Molecular analysis of small-ruminant lentiviruses in Polish flocks reveals the existence of a novel subtype in sheep. *Arch. Virol.* 164, 1193–1198. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04161-9>
- Olech, M., Osiński, Z., Kuźmak, J., 2020. Seroprevalence of small ruminant lentivirus (SRLV) infection in wild cervids in Poland. *Prev. Vet. Med.* 176, 104905. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104905>
- Olech, M., Rachid, A., Croisé, B., Kuźmak, J., Valas, S., 2012. Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res.* 163, 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.019>
- Olech, M., Valas, S., Kuźmak, J., 2018. Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. *PLoS One* 13, e0193892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193892>
- Oliver, R.E., Gorham, J.R., Parish, S.F., Hadlow, W.J., Narayan, O., 1981. Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1554–1559.
- Orbegoza-Medina, R.A., Martínez-Sernández, V., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Mezo, M., Ubeira, F.M., 2018. Vaccination of sheep with Quil-A® adjuvant expands the antibody repertoire to the Fasciola MF6p/FhHDM-1 antigen and administered together impair the growth and antigen release of flukes. *Vaccine* 36, 1949–1957. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.115>
- Óskarsson, T., Hreggvidsdóttir, H.S., Agnarsdóttir, G., Matthíasdóttir, S., Ogmundsdóttir, M.H., Jónsson, S.R., Georgsson, G., Ingvarsson, S., Andrésón, Ó.S., Andrésdóttir, V., 2007. Duplicated Sequence Motif in the Long Terminal Repeat of Maedi-Visna Virus Extends Cell Tropism and Is Associated with Neurovirulence. *J. Virol.* 81, 4052–4057. <https://doi.org/10.1128/jvi.02319-06>
- oviespana.com, 2019. Castilla y León profundiza en su programa autonómico para controlar el maedi visna [WWW Document]. URL <https://www.oviespana.com/Articulos/289079-Castilla-y-Leon-profundiza-en-su-programa-autonomico-para-controlar-el-maedi-visna.html> (accessed 2.23.21).
- Paillot, R., 2014. A Systematic Review of Recent Advances in Equine Influenza Vaccination. *Vaccines* 2, 797–831. <https://doi.org/10.3390/vaccines2040797>
- Pálsson, P.A., 1990. Maedi-Visna. History and Clinical Description, in: *Maedi-Visna and Related Diseases*. Springer, Boston, MA, pp. 3–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1613-8_2
- Pálsson, P.A., 1976. Maedi and visna in sheep. *Front. Biol.* 44, 17–43.
- Pálsson, P.A., 1962. Paratuberculosis in Icelandic sheep and its control by vaccination. *Bull. Off. Int. Epiz.* 58, 65–79.
- Panei, C.J., Gos, M.L., Valera, A.R., Galosi, C.M., Echeverria, M.G., 2017. 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.* 7, 32–35. <https://doi.org/10.4314/ovj.v7i1.5>
- Pastoret, P.P., Jones, P., 2005. Veterinary vaccines for animal and public health, in: *Developments in Biologicals*. pp. 15–29.
- Payne, S., Elder, J., 2005. The Role of Retroviral dUTPases in Replication and Virulence. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2, 381–388. <https://doi.org/10.2174/1389203013381008>

- Pedersen, N.C., Ho, E.W., Brown, M.L., Yamamoto, J.K., 1987. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* (80-). 235, 790–793. <https://doi.org/10.1126/science.3643650>
- Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M., Ventura, P., 1985. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* 147, 231–236. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90246-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90246-6)
- Peng, G., Greenwell-Wild, T., Nares, S., Jin, W., Ke, J.L., Rangel, Z.G., Munson, P.J., Wahl, S.M., 2007. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110, 393–400. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-051763>
- Pépin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J.F., Peterhans, E., 1998. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet. Res.* 29, 341–367.
- Péretz, G., Bugnard, F., Calavas, D., 1994. Study of a prevention programme for caprine arthritis-encephalitis. *Vet. Res.* 25, 322–326.
- Pérez, M., Biescas, E., de Andrés, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Reina, R., Bolea, R., de Andrés, D., Juste, R.A., Cancer, J., Gracia, J., Amorena, B., Badiola, J.J., Luján, L., 2010. Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón (Spain). *Vet. J.* 186, 221–225. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2009.07.031>
- Pérez, M., Biescas, E., Reina, R., Glaría, I., Marín, B., Marquina, A., Salazar, E., Álvarez, N., de Andrés, D., Fantova, E., Badiola, J.J., Amorena, B., Luján, L., 2015. Small Ruminant Lentivirus–Induced Arthritis: Clinicopathologic Findings in Sheep Infected by a Highly Replicative SRLV B2 Genotype. *Vet. Pathol.* 52, 132–139. <https://doi.org/10.1177/0300985813519654>
- Perricone, C., Colafrancesco, S., Mazor, R.D., Soriano, A., Agmon-Levin, N., Shoenfeld, Y., 2013. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) 2013: Unveiling the pathogenic, clinical and diagnostic aspects. *J. Autoimmun.* <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.10.004>
- Perry, L.L., Wilkerson, M.J., Hullinger, G.A., Cheevers, W.P., 1995. Depressed Cd4+ T Lymphocyte Proliferative Response and Enhanced Antibody Response to Viral Antigen in Chronic Lentivirus-Induced Arthritis. *J. Infect. Dis.* 171, 328–334. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.2.328>
- Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., Eliasiewicz, M., Juste, R.A., Krašnič, R., Lafont, J.-P., Lenihan, P., Pétursson, G., Pritchard, G., Thorley, J., Vitu, C., Mornex, J.-F., Pépin, M., 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 35, 257–274. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004014>
- Peterson, K., Brinkhof, J., Houwers, D.J., Colenbrander, B., Gadella, B.M., 2008. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 69, 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.013>
- Petursson, G., Andresdottir, V., Andresson, O.S., Georgsson, G., Palsson, P.A., Rafnar, B., Torsteinsdóttir, S., 1992. Lentivirus diseases of sheep and goats: maedi-visna and caprine arthritis-encephalitis.
- Petursson, G., Nathanson, N., Georgsson, G., Panitch, H., Pálsson, P.A., 1976. Pathogenesis of visna. I. Sequential virologic, serologic, and pathologic studies. *Lab. Invest.* 35, 402–412.
- Pétursson, G., Turelli, P., Matthíasdóttir, S., Georgsson, G., Andrésson, Ó.S., Torsteinsdóttir, S., Vigne, R., Andrésdóttir, V., Gunnarsson, E., Agnarsdóttir, G., Quérat, G., 1998. Visna Virus dUTPase Is Dispensable for Neuropathogenicity. *J. Virol.* 72, 1657–1661. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.2.1657-1661.1998>
- Phillips, T.R., Jensen, J.L., Rubino, M.J., Yang, W.C., Schultz, R.D., 1989. Effects of vaccines on the canine immune system. *Can. J. Vet. Res.* 53, 154–160.
- Picault, J.P., Guittet, M., Bennejean, G., 1982. Safety and potency of different vaccines against avian infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol. J. WVPA* 11, 39–48. <https://doi.org/10.1080/03079458208436080>
- Pisoni, G., Bertoni, G., Manarolla, G., Vogt, H.-R., Scaccabarozzi, L., Locatelli, C., Moroni, P., 2010. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology* 407, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.004>
- Pisoni, G., Moroni, P., Turin, L., Bertoni, G., 2007. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology* 369, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.021>
- Pisoni, G., Quasso, A., Moroni, P., 2005. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.013>
- Pizzato, M., Erlwein, O., Bonsall, D., Kaye, S., Muir, D., McClure, M.O., 2009. A one-step SYBR Green I-based product-enhanced reverse transcriptase assay for the quantitation of retroviruses in cell culture supernatants. *J. Virol. Methods* 156, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.10.012>
- Pławińska-Czarnak, J., Bagnicka, E., Kaba, J., Bogdan, J., Zarzyńska, J., 2014. Analysis of the CAEV infection impact on the milk yield and milk SCC of Polish dairy goats. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 39–42.
- Ploumi, K., Vainas, E., Lymberopoulos, A., Paschaleri, E., Christodoulou, V., Giouzeljannis, A., Xioufis, A., Ap Dewi, I., 2001. Effect of maedi-visna virus infection on milk production in dairy sheep in Greece. *Vet. Rec.* 149, 526–527. <https://doi.org/10.1136/vr.149.17.526>

- Polledo, L., González, J., Fernández, C., Miguélez, J., Martínez-Fernández, B., Morales, S., Ferreras, M.C., Marín, J.F.G., 2013. Simple control strategy to reduce the level of Maedi-Visna infection in sheep flocks with high prevalence values (>90%). *Small Rumin. Res.* 112, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.010>
- Power, C., Richardson, S., Briscoe, M., Pasick, J., 1995. Evaluation of two recombinant Maedi-visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* 2.
- Preziuso, S., Renzoni, G., Allen, T.E., Taccini, E., Rossi, G., Demartini, J.C., Braca, G., 2004. Colostral transmission of maedi visna virus: Sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Vet. Microbiol.* 104, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.010>
- Preziuso, S., Taccini, E., Rossi, G., Renzoni, G., Braca, G., 2003. Experimental Maedi Visna Virus Infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *Eur. J. Histochem.* 373–378.
- Pujols, J.G., Galindo, I., Rosell, R., Domingo, M., 2009. The Ministry of Agriculture, Food and Environment, Spanish: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). CRESA-Estudio de brotes de enfermedad en granjas de ovino en Cataluña y de su posible relación con la vacunación frente a la Le [WWW Document]. URL https://www.oviespana.com/extras/pdf/gana156_2.pdf
- Pyrah, I.T.G., Watt, N.J., 1995. Immunohistological study of the cutaneous delayed type hypersensitivity reaction in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48, 299–312. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05428-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05428-9)
- Querat, G., Audoly, G., Sonigo, P., Vigne, R., 1990. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 175, 434–47. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90428-t](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90428-t)
- Quérat, G., Barban, V., Sauze, N., Filippi, P., Vigne, R., Russo, P., Vitu, C., 1984. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J. Virol.* 52.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2000. *Ovine progressive pneumonia (maedi, maedi-visna)*. *Veterinary Medicine*, 9th editio. ed.
- Ramírez, H., Glaria, I., Andrés, X. de, Martínez, H.A., Hernández, M.M., Reina, R., Iraizoz, E., Crespo, H., Berriatua, E., Vázquez, J., Amorena, B., Andrés, D.D., 2011. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *Vet. J.* 190, 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.005>
- Ramírez, H., Reina, R., Amorena, B., Andrés, D., Martínez, H., 2013. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Viruses* 5, 1175–1207. <https://doi.org/10.3390/v5041175>
- Ramírez, H., Reina, R., Bertolotti, L., Cenoz, A., Hernández, M.M., San Román, B., Glaria, I., de Andrés, X., Crespo, H., Jáuregui, P., Benavides, J., Polledo, L., Pérez, V., García-Marín, J.F., Rosati, S., Amorena, B., de Andrés, D., 2012. Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Vet. Res.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-8>
- Ramírez, H., Román, B.S., Glaria, I., Reina, R., Hernández, M.M., de Andrés, X., Crespo, H., Hichou, B., Cianca, S., Goñi, C., Grandas, A., García-Pastor, L., Vijil, L.E., Quintín, F., Grilló, M.J., de Andrés, D., Amorena, B., 2009. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology* 72, 1085–1096. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.028>
- Ramon, G., 1924. Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtheriques. *Ann. Inst. Pasteur* 38, 13.
- Ramsay, J.D., Williams, C.L., Simko, E., 2005. Fatal adverse pulmonary reaction in calves after inadvertent intravenous vaccination. *Vet. Pathol.* 42, 492–495. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-492>
- Rau, H., Revets, H., Cornelis, P., Titzmann, A., Ruggli, N., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2006. Efficacy and functionality of lipoprotein OprI from *Pseudomonas aeruginosa* as adjuvant for a subunit vaccine against classical swine fever. *Vaccine* 24, 4757–4768. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.028>
- Ravazzolo, A.P., Nenci, C., Vogt, H.R., Waldvogel, A., Obexer-Ruff, G., Peterhans, E., Bertoni, G., 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 350, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.014>
- Reddy, T.R., Kraus, G., Yamada, O., Looney, D.J., Suhasini, M., Wong-Staal, F., 1995. Comparative analyses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 Vif mutants. *J. Virol.* 69.
- Reina, R., Bertolotti, L., Dei Giudici, S., Puggioni, G., Ponti, N., Profiti, M., Patta, C., Rosati, S., 2010. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet. Microbiol.* 144, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.020>
- Reina, R., De Andrés, D., Amorena, B., Baja, M., 2013. Immunization against Small Ruminant Lentiviruses. *Viruses* 5. <https://doi.org/10.3390/v5081948>
- Reina, R., Glaria, I., Benavides, J., de Andrés, X., Crespo, H., Solano, C., Pérez, V., Luján, L., Pérez, M.M., de la Lastra, J.M.P., Rosati, S., Blacklaws, B., Harkiss, G., de Andrés, D., Amorena, B., 2007. Association of CD80 and CD86 Expression Levels with Disease Status of Visna/Maedi Virus Infected Sheep. *Viral Immunol.* 20, 609–622. <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0071>

- Reina, R., Glaria, I., Cianca, S., Crespo, H., Andrés, X. de, Goñi, C., Lasarte, J.M., Luján, L., Amorena, B., De Andrés, D.F., 2011. Use of small ruminant lentivirus-infected rams for artificial insemination. *Vet. J.* 189, 106–107. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.07.001>
- Reina, R., Grego, E., Bertolotti, L., De Meneghi, D., Rosati, S., 2009a. 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.* 83, 1152–1155. <https://doi.org/10.1128/jvi.01627-08>
- Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P., Quasso, A., Amorena, B., Rosati, S., 2009b. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Vet. Microbiol.* 138, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.005>
- Reina, R., Mora, M.I., Glaria, I., García, I., Solano, C., Luján, L., Badiola, J.J., Contreras, A., Berriatua, E., Juste, R., Mamoun, R.Z., Rolland, M., Amorena, B., de Andrés, D., 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res.* 121, 189–198. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2006.05.011>
- Remond, M., Larenaudie, B., 1985. Maedi/visna infection in France. Results of serological examinations and trial of eradication., in: Communities, J.S. and R.H.-J.L.C. of the E. (Ed.), *Slow Viruses in Sheep, Goats and Cattle: In Particular Maedi Visna, Jaagsiekte, and in Caprines, Arthritis, Encephalitis and Pneumonitis: Proceedings of Two Workshops.*
- Ressang, A.A., de Boer, G.F., de Wijn, G.C., 1968. The Lung in Zwøegerziekte. *Pathol. Vet.* 5, 353–369. <https://doi.org/10.1177/030098586800500406>
- Reviriego, F.J., 1998. Seroprevalencia de Maedi-Visna y artritis encefalitis caprina. Estudio realizado en la provincia de Ávila. *Albeitar* 21:15.
- Reyburn, H.T., Roy, D.J., Blacklaws, B.A., Sargan, D.R., McConnell, I., 1992. Expression of maedi-visna virus major core protein, p25: development of a sensitive p25 antigen detection assay. *J. Virol. Methods* 37, 305–320. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(92\)90031-8](https://doi.org/10.1016/0166-0934(92)90031-8)
- Rimstad, E., East, N.E., Torten, M., Higgins, J., DeRock, E., Pedersen, N.C., 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1858–1862.
- Ritchie, C., Hosie, B., 2014. Concern over maedi visna breakdowns. *Vet. Rec.* 175, 50–51.
- Roberts, J.D., Bebenek, K., Kunkel, T.A., 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* (80-). 242, 1171–1173. <https://doi.org/10.1126/science.2460925>
- Roeder, P.L., 2011. Rinderpest: The end of cattle plague. *Prev. Vet. Med.* 102, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.004>
- Rolland, M., Mooney, J., Valas, S., Perrin, G., Mamoun, R.Z., 2002. Characterisation of an Irish caprine lentivirus strain - SRLV phylogeny revisited. *Virus Res.* 85, 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00015-1)
- Rosati, S., Kwang, J., Keen, J.E., 1995. Genome Analysis of North American Small Ruminant Lentiviruses by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 7, 437–443. <https://doi.org/10.1177/104063879500700403>
- Rosati, S., Mannelli, A., Merlo, T., Ponti, N., 1999. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res.* 61, 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00031-3)
- Roth, J.A., Kaeberle, M.L., 1983. Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhoea virus with and without the administration of ACTH. *Am. J. Vet. Res.* 44, 2366–2372.
- Rowe, J.D., East, N.E., Thurmond, M.C., Franti, C.E., Pedersen, N.C., 1992. 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.* 53, 2386–2395.
- Sadoff, J., Le Gars, M., Shukarev, G., Heerwegh, D., Truyers, C., de Groot, A.M., Stoop, J., Tete, S., Van Damme, W., Leroux-Roels, I., Berghmans, P.-J., Kimmel, M., Van Damme, P., de Hoon, J., Smith, W., Stephenson, K.E., De Rosa, S.C., Cohen, K.W., McElrath, M.J., Cormier, E., Scheper, G., Barouch, D.H., Hendriks, J., Struyf, F., Douguilh, M., Van Hoof, J., Schuitemaker, H., 2021. Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* *NEJMoa2034201*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034201>
- Salazar, E., Monleon, E., Bolea, R., Acin, C., Pérez, M., Álvarez, N., Leginagoikoa, I., Juste, R.A., Minguijon, E., Reina, R., Glaria, I., Berriatua, E., De Andrés, D., Badiola, J.J., Amorena, B., Luján, L., 2010. Detection of PrP(Sc) in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Vet Res* 41, 58–68.
- Saltarelli, M., Querat, G., Konings, D.A.M., Vigne, R., Clements, J.E., 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179, 347–364. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90303-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90303-9)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Mol. cloning a Lab.

- manual.
- Sánchez-Vizcaíno, F., Martínez-López, B., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2013. Identification of suitable areas for the occurrence of Rift Valley fever outbreaks in Spain using a multiple criteria decision framework. *Vet. Microbiol.* 165, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.016>
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2009. Informe sobre el estudio del aumento de mortalidad en el ganado ovino y su posible relación con la vacunación de lengua azul. The Ministry of Agriculture, Food and Environment, Spanish: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). V [WWW Document]. URL https://www.oviespana.com/extras/pdf/gana156_3.pdf
- Sánchez, A.B., Rodríguez, D., Garzón, A., Amorena, B., Esteban, M., Rodríguez, J.R., 2002. 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.* 147, 2377–2392. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0874-7>
- Sanjosé, L., Crespo, H., Blatti-Cardinaux, L., Glaria, I., Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E., Amorena, B., De Andrés, D., Bertoni, G., Reina, R., 2016. Post-entry blockade of small ruminant lentiviruses by wild ruminants. *Vet. Res.* 47, 1. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0288-7>
- Santry, L.A., de Jong, J., Gold, A.C., Walsh, S.R., Menzies, P.I., Wootton, S.K., 2013. Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario, Canada. *Virus Res.* 175, 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.03.019>
- Sarafidou, T., Stamatis, C., Kalozoumi, G., Spyrou, V., Fthenakis, G.C., Billinis, C., Mamuris, Z., 2013. Toll Like Receptor 9 (TLR9) Polymorphism G520R in Sheep Is Associated with Seropositivity for Small Ruminant Lentivirus. *PLoS One* 8, e63901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063901>
- Sargan, D.R., Bennet, I.D., Cousens, C., Roy, D.J., Blacklaws, B.A., Dalziel Watt, R.G.N.J., McConnell, I., 1991. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J. Gen. Virol.* 72, 1893–1903. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-8-1893>
- Schaller, P., Vogt, H.R., Strasser, M., Nettleton, P.F., Peterhans, E., Zanoni, R., 2000. Seroprevalence of maedi-visna and border disease in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 142, 145–153.
- Scheer-Czechowski, P., Vogt, H.R., Tontis, A., Peterhans, E., Zanoni, R., 2000. Pilotprojekt zur Sanierung der Maedi-Visna bei Walliser Schwarznasenschafen. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 142, 155–164.
- Sesardic, D., 2006. Regulatory considerations on new adjuvants and delivery systems. *Vaccine* 24, S86–S87. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.135>
- Shah, C., Böni, J., Huder, J.B., Vogt, H.R., Mühlherr, J., Zanoni, R., Miserez, R., Lutz, H., Schüpbach, J., 2004a. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* 319, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.047>
- Shah, C., Huder, J.B., Böni, J., Schönmann, M., Mühlherr, J., Lutz, H., Schüpbach, J., 2004b. Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *J. Virol.* 78, 7518–7522. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7518-7522.2004>
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646–650. <https://doi.org/10.1038/nature00939>
- Shih, D.S., Carruth, L.M., Anderson, C., Clements, J.E., 1992. Involvement of FOS and JUN in the activation of visna virus gene expression in macrophages through an AP-1 site in the viral LTR. *Virology* 190, 84–91. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)91194-Y](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)91194-Y)
- Shoenfeld, Y., Agmon-Levin, N., 2011. “ASIA” - Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J. Autoimmun.* <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.07.003>
- Shuaib, M., Green, C., Rashid, M., Duizer, G., Whiting, T.L., 2010. Herd risk factors associated with seroprevalence of Maedi-Visna in the Manitoba sheep population. *Can. Vet. J.* 51, 385–390.
- Sider, L.H., Heaton, M.P., Chitko-McKown, C.G., Harhay, G.P., Smith, T.P., Leymaster, K.A., Laegreid, W.W., Clawson, M.L., 2013. Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. *Vet. Res.* 44, 64. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-64>
- Sigurdardóttir, B., Thormar, H., 1964. Isolation of a Viral Agent from the Lungs of Sheep Affected with Maedi. *J. Infect. Dis.* 114, 55–60.
- Sigurdsson, B., 1954. Maedi, A Slow Progressive Pneumonia of Sheep: An Epizootological and a Pathological Study. *Br. Vet. J.* 110, 255–270. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)50273-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)50273-0)
- Sigurdsson, B., Grímsson, H., Pálsson, P.A., 1952. Maedi, a Chronic, Progressive Infection of Sheep's Lungs. *J. Infect. Dis.* 90, 233–241.
- Sigurdsson, B., Pálsson, P.A., 1958. Visna of sheep; a slow, demyelinating infection. *Br. J. Exp. Pathol.* 39, 519–528.
- Sigurdsson, B., Pálsson, P.A., Grímsson, H., 1957. Visna, a Demyelinating Transmissible Disease of Sheep. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 16, 389–403. <https://doi.org/10.1097/00005072-195707000-00010>
- Sigurdsson, B., Pálsson, P.A., Tryggvadóttir, A., 1953. Transmission Experiments with Maedi. *J. Infect. Dis.* 93, 166–175.

- Sihvonen, L., 1984. Late immune responses in experimental maedi. *Vet. Microbiol.* 9, 205–213. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(84\)90038-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(84)90038-5)
- Sihvonen, L., 1981. Early immune responses in experimental maedi. *Res. Vet. Sci.* 30, 217–222. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)32584-0](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)32584-0)
- Sihvonen, L., 1980. Studies on Transmission of Maedi Virus to Lambs. *Acta Vet. Scand.* 21, 689–698. <https://doi.org/10.1186/BF03546855>
- Sihvonen, L., Hirvelä-Koski, V., Nuotio, L., Kokkonen, U.M., 1999. Serological survey and epidemiological investigation of maedi-visna in sheep in Finland. *Vet. Microbiol.* 65, 265–270. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00312-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00312-5)
- Sihvonen, L., Nuotio, L., Rikula, U., Hirvelä-Koski, V., Kokkonen, U.M., 2000. Preventing the spread of maedi-visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. *Prev. Vet. Med.* 47, 213–220. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00162-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00162-8)
- Simard, C., Morley, R.S., 1991. Seroprevalence of maedi-visna in Canadian sheep. *Can. J. Vet. Res.* 55, 269–273.
- Smyth, R.P., Davenport, M.P., Mak, J., 2012. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res.* 169, 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.015>
- Snowder, G., Gates, N., ... H.G.-J. of the A., 1990, U., 1990. Prevalence and effect of subclinical ovine progressive pneumonia virus infection on ewe wool and lamb production. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 475–9.
- Snowder, G.D., Gates, N.L., Glimp, H.A., Knowles, D.P., 1991. The effect of production trait selection over 10 years on the seroprevalence of ovine progressive pneumonia virus in a closed flock. *Sheep Res J* 7, 24–28.
- Soares, E., Jesus, S., Borges, O., 2018. Chitosan:β-glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis B antigen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 131, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.018>
- Soos, T., 1987. Some problems of testing foot-and-mouth disease vaccine. I. Inocuity testing. *Acta Vet Hung.* 35, 319–330.
- Sotelo, J., Gutierrez, A., Fernandez, M., Carmenes, P., Muñoz, M., 1995. Seroprevalencia de la infección por lentivirus en ganado ovino y caprino de la provincia de León., in: IV Congreso Nacional de Virología. Madrid.
- Souza, K.C. de, Pinheiro, R.R., Santos, D.O., Brito, R.L.L. de, Rodrigues, A. de S., Sider, L.H., Paula, N.R.O., Avila, A.A., Cardoso, J. de F.S., Andrioli, A., 2013. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. *Small Rumin. Res.* 109, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.031>
- Spickler, A.R., Roth, J.A., 2003. Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 273–281. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02448.x>
- Stavrou, S., Crawford, D., Blouch, K., Browne, E.P., Kohli, R.M., Ross, S.R., 2014. Different Modes of Retrovirus Restriction by Human APOBEC3A and APOBEC3G In Vivo. *PLoS Pathog.* 10, e1004145. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004145>
- Steinhagen, F., Kinjo, T., Bode, C., Klinman, D.M., 2011. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine.* <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.002>
- Stonos, N., Wootton, S., Karrow, N., 2014. Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections. *Viruses* 6, 3311–3333. <https://doi.org/10.3390/v6083311>
- Stowring, L., Haase, A.T., Petursson, G., Georgsson, G., Pálsson, P., Lutley, R., Roos, R., Szuchet, S., 1985. Detection of visna virus antigens and RNA in glial cells in foci of demyelination. *Virology* 141, 311–318. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90264-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90264-8)
- Strassburg, M.A., 1982. The global eradication of smallpox. *Am. J. Infect. Control* 10, 53–59. [https://doi.org/10.1016/0196-6553\(82\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0196-6553(82)90003-7)
- Straw, B.E., Shin, S., Callihan, D., Petersen, M., 1990. Antibody production and tissue irritation in swine vaccinated with *Actinobacillus bacterins* containing various adjuvants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 600–604.
- Suveges, T., Szeky, A., 1973. Incidence of Maedi (chronic progressive interstitial pneumonia) among sheep in Hungary. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 23, 205–217.
- T. Blackard, J., 2012. HIV Compartmentalization: A Review on a Clinically Important Phenomenon. *Curr. HIV Res.* 10, 133–142. <https://doi.org/10.2174/157016212799937245>
- Terai, C., Carson, D.A., 1991. Pyrimidine nucleotide and nucleic acid synthesis in human monocytes and macrophages. *Exp. Cell Res.* 193, 375–381. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90110-G](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90110-G)
- Thormar, H., 2013. The Origin of Lentivirus Research: Maedi-Visna Virus. *Curr. HIV Res.* 11, 2–9. <https://doi.org/10.2174/157016213804999212>
- Tiley, L.S., Malim, M.H., Cullen, B.R., 1991. Conserved functional organization of the human immunodeficiency virus type 1 and visna virus Rev proteins. *J. Virol.* 65.
- Tomonaga, K., Norimine, J., Shin, Y.S., Fukasawa, M., Miyazawa, T., Adachi, A., Toyosaki, T., Kawaguchi, Y., Kai, C., Mikami, T., 1992. Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. *J. Virol.* 66.

- Toohy, K.L., Haase, A.T., 1994. The rev Gene of Visna Virus Is Required for Productive Infection. *Virology* 200, 276–280. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1186>
- Torfason, E.G., Gudnadóttir, M., Löve, A., 1992. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of visna-maedi. *Arch. Virol.* 123, 47–58. <https://doi.org/10.1007/BF01317137>
- Torsteinsdóttir, S., Andrésdóttir, V., Arnarson, H., Petursson, G., 2007. Immune response to Maedi-Visna virus Maedi Visna virus DNA vaccination View project Insect bite hypersensitivity (summer eczema) in horses View project. *Front Biosci* 12, 1532–1543. <https://doi.org/10.2741/2166>
- Torsteinsdóttir, S., Matthíasdóttir, S., Vidarsdóttir, N., Svansson, V., Pétursson, G., 2003. Intratracheal inoculation as an efficient route of experimental infection with maedi-visna virus. *Res. Vet. Sci.* 75, 245–247. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00098-5)
- Toussi, D., Massari, P., 2014. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. *Vaccines* 2, 323–353. <https://doi.org/10.3390/vaccines2020323>
- Travassos, C.E., Benoît, C., Valas, S., Da Silva, A.G., Perrin, G., 1999. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rumin. Res.* 32, 101–106. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(98\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(98)00172-2)
- Trujillo, J.D., Hötzel, K.J., Snekvik, K.R., Cheevers, W.P., 2004. Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: Disease status is predicted by SU antibody isotype. *Virology* 325, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.048>
- Tsumiyama, K., Miyazaki, Y., Shiozawa, S., 2009. Self-Organized Criticality Theory of Autoimmunity. *PLoS One* 4, e8382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008382>
- Tung, T., Phalen, D., Toribio, J.-A., 2015. Adverse reactions in a population of Sydney pet rabbits vaccinated against rabbit calicivirus. *Aust. Vet. J.* 93, 405–411. <https://doi.org/10.1111/avj.12373>
- Turelli, P., Pétursson, G., Guiguen, F., Mornex, J.F., Vigne, R., Quérat, G., 1996. Replication properties of dUTPase-deficient mutants of caprine and ovine lentiviruses. *J. Virol.* 70.
- Turin, L., Pisoni, G., Giannino, M.L., Antonini, M., Rosati, S., Ruffo, G., Moroni, P., 2005. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Rumin. Res.* 57, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.06.018>
- Valas, S., Le Ven, A., Croise, B., Maquigneau, M., Perrin, C., 2011. Interference of vaccination against bluetongue virus serotypes 1 and 8 with serological diagnosis of small-ruminant lentivirus infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 513–7. <https://doi.org/10.1128/CVI.00343-10>
- Valas, S., Rolland, M., Perrin, C., Perrin, G., Mamoun, R.Z., 2008. Characterization of a new 5' splice site within the caprine arthritis encephalitis virus genome: Evidence for a novel auxiliary protein. *Retrovirology* 5, 22. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-22>
- Valli, J.L., 2015. Suspected adverse reactions to vaccination in Canadian dogs and cats. *Can. Vet. J.* 56, 1090–1092.
- Valsson, O., Alenius, S., Nielsen, T.K., Nyberg, O., Salmela, P., 2001. Surveillance of ruminant diseases in the Nordic countries. *Acta Vet. Scand.* <https://doi.org/10.1186/1751-0147-42-S1-S27>
- Valtulini, S., Macchi, C., Ballanti, P., Cherel, Y., Laval, A., Theaker, J.M., Bak, M., Ferretti, E., Morvan, H., 2005. Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs. *Vaccine* 23, 3999–4004. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.06.058>
- Van Der Maaten, M.J., Boothe, A.D., Seger, C.L., 1972. Isolation of a Virus From Cattle With Persistent Lymphocytosis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 49, 1649–1657. <https://doi.org/10.1093/jnci/49.6.1649>
- Vartanian, J.P., Meyerhans, A., Asjö, B., Wain-Hobson, S., 1991. Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J. Virol.* 65.
- Vascellari, M., Melchioti, E., Bozza, M.A., Mutinelli, F., 2003. Fibrosarcomas at Presumed Sites of Injection in Dogs: Characteristics and Comparison with Non-vaccination Site Fibrosarcomas and Feline Post-vaccinal Fibrosarcomas. *J. Vet. Med. Ser. A* 50, 286–291. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2003.00544.x>
- Vermeire, J., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Landi, A., Iannucci, V., Van Nuffel, A., Taghon, T., Pizzato, M., Verhasselt, B., 2012. 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* 7, e50859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050859>
- Villet, S., Bouzar, B.A., Morin, T., Verdier, G., Legras, C., Chebloune, Y., 2003a. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis Encephalitis Virus Genomes Encode a Vpr-Like but No Tat Protein. *J. Virol.* 77, 9632–9638. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.17.9632-9638.2003>
- Villet, S., Faure, C., Bouzar, B.A., Morin, T., Verdier, G., Chebloune, Y., Legras, C., 2003b. Lack of trans-activation function for Maedi Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus Tat proteins. *Virology* 307, 317–327. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00076-4)
- Villoria, M., Leginagoikoa, I., Luján, L., Pérez, M., Salazar, E., Berriatua, E., Juste, R.A., Minguijón, E., 2013. Detection of Small Ruminant Lentivirus in environmental samples of air and water. *Small Rumin. Res.* 110, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.025>

- Vitu, C., Russo, P., Filippi, P., Vigne, R., Querat, G., Giauffret, A., 1982. Une technique ELISA pour la detection des anticorps anti-virus maedi-visna. Etude comparative avec l'immunodiffusion en gelose et la fixation du complement. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 469–481. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(82\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0147-9571(82)90073-X)
- Voysey, M., Clemens, S.A.C., Madhi, S.A., et al., 2021. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 397, 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
- Warren-Gash, C., Forbes, H., Breuer, J., 2017. Varicella and herpes zoster vaccine development: lessons learned. *Expert Rev. Vaccines*. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1394843>
- Watt, N., Cott, P., Collie, D., 1994. Maedi-visna virus infection in practice. *Pract.* 16, 239–247.
- Watt, N.J., MacIntyre, N., Collie, D., Sargan, D., McConnell, I., 1992. Phenotypic analysis of lymphocyte populations in the lungs and regional lymphoid tissue of sheep naturally infected with maedi visna virus. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 204–208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1992.tb07929.x>
- White, S.N., Mousel, M.R., Herrmann-Hoesing, L.M., Reynolds, J.O., Leymaster, K.A., Neiberger, H.L., Lewis, G.S., Knowles, D.P., 2012. Genome-Wide Association Identifies Multiple Genomic Regions Associated with Susceptibility to and Control of Ovine Lentivirus. *PLoS One* 7, e47829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047829>
- White, S.N., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Herrmann-Hoesing, L.M., Knowles, D.P., 2014. Deletion variant near *ZNF389* is associated with control of ovine lentivirus in multiple sheep flocks. *Anim. Genet.* 45, 297–300. <https://doi.org/10.1111/age.12107>
- White, S.N., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Lewis, G.S., Herrmann-Hoesing, L.M., 2009. Common promoter deletion is associated with 3.9-fold differential transcription of ovine *CCR5* and reduced proviral level of ovine progressive pneumonia virus. *Anim. Genet.* 40, 583–589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01882.x>
- Winward, L.D., Leendertsen, L., Shen, D.T., 1979. Microimmunodiffusion test for diagnosis of ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 40, 564–566.
- Woldemeskel, M., Tibbo, M., 2010. Pulmonary adenomatosis and maedi-visna in Ethiopian central highland sheep: A microscopic study. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 995–999. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9520-7>
- Woodard, J.C., Gaskin, J.M., Poulos, P.W., MacKay, R.J., BurrIDGE, M.J., 1982. Caprine arthritis-encephalitis: clinicopathologic study. *Am. J. Vet. Res.* 43, 2085–2096.
- Woodward, K.N., 2009. Adverse reactions to vaccines. In: *Veterinary Pharmacovigilance: Adverse Reactions to Veterinary Medicinal Products*, 1st Edit. ed.
- Yan, N., Chen, Z.J., 2012. Intrinsic antiviral immunity. *Nat. Immunol.* 13, 214–222. <https://doi.org/10.1038/ni.2229>
- Yeruham, I., Perl, S., Nyska, A., Abraham, A., Davidson, M., Haymovitch, M., Zamir, O., Grinstein, H., 1994. Adverse reactions in cattle to a capripox vaccine. *Vet. Rec.* 135, 330–332. <https://doi.org/10.1136/vr.135.14.330>
- Yu, Q., Wang, X., Fan, X., 2017. A new adjuvant MTOM mediates Mycobacterium tuberculosis subunit vaccine to enhance Th1-type T cell immune responses and IL-2+ T cells. *Front. Immunol.* 8, 585. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00585>
- Zanoni, R., Krieg, A., Peterhans, E., 1989. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.* 27.
- Zanoni, R.G., 1998. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 79, 1951–1961. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-8-1951>
- Zanoni, R.G., Cordano, P., Nauta, I.M., Peterhans, E., 1996. Die PCR für den Nachweis von Lentiviren der kleinen Wiederkäuer. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 138, 93–98.
- Zanoni, R.G., Nauta, I.M., Pauli, U., Peterhans, E., 1991. 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.* 29.
- Zanoni, R.G., Vogt, H.-R., Pohl, B., Böttcher, J., Bommeli, W., Peterhans, E., 1994. An ELISA Based on Whole Virus for the Detection of Antibodies to Small-ruminant Lentiviruses. *J. Vet. Med. Ser. B* 41, 662–669. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1994.tb00277.x>
- Zhang, Z., Watt, N.J., Hopkins, J., Harkiss, G., Woodall, C.J., 2000. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Virol. Methods* 86, 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00169-X)
- Zink, M.C., Johnson, L.K., 1994. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Res.* 32, 139–154. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)90039-6)

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La vacunación es la mejor herramienta para controlar y erradicar las enfermedades infecciosas, tanto en la medicina humana como en la veterinaria. Las vacunas que más se emplean en medicina veterinaria se basan en la inoculación del patógeno inactivado, o alguna de sus partes, combinado con la presencia de adyuvantes, generalmente sales de aluminio. Estas vacunas proteicas han demostrado buenos perfiles de protección y seguridad permitiendo el control epidemiológico de un buen número de enfermedades, principalmente mediante la generación de respuestas de anticuerpos. Sin embargo, algunas infecciones virales escapan al control de los anticuerpos y, por otro lado, algunos adyuvantes pueden presentar reacciones adversas como la formación de granulomas post-vacunales (estructuras subcutáneas compuestas por macrófagos), común en muchas especies animales que, en el caso de los ovinos, son persistentes.

La infección por lentivirus es una de las más extendidas en el ganado ovino y caprino en todo el mundo, causando una enfermedad crónica incurable para la que no existen vacunas disponibles. Así, el control de la enfermedad se realiza mediante la identificación de los animales seropositivos y la toma de medidas zoonosanitarias enfocadas a evitar el contacto con los animales infectados. Además, recientemente se ha propuesto que la selección genética de individuos resistentes a la enfermedad puede realizarse mediante la caracterización genética del polimorfismo E35K de la proteína TMEM154.

El virus Maedi Visna, antiguo prototipo del género lentivirus, y el virus de la artritis encefalitis caprina, inicialmente considerados dos entidades etiológicas diferentes, se agrupan filogenéticamente dentro de los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV, *Small Ruminant Lentivirus*) como genotipos A y B, respectivamente. Estos genotipos principales agrupan a su vez más de 30 subtipos que, junto con los genotipos C y E de ámbito geográfico más restringido y altamente divergentes, muestran una elevada heterogeneidad genética y antigénica que determina la forma de la enfermedad, afecta la precisión del diagnóstico serológico y molecular, y dificulta el desarrollo de estrategias de control y vacunación.

La enfermedad puede aparecer en cuatro formas típicas afectando a la glándula mamaria, los pulmones, las articulaciones y/o el sistema nervioso central y, si bien habitualmente no causa grandes pérdidas directas, es responsable de descensos productivos, incremento de infecciones secundarias y pérdida de condición corporal de los

animales. Sin embargo, muchos estudios ponen en cuestión las pérdidas productivas debidas a la infección ya que no se encuentran diferencias en los rasgos evaluados entre los animales seropositivos y seronegativos.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto los objetivos a desarrollar en esta Tesis son:

- 1. Caracterizar la presencia de SRLV en granulomas persistentes derivados de la inoculación con hidróxido de aluminio y su importancia en la patogénesis de la enfermedad.**
- 2. Evaluar la eficiencia del diagnóstico serológico y molecular, tanto individualmente como en conjunto, clasificando una población ovina amplia.**
- 3. Cuantificar y valorar diferentes rasgos productivos, tanto lecheros como cárnicos, en los animales clasificados atendiendo a su estatus sanitario.**
- 4. Analizar el polimorfismo E35K de la proteína TMEM154 tanto en animales positivos como negativos y valorar su posible asociación con la ausencia o presencia de infección.**

CHAPTER I

***Replication of Small Ruminant Lentiviruses in Aluminium Hydroxide-Induced
Granulomas in Sheep: a Potential New Factor for Viral Dissemination***

ABSTRACT

Aluminum (Al)-based salts are widely used adjuvants in ruminants and other species to strengthen the immune response elicited against vaccine antigen(s). However, they can lead to the formation of long-lasting granulomas composed of abundant activated macrophages. Small ruminant lentiviruses (SRLV) are widely distributed macrophage-tropic retroviruses that cause persistent infections in sheep and goats. Infected monocytes/macrophages and dendritic cells establish an inflammatory microenvironment that eventually leads to clinical manifestations. The aim of this work was to study the effect of Al-induced granulomas in the replication and pathogenesis of SRLV. Eleven adult, naturally SRLV-infected sheep showing clinical arthritis were distributed in vaccine (n=6), adjuvant-only (n=3), and control (n=2) groups and inoculated with commercial Al-based vaccines, Al hydroxide adjuvant alone, or phosphate-buffered saline, respectively. In vitro studies demonstrated viral replication in Al-induced granulomas in 5 out of 10 sheep. Immunohistochemistry (IHC) evinced granular, intracytoplasmic SRLV presence in macrophages within granulomas. Viral sequences obtained from granulomas, blood monocytes, and other tissues were highly similar in most animals, suggesting virus circulation among body compartments. However, notable differences between isolated strains in granulomas and other tissues in specific animals were also noted. Interestingly, the B2 subtype was the most commonly found SRLV genotype, reaching a wider body distribution than previously described. Recombination events between genotypes B2 and A3 along the gag region were identified in two sheep. Our results indicate that Al-hydroxide derived granulomas may represent an ideal compartment for SRLV replication, perhaps altering natural SRLV infection by providing a new, suitable target tissue.

Echeverría, I.*, de Miguel, R.*, Asín, J., Rodríguez-Largo, A., Fernández, A., Pérez, M., de Andrés, D., Luján, L., Reina, R., (2020). Replication of Small Ruminant Lentiviruses in Aluminum Hydroxide-Induced Granulomas in Sheep: a Potential New Factor for Viral Dissemination. *Journal of Virology*, vol. 95, no 2.

* Irache Echeverría and Ricardo de Miguel contributed equally to this work.

INTRODUCTION

Vaccines play a major role in controlling infectious diseases in animals and humans (Canouï and Launay, 2019). Most vaccines are based on inactivated pathogens or recombinant proteins that are often poorly immunogenic. As a consequence, adjuvants are needed to strengthen the immune response against vaccine antigens (Apostólico et al., 2016; Bastola et al., 2017). Adjuvants in vaccines intended for veterinary use are mainly based on aluminum (Al) compounds and formulated as different salts, mostly Al hydroxide (Burakova et al., 2018). Al content in vaccines and several other factors, such as individual genetic background, number of inoculations, and antigen immunogenicity may raise undesired side effects, including local inflammation or fever (Roth, 1999). In sheep, postinjection inflammation leading to granuloma formation is a consistent response after the inoculation of Al adjuvant (Asín et al., 2019). These granulomas consist of Al-loaded activated macrophages and multinucleated giant cells (Asín et al., 2019), and they have been described in almost all species, including mice (Crépeaux et al., 2017), pigs (Valtulini et al., 2005), cows (Marcato, 1990), nonhuman primates (Chamanza, 2012), and humans (Chong et al., 2006; Fawcett and Smith, 1984).

Small ruminant lentiviruses (SRLV) are macrophage-tropic retroviruses that cause highly prevalent chronic infections in sheep and goats, linked to important detrimental effects on animal production and breeding stock trade restrictions (Echeverría et al., 2020). SRLV have a defined tropism for the mononuclear-phagocytic system altering cytokine production, MHC-II expression, and maturation state, thus leading to persistent inflammation. Infection is highly restricted in monocytes and classically activated M1-macrophages, but it is productive in M2-like and tissue-differentiated macrophages (Blacklaws, 2012; Crespo et al., 2011). SRLV systemically disseminate and mostly affect, in an immune-mediated manner, lungs, brain, mammary gland, and joints (Minguijón et al., 2015). Four main genotypes (A, B, C, and E) and more than 35 subgroups with significant antigenic heterogeneity have been characterized (Michiels et al., 2020). In the articular form, the main clinical sign is unilateral or bilateral carpal arthritis; in sheep it is mainly caused by genotype B2 strains (Glaría et al., 2009; Pérez et al., 2015). On the other hand, genotype A strains have been associated with outbreaks of encephalitis (Glaría et al., 2012; Thormar, 2013) and are also related to pneumonia and mastitis. Recombination between the most widely distributed SRLV genotypes A and B has been reported in goats from Italy

(Pisoni et al., 2007a), Canada (L'Homme et al., 2015), and Mexico (Ramírez et al., 2011), though only a single description of lentiviral recombination has been reported in sheep (Andrésdóttir, 2003). Coinfection and recombination are hallmarks of lentivirus infections and may potentially expand their host-range species and promote colonization of different organs (Minardi da Cruz et al., 2013). After infection through respiratory secretions or colostrum intake, monocytes carrying the integrated provirus may distribute and differentiate into tissue macrophages, triggering viral replication and inflammation and contributing to lesion development in target organs (Minguijón et al., 2015). Macrophages in granulomas might represent a replication site for SRLV that could modify viral pathogenesis by altering virus replication and immunological host responses. The aim of this work was to study the potential SRLV presence, replication, and recombination in AI-induced granulomas of naturally infected sheep.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

Experimental design and procedures were licensed by the Ethical Committee of the University of Zaragoza (PI15/14). Requirements of the Spanish Policy for Animal Protection (RED53/2013) and the European Union Directive 2010/63 on the protection of experimental animals were fulfilled at all times. Nine adult (>4 year-old) Rasa Aragonesa ewes at the same production stage naturally infected by SRLV and showing lentivirus-induced bilateral arthritis in carpal joints were selected from three different flocks in Aragón (Spain). No other selection criteria were included at this stage. Upon checking for bacterial growth, one animal showed *Chlamydia spp.* growth in joints and it was discarded from this study. Sheep were lodged at the experimental farm of the University of Zaragoza, and kept for 75 days under appropriate housing, management, and diet conditions. Animals were divided into 3 groups and injected with different substances as follows: (i) vaccine group (n=4; animals V-1, V-2, V-3, and V-4) was inoculated with commercial vaccines; (ii) adjuvant-only group (n=3; animals A-5, A-6, and A-7) received Al hydroxide (Alhydrogel, CZ Veterinaria); and (iii) control group (n=2; animals C-8 and C-9) was injected with phosphate-buffered saline (PBS). Vaccination records of these animals prior to the study were unknown.

The vaccine inoculation protocol during the experiment followed the manufacturer's instructions, i.e., prime vaccination and boosting at 21 to 30 days. After the recommended resting period, a second round of vaccination was applied following the same protocol. Commercial vaccines, antigens, inoculation days, and Al dosage are detailed in **Figure 1**. Animals received 8 subcutaneous inoculations distributed across 4 injection dates, i.e., two vaccines were applied at each date, one at each thoracic flank, with 21-day intervals between them. The four injections at each side were symmetrically distributed, forming a square in the subcutaneous thoracic tissue. Euthanasia was carried out at 75 days post first inoculation (dpi). Al content of each inoculum was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry. Vaccine and adjuvant-only groups received a total of 43.36 mg of Al per animal. Al content in PBS was always below the detection limit of the technique (0.074 g/ml). A further vaccine-extra group (n=2; animals V-10 and V-11) of the same breed and age was established after the end of this first experiment to confirm and complement the molecular results obtained. These two sheep were housed under the same

conditions and subjected to the same injection protocol until euthanasia at 40 dpi, therefore receiving four inoculations in total.

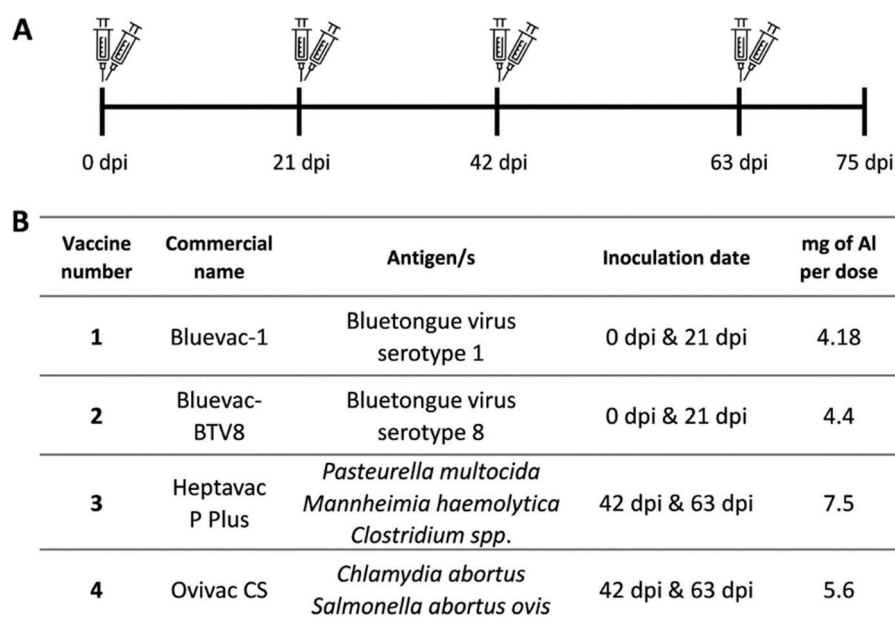


Figure 1. Inoculation schedule and vaccines used. (A) Inoculations were administered at 0, 21, 42, and 63 days post first inoculation (dpi). Animals were euthanized at 75 dpi. (B) Description of the vaccines used. Aluminum (Al) content was established by inductively coupled mass spectrometry and calculated per dose.

In vivo studies

General clinical examination and blood sampling were performed at 0, 40, and 75 dpi. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on a Ficoll-Hypaque gradient ($\delta=1.077$; Lymphoprep Axis-Shield) for DNA extraction from 6 ml EDTA tubes (BD Vacutainer), and 2 ml of plasma was stored at -20°C for antibody analysis using ELISA.

Pathology

Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin for 48 to 72 h. Additionally, selected samples from postvaccination granulomas were fixed in a zinc solution for 36 h to carry out immunohistochemistry (IHC) against the SRLV capsid antigen (Julio Benavides et al., 2006).

Samples were routinely processed for paraffin embedding and $4\ \mu\text{m}$ sections were stained with either standard hematoxylin-eosin (HE), lumogallion, or IHC. Lumogallion is a specific staining for Al that was carried out only in granulomas, following a previously

described protocol (Asín et al., 2019; Mirza et al., 2016). For IHC, samples were subjected to pretreatment for antigen retrieval (30 min in a solution of 10 mM citric acid [pH 6] immersed in a water bath at 95°C), endogenous peroxidase inhibition, and nonspecific binding site blocking (20 min in normal horse serum diluted 1:200 in PBS). Tissue samples were then incubated overnight at 4°C with a specific monoclonal antibody against the p28 capsid protein of SRLV (CAEP5A1, VMRD), labeled for 30 min at room temperature with anti-mouse EnVision HRP system (Dako, Agilent Technologies), and revealed with 3-3'-diaminobenzidine. The specificity of the technique was controlled by immunolabeling granulomas from SRLV-free animals, obtained from previous studies (Asín et al., 2019).

Serological tests

Blood plasma was used for SRLV antibody screening using two commercially available ELISA kits: (i) Elitest-MVV (Hyphen-Biomed, France), based on p25 recombinant protein and a transmembrane synthetic peptide, both derived from genotype A (Saman et al., 1999); and (ii) Eradikit SRLV Screening kit (IN3 diagnostic, Italy), based on a mixture of Gag and Env antigens belonging to three different SRLV genotypes (Reina et al., 2009). Both assays were performed to confirm infection status at the beginning and the end of the experiment.

Virus isolation

For the *in vitro* studies, the following granulomas were collected at necropsy: (i) one granuloma per animal of the vaccine and adjuvant-only groups, (ii) a single granuloma found in control sheep C-8, and (iii) the four granulomas found in each animal of the vaccine-extra group. Therefore, a total of 16 granulomas were analyzed. Granulomas and tissue samples from carpal joints, spleen, mediastinal lymph node, brain, and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were kept in PBS with antibiotic/antimycotic mix solution (Sigma) and either processed immediately or stored in RNAlater (Thermo Fisher) at -80°C until used. Samples kept in PBS were cut in small pieces (1 cm³) with a scalpel blade and seeded in 25 cm² flasks with Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complete medium, supplemented with 1% L-glutamine, 1% vitamins, 1% antibiotics/antimycotics mix, 1% nonessential amino acids, 10 mM sodium pyruvate, 50 µM β-mercaptoethanol, and 10% fetal bovine serum (FBS). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and medium was partially replaced every 3 to 7 days. Once per week, medium was collected and reverse

transcriptase (RT) activity was determined using SYBR green-based PCR-enhanced reverse transcriptase assays (SG-PERT) (Vermeire et al., 2012). The presence of cytopathic effect was observed under light microscopy at each culture passage.

Genetic characterization

Genomic DNA from samples was extracted, using E.Z.N.A Blood DNA minikit (Omega bio-tek) from the following sources: (i) PBMCs; (ii) trypsinized cultured cells from tissue cultures with positive RT activity; and (iii) tissue samples kept in RNAlater previously homogenized in a Micro-Dismembrator U (Sartorius) using steel beads. SRLV viral DNA detection was carried out by partial amplification of LTR, gag, and pol using PCR with primers and conditions previously described and detailed in Table 3 (Grego et al., 2002; L'Homme et al., 2011; Reina et al., 2006; Rimstad et al., 1993; Shah et al., 2004; Zanoni et al., 1992). Following PCR, classical amplicons were visualized in 1% agarose gels, purified, and cloned into pGEMT-easy (Promega) or pJET1.2 blunt vector (Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. Three positive clones were submitted to external Sanger sequencing (Stab Vida). Sequence analysis was carried out by comparison with GenBank-deposited sequences using BioEdit, Chromas, and SnapGene softwares. Phylogenetic trees were created using the web application (www.phylogeny.fr) and modified using MEGA version 10.0.5 software. SimPlot v.3.5.1 software was used to define genomic regions that displayed significant percentages of nucleotide sequence identity and provide indications of possible recombination events. Sequences obtained in this study were compared with reference sequences from all described SRLV genotypes.

RESULTS

SRLV presence in animals

Clinical examination and cell blood count revealed no significant differences between the treatment groups during the inoculation scheme (Kruskal-Wallis; $P>0.05$) (**Figure 1**).

Infection by SRLV was confirmed in all the animals by two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and reactivity remained positive until the end of the experiment. PCR performed on DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was less sensitive as a diagnostic tool compared to ELISAs and identified 5 out of 11 and 6 out of 9 infected animals at the beginning and the end of the experiment, respectively (**Table 1**).

Table 1. ELISA and PCR results from sheep naturally infected with small ruminant lentiviruses, including presence of virus in granuloma, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and spleen tissue cultures.

Group	Animal	ELISA ^a			PCR ^a			RT activity ^a		
		0 dpi	40 dpi	75 dpi	0 dpi	40 dpi	75 dpi	Granuloma	BAL	Spleen
Vaccine	V-1	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	V-2	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	V-3	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	V-4	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	V-10	+	+	ND	+	+	ND	+	ND	ND
	V-11	+	+	ND	+	+	ND	+	ND	ND
Adjuvant-only	A-5	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	A-6	+	+	+	+	-	+	-	+	+
	A-7	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Control	C-8	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	C-9	+	+	+	+	-	+	ND	+	-

^a Animals from the vaccine (V), adjuvant-only (A), and control (C) groups were analyzed by commercial ELISA and diagnostic PCR targeting the gag region. PCR was performed on DNA isolated from PBMCs. Granuloma samples were cultured in vitro and analyzed for RT activity by SG-PERT. ND, not determined; dpi, days post first inoculation.

Granulomas in animal groups and SRLV presence

At necropsy, 31 subcutaneous granulomas were recovered in the vaccine group out of 32 vaccine injections (96.7%). In the adjuvant-only group, 19 granulomas were isolated out of 24 inoculations (79.2%). Interestingly, one of the control animals (C-8) exhibited a single, small-sized granuloma, possibly associated with a prior on-farm vaccination. Histologically, granulomas were composed of abundant epithelioid macrophages and occasional multinucleated giant cells admixed with moderate numbers of lymphocytes, plasma cells, and fibroblasts immersed in abundant collagenous matrix (**Figure 2A**). These granulomas inconsistently showed a central necrotic core. Lumogallion staining revealed abundant intracytoplasmic Al-positive deposits within epithelioid macrophages and giant cells in all evaluated granulomas (**Figure 2B**). The presence of SRLV in postvaccination granulomas was assessed by immunohistochemistry (IHC). Granular, intracytoplasmic positive immunolabeling was found in macrophages and multinucleated giant cells, whereas no labeling was observed in fibrous capsule, lymphocytes, or plasma cells (**Figure 2C and D**). Granulomas from SRLV negative animals consistently showed no staining.

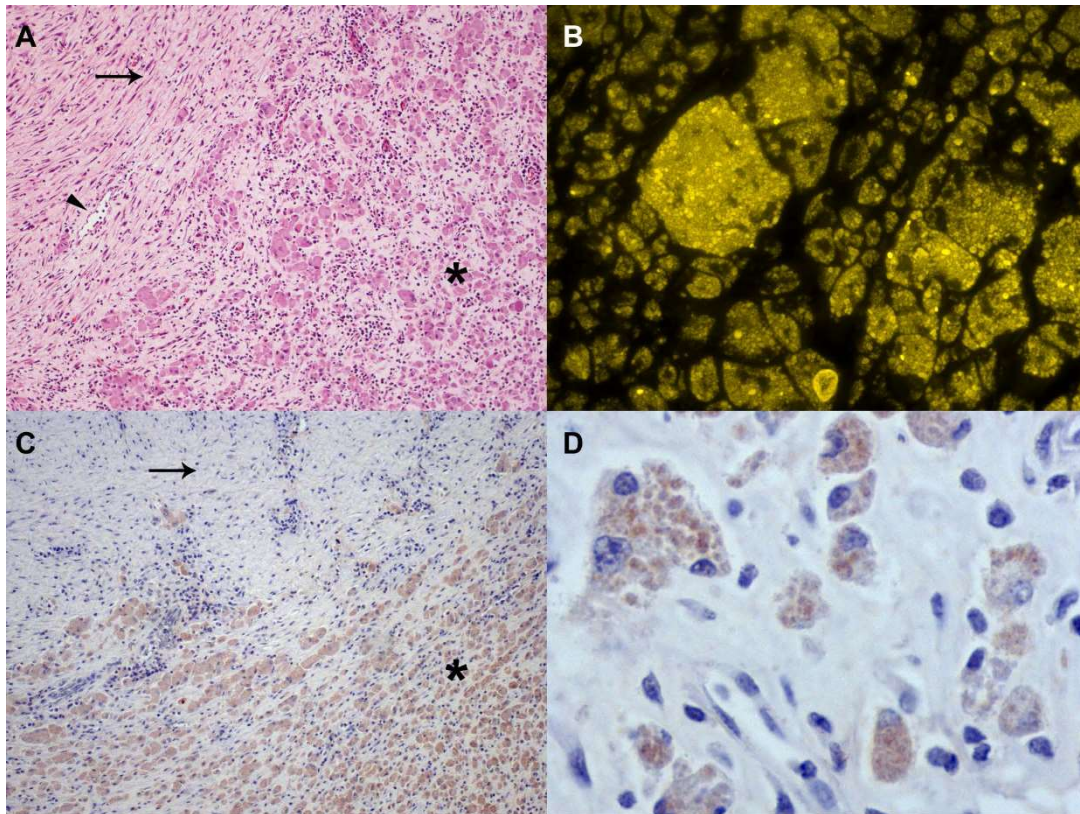


Figure 2. Postvaccination granuloma. (A) Abundant epithelioid macrophages and multinucleated giant cells (asterisk) intermingled with lymphocytes and plasma cells are surrounded by dense fibrous (arrow) tissue and neovessels (arrowhead). Hematoxylin-eosin stain, 10X magnification. (B) Multiple intense yellowish fluorescent aluminum (Al) deposits are located within the cytoplasm of macrophages and giant cells. Lumogallion stain, 40X magnification. (C) Positive immunolabelling against Gag proteins of small ruminant lentiviruses (SRLV) of epithelioid macrophages (asterisk) within the granuloma. Note the negative result in the connective tissue (arrow); 10X magnification. (D) Detail of positive macrophages by immunohistochemistry showing granular, intracytoplasmic labeling against SRLV; 40X magnification.

Virus isolation from tissue samples

A total of 16 granulomas were submitted for tissue culture and monitored for cytopathic effects and reverse transcriptase (RT) activity for more than 3 weeks. Granulomas from sheep V-2, V-3, C-8, three out of four granulomas from V-10, and two out of four granulomas from V-11 showed cytopathic effects with the presence of syncytia and/or positive RT supernatants, thus indicating active SRLV replication in 5 out of 10 sheep (**Table 1**). In spleen or bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, 6 out of 9 samples showed active SRLV replication evidenced by the appearance of cytopathic effects in tissue culture and RT activity determinations (**Table 1**)

SRLV genetic characterization

DNA from carpal joint, brain, spleen, mediastinal lymph node, BAL fluid, and granulomas was submitted to SRLV genetic characterization. Positive PCRs from samples were purified, cloned into shuttle plasmids, and sequenced. Genetic regions partially covered by the PCRs (LTR, gag, and pol) allowed phylogenetic classification of the circulating viruses. PCRs covering the capsid and nucleocapsid clustered sequences from PBMCs mainly within B2 genotypes and, just in one animal (V-11), within A genotypes (**Figure 3A**). Sequences covering the LTR, matrix, and capsid depicted exactly the same clustering pattern (**Figure 3B**). The genotype A sequence obtained from sheep V-11 showed values of about 85% similarity compared with GenBank reference sequences, but was not unequivocally assigned to any previously described subgroup (**Table 2**).

DNA from granuloma cultures contained sequences from different SRLV genotypes. In general, genotypes present in granulomas resembled those in PBMCs. Capsid and nucleocapsid fragments designated all the sequences from granulomas as genotype B2 (**Figure 3A**), while sequences spanning LTR and matrix protein clustered in genotypes B2 and A3 (**Figure 3B**). Genotype B2 was the most prevalent genotype and was similar to the previously described SRLV B2 strain 496 (Glaria et al., 2009). However, genotype A, identified in granulomas from animals V-11, A-6, and C-8 (**Figure 3A and B**), were hardly assigned to previously known subtypes, as they showed similarity values of almost 85% in gag and pol genes compared with the genotypes A1, A2, and A3 (**Table 2**).

Table 2. Sequence identity matrix among sequences found in animals V-6, V-11, and C-8 and standard GenBank-deposited sequences for small ruminant lentiviruses from the indicated genotypes.

Sequence ^a	Region	Genotype ^b						
		A1	A2	A3	B2	B1	E	C
V-11 PBMCs t0	<i>gag</i>	0.776	0.822	0.858	0.734	0.722	0.650	0.694
V-11 PBMCs t0	<i>ltr-gag</i>	0.649	0.667	0.752	0.454	0.450	0.510	0.450
V-11 Granuloma	<i>ltr-gag</i>	0.707	0.718	0.815	0.502	0.488	0.554	0.494
A-6 Granuloma	<i>gag</i>	0.727	0.765	0.738	0.941	0.830	0.650	0.735
A-6 Granuloma-1	<i>ltr-gag</i>	0.710	0.707	0.790	0.503	0.486	0.582	0.501
A-6 Granuloma-2	<i>ltr-gag</i>	0.711	0.708	0.791	0.506	0.489	0.585	0.502
A-6 Granuloma-3	<i>ltr-gag</i>	0.710	0.708	0.792	0.503	0.486	0.584	0.502
C-8 Granuloma-1	<i>gag-pol</i>	0.809	0.826	0.847	0.758	0.753	0.721	0.731
C-8 Granuloma-2	<i>gag-pol</i>	0.808	0.826	0.847	0.757	0.752	0.720	0.730
C-8 Granuloma-1	<i>ltr-gag</i>	0.711	0.708	0.791	0.505	0.489	0.584	0.502
C-8 Granuloma-2	<i>ltr-gag</i>	0.711	0.708	0.791	0.505	0.489	0.582	0.502
C-8 Spleen-1	<i>gag-pol</i>	0.744	0.757	0.755	0.870	0.811	0.691	0.746
C-8 Spleen-2	<i>gag-pol</i>	0.751	0.766	0.755	0.874	0.819	0.699	0.754
C-8 Spleen-3	<i>gag-pol</i>	0.750	0.766	0.752	0.874	0.821	0.699	0.754

^a Numbers in sequences represent the different clones analyzed.

^b Values in bold highlight the most similar genotypes.

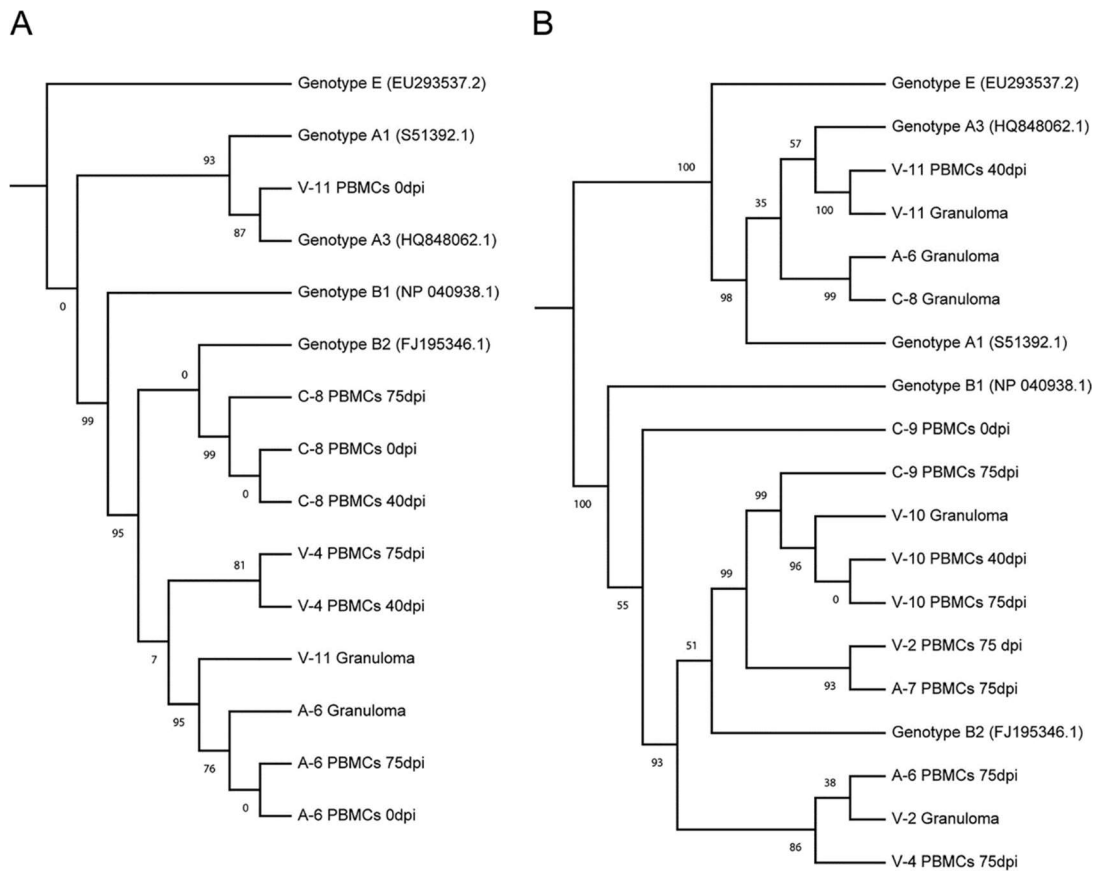


Figure 3. Phylogenetic trees of SRLV sequences isolated from vaccine (V), adjuvant-only (A), and control (C) sheep. (A) SRLV capsid and nucleocapsid sequences obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). (B) SRLV LTR and matrix sequences from PBMCs.

Sequences obtained from spleen or BAL fluid reflected a similar classification compared with PBMCs and granuloma samples, with genotype B2 being present in almost all samples. Remarkably, sequences related to the carpal joint-tropic B2 genotype were also identified in the brains of four sheep (V-2, V-10, V-11, and A-7). Additional genotypes included the unassigned genotype A in spleen from animal V-3 (**Figure 4**). Viral sequences from granulomas, PBMCs, and other tissues were highly similar in animals V-2 and V-10, whereas they showed notable differences between the isolated strains from different tissues in animals V-11, A-6, and C-8 (**Figure 3** and **4**).

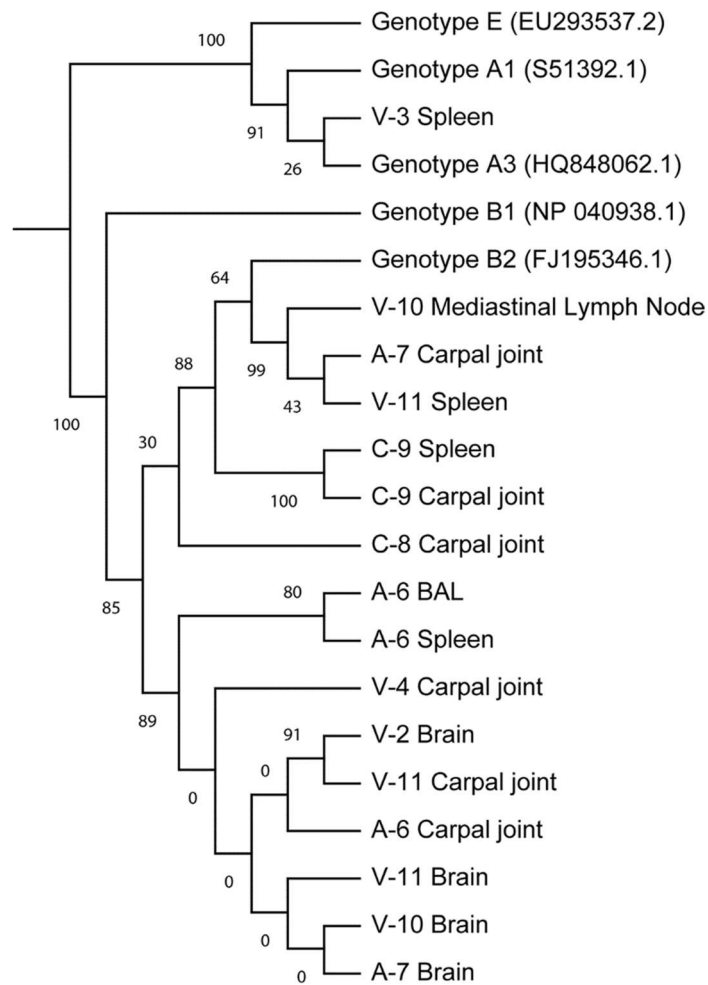


Figure 4. Phylogenetic trees of SRLV matrix sequences isolated from carpal joint, brain, spleen, mediastinal lymph node, and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid obtained from vaccine (V), adjuvant-only (A), and control (C) sheep.

Sequences were analyzed with Bootscan and identified recombination events between genotypes A3 and B2 in spleen of sheep C-8 and in PBMCs of sheep A-6 along *gag-pol* (Fig. 5A) and LTR-*gag* regions (Fig. 5B), respectively.

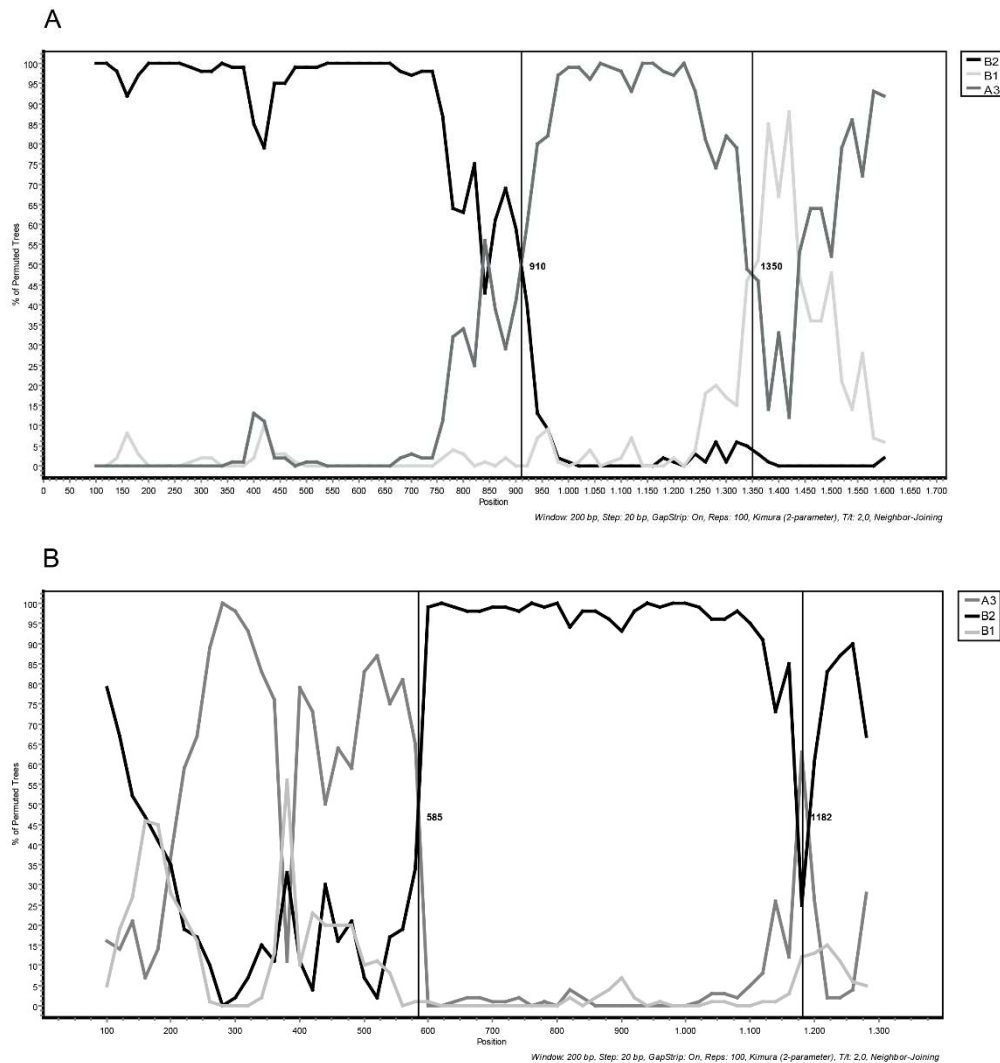


Figure 5. Recombination analysis of *gag-pol* small ruminant lentiviruses sequences from sheep C-8 spleen (A) and LTR-*gag* sequences from sheep A-6 PBMCs (B). Recombinant sequences were detected by Bootscan analysis of consensus sequences in Simplot using a window size of 200, a step size of 20, 1,000 replicates, gap stripping, and the Kimura 2 distance model with the neighbor-joining tree model. Breakpoints on the recombinant sequences are indicated by orange vertical lines. Analysis revealed that SRLV sequences were the result of a recombination between genotype A3 (dark gray) and genotype B2 (black).

DISCUSSION

This work describes the presence and replication of SRLV in AI-induced granulomas of sheep naturally infected with SRLV. The occurrence of lentiviruses in iatrogenic granulomas has never been described before, and the study of possible interactions reveals a novel research field. Sheep provide a unique model for understanding this interaction, as granuloma formation is a constant feature after the injection of AI-containing vaccines in this species (Asín et al., 2019) and SRLV is one of the most widespread viral infections in sheep and goats (Minguijón et al., 2015). SRLV targets macrophages that actively phagocytize AI adjuvants (Asín et al., 2019; Blacklaws, 2012). Therefore, SRLV and AI can merge in single animals depending on the SRLV prevalence and the intensity of vaccination programs.

Vaccination protocols on sheep farms may vary remarkably between areas or countries depending on the health status and challenges, the farming system, and other environmental and management factors (Lacasta et al., 2015; <https://www.ruma.org.uk/>). These protocols can be affected by the implementation of compulsory vaccinations against emerging diseases (Lacasta et al., 2015), such as the vaccination campaigns for bluetongue disease in Spain (Asín et al., 2018) and other European countries (European Commission, 2008) about a decade ago. In the present study, a typical vaccination protocol using the bluetongue virus vaccine was followed to simulate a real-world scenario. Vaccines against bluetongue virus have been associated with increased SRLV seroprevalence on Spanish sheep farms after the compulsory vaccination against the virus (M. Vila, personal communication). However, high SRLV seroconversion rates in the context of this particular vaccination program against bluetongue virus in France have been attributed to false-positive ELISA results due to vaccine contamination (Valas et al., 2011).

SRLV infection was confirmed in all animals enrolled in our study, including controls, by detecting SRLV antibodies, indicating that infection had been naturally established prior to the experiment. Nearly one granuloma per injection was detected at postmortem examination; indeed, 96.7% and 79.2% of the expected granulomas were recovered in the vaccine and adjuvant-only groups, respectively. A similar result was obtained in a previous study (Asín et al., 2019), in which higher numbers of granulomas were recovered in vaccinated animals compared with sheep injected with AI hydroxide only. Additionally, sheep C-8 (control group) showed an AI-containing subcutaneous granuloma, likely as a result of previous vaccination, since these granulomas can persist for at least 15 months

(Asín et al., 2019) and the present experiment was performed with SRLV-infected, commercial animals for only 75 days. Therefore, occurrence of granulomas from on-farm vaccinations cannot be totally excluded in animals from the vaccine or adjuvant-only groups.

SRLV presence was demonstrated in granulomas by IHC, which showed viral proteins in the cytoplasm of epithelioid macrophages and multinucleated giant cells. The positive signal was observed within intracytoplasmic granules with a pattern very similar to that of AI-containing phagolysosomes (Asín et al., 2019). This might indicate that the vacuoles induced by AI phagocytosis provide a suitable environment for viral replication. Intracytoplasmic location and granular aspect of positive immunolabeled viral particles have already been described in macrophages of other ovine tissues (Angelopoulou et al., 2006; Luján et al., 1994). Similarly, lentivirus replication within granulomas has been found in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macaques and humans (Diedrich et al., 2020, 2016).

Moreover, SRLV presence and replication were detected in cultured macrophages derived from postvaccination granulomas by PCR, RT-activity, and analysis of cytopathic effect in 50% of the sheep (5 out of 10) showing subcutaneous granulomas. SRLV most likely reached granulomas via infected circulating monocytes, and it is well known that migration of blood monocytes following proinflammatory cytokine gradients is the most common mechanism for macrophage accumulation in interstitial tissues (Kumar et al., 2015). Indeed, AI-containing macrophages in postvaccination granulomas in mice derive from circulating monocytes (Khan et al., 2013). Additionally, resident macrophages may proliferate and collaborate in granuloma formation, as demonstrated in alveolar macrophages infected with *M. tuberculosis* (Frieden et al., 2003).

Sequences obtained from circulating PBMCs demonstrated that most of the SRLV amplified belonged to the genotype B2, a genotype strongly related to sheep lentiviral arthritis in the area of the study (Glaría et al., 2009; Pérez et al., 2015). Sheep V-11 presented sequences similar to the genotype A, having similarity values approximating 85%, which is around the threshold limit to consider the occurrence of a novel subtype. However, further studies are needed to fully support a new SRLV subtype designation. Sheep V-11, A-6, and C-8 showed coexistence of different quasi-species in the granulomas, the PBMCs, and other tissues of the same animal. This phenomenon, known as compartmentalization, can

be the result of either genetic variation in a single viral strain over time, or coinfection of a certain individual with several viral strains (Pisoni et al., 2007a, 2007b; Ramírez et al., 2012). Most of the virus sequences obtained from granulomas were very similar to those obtained from PBMCs, which is compatible with the aforementioned migration of SRLV-infected circulating monocytes to granulomas.

Interesting results were obtained in sheep V-11. In this animal, sequences of the matrix and capsid regions of SRLV isolated in the granuloma were similar to those isolated in PBMCs. However, when capsid and nucleocapsid regions were sequenced, the viral sequences of the granuloma differed from the sequences obtained in PBMCs and were similar to those isolated in spleen, carpal joint, and brain. This fact might indicate viral recombination in the granuloma, which was also supported by the presence of recombinant strains in spleen of two further animals, A-6 and C-8. Recombination highly expands virus variability by mixing genetic fragments from different genotypes in double-infected cells. This may have important implications for diagnosis, tissue tropism, host range, generation of escape mutants, and SRLV transmission (Minardi da Cruz et al., 2013; Stonos et al., 2014). Recombination between genotypes A and B has been occasionally described in goats and only rarely in sheep (Andrésdóttir, 2003; L'Homme et al., 2015; Pisoni et al., 2007a; Ramírez et al., 2011).

These findings suggest that AI-induced granulomas may represent a compartment for SRLV replication and also for cell-to-cell propagation, an evolutionarily conserved mechanism of SRLV to elude immune surveillance (Blacklaws, 2012; Luján et al., 1994). SRLV replicate in activated macrophages (Blacklaws, 2012) and granulomas are focal chronic inflammatory reactions mostly composed of activated macrophages. Al hydroxide injection induces a robust inflammation with recruitment of blood monocytes, some of them potentially infected by SRLV (Asín et al., 2019). Monocyte maturation into activated macrophages will lead to phagocytosis of Al micron-sized aggregates inducing granuloma formation (Asín et al., 2019; Khan et al., 2013), but would also trigger SRLV replication in infected animals (Blacklaws, 2012). This phenomenon could, at least partially, explain the high SRLV seroprevalence rates observed in Spanish regions, in which nearly all flocks are infected (Pérez et al., 2010), and the application of Al-containing vaccines is intensive (Lacasta et al., 2015). This hypothetical association could have deep implications in the sheep industry, since increased seroprevalence due to vaccination may bias ongoing SRLV

control programs and accreditation schemes, both based on serological identification, and hinder breeding stock trade. Reduced milk and lamb production are linked to SRLV infection (Echeverría et al., 2020) and, hence, SRLV replication in AI-derived granulomas might also have a role in clinicopathologic features as well as productive traits. However, further experimental studies are needed to better understand these findings.

Additionally, AI-induced granulomas may play a role in SRLV dissemination and tissue tropism due to the translocation of macrophages. It has been demonstrated that AI-loaded macrophages can systemically biodistribute from the granulomas to other body locations (Asín et al., 2019; Khan et al., 2013). Furthermore, AI increase has been detected in the central nervous system (CNS) of experimentally vaccinated mice and sheep (de Miguel et al., 2020; Khan et al., 2013). The SRLV nervous form is usually caused by genotype A strains (Glaría et al., 2012; Thormar, 2013), which is in contrast with the presence of B2 strains in the brain of four animals in the present study. In previous studies, in sheep of the same breed and at the same regions, natural and experimental infection with a similar B2 strain resulted in clinical infection of carpal joints without the presence of this strain in the CNS (Pinczowski et al., 2017). This may suggest that AI-induced granulomas could favor a wider SRLV tissue tropism since, in addition, AI derived from granulomas has been found in the spinal cord of vaccinated sheep (de Miguel et al., 2020). SRLV in the spinal cord may be associated with a particular nervous form characterized by myelitis as the sole lesion (Benavides et al., 2006). Analogous interactions have been described between SIV and *M. tuberculosis*-derived granulomas in infected macaques. SIV induced clinical reactivation and disrupted immune responses against latent *M. tuberculosis* infection by replicating within tuberculous granulomas (Diedrich et al., 2020).

Alternative vaccine formulations, including biocompatible and biodegradable adjuvants such as microcrystalline tyrosine or calcium phosphate, have shown promising results in terms of protection against bacterial pathogens (Leuthard et al., 2018; Masson et al., 2017). The use of AI-free vaccines in sheep may reduce granuloma formation and accordingly the availability of macrophages for SRLV to infect, while ensuring high protection rates. Further studies are needed to find out whether eventual granulomas after vaccination with alternative vaccines have any effect on SRLV replication.

In conclusion, our results indicate that, in naturally infected sheep, AI-injection site granulomas possibly promote viral replication, body distribution, and recombination,

therefore potentially modifying viral tropism and immunological responses. Data presented in this work may open a new research field in which new alternative adjuvants should elicit a protective immune response, avoiding granuloma formation. Finally, it is important to ascertain whether the findings described in this study are exclusive to the SRLV infection in sheep, or rather might be observed in macrophage-tropic infections of other species developing granulomas. In cats, persistent inflammation induced after vaccination may reactivate feline leukemia virus infection, contributing to the emergence of cutaneous lymphomas at injection sites (Roccabianca et al., 2016). Mechanisms underlying these and likely other interactions, such as HIV and *M. tuberculosis*, may involve virus infection of macrophages within granulomas, and need to be uncovered in order to improve vaccine safety.

REFERENCES

- Andrésdóttir, V., 2003. Evidence for recombination in the envelope gene of maedi-visna virus. *Virus Genes* 27, 5–9. <https://doi.org/10.1023/A:1025105116342>
- Angelopoulou, K., Brellou, G.D., Vlemmas, I., 2006. Detection of Maedi-Visna Virus in the Kidneys of Naturally Infected Sheep. *J. Comp. Pathol.* 134, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.01.002>
- Apostólico, J.D.S., Lunardelli, V.A.S., Coirada, F.C., Boscardin, S.B., Rosa, D.S., 2016. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J. Immunol. Res.* <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>
- Asín, J., Molín, J., Pérez, M., Pinczowski, P., Gimeno, M., Navascués, N., Muniesa, A., de Blas, I., Lacasta, D., Fernández, A., de Pablo, L., Mold, M., Exley, C., de Andrés, D., Reina, R., Luján, L., 2019. Granulomas Following Subcutaneous Injection With Aluminium Adjuvant-Containing Products in Sheep. *Vet. Pathol.* 56, 418–428. <https://doi.org/10.1177/0300985818809142>
- Asín, J., Pérez, M., Pinczowski, P., Gimeno, M., Luján, L., 2018. From the bluetongue vaccination campaigns in sheep to overimmunization and ovine ASIA syndrome. *Immunol. Res.* 66, 777–782. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9059-7>
- Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J.E., Choi, J., Oh, Y., Cho, Y.S., Lee, S., 2017. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch. Pharm. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
- Benavides, J., Fuertes, M., García-Pariente, C., Ferreras, M.C., Marín, J.F.G., Pérez, V., 2006. Natural Cases of Visna in Sheep with Myelitis as the Sole Lesion in the Central Nervous System. *J. Comp. Pathol.* 134, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.11.003>
- Benavides, Julio, García-Pariente, C., Gelmetti, D., Fuertes, M., Ferreras, M.C., García-Marín, J.F., Pérez, V., 2006. Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples. *J. Virol. Methods* 137, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.009>
- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.003>
- Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J.R., Shi, J., 2018. Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunol.* <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>
- Canouï, E., Launay, O., 2019. History and principles of vaccination. *Rev. Mal. Respir.* <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.015>
- Chamanza, R., 2012. Non-human primates: cynomolgus (*Macaca fascicularis*) and rhesus (*Macaca mulatta*) macaques and the common marmoset (*Callithrix jacchus*). In: *Background Lesions in Laboratory Animals: A Color Atlas*, 1st Edit. ed.
- Chong, H., Brady, K., Metzger, D., Calonje, E., 2006. Persistent nodules at injection sites (aluminium granuloma)-clinicopathological study of 14 cases with a diverse range of histological reaction patterns. *Histopathology* 48, 182–188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02312.x>
- Crépeaux, G., Eidi, H., David, M.O., Baba-Amer, Y., Tzavara, E., Giros, B., Authier, F.J., Exley, C., Shaw, C.A., Cadusseau, J., Gherardi, R.K., 2017. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. *Toxicology* 375, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.018>
- Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., De Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomares, L., Amorena, B., De Andrés, D.F., 2011. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet. Res.* 42, 28. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-28>
- de Miguel, R., Asín, J., Rodríguez-Largo, A., Molín, J., Echeverría, I., de Andrés, D., Pérez, M., de Blas, I., Mold, M., Reina, R., Luján, L., 2020. Detection of aluminum in lumbar spinal cord of sheep subcutaneously inoculated with aluminum-hydroxide containing products. *J. Inorg. Biochem.* 204, 110871. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110871>
- Diedrich, C.R., O'Hern, J., Wilkinson, R.J., 2016. HIV-1 and the Mycobacterium tuberculosis granuloma: A systematic review and meta-analysis. *Tuberculosis*. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.02.010>
- Diedrich, C.R., Rutledge, T., Maiello, P., Baranowski, T.M., White, A.G., Borish, H.J., Karell, P., Hopkins, F., Brown, J., Fortune, S.M., Flynn, J.L., Ambrose, Z., Lin, P.L., 2020. SIV and Mycobacterium tuberculosis synergy within the granuloma accelerates the reactivation pattern of latent tuberculosis. *PLOS Pathog.* 16, e1008413. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008413>
- Echeverría, I., De Miguel, R., De Pablo-Maiso, L., Glaria, I., Benito, A.A., De Blas, I., De Andrés, D., Luján, L., Reina, R., 2020. Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Front. Vet. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00182>
- European Commission. 2008. EU Commission Decision 2008/655/EC, 24 July 2008, approving the emergency vaccination plans against bluetongue of certain Member States and fixing the level of the Community's

- financial contribution for 2007 and 2008.
<https://www.eumonitor.eu/9353000/1/j9vvik7m1c3gyxp/vi8rm2zkwfza>
- Fawcett, H.A., Smith, N.P., 1984. Injection-Site Granuloma due to Aluminum. *Arch. Dermatol.* 120, 1318–1322.
<https://doi.org/10.1001/archderm.1984.01650460058020>
- Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J., Dye, C., 2003. Tuberculosis, in: *Lancet*. Elsevier Limited, pp. 887–899. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14333-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14333-4)
- Glaría, I., Reina, R., Crespo, H., de Andrés, X., Ramírez, H., Biescas, E., Pérez, M.M., Badiola, J., Luján, L., Amorena, B., de Andrés, D., 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet. Microbiol.* 138, 156–162.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.002>
- Glaría, I., Reina, R., Ramírez, H., de Andrés, X., Crespo, H., Jauregui, P., Salazar, E., Luján, L., Pérez, M.M., Benavides, J., Pérez, V., Polledo, L., García-Marín, J.F., Riezu, J.I., Borrás, F., Amorena, B., de Andrés, D., 2012. Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Vet. Microbiol.* 155, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.027>
- Grego, E., Profiti, M., Giammarioli, M., Giannino, L., Rutili, D., Woodall, C., Rosati, S., 2002. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 828–32.
<https://doi.org/10.1128/cdli.9.4.828-832.2002>
- Khan, Z., Combadière, C., Authier, F.J., Itier, V., Lux, F., Exley, C., Mahrouf-Yorgov, M., Decrouy, X., Moretto, P., Tillement, O., Gherardi, R.K., Cadusseau, J., 2013. Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Med.* 11, 99. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-99>
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., Aster, J., 2015. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, ninth edit. ed. L'Homme, Y., Leboeuf, A., Arsenault, J., Fras, M., 2015. Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). *Virology* 475, 159–171.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.006>
- L'Homme, Y., Ouardani, M., Lévesque, V., Bertonni, G., Simard, C., Pisoni, G., 2011. Molecular characterization and phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses isolated from Canadian sheep and goats. *Viol.* J. 8, 271. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-271>
- Lacasta, D., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., González, J.M., Ortín, A., Fthenakis, G.C., 2015. Vaccination schedules in small ruminant farms. *Vet. Microbiol.* 181, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.018>
- Leuthard, D.S., Duda, A., Freiburger, S.N., Weiss, S., Dommann, I., Fenini, G., Contassot, E., Kramer, M.F., Skinner, M.A., Kündig, T.M., Heath, M.D., Johansen, P., 2018. Microcrystalline Tyrosine and Aluminum as Adjuvants in Allergen-Specific Immunotherapy Protect from IgE-Mediated Reactivity in Mouse Models and Act Independently of Inflammation and TLR Signaling. *J. Immunol.* 200, 3151–3159.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800035>
- Luján, L., Begara, I., Watt, N.J., 1994. Ovine Lentivirus (Maedi-visna Virus) Protein Expression in Sheep Alveolar Macrophages. *Vet. Pathol.* 31, 695–703. <https://doi.org/10.1177/030098589403100610>
- Marcato, P.S., 1990. Anatomía e histología patológica especial de los mamíferos domésticos, 2nd ed. ed.
- Masson, J.D., Thibaudon, M., Bélec, L., Crépeaux, G., 2017. Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? *Expert Rev. Vaccines.* <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1244484>
- Michiels, R., Adajaj, N.R., De Regge, N., 2020. Phylogenetic Analysis of Belgian Small Ruminant Lentiviruses Supports Cross Species Virus Transmission and Identifies New Subtype B5 Strains. *Pathogens* 9, 183.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9030183>
- Minardi da Cruz, J., Singh, D., Lamara, A., Chebloune, Y., 2013. Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) Break the Species Barrier to Acquire New Host Range. *Viruses* 5, 1867–1884. <https://doi.org/10.3390/v5071867>
- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J.J., García-Marín, J.F., de Andrés, D., Luján, L., Amorena, B., Juste, R.A., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.* 181, 75–89. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.08.007>
- Mirza, A., King, A., Troakes, C., Exley, C., 2016. The Identification of Aluminum in Human Brain Tissue Using Lumogallion and Fluorescence Microscopy. *J. Alzheimer's Dis.* 54, 1333–1338.
<https://doi.org/10.3233/JAD-160648>
- Pérez, M., Biescas, E., de Andrés, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Reina, R., Bolea, R., de Andrés, D., Juste, R.A., Cancer, J., Gracia, J., Amorena, B., Badiola, J.J., Luján, L., 2010. Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón (Spain). *Vet. J.* 186, 221–225. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2009.07.031>
- Pérez, M., Biescas, E., Reina, R., Glaría, I., Marín, B., Marquina, A., Salazar, E., Álvarez, N., de Andrés, D., Fantova, E., Badiola, J.J., Amorena, B., Luján, L., 2015. Small Ruminant Lentivirus-Induced Arthritis: Clinicopathologic Findings in Sheep Infected by a Highly Replicative SRLV B2 Genotype. *Vet. Pathol.* 52, 132–139. <https://doi.org/10.1177/0300985813519654>

- Pinczowski, P., Sanjosé, L., Gimeno, M., Crespo, H., Glaria, I., Amorena, B., de Andrés, D., Pérez, M., Reina, R., Luján, L., 2017. Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Vet. Pathol.* 54, 413–424. <https://doi.org/10.1177/0300985816688742>
- Pisoni, G., Bertoni, G., Puricelli, M., Maccalli, M., Moroni, P., 2007a. Demonstration of Coinfection with and Recombination by Caprine Arthritis-Encephalitis Virus and Maedi-Visna Virus in Naturally Infected Goats. *J. Virol.* 81, 4948–4955. <https://doi.org/10.1128/jvi.00126-07>
- Pisoni, G., Moroni, P., Turin, L., Bertoni, G., 2007b. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology* 369, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.021>
- Ramírez, H., Glaria, I., Andrés, X. de, Martínez, H.A., Hernández, M.M., Reina, R., Iráizoz, E., Crespo, H., Berriatua, E., Vázquez, J., Amorena, B., Andrés, D.D., 2011. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *Vet. J.* 190, 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.005>
- Ramírez, H., Reina, R., Bertolotti, L., Cenoz, A., Hernández, M.M., San Román, B., Glaria, I., de Andrés, X., Crespo, H., Jáuregui, P., Benavides, J., Polledo, L., Pérez, V., García-Marín, J.F., Rosati, S., Amorena, B., de Andrés, D., 2012. Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Vet. Res.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-8>
- Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P., Quasso, A., Amorena, B., Rosati, S., 2009. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Vet. Microbiol.* 138, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.005>
- Reina, R., Mora, M.I., Glaria, I., García, I., Solano, C., Luján, L., Badiola, J.J., Contreras, A., Berriatua, E., Juste, R., Mamoun, R.Z., Rolland, M., Amorena, B., de Andrés, D., 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res.* 121, 189–198. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2006.05.011>
- Responsible Use of Medicines in Agriculture (RUMA) Alliance. 2009. Responsible use of vaccines and vaccination in sheep production. [<https://ruma.org.uk/sheep/vaccines-sheep-production/>..
- Rimstad, E., East, N.E., Torten, M., Higgins, J., DeRock, E., Pedersen, N.C., 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1858–1862.
- Roccabianca, P., Avallone, G., Rodriguez, A., Crippa, L., Lepri, E., Giudice, C., Caniatti, M., Moore, P.F., Affolter, V.K., 2016. Cutaneous Lymphoma at Injection Sites: Pathological, Immunophenotypical, and Molecular Characterization in 17 Cats. *Vet. Pathol.* 53, 823–832. <https://doi.org/10.1177/0300985815623620>
- Roth, J.A., 1999. Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. *Adv. Vet. Med.* 41, 681–700.
- Saman, E., Van Eynde, G., Lujan, L., Extramiana, B., Harkiss, G., Tolari, F., González, L., Amorena, B., Watt, N., Badiola, J., 1999. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 734–40.
- Shah, C., Huder, J.B., Böni, J., Schönmann, M., Mühlherr, J., Lutz, H., Schüpbach, J., 2004. Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *J. Virol.* 78, 7518–7522. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7518-7522.2004>
- Stonos, N., Wootton, S., Karrow, N., 2014. Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections. *Viruses* 6, 3311–3333. <https://doi.org/10.3390/v6083311>
- Thormar, H., 2013. The Origin of Lentivirus Research: Maedi-Visna Virus. *Curr. HIV Res.* 11, 2–9. <https://doi.org/10.2174/157016213804999212>
- Valas, S., Le Ven, A., Croise, B., Maquigneau, M., Perrin, C., 2011. Interference of vaccination against bluetongue virus serotypes 1 and 8 with serological diagnosis of small-ruminant lentivirus infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 513–7. <https://doi.org/10.1128/CVI.00343-10>
- Valtulini, S., Macchi, C., Ballanti, P., Cherel, Y., Laval, A., Theaker, J.M., Bak, M., Ferretti, E., Morvan, H., 2005. Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs. *Vaccine* 23, 3999–4004. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.06.058>
- Vermeire, J., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Landi, A., Iannucci, V., Van Nuffel, A., Taghon, T., Pizzato, M., Verhasselt, B., 2012. 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* 7, e50859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050859>
- Zanoni, R.G., Nauta, I.M., Kuhnert, P., Pauli, U., Pohl, B., Peterhans, E., 1992. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet. Microbiol.* 33, 341–351. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90061-W](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90061-W)

CHAPTER II

***Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and
Provirus as Biomarkers of Production Losses***

ABSTRACT

Small ruminant lentiviruses (SRLVs) are endemic in most areas of Europe, causing a chronic infection and a multisystemic disease affecting the udder, carpal joints, lungs, and central nervous system. Due to the lack of treatments and protective vaccination strategies, infection control is focused on the identification of infected animals through serological or molecular techniques. However, antigenic and genetic heterogeneity of SRLVs represent a clear drawback for diagnosis. Infected animals may present lower animal production parameters such as birth weight or milk production and quality, depending on productive systems considered and, likely, to the diagnostic method applied. In this study, four sheep flocks dedicated to dairy or meat production were evaluated using three different ELISA and two PCR strategies to classify animal population according to SRLV infection status. Productive parameters were recorded along one whole lactation or reproductive period and compared between positive and negative animals. SRLV was present in 19% of the total population, being unequally distributed in the different flocks. Less than half of the infected animals were detected by a single diagnostic method, highlighting the importance of combining different diagnostic techniques. Statistical analysis employing animal classification using all the diagnostic methods associated lambing size, lamb weight at birth, and daily weight gain with SRLV infection status in meat flocks. Milk production, somatic cell count, fat, and protein content in the milk were associated with SRLV infection in dairy flocks, to a greater extent in the flock showing higher seroprevalence. A multi-platform SRLV diagnostic strategy was useful for ensuring correct animal classification, thus validating downstream studies investigating production traits.

Echeverría, I., De Miguel, R., De Pablo-Maiso, L., Glaría, I., Benito, A.A., De Blas, I., De Andrés, D., Luján, L., Reina, R., (2020). Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 7, p. 182.

INTRODUCTION

Small ruminant lentiviruses (SRLVs) cause chronic infection in sheep and goats that results in the development of a multisystemic disease that may affect animal production depending on a myriad of factors including breed susceptibility (Cutlip et al., 1986; Dawson, 1987; Houwers et al., 1989), virulence of circulating strains (Benavides et al., 2013; Thormar, 2013), or production systems (Leginagoikoa et al., 2006).

Antibody production in response to infection can be detected by serological tests, while integrated provirus in circulating monocytes can be targeted by primers in PCR strategies. Despite the important contribution of ELISA approaches in control programs established so far (Pérez et al., 2010), a description of novel genotypes that enlarge antigenic heterogeneity within SRLV jeopardizes ELISA performance, leading to diagnostic failures (Cardinaux et al., 2013; Olech et al., 2018, 2012; Reina et al., 2009).

Quantification of productive losses due to SRLV infection remains controversial, while some studies claim for a role of SRLV infection in decreasing quantity and quality of animal productions in both dairy and meat farms (Barquero et al., 2013b; Dohoo et al., 1987; Martínez-Navalón et al., 2013), others have revealed no differences between seronegative and seropositive animals (Arsenault et al., 2003; Dungu et al., 2000; Greenwood., 1995; Nalbert et al., 2019; Snowden et al., 1990). Slow disease development is a key feature of lentiviral infections and is the main cause of the underestimated losses in terms of animal production. However, differences in the production system, breed resistance, flock management, and parameters evaluated (Minguijón et al., 2015) may also explain the different associations between SRLV infection and productive traits.

Furthermore, diagnostics sensitivity may have significantly influenced studies aiming at evaluating production losses derived from SRLV infection. After initial assessment of antibody production for the detection of infected animals by agar gel immunodiffusion (AGID), later studies have demonstrated that ELISA methods are more sensitive (de Andrés et al., 2005). Beyond this, PCR and histopathology strategies can further improve the detection of virus in seronegative animals, indicating a benefit for combining molecular, and serological strategies (Gayo et al., 2019). Antigenic and genetic heterogeneity of SRLVs are on the basis of the serologic and PCR test drawbacks, respectively. Indeed, antibodies against circulating strains are better detected using homologous antigens (Lacerenza et al.,

2006; Olech et al., 2018; Reina et al., 2009), and primer design is critical when developing sensitive and specific PCRs (Brajon, 2012; Brinkhof et al., 2008; Kuhar et al., 2013).

In this study, four sheep flocks belonging to two different production systems (dairy and meat) and breeds (Raza Navarra and Latxa Navarra) were classified as SRLV infected or uninfected using three different commercial ELISA methods, a home-made PCR kit, and a commercial PCR kit. The different commercial ELISA methods globally detected a similar number of infected animals; however, the combination of the three methods identified a significantly greater infected population in all the flocks analyzed. Furthermore, commercial PCR was more sensitive than ELISA in some cases and clearly added value to SRLV diagnosis and animal classification. Different production parameters in meat and dairy flocks were recorded during one lactation or reproductive period and, after final classification according to the different tests, were negatively (birth weight and weaning weight) or positively [somatic cell count (SCC)] associated with SRLV infection.

These results highlight the importance of using a multi-platform strategy to detect the humoral response to, as well as the presence of, different circulating strains in order to unequivocally identify infected and uninfected individuals, thereby influencing downstream studies such as production losses estimation, accreditation schemes, or control programs.

MATERIAL AND METHODS

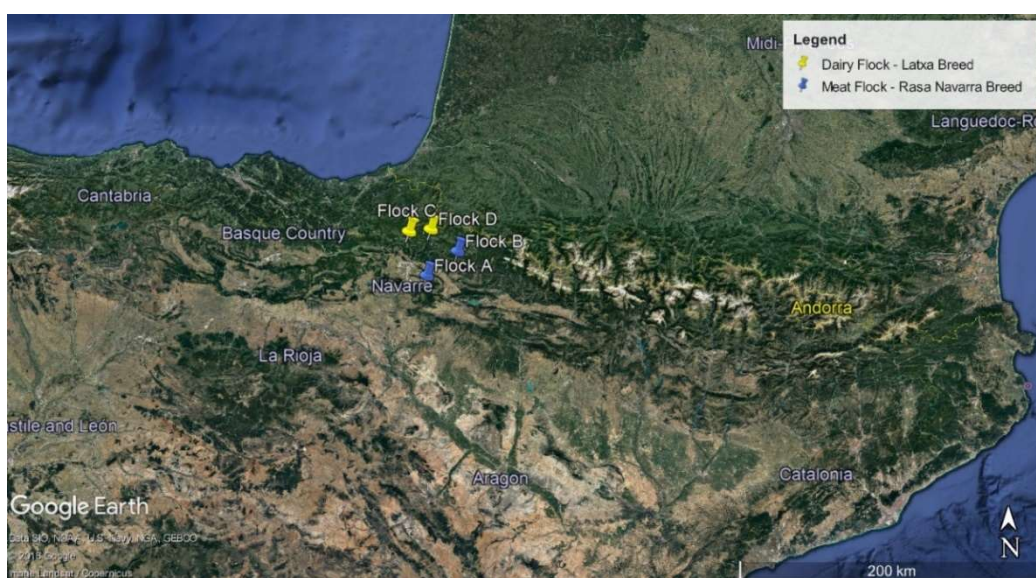
Animals and Samples

A total of 1,497 animals belonging to four different flocks dedicated to dairy or meat production were used (**Table 1**). Flocks A and B (meat flocks, focused on lamb production) and Flocks C and D (dairy flocks) were located in the north of Navarra (humid climate) and bred in a semi-extensive system with periods of housing, especially during lactation. In addition, Flock D was bred in an ecological production scheme. None of the studied animals presented clinical signs of SRLV disease.

Whole blood was obtained by jugular puncture and placed in EDTA-K3+ tubes. After centrifugation, plasma samples were stored at -20°C until use in ELISA. Buffy coats were washed, erythrocytes lysed, resuspended in PBS, and stored at -20°C until DNA extraction.

Table 1. Flocks studied: location (map), breed, production system, and total sheep in each flock.

Flock	Breed	Production system	<i>n</i>
A	Raza Navarra	Semi-extensive meat	376
B	Raza Navarra	Semi-extensive meat	443
C	Latxa Navarra	Semi-extensive dairy	240
D	Latxa Navarra	Semi-extensive dairy	438



ELISA Tests

Plasma samples were tested for the presence of SRLV antibodies with three commercial ELISA kits: ELISA#1 uses an Eradikit™ SRLV screening test (In3Diagnostic, Torino, Italia) that includes capsid recombinant proteins from different genotypes; ELISA#2 uses ELITEST™ MVV/CAEV (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France) that uses recombinant a capsid protein and synthetic peptide of the TM region; and ELISA#3 uses INgezim Maedi screening™ (Ingenasa, Eurofins Technologies, Spain) that includes synthetic peptides from the Env protein. All tests were performed following manufacturers' instructions.

Data were analyzed by considering each ELISA individually and the combinations of diagnostic kits. “Total ELISA” results were built by summarizing all positive samples to at least one of the ELISAs tested. Diagnostic efficiency was determined for each of the ELISAs in samples analyzed by the three methods, in comparison with the Total ELISA result.

DNA Extraction and PCR

Genomic DNA was extracted from buffy coat samples with and E.Z.N.A. tissue/blood kit (OMEGA, Bio-Tek, Norcross, GA, USA). DNA was quantified (NanoDrop OneC, Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA), and real-time PCRs were performed using 250 ng of DNA (AriaMx Real Time PCR System) using the commercial kit EXOone Maedi Visna CAEV oneMix (Exopol, Spain) following manufacturer's instructions.

A total of 341 samples randomly distributed across all the flocks were analyzed by Gag PCR using primers described elsewhere (Grego et al., 2002; Reina et al., 2006; Rimstad et al., 1993; Zaroni et al., 1992). Amplicons from 28 positive reactions were sequenced for molecular characterization purposes.

An animal was finally considered as infected when at least one commercial ELISA test or one PCR method revealed a positive result (“Total Infected”).

Productive Parameters

In meat production farms, the following factors were studied during one production period: lambing size, weaning date, birth and weaning weight, and daily weight gain (DWG).

In dairy production farms, total volume of produced milk, fat, and protein content, and SCC were parameters quantified in each monthly quality control during a whole lactation.

Statistical Analysis

A generalized linear model (GLM) was used to assess the effect of each diagnostic strategy on each productive parameter recorded in meat flocks, taking into account the effect of the flock and the age of the mother included as covariables. Statistical results were shown as mean and standard error (SE). Production parameters were analyzed in dairy flocks by Mann Whitney's test due to significant heterogeneity in terms of SRLV prevalence, animal management, and production values between the flocks. Medians and interquartile range (IR) are shown.

The kappa coefficient was calculated to assess the agreement between tests using the methods of Cohen–Fleiss (weighted) and Pearson-Fleiss.

Statistical analyses were carried out with IBM SPSS Statistics 19.0 for Windows, and alpha error was set at 0.050.

RESULTS

Serodiagnosis

Serological diagnosis strongly depended on the flock and the test used. While Flocks A, B, and C presented low seroprevalence rates of up to 10%, Flock D showed a moderate rate of seropositive animals of around 30%. Seroprevalence values in meat flocks ranged from 2.5 to 7.5% depending on the ELISA used, showing an average value of 5% with similar ELISA efficiencies (**Table 2**). However, seroprevalence in dairy flocks differed not only depending on the ELISA used but also depending on the flock. While Flock C showed low seroprevalence values, up to 10% (range 1.9-10%), seropositive animals in Flock D ranged from 24 to 34.1% depending on the test used. Average values considering both flocks ranged from 14.9 to 22%. ELISA efficiencies differed between flocks and ELISA tests, ranging from 10 to 84% (**Table 2**).

Overall, ELISA#1 showed better results in terms of reactivity, taking into account the whole population, followed by ELISA#3 and ELISA#2. However, when considering data within flocks, ELISA#1 detected a higher number of animals in Flocks A and C, whereas ELISA#2 and ELISA#3 were more accurate in detecting infected animals in Flocks D and B, respectively. Considering samples positive to any of the kits tested (Total ELISA), a single ELISA only detected from 19 to 57% of the seropositive animals in Flock A and from 22 to 54% in Flock B; and the range in Flock C was from 10 to 53%. Single ELISA reactivity in Flock D ranged from 61 to 84.1% in comparison with Total ELISA results (**Table 2**).

Indeed, agreement between serological tests calculated in samples analyzed with the three methods was very good between ELISA#1 and ELISA#2 only in Flock D. Values in Flocks A and C were not calculated since no samples were found to be simultaneously positive to more than one ELISA. In addition, association was minimal or low in Flock B (data not shown).

PCR

PCR analysis included a commercial kit that employs real-time PCR to detect and quantify different genotypes of SRLV and a home-made PCR based on previous publications. Commercial PCR detected more positive animals than did the classical home-made procedure, and both detected a total percentage of positive animals of 0, 36.8, 3.3, and 38.5% in Flocks A, B, C, and D, respectively. These values were higher than those obtained by serological methods in all flocks, except for Flock A in which the number of samples analyzed by PCR was significantly lower. In addition, an average of 10% of the seronegative animals rendered PCR-positive reactions. Consistently, PCR and ELISA agreement was minimal (**Table 3**).

Sequence characterization of the Gag region in Flocks B, C, and D showed a mixed virus population between genotypes A and B2, the latter being prevalent, with high similarity in respect to previous deposited sequences. Gag immunodominant region alignment revealed no significant changes compared to sequences described (data not shown).

Table 2. SRLV serological analysis of sheep belonging to meat (A and B) or dairy (C and D) flocks, employing three commercial ELISAs (1, 2 and 3).

ELISA	Flock A				Flock B				Flock C				Flock D			
	n	Positive		Efficiency (%)	n	Positive		Efficiency (%)	n	Positive		Efficiency (%)	n	Positive		Efficiency (%)
		n	%			n	%			n	%			n	%	
1	376	20	5.32	57.14	435	32	7.36	54.55	240	24	10	53.33	434	123	28.34	84.15
2	238	6	2.52	19.05	257	10	3.89	22.73	155	3	1.94	10.00	249	85	34.14	80.49
3	236	8	3.39	33.33	292	22	7.53	43.18	226	20	8.85	36.67	259	62	23.94	60.98
Total	376	32	8.51	-	443	52	11.74	-	240	45	18.75	-	438	142	32.42	-

Total ELISA represents sample reactivity to any of the ELISA used. Efficiency was calculated as the ratio between reactivity to a single ELISA and the Total ELISA result.

Table 3. Total ELISA and PCR analyses of sheep belonging to meat (A and B) or dairy (C and D) flocks.

Test	Flock A			Flock B			Flock C			Flock D		
	n	Positive		n	Positive		n	Positive		n	Positive	
		n	%		n	%		n	%		n	%
Home-made PCR	55	0	0	51	8	15.68	153	5	3.27	82	10	12.19
Comercial qPCR	ND	ND	ND	86	29	33.72	ND	ND	ND	101	43	42.57
Total PCR	55	0	0	87	32	36.78	153	5	3.27	122	47	38.52
Total ELISA	376	32	8.51	443	52	11.74	240	45	18.75	438	142	32.42
Total Infected	376	32	8.51	443	59	13.32	240	50	20.83	438	148	33.11

Total ELISA represents sample reactivity to any of the ELISAs used. Total Infected was calculated with samples positive to any of the tests used. ND, not determined.

Evaluation of Production in Meat Farms

Lambing size, birth body weight, weaning date, and weight gain per day were affected depending on animal classification using single or combined ELISA results as well as PCRs. Lambing size was not affected when animal classification was conducted with single ELISAs; however, a combination of the three ELISAs and Total ELISA data revealed a significant positive association. A combination of PCRs also associated SRLV infection status with higher lambing size. However, a combination of serological and molecular tests associated SRLV infection with lower lambing size (**Table 4**).

Birth weight was also associated when animals were classified according to ELISA combinations but not when considering the Total Infected result. SRLV infection influenced weaning date when considering a combination of the serological tests or the Total Infected data. Finally, daily weight gain was not associated when animals were classified according to single considered methods; however, the Total Infected result showed significant association with lower DWG values (**Table 4**).

Total ELISA-positive animals were further classified into PCR negative or positive, and production losses were evaluated (**Table 5**). Lower birth weight, weaning date, weight, and DWG values were observed in double-positive animals.

Table 4. Meat production parameters in Flocks A and B of the Raza Navarra breed according to SRLV infection status.

Diagnosis		Lambing size				Birth weight				Weaning date				Weaning weight				Daily weight gain			
		Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>
ELISA#1	Positive	1.84	0.081	55	0.097	3.76	0.118	55	0.590	35.75	0.624	55	0.390	11.55	0.344	55	0.464	0.22	0.007	55	0.126
	Negative	1.97	0.023	737		3.75	0.029	730		37.89	0.236	703		11.85	0.109	678		0.21	0.002	678	
ELISA#2	Positive	1.89	0.151	19	0.586	3.77	0.212	19	0.642	36.58	1.305	19	0.793	11.40	0.712	19	0.783	0.21	0.013	19	0.860
	Negative	1.97	0.026	552		3.80	0.033	545		38.03	0.282	524		11.99	0.123	508		0.21	0.003	508	
ELISA#3	Positive	2.20	0.200	10	0.253	3.74	0.145	38	0.346	35.19	0.791	37	0.112	11.25	0.429	37	0.916	0.21	0.009	37	0.356
	Negative	1.96	0.026	561		3.77	0.033	543		38.90	0.292	514		12.15	0.127	503		0.21	0.003	503	
ELISA#1&2	Positive	2.2	0.2	10	0.267	3.23	0.186	10	0.007*	38.2	1.555	10	0.182	10.03	0.579	10	0.065	0.18	0.027	10	0.089
	Negative	1.97	0.027	571		3.81	0.033	554		37.98	0.279	533		12.00	0.122	517		0.21	0.058	517	
ELISA#1&3	Positive	2.11	0.261	9	0.207	3.29	0.308	9	0.013*	35.22	0.894	9	0.273	10.40	0.652	9	0.836	0.20	0.018	9	0.664
	Negative	1.91	0.024	574		3.78	0.032	572		37.81	0.274	542		12.12	0.124	531		0.21	0.002	531	
ELISA#2&3	Positive	2.33	0.333	6	0.060	3.15	0.339	6	0.007*	36.17	1.195	6	0.124	9.55	0.697	6	0.275	0.18	0.020	6	0.423
	Negative	1.92	0.026	464		3.83	0.036	462		38.40	0.311	438		12.05	0.136	429		0.21	0.003	429	
ELISA#1&2&3	Positive	2.6	0.245	5	0.006*	2.90	0.281	5	0.001*	37.2	0.735	5	0.048*	8.92	0.365	5	0.124	0.16	0.011	5	0.158
	Negative	1.91	0.026	466		3.83	0.036	464		38.38	0.310	440		12.06	0.140	431		0.21	0.003	431	
Total ELISA	Positive	1.80	0.059	91	0.005*	3.86	0.092	91	0.399	35.68	0.519	90	0.016*	11.67	0.289	90	0.339	0.22	0.006	90	0.098
	Negative	1.98	0.024	700		3.74	0.029	693		38.01	0.243	667		11.85	0.112	643		0.21	0.002	642	
PCR	Positive	1.67	0.142	12	0.265	4.01	0.244	12	0.414	35.08	1.171	12	0.964	12.27	0.605	12	0.520	0.24	0.013	12	0.368
	Negative	1.80	0.069	80		3.94	0.087	78		39.96	0.759	75		12.77	0.282	71		0.22	0.007	71	
Total PCR	Positive	2.09	0.094	45	0.027*	3.91	0.124	45	0.916	34.93	0.625	45	0.204	10.97	0.386	43	0.992	0.20	0.008	43	0.445
	Negative	1.86	0.059	92		3.81	0.085	90		38.60	0.751	87		12.06	0.322	84		0.21	0.007	84	
Total Infected	Positive	1.78	0.055	101	0.001*	3.90	0.087	105	0.184	35.58	0.486	100	0.034*	11.75	0.269	100	0.084	0.22	0.005	100	0.021*
	Negative	1.98	0.024	690		3.73	0.029	693		38.06	0.246	657		11.84	0.113	632		0.21	0.002	632	

Mean, standard error (SE), and number of samples analyzed (*n*) of each parameter are shown. The associated probability (*p*) with SRLV infection status obtained in the general linearized model is indicated. Animals were classified as positive or negative by considering the following: individual ELISAs, the result obtained with the different ELISAs (i.e., ELISA#1 and ELISA#2 are samples positive to both ELISA methods), the Total ELISA and Total PCR data (samples positive to any of the ELISA or PCR tested, respectively), and the Total Infected results (obtained combining Total ELISA and Total PCR results). **p* < 0.05. Bold values indicate significant differences.

Table 5. Meat production parameters in ELISA-positive animals from Flocks A and B of the Raza Navarra breed according to PCR infection status. Meat production parameters in Flocks A and B of the Raza Navarra breed according to SRLV infection.

Total PCR	Lambing size				Birth weight				Weaning date				Weaning weight				Daily weight gain			
	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>	Mean	SE	<i>n</i>	<i>p</i>
Positive	2.38	0.59	16	0.000*	3.41	0.85	16	0.147	33.94	8.49	16	0.026*	9.34	2.33	16	0.001*	0.17	0.04	16	0.004*
Negative	1.75	0.33	28		3.81	0.72	28		37.58	7.37	26		12.20	2.39	26		0.22	0.04	26	

Mean, standard error (SE), and number of samples analyzed (*n*) of each parameter are shown. The associated probability (*p*) with SRLV infection status obtained in general linearized model is indicated. **p* < 0.05. Bold values indicate significant differences.

Evaluation of Production in Dairy Farms

Classification of animals according to serological tests, individually, or collectively considered, revealed differences in SCCs between seropositive and seronegative animals (**Table 6**). Animal classification with both PCRs also identified elevated SCC in infected animals. Considering Total Infected animals (ELISA and PCR), SCCs were elevated in positive animals to an extent of 62% compared to uninfected individuals ($p < 0.01$). Milk yield was reduced by 6% in infected animals classified by single or combined ELISA results, as well as by commercial PCR ($p < 0.05$). Fat and protein contents were also related to SRLV serodiagnosis, while fat percentage was higher in milk from infected animals, protein content was reduced (**Table 6**).

Total ELISA-positive animals were again further classified into PCR-negative or PCR-positive animals (**Table 7**). While milk yield and protein content were reduced in ELISA- and PCR-positive animals, milk fat was inversely affected. A tendency to higher SCC was also observed in double-positive animals.

Table 6. Milk production parameters evaluated in Flocks C and D from the Latxa Navarra breed according to SRLV infection status.

Diagnosis		SCC (x10 ³ cells/mL)				Milk Yield				Milk Fat				Milk Protein			
		Median	IQR	n	p	Median	IQR	n	p	Median	IQR	n	p	Median	IQR	n	p
ELISA#1	Positive	145.25	446.4	119	0.004*	119	55	115	0.001*	6.75	1.31	119	0.001*	5.02	0.55	119	0.03*
	Negative	106.7	176.29	417		133.5	59.75	390		6.50	1.23	417		5.08	0.7	417	
ELISA#2	Positive	191.6	624.3	68	0.001*	117	46.5	65	<0.001*	6.99	0.96	68	<0.001*	4.9	0.46	68	0.015*
	Negative	104.6	160.9	261		136	65	248		6.47	1.35	261		5.07	0.62	261	
ELISA#3	Positive	133.75	616.8	67	0.165	123	59	63	0.018*	6.67	1.12	67	0.001*	5.02	0.52	67	0.181
	Negative	110.27	192.9	311		140.5	61.25	297		6.34	1.31	311		5.17	0.67	311	
ELISA#1&2	Positive	193.75	631.25	60	0.001*	117	47	59	<0.001*	7.05	0.98	60	<0.001*	4.91	0.45	60	0.013*
	Negative	104.6	161.85	269		135	63.5	254		6.47	1.33	269		5.06	0.63	269	
ELISA#1&3	Positive	191.6	695.6	39	0.048*	115	60.5	39	<0.001*	7.05	0.89	39	<0.001*	4.93	0.37	39	0.008*
	Negative	109.8	197.7	338		140	62	320		6.34	1.28	338		5.19	0.68	338	
ELISA#2&3	Positive	267	703.5	35	0.003*	109.5	62.75	33	0.001*	7.06	0.95	35	<0.001*	4.88	0.37	35	0.115
	Negative	106.51	161.16	246		136.5	62.5	232		6.4	5.94	246		5.07	0.66	246	
ELISA#1&2&3	Positive	328.25	712.92	33	0.003*	115	65	32	0.002*	7.07	0.91	33	<0.001*	4.88	0.36	33	0.147
	Negative	106.33	157.94	249		136.5	63.5	234		6.40	1.38	249		5.06	0.66	249	
Total ELISA	Positive	132.35	396.05	153	0.009*	122.5	55.25	144	0.021*	6.66	1.21	153	0.010*	5.03	0.59	153	0.230
	Negative	106.6	170.2	383		133	60	361		6.52	1.25	383		5.08	0.71	383	
PCR	Positive	185.7	180.74	12	0.216	146	60.75	11	0.216	6.87	0.97	12	0.008*	5.25	1.1	12	0.954
	Negative	108.75	273.3	186		153	67	175		6.15	1.39	186		5.23	0.59	186	
Total PCR	Positive	166.25	402.85	42	0.011*	120	48	40	<0.001*	6.98	0.85	42	<0.001*	4.95	0.55	42	0.011*
	Negative	108.75	267.32	188		155	69	178		6.12	1.4	188		5.23	0.58	188	
Total Infected	Positive	133.75	348	166	0.005*	125	53	157	0.044*	6.67	1.13	166	0.004*	5.03	0.59	166	0.350
	Negative	106.32	172.4	370		133	61	348		6.48	1.29	370		5.08	0.7	370	

Median, interquartile range (IQR), and number of samples analyzed (n) are indicated. Animals were classified as positive or negative by considering the following: individual ELISAs, the result obtained with the different ELISAs (i.e., ELISA#1 and ELISA#2 are samples positive to both ELISA methods),

the Total ELISA and Total PCR data (samples positive to any of the ELISA or PCR tested, respectively), and the Total Infected results (obtained combining Total ELISA and Total PCR results). SCC: somatic cell count. Mann–Whitney’s test associated probability (p) is indicated. * $p < 0.05$. Bold values indicate significant differences.

Table 7. Milk production parameters evaluated in ELISA-positive animals from Flocks C and D from the Latxa breed according to PCR infection status.

Total PCR	SCC ($\times 10^3$ cells/ml)				Milk Yield				Milk Fat				Milk Protein			
	Mean	SE	n	p	Mean	SE	n	p	Mean	SE	n	p	Mean	SE	n	p
Positive	660.19	156.68	28	0.084	109.54	6.00	26	0.015*	6.91	0.15	28	0.008*	4.99	0.07	28	0.111
Negative	474.97	99.45	53		138.45	6.95	49		6.39	0.16	53		5.07	0.08	53	

Median, interquartile range (IQR), number of samples analyzed (n) and Mann–Whitney’s test associated probability (p) are indicated. SCC, somatic cell count. * $p < 0.05$. Bold values indicate significant differences.

DISCUSSION

Serological diagnosis is currently the best choice for SRLV detection in livestock. It has been widely applied in control programs but also in downstream studies evaluating production losses (de Andrés et al., 2005; Gjerset et al., 2009) or genetic susceptibility and resistance to lentiviral infection (Alshanbari et al., 2014). However, serological methods may fail at detecting the whole infected population due to virus antigenic diversity (Barquero et al., 2013; Cardinaux et al., 2013; Herrmann-Hoesing, 2010) or to delayed seroconversion (Kaba et al., 2013), encouraging the update of existing serological methods to new variants and challenging the development and evaluation of molecular methods.

In this study, we analyze an ovine population of ~1,500 individuals by ELISA methods detecting antibodies that recognize different antigen preparations. Our results demonstrate that care should be taken when ELISA tests are considered individually, since the combination of tests is able to increase the detection of seropositive animals up to 50%. In addition, we included the evaluation of a recently developed commercial qPCR that showed better detection of infected animals when compared with individual ELISA results (**Table 3**). These results demonstrate that the truly infected population cannot be assessed by using a single ELISA strategy or even when applying three different commercial ELISA tests, since about 10% of infected animals remained seronegative but provirus positive and detected by PCR. SRLV seroprevalence in animals varied substantially when applying just one of the herein studied ELISA methods ranging from 2 to 34% of positive animals. A combination with PCR results, either commercial or home-made, enriched the infected population in different percentages depending on the flock studied, further modifying animal classification.

Three of the analyzed flocks, two of the Rasa Navarra breed (Flocks A and B) intended for meat production, and one milk flock of the Latxa Navarra breed (Flock C) presented low seroprevalence values. However, the remaining milk flock from the Latxa Navarra breed presented a moderate seroprevalence of around 30% excluding breed or production system influence.

Antigenic heterogeneity of SRLVs seems to be at the basis for this relatively low individual sensitivity. Consistently, the antigenic preparations included in the different ELISAs used may account for this different performance, since antigenic spectrum of the circulating strains in the studied population is also a key point to consider (Sanjosé et al.,

2015). Preliminary genetic characterization of the SRLVs in the different flocks reveals the presence of a mixed virus population including strains from different genotypes and subtypes. This may explain the better performance of the ELISA test including the highest antigenic diversity.

In spite of including antigenic preparations from different genotypes, ELISA failed at detecting a proportion of infected animals that were evidenced by molecular techniques. Infection by divergent SRLV strains in these animals is unlikely since primers used in PCR were designed based on known genotypes. Instead, low or fluctuating antibody titers may account for this discrepancy between serological and molecular techniques (Nogarol et al., 2019; Sanjosé et al., 2015). Indeed, absence of serological response has been described in the periparturient period (Czopowicz et al., 2017b) as well as a result of recent infections (Czopowicz et al., 2017a). Additionally, antibody response in infected animals to viral epitopes not included in ELISAs cannot be ruled out. Therefore, the previously suggested combination between ELISA and PCR to really achieve a “gold standard” (de Andrés et al., 2005; Minguijón et al., 2015) is reinforced from these results.

The use of more than one diagnostic technique allowed the evaluation of different animal classifications according to single ELISA, combined Total ELISA results, and the combination of these with PCRs, resulting in a Total Infected classification. Proper classification enabled determination of the real effect SRLV infection had on production traits. Of note, the use of a single ELISA may represent the detection of roughly the 61–84% of the seropositive animals as shown in Flock D of moderate seroprevalence. Furthermore, in low-seroprevalence flocks, a single ELISA may only detect 10% of the seropositive animals. ELISA performance differed among flocks, while results from Flocks A, B and C showed low seroprevalence and ELISA efficiency; in Flock D, seroprevalence and efficiency reached 32 and 84%, respectively. Breed, age, production system, nutrition, or animal management cannot be argued as important factors, since Flock C shared these features. Instead, circulation of a more prototypic SRLV in Flock D could explain this better performance.

In meat flocks, SRLV influence on animal production was clearly evidenced when serological tests were combined between them or with molecular tests. Furthermore, different interpretations could be reached, taking into account the different animal classifications. Total Infected animals, including PCR and ELISA, showed lower lambing sizes

and a trend to higher birth body weight. Despite one variable possibly being related to the other, since higher lambing size implies lower birth weights (Gama et al., 1991), previous studies relate SRLV with lower birth weights (Greenwood., 1995) or rather did not find association (Arsenault et al., 2003; Nalbert et al., 2019; Snowden et al., 1990) likely due to the low epidemiologic importance of natural in utero transmission (Blacklaws et al., 2004). In contrast, serological methods associated SRLV seropositivity with lower birth body weight and with lambing size depending on the data analysis performed. While positive animals to the three ELISAs used (ELISA#1, ELISA#2, and ELISA#3) showed higher lambing size, ELISA combination (Total ELISA) associated lower lambing size with SRLV positivity. Since Total PCR results were in accordance with higher lambing size in positive animals, inclusion of ELISA false-positive reactions in the Total ELISA and Total Infected groups may help to explain this discrepancy. Previous studies including one of the ELISAs used, reported specificity values ranging from 98.4 to 99.8% with respect to AGID (Saman et al., 1999), further supporting this hypothesis.

Despite the very low seroprevalence observed in meat flocks to single ELISAs, a moderate presence of infected animals (~30%) was evidenced by PCR. Thus, PCR analysis has improved the results presented here due to detection of incipient infections that may mask SRLV influence. Chronic infections and especially SRLV show a long asymptomatic period in which ewe's body condition may inadvertently diminish, likely determining a reduced nutrient transfer to the fetus (Kenyon et al., 2014; Vatankhah et al., 2012). Sustained immune response in these infections may also alter the metabolism to a more catabolic profile, thereby reducing disposable input for the lamb. Actually, HIV infection has severe impact on pregnancy outcomes such as low birth weight and preterm delivery (Brocklehurst and French, 1998; Cotton et al., 2015; Xiao et al., 2015).

In dairy flocks, the application of single ELISA already identified higher SCC and fat content as well as lower milk yield and protein in milk from SRLV-seropositive sheep. A combination of ELISAs and PCR further confirmed this finding. Total Infected animals showed lower milk production (up to 3%) and elevated SCCs (60% increment). Augmented SCC has been already linked to SRLV infection due to epithelial cell desquamation derived from microscopic alterations in the mammary gland (Christodoulopoulos, 2006; Lerondelle et al., 1992), and may represent lower milk quality and, beyond, economic losses to farmers due to penalties. In the absence of clinical signs, increased SCC could be related to systemic

incipient lesions that may be present in up to 20% of infected animals (Gayo et al., 2018). Interestingly, recent studies show that up to 90.9% of naturally SRLV-infected animals exhibit minimal to moderate lesions in the mammary gland, this prevalence being even higher in intensive milk-producing systems (Gayo et al., 2019). Increased fat content in the milk could be the simple consequence of lower production (Junkuszew et al., 2010). Decreased protein content was found in infected animals, further pointing out SRLV influence on milk production parameters.

Among ELISA-positive animals, the PCR-negative population showed lower production losses as compared to PCR-positive animals in meat and dairy flocks. Higher viral load implies higher PCR sensitivity as well as increased disease severity (Crespo et al., 2016; Ravazzolo et al., 2006; Zhang et al., 2000). These results suggest that antibodies revealed in ELISA may play a protective role, thereby reducing clinical signs and production losses. In agreement, the presence of antibodies against SRLV in milk may reduce proviral load detection in milk cells (Barquero et al., 2013a).

Interestingly, lower weight at weaning presented by lambs from seropositive ewes in meat farms could be explained by the lower milk production observed in infected sheep from dairy flocks. However, milk production parameters were not evaluated in meat flocks.

Exhaustive estimation of production losses derived from infections, especially those chronic, should be evaluated after proper infection status evaluation. The multi-platform strategy applied here to classify more than 1,000 animals into SRLV infected vs. uninfected enabled the analysis of different production parameters in meat and milk-oriented semi-extensive production systems. Proper diagnosis was achieved when three different ELISA methods and two different PCRs were used. Both meat and dairy flocks showed diminished production parameters in infected animals, mainly affecting birth and weaning weights as well as milk production together with an increased number of somatic cells counts. These results highlight the crucial importance of proper SRLV infection status determination in sheep production studies and help to clarify previous colliding results obtained by other authors.

REFERENCES

- Alshanbari, F.A., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Herrmann-Hoesing, L.M., Highland, M.A., Lewis, G.S., White, S.N., 2014. Mutations in *Ovis aries* *TMEM154* are associated with lower small ruminant lentivirus proviral concentration in one sheep flock. *Anim. Genet.* 45, 565–571. <https://doi.org/10.1111/age.12181>
- Arsenault, J., Dubreuil, P., Girard, C., Simard, C., Bélanger, D., 2003. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Prev. Vet. Med.* 59, 125–137. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00086-2)
- Barquero, N., Domenech, A., Arjona, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Gomez-Lucia, E., 2013. Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* 94, 817–819. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.004>
- Barquero, Nuria, Gomez-Lucia, E., Arjona, A., Toural, C., Heras, A., Fernández-Garayzabal, J., Domenech, A., 2013a. Evolution of Specific Antibodies and Proviral DNA in Milk of Small Ruminants Infected by Small Ruminant Lentivirus. *Viruses* 5, 2614–2623. <https://doi.org/10.3390/v5102614>
- Barquero, Nuria, Gomez-Lucia, E., Arjona, A., Toural, C., Las Heras, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Doménech, A., 2013b. Investigation of risk factors associated with infections caused by small ruminant lentiviruses. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 57, 473–478. <https://doi.org/10.2478/bvip-2013-0082>
- Benavides, J., Fuertes, M., García-Pariente, C., Otaola, J., Delgado, L., Giraldez, J., García Marín, J.F., Carmen Ferreras, M., Pérez, V., 2013. Impact of maedi-visna in intensively managed dairy sheep. *Vet. J.* 197, 607–612. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2013.03.031>
- Blacklaws, B., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N., de Andres, D., Klein, D., Harkiss, G., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 101, 199–208. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.04.006>
- Brajon, G., 2012. Development and Field Testing of a Real-Time PCR Assay for Caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV). *Open Virol. J.* 6, 82–90. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010082>
- Brinkhof, J.M.A., van Maanen, C., Wigger, R., Peterson, K., Houwers, D.J., 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 147, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.013>
- Brocklehurst, P., French, R., 1998. The association between maternal HIV infection and perinatal outcome: A systematic review of the literature and meta-analysis. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 105, 836–848. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1998.tb10227.x>
- Cardinaux, L., Zahno, M.L., Deubelbeiss, M., Zanoni, R., Vogt, H.R., Bertoni, G., 2013. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet. Microbiol.* 162, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.017>
- Christodouloupoulos, G., 2006. Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries, in: *Small Ruminant Research*. Elsevier, pp. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.046>
- Cotton, M.F., Holgate, S., Nelson, A., Rabie, H., Wedderburn, C., Mirochnick, M., 2015. The last and first frontier - emerging challenges for HIV treatment and prevention in the first week of life with emphasis on premature and low birth weight infants. *J. Int. AIDS Soc.* 18, 20271. <https://doi.org/10.7448/IAS.18.7.20271>
- Crespo, H., Bertolotti, L., Proffitti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Acutis, P.L., de Andrés, D., Reina, R., Rosati, S., 2016. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Vet. Microbiol.* 192, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.008>
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Brogden, K.A., Sacks, J.M., 1986. Breed susceptibility to ovine progressive pneumonia (maedi/visna) virus. *Vet. Microbiol.* 12, 283–288. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(86\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90057-X)
- Czopowicz, M., Szaluś-Jordanow, O., Mickiewicz, M., Moroz, A., Witkowski, L., Markowska-Daniel, I., Bagnicka, E., Kaba, J., 2017a. Influence of true within-herd prevalence of small ruminant lentivirus infection in goats on agreement between serological immunoenzymatic tests. *Prev. Vet. Med.* 144, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.017>
- Czopowicz, M., Szaluś-Jordanow, O., Mickiewicz, M., Witkowski, L., Moroz, A., Markowska-Daniel, I., Reczyńska, D., Bagnicka, E., Kaba, J., 2017b. Fall in antibody titer to small ruminant lentivirus in the periparturient period in goats. *Small Rumin. Res.* 147, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.006>
- Dawson, M., 1987. Pathogenesis of maedi-visna. *Vet. Rec.* <https://doi.org/10.1136/vr.120.19.451>
- de Andrés, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 107, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.012>
- Dohoo, I.R., Heaney, D.P., Stevenson, R.G., Samagh, B.S., Rhodes, C.S., 1987. The effects of maedi-visna virus infection on productivity in ewes. *Prev. Vet. Med.* 4, 471–484. [180](https://doi.org/10.1016/0167-</p></div><div data-bbox=)

- 5877(87)90032-8
- Dungu, B., Vorster, J., Bath, G.F., Verwoerd, D.W., 2000. The effect of a natural maedi-visna virus infection on the productivity of South African sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 67, 87–96.
- Gama, L.T., Dickerson, G.E., Young, L.D., Leymaster, K.A., 1991. Effects of breed, heterosis, age of dam, litter size, and birth weight on lamb mortality¹. *J. Anim. Sci.* 69, 2727–2743. <https://doi.org/10.2527/1991.6972727x>
- Gayo, E., Polledo, L., Balseiro, A., Martínez, C.P., García Iglesias, M.J., Preziuso, S., Rossi, G., García Marín, J.F., 2018. Inflammatory Lesion Patterns in Target Organs of Visna/Maedi in Sheep and their Significance in the Pathogenesis and Diagnosis of the Infection. *J. Comp. Pathol.* 159, 49–56. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2018.01.001>
- Gayo, E., Polledo, L., Magalde, A., Balseiro, A., García Iglesias, M.J., Pérez Martínez, C., Preziuso, S., Rossi, G., García Marín, J.F., 2019. Characterization of minimal lesions related to the presence of visna/maedi virus in the mammary gland and milk of dairy sheep. *BMC Vet. Res.* 15, 109. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1855-3>
- Gjerset, B., Rimstad, E., Teige, J., Soetaert, K., Jonassen, C.M., 2009. Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. *Vet. Microbiol.* 135, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.069>
- Greenwood, P.L., 1995. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.* 22, 71–87. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(94\)00399-4](https://doi.org/10.1016/0167-5877(94)00399-4)
- Grego, E., Profiti, M., Giammarioli, M., Giannino, L., Rutili, D., Woodall, C., Rosati, S., 2002. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 828–832. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.4.828-832.2002>
- Herrmann-Hoesing, L.M., 2010. Diagnostic Assays Used to Control Small Ruminant Lentiviruses. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 843–855. <https://doi.org/10.1177/104063871002200602>
- Houwers, D.J., Visscher, A.H., Defize, P.R., 1989. Importance of ewe/lamb relationship and breed in the epidemiology of maedi-visna virus infections. *Res. Vet. Sci.* 46, 5–8. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)31108-1](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)31108-1)
- Junkuszew, A., Kuzmak, J., Olech, M., 2010. Milk yield and quality in sheep with maedi-visna virus, researchgate.net.
- Kaba, J., Czopowicz, M., Ganter, M., Nowicki, M., Witkowski, L., Nowicka, D., Szaluś-Jordanow, O., 2013. Risk factors associated with seropositivity to small ruminant lentiviruses in goat herds. *Res. Vet. Sci.* 94, 225–227. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.018>
- Kenyon, P., Maloney, S., Blache, D., 2014. Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. *New Zeal. J. Agric. Res.* 57, 38–64. <https://doi.org/10.1080/00288233.2013.857698>
- Kuhar, U., Barlič-Maganja, D., Grom, J., 2013. Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. *BMC Vet. Res.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-172>
- Lacerenza, D., Giammarioli, M., Grego, E., Marini, C., Profiti, M., Rutili, D., Rosati, S., 2006. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.016>
- Leginagoikoa, I., Juste, R.A., Barandika, J., Amorena, B., De Andrés, D., Luján, L., Badiola, J., Berriatua, E., 2006. Extensive rearing hinders Maedi-Visna Virus (MVV) infection in sheep. *Vet. Res.* 37, 767–778. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006034>
- Lerondelle, C., Richard, Y., Issartial, J., 1992. Factors affecting somatic cell counts in goat milk. *Small Rumin. Res.* 8, 129–139. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(92\)90014-U](https://doi.org/10.1016/0921-4488(92)90014-U)
- Martínez-Navalón, B., Peris, C., Gómez, E.A., Peris, B., Roche, M.L., Caballero, C., Goyena, E., Berriatua, E., 2013. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet. J.* 197, 311–317. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2012.12.020>
- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J.J., García-Marín, J.F., de Andrés, D., Luján, L., Amorena, B., Juste, R.A., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.* 181, 75–89. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.08.007>
- Nalbert, T., Czopowicz, M., Szaluś-Jordanow, O., Witkowski, M., Witkowski, L., Stoniewska, D., Reczyńska, D., Bagnicka, E., Kaba, J., 2019. 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.* 165, 71–75. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2019.02.011>
- Nogarol, C., Bertolotti, L., Klevar, S., Profiti, M., Gjerset, B., Rosati, S., 2019. Serological characterization of small ruminant lentiviruses: A complete tool for serotyping lentivirus infection in goat. *Small Rumin. Res.* 176, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.05.010>
- Olech, M., Rachid, A., Croisé, B., Kuźmak, J., Valas, S., 2012. Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res.* 163, 528–536.

- <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.019>
- Olech, M., Valas, S., Kuźmak, J., 2018. Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. *PLoS One* 13, e0193892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193892>
- Pérez, M., Biescas, E., de Andrés, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Reina, R., Bolea, R., de Andrés, D., Juste, R.A., Cancer, J., Gracia, J., Amorena, B., Badiola, J.J., Luján, L., 2010. Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón (Spain). *Vet. J.* 186, 221–225. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2009.07.031>
- Ravazzolo, A.P., Nenci, C., Vogt, H.R., Waldvogel, A., Obexer-Ruff, G., Peterhans, E., Bertoni, G., 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 350, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.014>
- Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P., Quasso, A., Amorena, B., Rosati, S., 2009. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Vet. Microbiol.* 138, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.005>
- Reina, R., Mora, M.I., Glaria, I., García, I., Solano, C., Luján, L., Badiola, J.J., Contreras, A., Berriatua, E., Juste, R., Mamoun, R.Z., Rolland, M., Amorena, B., de Andrés, D., 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res.* 121, 189–198. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2006.05.011>
- Rimstad, E., East, N.E., Torten, M., Higgins, J., DeRock, E., Pedersen, N.C., 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1858–1862.
- Saman, E., Van Eynde, G., Lujan, L., Extramiana, B., Harkiss, G., Tolari, F., González, L., Amorena, B., Watt, N., Badiola, J., 1999. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 734–40.
- Sanjosé, L., Pincowski, P., Crespo, H., Pérez, M., Glaria, I., Gimeno, M., de Andrés, D., Amorena, B., Luján, L., Reina, R., 2015. Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. *Vet. J.* 204, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.012>
- Snowder, G., Gates, N., ... H.G.-J. of the A., 1990, U., 1990. Prevalence and effect of subclinical ovine progressive pneumonia virus infection on ewe wool and lamb production. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 475–9.
- Thormar, H., 2013. The Origin of Lentivirus Research: Maedi-Visna Virus. *Curr. HIV Res.* 11, 2–9. <https://doi.org/10.2174/157016213804999212>
- Vatankhah, M., Talebi, M.A., Zamani, F., 2012. Relationship between ewe body condition score (BCS) at mating and reproductive and productive traits in Lori-Bakhtiari sheep. *Small Rumin. Res.* 106, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.004>
- Xiao, P.L., Zhou, Y.B., Chen, Y., Yang, M.X., Song, X.X., Shi, Y., Jiang, Q.W., 2015. Association between maternal HIV infection and low birth weight and prematurity: A meta-analysis of cohort studies. *BMC Pregnancy Childbirth* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12884-015-0684-z>
- Zanoni, R.G., Nauta, I.M., Kuhnert, P., Pauli, U., Pohl, B., Peterhans, E., 1992. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet. Microbiol.* 33, 341–351. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90061-W](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90061-W)
- Zhang, Z., Watt, N.J., Hopkins, J., Harkiss, G., Woodall, C.J., 2000. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Virol. Methods* 86, 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00169-X)

CHAPTER III

***Accurate Diagnosis of Small Ruminant Lentivirus Infection Is Needed for
Selection of Resistant Sheep through TMEM154 E35K Genotyping***

ABSTRACT

Small ruminant lentiviruses (SRLV) cause an incurable multiorganic disease widely spread in sheep and goats that disturbs animal welfare and production. In the absence of a vaccine, control measures have been traditionally based on early diagnosis and breeding with virus-inactivated colostrum with segregation of seropositive animals. However, antigenic heterogeneity, poor antibody production due to low viral load, and single strain design of most available ELISA, pose a threat to SRLV diagnosis. Genome-wide association studies have described TMEM154 E35K polymorphism as a good genetic marker for selection of resistant animals in some American and European breeds. In this study, a multitargeted serological and virological screening of more than 500 animals from four different breeds (Latxa Navarra, Raza Navarra, Assaf, and Churra) attending to SRLV infection status was performed. Then, animals were genotyped to characterize TMEM154 E35K polymorphism. ELISA procedures, individually considered, only identified a proportion of the seropositive animals, and PCR detected a fraction of seronegative animals, globally offering different animal classifications according to SRLV infection status. TMEM154 allele frequency differed substantially among breeds and a positive association between seroprevalence and TMEM154 genotype was found only in one breed. Selection based on TMEM154 may be suitable for specific ovine breeds or SRLV strains, however generalization to the whole SRLV genetic spectrum, ovine breeds, or epidemiological situation may need further validation.

Ramírez, H.*, Echeverría, I.*, Benito, A.A., Glaría, I., Benavides, J., Pérez, V., de Andrés, D., Reina, R., (2021). Accurate Diagnosis of Small Ruminant Lentivirus Infection Is Needed for Selection of Resistant Sheep through TMEM154 E35K Genotyping. *Pathogens*, vol. 10, no 1, p. 83

* Hugo Ramírez and Irache Echeverría contributed equally to this work.

INTRODUCTION

Small ruminant lentivirus (SRLV) infection widely affects animal health and production by causing a wasting disease characterized by chronic inflammation of carpal joints, udder, central nervous system, and/or lungs (Minguijón et al., 2015). Infection takes place through colostrum/milk consumption from infected ewes, and/or by direct contact with respiratory secretions from infected animals (Blacklaws et al., 2004; Preziuso et al., 2004). Once infection occurs, immune responses result in production of antibodies that generally remain detectable, for the whole animal's life, which is at the basis of the current control programs (Herrmann-Hoesing, 2010; Pérez et al., 2010). Strategies to control SRLV are based on the identification of seropositive animals since no vaccine is available, despite profuse trials (Kalogianni et al., 2020). However, antigenic heterogeneity of circulating strains may be wider than the covered by available ELISA tests making serological response not always detectable. Accordingly, the description of new infection outbreaks in ELISA-controlled flocks (Cardinaux et al., 2013; Kaba et al., 2013; Ritchie and Hosie, 2014, 2010) have practically questioned current control strategies. Molecular diagnosis by PCR may add diagnostic value to serodiagnosis since seronegative animals may show PCR positive results due to low antibody production (Brinkhof et al., 2010; Kaba et al., 2013). New molecular methods are being described focused on the design of universal primers, thereby increasing sensitivity to enable the identification and removal of animals with low viral load *in vivo* (Chassalevris et al., 2020; Dolfini et al., 2015; Eltahir et al., 2006; Marinho et al., 2018).

In addition to their use in control programs, the detection of antibodies through ELISA tests along with molecular tools has been used to identify association between breeds and susceptibility patterns to SRLV infection. Genome wide association studies (GWAS) have opened the possibility to apply genetic selection programs by describing a number of candidate genes associated to SRLV seroreaction (Cecchi et al., 2019; Heaton et al., 2013, 2012; White et al., 2012) or proviral load (Alshanbari et al., 2014). Among them, different studies suggest that TMEM154 haplotypes 1, 2, and 3, the most common haplotypes found in sheep, have an effect on SRLV susceptibility. Sheep with a copy of either haplotype 2 or 3, both of which encode a glutamate amino acid residue at position 35 (E35) of the extracellular portion of TMEM154, have an increased risk of SRLV infection. Conversely, sheep homozygous for haplotype 1, which encodes a lysine residue at position 35 (K35), have a decreased risk of infection in sheep breeds from North America and Germany (Heaton et al., 2012; Leymaster et al., 2013; Molaei et al., 2018), but also in Asian sheep

breeds (Molaei et al., 2019; Yaman et al., 2019). With the exception of the mentioned countries, there is little information about the TMEM154 haplotype composition in productive breeds and its association with SRLV susceptibility.

In this study, we analyzed TMEM154 E/K genotype association with SRLV infectious status in approximately 500 sheep belonging to different flocks, production systems, and breeds according to three different ELISAs and a PCR-based molecular test.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Samples

Blood samples of the Latxa Navarra (two flocks, n=194), Raza Navarra (two flocks, n=114), Assaf (four flocks, n=74), and Churra (10 flocks, n=101) ovine breeds from northern Spanish flocks were obtained. All sheep belonged to 18 different flocks dedicated to dairy or meat production. Flocks 1 and 2 from the Raza Navarra breed (meat flocks focused on semi-intensive lamb production), and flocks 4 and 5 from the Latxa Navarra breed (dairy flocks, focused on semi-intensive milk production combining free grazing periods with housing) were likely infected by different genotypes of SRLV (Michiels et al., 2020). Assaf and Churra sheep were from intensive and semi-intensive dairy farms, respectively, located in Castilla y León, except flock 3 from Assaf breed that was located in Navarra. None of the studied animals presented clinical signs of SRLV disease.

Whole blood was obtained in EDTA-K3+ tubes by jugular puncture. After centrifugation, plasma samples were stored at -20 °C until use in ELISA. Buffy coats were washed, erythrocytes lysed, resuspended in PBS, and stored at -20 °C until DNA extraction.

Serological Survey

Plasma samples were tested for the presence of SRLV antibodies with three commercial ELISA kits: Eradikit™ SRLV screening test (In3 Diagnostic, Torino, Italia, ELISA#1) (Reina et al., 2009); ELITEST™ MVV/CAEV (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France, ELISA#2) (Saman et al., 1999) and INgezim Maedi screening™ (Ingenasa, Eurofins Technologies, Madrid, Spain, ELISA#3) (Sanjosé et al., 2015). All tests were performed following manufacturers' instructions. Data were analyzed by considering each ELISA individually and combined. Samples positive to at least one of the ELISA tested were considered in "Total ELISA" results.

DNA Extraction and Quantification

Genomic DNA was extracted from buffy coat samples with E.Z.N.A. tissue/blood kit (OMEGA, Bio-tek, Norcross, GA, USA) following the manufacturer's instructions. DNA was quantified at 260–280nm (Nanodrop OneC, Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) and stored at -20 °C until use.

SRLV Molecular Diagnosis

Real time PCR was performed with 250 ng of DNA in an Agilent sequence detector system using the commercial kit EXOone Maedi Visna-CAEV oneMix kit, following manufacturer's instructions (Exopol, Zaragoza, Spain). Six-fold serial dilutions of the positive control were prepared to generate a standard curve (cycle threshold vs. copy number) from which copy number values were extrapolated. Positive control copy number ranged from 5×10^5 to 5. Results were expressed as provirus copy number/250 ng of DNA.

An animal was considered as infected when at least one ELISA test or one PCR method revealed a positive result (Total Infected).

TMEM154 Genotyping

Setting-up TMEM154 E/K genotyping involved a first step, in which 10 DNA samples from SRLV seronegative (5) and seropositive (5) Latxa Navarra animals were used. Amplification of the corresponding TMEM154 region (**Table 2**) following standard PCR procedures, cloning in pGEMT-easy plasmids (Promega, Madison, WI, USA) and sequencing (STAbVida, Caparica, Portugal), were carried out. Based on the obtained sequences, specific primers and fluorogenic probes were designed using Primer Express® Software (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA). Each probe was specifically designed to match the E35K mutation, E version was synthesized with HEX and K version with FAM. Both reporters were quenched with BHQ-1 (**Table 3**). Real time PCR was carried out in Buffer 1x (Biotools, Madrid, Spain), 1.5 MgCl₂ (Biotools, Madrid, Spain), 230 μM dNTPs (Applied Biosystems, Warrington, UK), 400 nM of forward and reverse primer, 200 nM of each probe (Metabion, Planegg, Germany), 0.04 U/uL of Taq DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a final volume of 25 μL. Samples were submitted to an initial denaturation at 95 °C/5 min, followed by 45 cycles of 55 °C 30 s. Allelic discrimination was analyzed using BIO-RAD CFX96 software. This new method for ovine TMEM154 genotyping was evaluated with plasmids encoding each of the versions (E or K) obtained from the sequencing. Equimolar mixes of these plasmids were mixed to mimic heterozygote samples. Plasmid controls encoding E, K alleles or the equimolar mix were included in each plate when analyzing biological samples.

Statistical Analysis

Diagnostic efficiency was determined for each of the ELISAs in comparison with the total seropositive (Total ELISA) and infected (Total infected) population. Efficiency of diagnostic PCR was calculated as regarding to the Total infected. Differences in the distribution of allele frequencies between groups of SRLV infected and uninfected samples were tested by Fisher's exact test. The relative risk (RR) to be detected by ELISA or PCR was estimated for animals carrying one and/or two copies of the putative susceptible allele (risk factor) with the method of Altman (Varea et al., 2001). Non-parametric Mann-Whitney tests were used to compare ELISA absorbance and proviral load values among TMEM154 genotyped groups. Association between TMEM154 genotype and SRLV infection status was performed using regression through generalized linear model.

The SPSS program (v. 25.0) for Windows was used for statistical analyses and alpha error was set at 0.05.

RESULTS

Serodiagnosis

SRLV diagnosis through ELISA was carried out using three different commercial tests based on different strains and antigens. An animal was considered infected in the Total ELISA classification when tested positive to at least one of the ELISAs.

At the population level, ELISA testing indicated that all the flocks were infected with a seroprevalence ranging from 3.5% to 100%. Individually considered, the different ELISAs showed important differences when examining intraflock seroprevalence. Interestingly, two flocks of the Churra breed were classified as uninfected taking into account results from ELISA#1. However, Total ELISA analysis indicated a seroprevalence of 60% (**Table S1**). Considering animals by breed, Assaf flocks were the most infected showing a seroprevalence up to 89%, depending on the ELISA tested. When considering the results from the three ELISA tests, seropositive animals reached 97.3% (**Table 1**), being all flocks above 90% of seroprevalence. Raza and Latxa Navarra breeds showed a moderate seroprevalence according to single ELISA tests, however, when applying the three ELISAs seropositive animals reached 50%. Churra sheep showed moderate to high seroprevalence values, reaching a total ELISA rate of 66.3% (**Table 1**). ELISA efficiencies, calculated as the proportion of seropositive animals detected by a single ELISA, reached 56%, 74%, 92%, and 91% in Raza Navarra, Latxa Navarra, Assaf, and Churra animals, respectively. ELISA#3 was clearly more performant in Churra animals, whereas infection in Latxa Navarra animals was better detected by ELISA#1 (**Table 1**).

Interestingly, the combination of all ELISAs revealed a global seroprevalence higher than 65%, practically doubling the performance offered by kits individually considered. Indeed, efficiency of individual ELISAs varied from 0% to 100% according to flocks (**Table S1**) and from 38.46% to 91.67% depending on the breed (**Table 1**).

Table 1. Small Ruminant Lentivirus (SRLV) seroprevalence and ELISA efficiency in Raza Navarra, Latxa Navarra, Assaf and Churra ovine breeds. Total ELISA reflects reactivity to any of the ELISAs used.

TEST	Raza Navarra				Latxa Navarra				Assaf				Churra			
	<i>n</i>	Positive		Efficiency %	<i>n</i>	Positive		Efficiency %	<i>n</i>	Positive		Efficiency %	<i>n</i>	Positive		Efficiency %
		<i>n</i>	%			<i>n</i>	%			<i>n</i>	%			<i>n</i>	%	
ELISA#1	114	29	25.4	55.8	194	76	39.2	73.8	74	66	89.2	91.7	101	32	31.7	47.8
ELISA#2	114	28	24.6	53.9	194	60	30.9	58.3	74	61	82.4	84.7	101	42	41.6	62.7
ELISA#3	114	20	17.5	38.5	194	60	30.9	58.3	74	46	62.2	63.9	101	61	60.4	91.0
Total ELISA	114	52	45.6	100.0	194	103	53.1	100.0	74	72	97.3	100.0	101	67	66.3	100.0

Table 2. Small Ruminant Lentivirus (SRLV) provirus detection using real time quantitative PCR (qPCR). Total infected refers to samples positive to any of the diagnostic methods used (ELISA and/or PCR):

TEST	Raza Navarra				Latxa Navarra				Assaf				Churra			
	<i>n</i>	Positive		Efficiency %	<i>n</i>	Positive		Efficiency %	<i>n</i>	Positive		Efficiency %	<i>n</i>	Positive		Efficiency %
		<i>n</i>	%	%		<i>n</i>	%	%		<i>n</i>	%	%		<i>n</i>	%	%
qPCR	111	33	29.7	45.2	191	90	47.1	65.7	74	57	77.0	79.2	82	18	22.0	32.1
Total infected	114	75	65.8	100.0	194	139	71.6	100.0	74	72	97.3	100.0	101	67	66.3	100.0

Molecular Diagnosis

Diagnosis through commercial PCR resulted as sensitive as ELISA, since the overall PCR reactivity was around 44% compared to 46.4%, 44.9%, and 42.7% for ELISAs #1, #2, and #3, respectively (**Table 2**). As shown for serological analysis, PCR reactivity also depended on the flock considered, since 77% of the animals were detected in Assaf flocks and only 22% in the Churra animals (**Table S2**).

Among seronegative samples, 54 out of 179 (30%) were identified as qPCR positive, whereas 135 seropositive samples resulted negative in qPCR. When considering each ELISA individually, PCR detected a 22.37%, 34.53%, and 37.94% of seronegative animals to ELISAs #1, #2, and #3, respectively (**Figure 1** and **Tables S4–S6**).

Total infected animal classification, revealed by ELISA or PCR, allowed the evaluation of PCR efficiency compared to ELISA. qPCR efficiency reached 79% in Assaf animals and decreased to 32% in Churra flocks. Intraflock efficiency in Assaf flocks peaked at 95.8%, whereas highly seropositive Churra flocks were not detected by qPCR (**Table S2**).

Animal classification into infected and uninfected after ELISA (**Table S3**) and qPCR proviral quantification is represented in **Figure 1**.

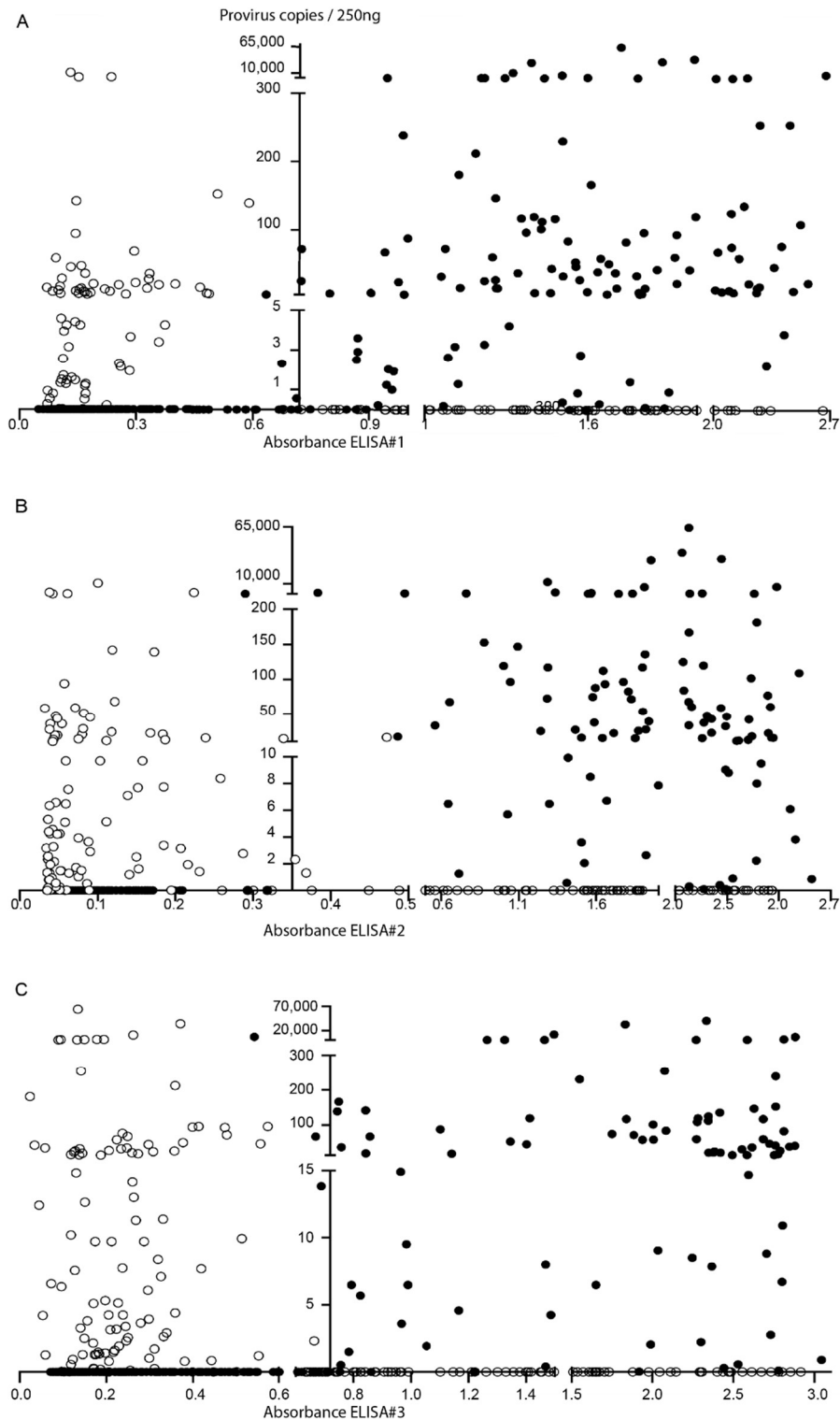


Figure 1. Small ruminant lentivirus (SRLV) diagnosis. Scatter plot distribution of ELISA absorbance (X-axis) and proviral load in 250 ng of DNA (Y-axis) data. Samples concordantly positive or negative between ELISA#1 (A), ELISA #2 (B), or ELISA#3 (C) and PCR (●) and discordant samples (O) are represented. The Y-axis intercepted the X-axis at the average value of the corresponding ELISA positivity threshold.

TMEM154 Genotyping

Ovine DNA samples (n = 10) from the studied population were employed to amplify a 335bp region of the TMEM154 gene (**Table 3**), including residue at position 35, that was cloned and sequenced (**Figure 2**).

Considering Sanger sequencing, seven samples were identified as homozygotes for allele 1, one as homozygote for allele 2, and two as heterozygotes. Specific clones encoding allele 1 or allele 2 were used for real time PCR standardization.

Fluorogenic probes were designed within the E35K SNP, with either FAM or HEX (**Table 3**), to specifically detect plasmids encoding the corresponding genotype. Equimolar mixes of plasmids encoding each of the alleles were automatically classified as heterozygotes, validating their application in biological samples (**Figure 3**).

Allelic discrimination analysis showed different allele frequencies according to the breed considered (**Table 4**). The protective genotype (K/K) was predominant in all breeds analyzed, followed by heterozygotes and homozygotes (E/E), except for the Assaf breed in which heterozygotes and homozygotes (E/E) were prevalent.

Table 3. Primer and probe sequences, amplification product size, and purpose of the corresponding PCR method.

Probes/Primers Sequences	Product Size (Base Pairs)	Purpose
Fw 5'-CTGCCTTTGTGGGAGATTTA-3'	335	Amplification and sequencing for verification of genotyping results
Rv 5'-TTCTGTGGTCACTGAAGCAA-3'		
Fw 5'-TTCGTCTCCATGACAAGTCTCAAT-3'	121	Determination of nucleotide substitution G/A, resulting in amino acid substitution E35K.
Rv 5'-GCTTAGGGCCTCTGACTCTTCA-3'		
HEX-AGGACACAGAACTGT-BHQ-1		
6-FAM-AGGACACAAAACACTGT-BHQ-1		

Considering Sanger sequencing, seven samples were identified as homozygotes for allele 1, one as homozygote for allele 2, and two as heterozygotes. Specific clones encoding allele 1 or allele 2 were used for real time PCR standardization.

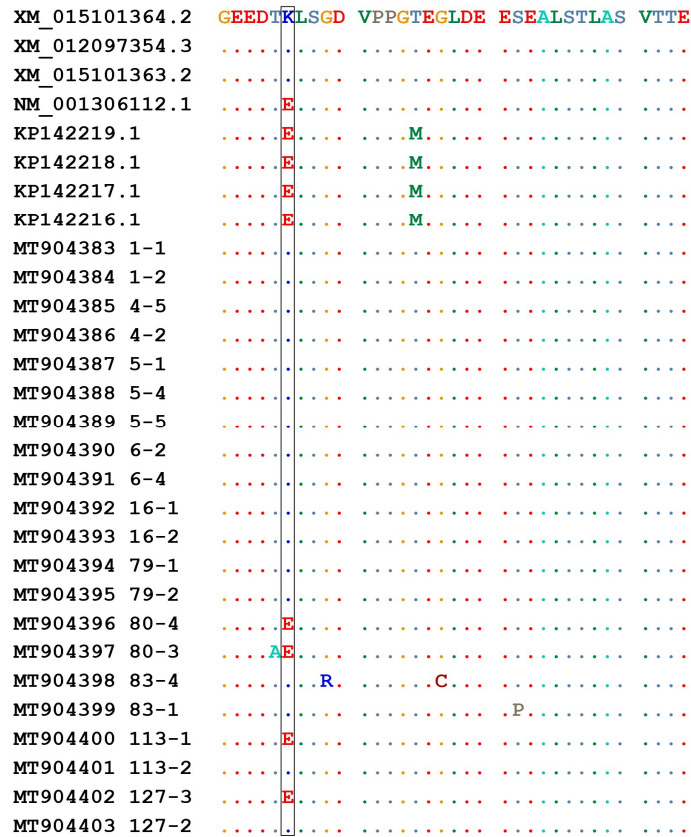


Figure 2. Identification of TMEM154 E35K genotype. Alignment of partial TMEM154 sequences obtained from selected sheep. Numbers refer to the animal sample and clone analyzed. Amino acid substitution at position 35 is highlighted. Identical residues are indicated by dots.

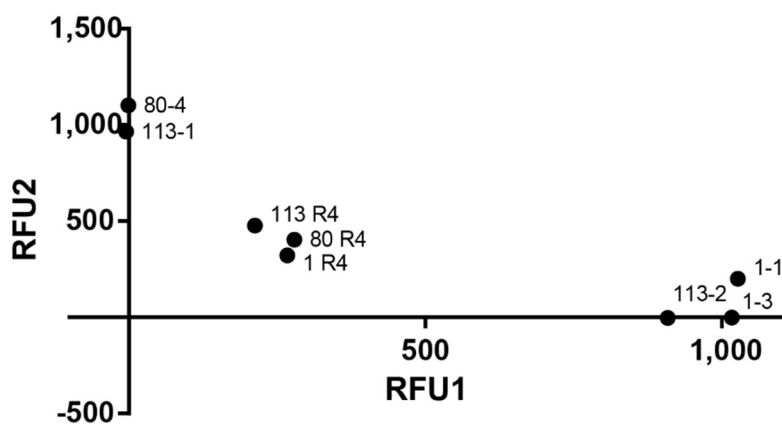


Figure 3. TMEM154 E35K genotyping using fluorogenic probes. Scatter plot distribution of relative fluorescence of FAM, representative of allele 1 (X-axis) and HEX (allele 2; Y-axis) of TMEM154 clones. Original animal samples are also shown, with a heterozygote pattern.

Table 4. TMEM154 E35K allelic frequency in Raza Navarra, Latxa Navarra, Assaf, and Churra ovine breeds.

Genotype	Raza Navarra		Latxa Navarra		Assaf		Churra	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
K/K	92	80.7	134	69.1	15	20.3	75	74.3
E/K	18	15.8	56	28.9	32	43.2	24	23.8
E/E	4	3.5	4	2.1	27	36.5	2	2.0
Total	114	100	194	100	74	100	101	100

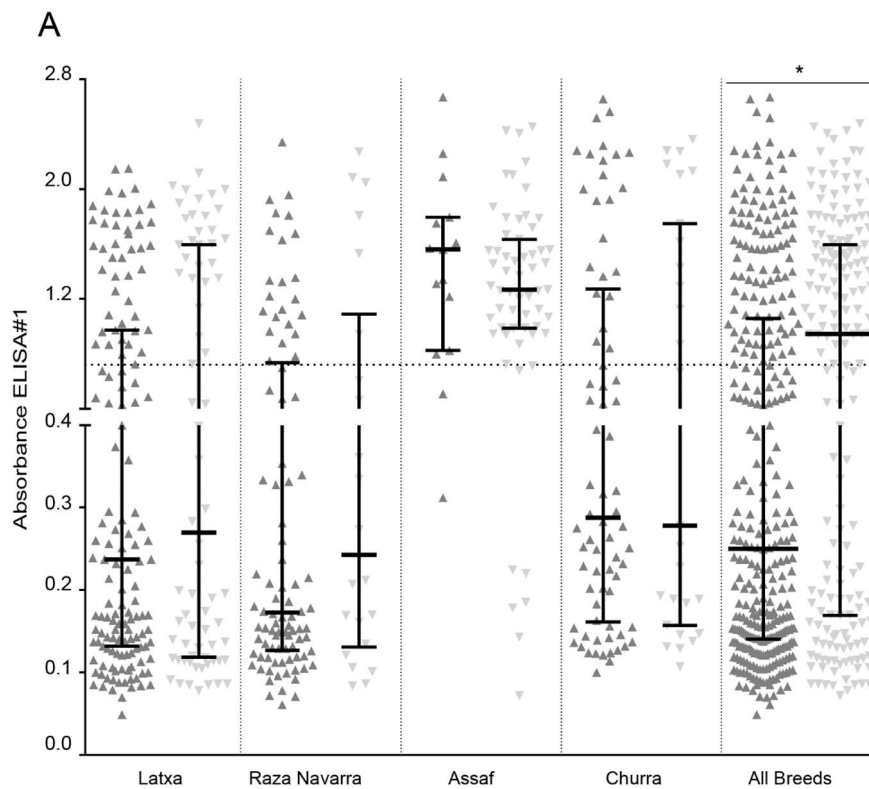
TMEM154 E35K Association with SRLV Infection Status

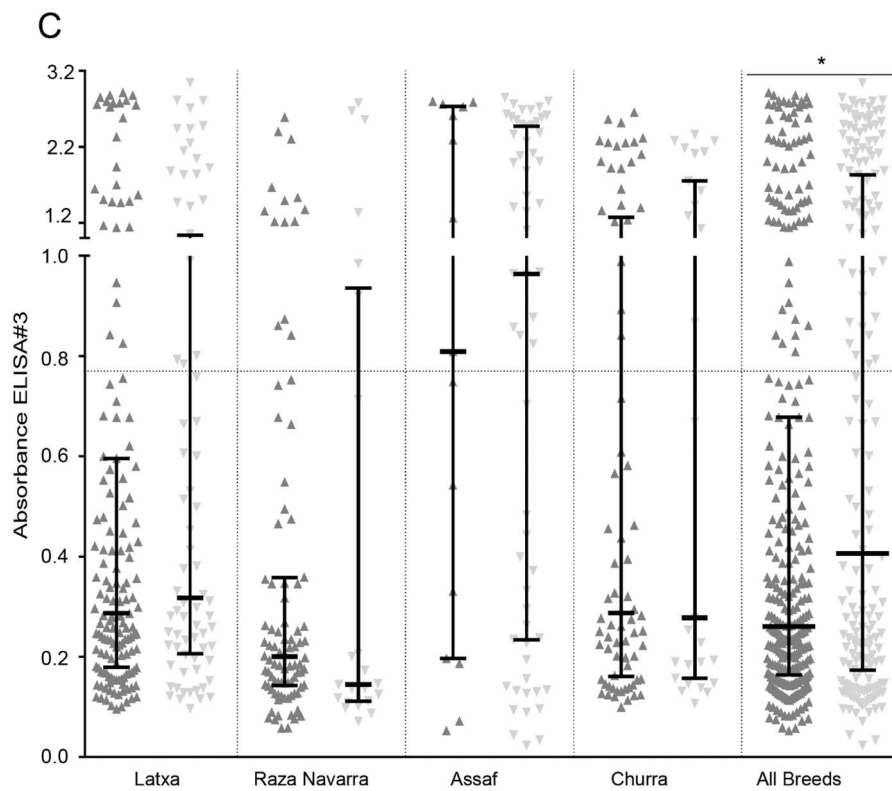
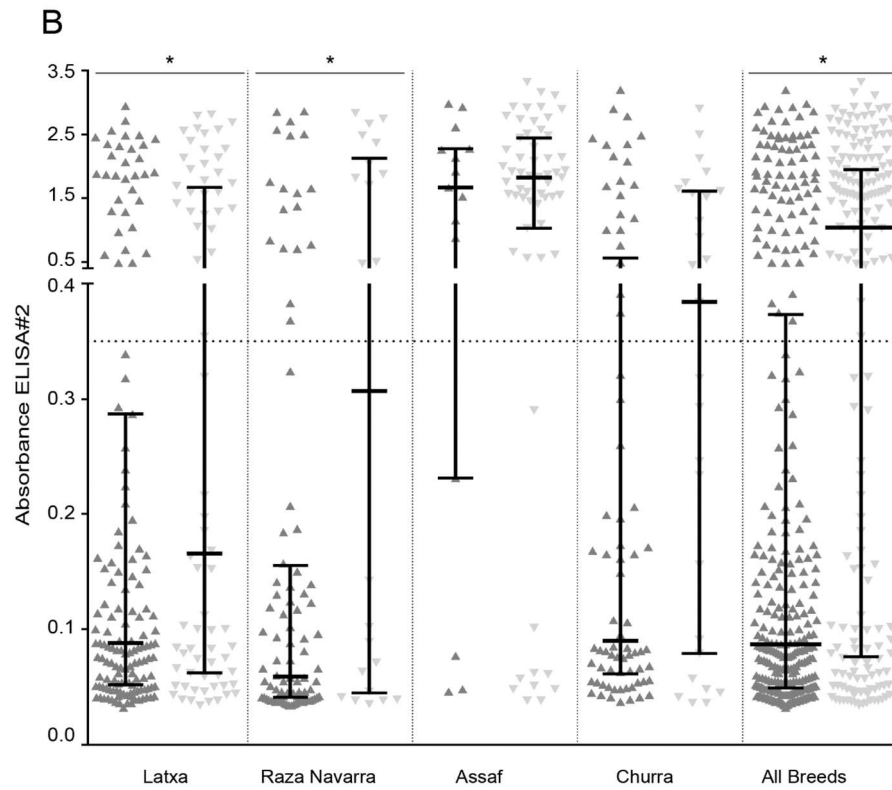
Genotyped sheep were distributed according to ELISA absorbance and PCR proviral load (**Figure 4**). Considering breeds in which the K/K allele was predominant, the proportion of seropositive and seronegative samples in ELISAs #1 and #3 was similar in resistant (K/K) or susceptible (E/K and E/E) genotypes (**Table 5**). Similarly, Assaf animals were mostly seropositive irrespective of their TMEM154 genotype (**Tables S4–S6**). However, when considering all breeds as a whole, significant difference was found between resistant and susceptible genotyped samples, mean absorbance being higher in susceptible samples ($p < 0.05$ Mann-Whitney). Exceptions to this general picture were evident when analyzing data obtained after ELISA#2 testing of Latxa and Raza Navarra breeds, since differences were found in ELISA absorbance according to TMEM154 genotype (**Figure 4B and Table S5**).

Distribution of genotyped samples according to proviral load values was similar among resistant (K/K) and susceptible (E/K and E/E) samples, suggesting poor association between TMEM154 genotype and SRLV infection (**Figure 4D**).

Relationship between SRLV infection status and TMEM154 genotyping was evaluated using association and relative risk, and regression statistical analyses. Animals from the Assaf and Churra breeds did not show significant association between TMEM154 genotype and SRLV antibody occurrence, except for ELISA#2 in Churra animals (**Table 5**). Similarly, animal classification by ELISA#2 of the Raza Navarra and Latxa Navarra breeds allowed a significant association between SRLV seroreactivity and TMEM154 genotype. Additionally, reactivity to ELISAs #1, 2, and 3 was also associated to TMEM154 genotype in Latxa Navarra animals. Total ELISA reactivity was associated to genotyping in the case of the aforementioned breeds (Raza Navarra and Latxa Navarra), but not in Assaf or Churra sheep.

Molecular diagnosis led to a classification of animals into infected or uninfected that was not associated with TMEM154 genotype in the sheep analyzed. However, when combining PCR and ELISA results (Total infected), association was found in the case of the Latxa Navarra breed. The relative risk of being seropositive when encoding a susceptible genotype, homozygous or heterozygotes, was moderate within quoted significant associations, and varied from 1.54 to 3.59 (**Table 5**). Identical results were obtained when applying a generalized linear model of association.





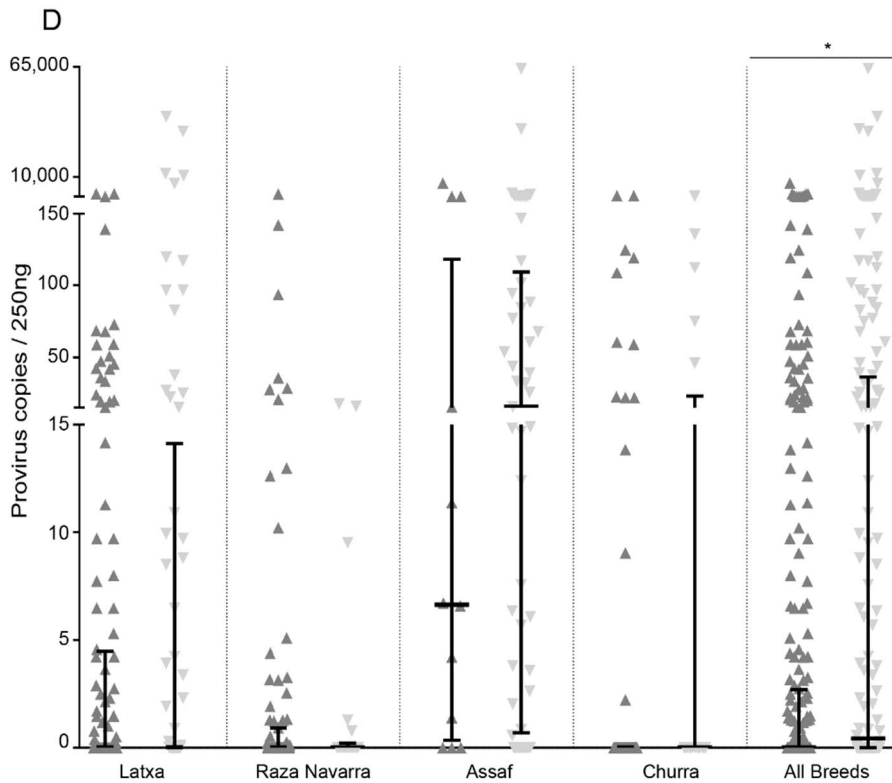


Figure 4. Distribution of ELISA#1 (A), ELISA#2 (B), ELISA#3 (C) absorbance and qPCR proviral load (D) according to TMEM154 genotyped Latxa Navarra, Raza Navarra, Assaf, and Churra sheep. Animal samples were classified according to the E35K TMEM154 polymorphism into K/K (▲) or E/K and E/E (▼) and analyzed by ELISA and qPCR. Samples were grouped by individual breeds and combined (All breeds). Average cut-off values of individual ELISA are represented as a horizontal dotted line (* Mann–Whitney, $p < 0.05$).

Table 5. Small Ruminant Lentivirus (SRLV) infection status and TMEM154 genotyping association. Samples classified into positive or negative according to different methods (ELISAs and qPCR) were re-classified according TMEM154 E35K polymorphism. Statistical probability associated to Fisher's exact test (p) and to relative risk (RR; p') are shown. Significant values are in bold.

TEST	SRLV	Raza Navarra					Latxa Navarra					Assaf					Churra				
		TMEM154 genotype (%)		p	RR (95%CI)	P'	TMEM154 genotype (%)		p	RR (95%CI)	P'	TMEM154 genotype (%)		p	RR (95%CI)	P'	TMEM154 genotype (%)		p	RR (95%CI)	P'
		KK	EK/EE				KK	EK/EE				KK	EK/EE				KK	EK/EE			
ELISA#1	Negative	69	16	0.792	1.09 (0.51-2.35)	0.824	95	23	<0.0001	2.12 (1.52-2.95)	<0.0001	2	6	0.66	1.04 (0.83-1.29)	0.745	53	16	0.338	1.35 (0.74-2.48)	0.326
	Positive	23	6				39	37				13	53				21	10			
ELISA#2	Negative	74	12	0.024	2.32 (1.25-4.31)	0.008	111	23	<0.0001	3.59(2.36-5.48)	<0.0001	4	9	0.446	1.16 (0.84-1.60)	0.381	50	9	0.005	2.02 (1.31-3.10)	0.002
	Positive	18	10				23	37				11	50				24	17			
ELISA#3	Negative	78	16	0.214	1.79 (0.78-4.13)	0.171	101	33	0.007	1.83 (1.22-2.75)	0.0037	5	23	0.772	0.91 (0.60-1.38)	0.674	31	9	0.644	1.11 (0.79-1.56)	0.530
	Positive	14	6				33	27				10	36				44	17			
TOTAL ELISA	Negative	52	10	0.475	1.25 (0.80-1.96)	0.003	73	18	0.002	1.54(1.20-1.98)	0.0007	0	2	1	0.97 (0.92-1.01)	0.157	28	6	0.232	1.23 (0.93-1.61)	0.142
	Positive	40	12				61	42				15	57				47	20			
qPCR	Negative	62	16	1	0.90 (0.42-1.91)	0.781	72	29	0.437	1.15 (0.84-1.56)	0.3843	3	14	1	0.95 (0.71-1.27)	0.747	48	16	0.770	1.12(0.45-2.76)	0.810
	Positive	27	6				59	31				12	45				13	5			

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/1/83/s1>, **Table S1:** Serological screening using three commercial ELISA, **Table S2:** Provirus detection in studied animals, **Table S3:** ELISA individual classification, **Table S4:** Animal classifications according to ELISA#1 and PCR results, **Table S5:** Animal classifications according to ELISA#2 and PCR results, **Table S6:** Animal classifications according to ELISA#3 and PCR results.

DISCUSSION

Lentivirus infection remains one of the major threats in ovine and caprine species in spite of the surveillance and control programs driven from the 1990s in different countries by serological screening with available tools. However, ELISA testing has some inherent disadvantages that jeopardize SRLV diagnosis. On one hand, selection of diagnosis escape mutants could explain previously described diagnostic concerns (Andrésdóttir et al., 2002; Cardinaux et al., 2013; Ritchie and Hosie, 2010). On the other hand, the antigenic spectrum of SRLV, constantly enlarged by descriptions of new genotypes and subtypes (Michiels et al., 2018), is not fully covered by commercial ELISA (Cardinaux et al., 2013; Michiels et al., 2018; Reina et al., 2009; Sanjosé et al., 2015), at least when applied individually (Echeverría et al., 2020). Both factors account for the variable proportion of infected animals not recognized by available ELISAs, as revealed by molecular methods. In the search for alternative tools in the design of control measures, genetic selection through TMEM154 genotyping has been proposed in the SRLV field (Heaton et al., 2012). TMEM154 genotyping based on E35K position has been associated to SRLV infection in different American, European, and Asian ovine breeds and stands as the most promising candidate so far (Molaei et al., 2019, 2018; Yaman et al., 2019). This study aimed at uncovering the potential use of TMEM154 genetic selection in sheep belonging to different breeds and production systems, and infected with different SRLV genotypes (Echeverría et al., 2020). The first approach was to unequivocally identify SRLV infected animals through application of a multiplatform strategy including serological and molecular strategies. Stratified data allowed the analysis of association between TMEM154 genotype and SRLV infection status.

Serological screening revealed that antibody detection using more than one ELISA test significantly improved diagnosis, since the proportion of positive animals considerably increased when the three tests were included. Individual ELISA efficiency in seropositive samples varied among flocks being higher in heavily infected flocks, whereas in those showing moderate seroprevalence, efficiency decreased to 0%. Increased seroprevalence recorded in Assaf flocks may be due to the intensive dairy production system that implies close contact between animals and long-term indoor housing, contributing to increased virus transmission (Leginagoikoa et al., 2006). Interestingly, two Churra flocks would have been diagnosed as uninfected when using ELISA#1, or underestimated using ELISA#2. Despite these data, none of the ELISA could be chosen as the best option to detect SRLV infected animals according to the tested population, since ELISA performance varied

considerably depending on the flock considered. Animal management system or breed can be excluded from the possible reasons since differences in ELISA performance between similar managed flocks composed of different breeds were evident, as it occurred with semi-intensive Churra, Latxa Navarra, and Raza Navarra or in intensive Assaf breeds.

One possible explanation may rely on the unmatched antigenic ELISA design with the circulating strains. Sheep are likely infected by a mix of lentiviruses including strains of different genotypes, even within the same flock or individual (Colitti et al., 2019; Pisoni et al., 2007; Ramírez et al., 2012), thereby enlarging the antigenic repertoire to be detected. Cross-reaction paradigm among Maedi Visna (genotypes A1–3) and CAEV (genotype B1) strains was described in the 1990s when only few genotypes were known (Kwang et al., 1995; Rosati et al., 1999; Saman et al., 1999; Varea et al., 2001). However, molecular methods have allowed the discovery of more than 25 novel subtypes within genotypes A (Molaei et al., 2020) and B (Michiels et al., 2020), and even completely new genotypes such as C (Gjerset et al., 2006) and E (Grego et al., 2007) in recent years. Indeed, a variable proportion of seronegative samples have been evidenced as infected by PCR in this study and elsewhere (Barquero et al., 2013; Brinkhof et al., 2010; Eltahir et al., 2006; Kuhar et al., 2013). Accordingly, efficiencies of the individual tests, regardless serological or molecular, when referred to the Total infected result were low. In this situation, an adequate strategy, involving multiple ELISA testing combined with molecular methods, should be ideally established, not only for epidemiological or control purposes, but also in studies evaluating two cohorts of infected vs uninfected animals when assessing genetic resistance or production losses. Accurate identification of infected animals will reduce the risk of perpetuating the infection in controlled flocks. Additionally, new diagnostic strategies, based on both ELISA and PCR, should be updated aiming at detecting animals infected with new SRLV antigenic variants.

Alternative control strategies explored so far include genetic selection of resistant variants. Based on genome-wide association studies (GWAS), TMEM154 specific alleles at position 35 (E/K) have been associated to SRLV infection susceptibility, in terms of serological reaction (Heaton et al., 2012; Molaei et al., 2018; Yaman et al., 2019) but also proviral load (White et al., 2012). Up to date, susceptibility to SRLV in animals showing homozygous (E/E) or heterozygous (E/K) genotypes has been tested in American, but also European and Asian ovine breeds. Since a natural susceptibility may account for the

differences found in ELISA and qPCR performances presented in this work, a TMEM154 genotyping method was developed and applied to all the animals.

Fluorogenic probes were efficient and easy-to-design tools to genotype ovine DNA for E35K SNP. Allele frequency reflected previous observations and did significantly differ among breeds. Raza Navarra, a meat-oriented breed, showed a KK-resistant genotype frequency higher than 80%, very similar to previous results obtained in rasa Aragonesa, a closely related breed (Heaton et al., 2013). Despite the TMEM154 resistant profile found, SRLV infection is widely distributed in this breed (this study and (Pérez et al., 2010)), as it is in the milk-oriented breed Latxa Navarra, which also showed a high frequency of the resistant genotype (Heaton et al., 2012; Leginagoikoa et al., 2006). Churra flocks despite showing a prevalent frequency of the resistant genotype, were all seropositive at different degrees depending on the diagnostic test applied. By contrast, Assaf sheep showed a high frequency of the susceptible genotype, either homo or heterozygote, of around 80% that, however, was not associated with SRLV infection. Whether this is extensive to other productive breeds showing resistant genotypes, as lacaune for example (**Table S4**), is currently unknown.

Among breeds studied, only Latxa Navarra breed showed a constant association between TMEM154 genotyping and SRLV infection status regardless of the test used for animal classification. Similarly, Raza Navarra animals classified by ELISA#2 as uninfected more likely encoded a K/K resistant genotype. Regarding proviral load, no association was found with TMEM154 genotype as shown in **Figure 4D**. Meaningful association with proviral load should be evaluated not only in the context of infection status, but also involving evaluation of clinical signs in studied animals.

The lack of association described in this study may be due to the existence of other missense mutations within TMEM154 gene different from E35K such as D33N, T44M, I70N, or G38R (Yaman et al., 2019) that may link TMEM154 with SRLV susceptibility in these breeds. The potential involvement of these SNPs individually or jointly considered in SRLV susceptibility is unknown. Additional genotyping of these samples may uncover this possibility. In addition, high infection pressure present in flocks analyzed (most of them were above 50% of infected animals) may have overwhelmed association with TMEM154. However, similar infection pressure has been observed in German flocks, in which establishment of statistical association was possible (Molaei et al., 2018).

Another explanation may rely on the SRLV circulating strains and not related to the host. This association was firstly described in animals from the United States and infected with a genotype A2 strain, that may not require a functional TMEM154 to infect sheep (Juste et al., 2020); Turkish sheep included in the same study are likely infected by an ancestral genotype A variant (Clawson et al., 2015); SRLVs infecting German and Iranian sheep have not been characterized so far (Molaei et al., 2019). Circulating strains in the flocks included in this study are likely a mix of lentiviruses belonging to genotypes A and B, taking into account differential ELISA reactivity, and partial genetic characterization (data not shown). The main difference with the aforementioned studies was the diagnostic strategy used that implied multiple ELISA testing combined with molecular detection of provirus.

Little is known about TMEM154 function; apart from the transmembrane location, GWAS studies have identified TMEM154 as a candidate for asthma severity (Muz et al., 2013) and for type-2 diabetes in a meta-analysis, which combined GWAS data from multiple human ethnic groups, including European, East Asian, South Asian, and Mexican/Mexican American (Harder et al., 2015; Li et al., 2010; Mahajan et al., 2014; Matsuba et al., 2016), both studies relating TMEM154 to inflammatory processes. Disease caused by SRLV is characterized by inflammation, potentially relating TMEM154 expression with development of inflammation in target tissues.

Our results suggest that the relationship between TMEM154 E/K genotyping and susceptibility patterns when facing SRLV infection is not clear for all breeds and SRLV genotypes, and should be tested in a case-by-case manner in order to avoid selection of infected animals as resistant. Combined serological and molecular diagnosis are highly recommended to accurately classify infected animals in order to provide robust studies.

REFERENCES

- Alshanbari, F.A., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Herrmann-Hoesing, L.M., Highland, M.A., Lewis, G.S., White, S.N., 2014. Mutations in *Ovis aries* *TMEM154* are associated with lower small ruminant lentivirus proviral concentration in one sheep flock. *Anim. Genet.* 45, 565–571. <https://doi.org/10.1111/age.12181>
- Andrésdóttir, V., Skraban, R., Matthíasdóttir, S., Lutley, R., Agnarsdóttir, G., Thorsteinsdóttir, H., 2002. Selection of antigenic variants in maedi-visna virus infection. *J. Gen. Virol.* 83, 2543–2551. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2543>
- Barquero, N., Gomez-Lucia, E., Arjona, A., Tournal, C., Heras, A., Fernández-Garayzabal, J., Domenech, A., 2013. Evolution of Specific Antibodies and Proviral DNA in Milk of Small Ruminants Infected by Small Ruminant Lentivirus. *Viruses* 5, 2614–2623. <https://doi.org/10.3390/v5102614>
- Blacklaws, B., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N., de Andres, D., Klein, D., Harkiss, G., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 101, 199–208. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.04.006>
- Brinkhof, J.M.A., Houwers, D.J., Moll, L., Dercksen, D., van Maanen, C., 2010. Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet. Microbiol.* 142, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.060>
- Cardinaux, L., Zahno, M.L., Deubelbeiss, M., Zanoni, R., Vogt, H.R., Bertoni, G., 2013. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet. Microbiol.* 162, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.017>
- Cecchi, F., Dadousis, C., Bozzi, R., Fratini, F., Russo, C., Bandecchi, P., Cantile, C., Mazzei, M., 2019. Genome scan for the possibility of identifying candidate resistance genes for goat lentiviral infections in the Italian Garfagnina goat breed. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 729–733. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1728-y>
- Chassalevris, T., Chaintoutis, S.C., Apostolidi, E.D., Giadinis, N.D., Vlemmas, I., Brellou, G.D., Dovas, C.I., 2020. A highly sensitive semi-nested real-time PCR utilizing oligospermine-conjugated degenerate primers for the detection of diverse strains of small ruminant lentiviruses. *Mol. Cell. Probes* 51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101528>
- Clawson, M.L., Redden, R., Schuller, G., Heaton, M.P., Workman, A., Chitko-McKown, C.G., Smith, T.P., Leymaster, K.A., 2015. Genetic subgroup of small ruminant lentiviruses that infects sheep homozygous for *TMEM154* frameshift deletion mutation A4Δ53. *Vet. Res.* 46, 22. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0162-7>
- Colitti, B., Coradduzza, E., Puggioni, G., Capucchio, M.T., Reina, R., Bertolotti, L., Rosati, S., 2019. A new approach for small ruminant lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212585>
- Dolfini, T., Conrad, L.F., Flores, I.V.C., Ravazzolo, A.P., 2015. Comparison of primer pairs: Greater degeneracy improves small ruminant lentivirus (SRLVs) detection by seminested PCR. *Small Rumin. Res.* 123, 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.10.007>
- Echeverría, I., De Miguel, R., De Pablo-Maiso, L., Glaria, I., Benito, A.A., De Blas, I., De Andrés, D., Luján, L., Reina, R., 2020. Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Front. Vet. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00182>
- Eltahir, Y.M., Dovas, C.I., Papanastassopoulou, M., Koumbati, M., Giadinis, N., Verghese-Nikolakaki, S., Koptopoulos, G., 2006. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J. Virol. Methods* 135. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.010>
- Gjeriset, B., Storset, A.K., Rimstad, E., 2006. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: Characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81201-0>
- Grego, E., Bertolotti, L., Quasso, A., Profiti, M., Lacerenza, D., Muz, D., Rosati, S., 2007. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J. Gen. Virol.* 88, 3423–7. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83292-0>
- Harder, M.N., Appel, E.V.R., Grarup, N., Gjesing, A.P., Ahluwalia, T.S., Jørgensen, T., Christensen, C., Brandslund, I., Linneberg, A., Sørensen, T.I.A., Pedersen, O., Hansen, T., 2015. The Type 2 Diabetes Risk Allele of *TMEM154*-rs6813195 Associates with Decreased Beta Cell Function in a Study of 6,486 Danes. *PLoS One* 10, e0120890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120890>
- Heaton, M.P., Clawson, M.L., Chitko-McKown, C.G., Leymaster, K.A., Smith, T.P.L., Harhay, G.P., White, S.N., Herrmann-Hoesing, L.M., Mousel, M.R., Lewis, G.S., Kalbfleisch, T.S., Keen, J.E., Laegreid, W.W., 2012. Reduced Lentivirus Susceptibility in Sheep with *TMEM154* Mutations. *PLoS Genet.* 8, e1002467. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002467>
- Heaton, M.P., Kalbfleisch, T.S., Petrik, D.T., Simpson, B., Kijas, J.W., Clawson, M.L., Chitko-McKown, C.G., Harhay,

- G.P., Leymaster, K.A., 2013. Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. *PLoS One* 8, e55490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055490>
- Herrmann-Hoesing, L.M., 2010. Diagnostic Assays Used to Control Small Ruminant Lentiviruses. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 843–855. <https://doi.org/10.1177/104063871002200602>
- Juste, R.A., Villoria, M., Leginagoikoa, I., Ugarte, E., Minguijón, E., 2020. Milk production losses in Latxa dairy sheep associated with small ruminant lentivirus infection. *Prev. Vet. Med.* 176, 104886. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104886>
- Kaba, J., Czopowicz, M., Ganter, M., Nowicki, M., Witkowski, L., Nowicka, D., Szaluś-Jordanow, O., 2013. Risk factors associated with seropositivity to small ruminant lentiviruses in goat herds. *Res. Vet. Sci.* 94, 225–227. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.018>
- Kalogianni, A.I., Bossis, I., Ekateriniadou, L. V., Gelasakis, A.I., 2020. Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review. *Animals* 10, 616. <https://doi.org/10.3390/ani10040616>
- Kuhar, U., Barlič-Maganja, D., Grom, J., 2013. Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. *BMC Vet. Res.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-172>
- Kwang, J., Keen, J., Cutlip, R.C., Kim, H.S., de la Concha-Bermejillo, A., 1995. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Rumin. Res.* 16, 171–177. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(95\)00623-5](https://doi.org/10.1016/0921-4488(95)00623-5)
- Leginagoikoa, I., Daltabuit-Test, M., Álvarez, V., Arranz, J., Juste, R.A., Amorena, B., de Andrés, D., Luján, L.L., Badiola, J.J., Berriatua, E., 2006. Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. *Res. Vet. Sci.* 80, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.003>
- Leginagoikoa, Iratxe, Juste, R.A., Barandika, J., Amorena, B., De Andrés, D., Luján, L., Badiola, J., Berriatua, E., 2006. Extensive rearing hinders Maedi-Visna Virus (MVV) infection in sheep. *Vet. Res.* 37, 767–778. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006034>
- Leymaster, K.A., Chitko-McKown, C.G., Clawson, M.L., Harhay, G.P., Heaton, M.P., 2013. Effects of TMEM154 haplotypes 1 and 3 on susceptibility to ovine progressive pneumonia virus following natural exposure in sheep1,2,3. *J. Anim. Sci.* 91, 5114–5121. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6663>
- Li, X., Howard, T.D., Ampleford, E.J., Peters, S.P., Bleecker, E.R., Meyers, D.A., 2010. Genome-wide Association Study Of Asthma Severity Using Proportional Odds Model Identifies TMEM154, in: American Thoracic Society International Conference Meetings Abstracts American Thoracic Society International Conference Meetings Abstracts. American Thoracic Society, pp. A3728–A3728. https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2010.181.1_meetingabstracts.a3728
- Mahajan, A., Go, M.J., Zhang, W., Below, et al., 2014. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat. Genet.* 46, 234–244. <https://doi.org/10.1038/ng.2897>
- Marinho, R.C., Martins, G.R., Souza, K.C., Sousa, A.L.M., Silva, S.T.C., Nobre, J.A., Teixeira, M.F.S., 2018. Duplex nested-PCR for detection of small ruminant lentiviruses. *Brazilian J. Microbiol.* 49. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.013>
- Matsuba, R., Imamura, M., Tanaka, Y., Iwata, M., Hirose, H., Kaku, K., Maegawa, H., Watada, H., Tobe, K., Kashiwagi, A., Kawamori, R., Maeda, S., 2016. Replication study in a japanese population of six susceptibility loci for type 2 diabetes originally identified by a transethnic meta-analysis of genome-wide association studies. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154093>
- Michiels, R., Adjadj, N.R., De Regge, N., 2020. Phylogenetic Analysis of Belgian Small Ruminant Lentiviruses Supports Cross Species Virus Transmission and Identifies New Subtype B5 Strains. *Pathogens* 9, 183. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030183>
- Michiels, R., Van Mael, E., Quinet, C., Welby, S., Cay, A.B., De Regge, N., 2018. Seroprevalence and risk factors related to small ruminant lentivirus infections in Belgian sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 151, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.12.014>
- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J.J., García-Marín, J.F., de Andrés, D., Luján, L., Amorena, B., Juste, R.A., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.* 181, 75–89. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.08.007>
- Molaei, V., Bazzucchi, M., De Mia, G.M., Otarod, V., Abdollahi, D., Rosati, S., Lühken, G., 2020. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Sci. Rep.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58990-9>
- Molaei, V., Eltanany, M., Lühken, G., 2018. First survey on association of TMEM154 and CCR5 variants with serological maedi-visna status of sheep in German flocks. *Vet. Res.* 49, 36. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0533-y>
- Molaei, V., Otarod, V., Abdollahi, D., Lühken, G., 2019. Lentivirus Susceptibility in Iranian and German Sheep Assessed by Determination of TMEM154 E35K. *Animals* 9, 685. <https://doi.org/10.3390/ani9090685>
- Muz, D., Oğuzoğlu, T.Ç., Rosati, S., Reina, R., Bertolotti, L., Burgu, I., 2013. First molecular characterization of

- visna/maedi viruses from naturally infected sheep in Turkey . *Arch. Virol.* 158, 559–570. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1518-1>
- Pérez, M., Biescas, E., de Andrés, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Reina, R., Bolea, R., de Andrés, D., Juste, R.A., Cancer, J., Gracia, J., Amorena, B., Badiola, J.J., Luján, L., 2010. Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón (Spain). *Vet. J.* 186, 221–225. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2009.07.031>
- Pisoni, G., Bertoni, G., Puricelli, M., Maccalli, M., Moroni, P., 2007. Demonstration of Coinfection with and Recombination by Caprine Arthritis-Encephalitis Virus and Maedi-Visna Virus in Naturally Infected Goats. *J. Virol.* 81, 4948–4955. <https://doi.org/10.1128/jvi.00126-07>
- Prezioso, S., Renzoni, G., Allen, T.E., Taccini, E., Rossi, G., Demartini, J.C., Braca, G., 2004. Colostral transmission of maedi visna virus: Sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Vet. Microbiol.* 104, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.010>
- Ramírez, H., Reina, R., Bertolotti, L., Cenoz, A., Hernández, M.M., San Román, B., Glaria, I., de Andrés, X., Crespo, H., Jáuregui, P., Benavides, J., Polledo, L., Pérez, V., García-Marín, J.F., Rosati, S., Amorena, B., de Andrés, D., 2012. Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Vet. Res.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-8>
- Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P., Quasso, A., Amorena, B., Rosati, S., 2009. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Vet. Microbiol.* 138, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.005>
- Ritchie, C., Hosie, B., 2014. Concern over maedi visna breakdowns. *Vet. Rec.* 175, 50–51.
- Ritchie, C., Hosie, B., 2010. Health schemes: Increase in maedi-visna breakdowns. *Vet. Rec.* 389.
- Rosati, S., Mannelli, A., Merlo, T., Ponti, N., 1999. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res.* 61, 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00031-3)
- Saman, E., Van Eynde, G., Lujan, L., Extramiana, B., Harkiss, G., Tolari, F., González, L., Amorena, B., Watt, N., Badiola, J., 1999. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 734–40.
- Sanjosé, L., Pinczowski, P., Crespo, H., Pérez, M., Glaria, I., Gimeno, M., de Andrés, D., Amorena, B., Luján, L., Reina, R., 2015. Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. *Vet. J.* 204, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.012>
- Varea, R., Monleón, E., Pacheco, C., Luján, L., Bolea, R., Vargas, M.A., Van Eynde, G., Saman, E., Dickson, L., Harkiss, G., Amorena, B., Badiola, J.J., 2001. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 13, 301–307. <https://doi.org/10.1177/104063870101300404>
- White, S.N., Mouse, M.R., Herrmann-Hoesing, L.M., Reynolds, J.O., Leymaster, K.A., Neibergs, H.L., Lewis, G.S., Knowles, D.P., 2012. Genome-Wide Association Identifies Multiple Genomic Regions Associated with Susceptibility to and Control of Ovine Lentivirus. *PLoS One* 7, e47829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047829>
- Yaman, Y., Keleş, M., Aymaz, R., Sevim, S., Sezenler, T., Önal, A.T., Kaptan, C., Başkurt, A., Koncagül, S., Öner, Y., Öztürk, E.E., İriadam, M., Ün, C., Heaton, M.P., 2019. Association of TMEM154 variants with visna/maedi virus infection in Turkish sheep. *Small Rumin. Res.* 177, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.006>

PROYECTOS FUTUROS

PROYECTOS FUTUROS

La infección por lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) es una de las más extendidas en el ganado ovino y caprino de todo el mundo, causando una enfermedad multisistémica que afecta a la producción y al bienestar animal. La ausencia de tratamientos o vacunas ha propiciado que las estrategias de control frente a los SRLV se orienten hacia la detección temprana de animales infectados y a su manejo específico.

En esta Tesis doctoral se han puesto de manifiesto algunas carencias de las estrategias aplicadas a nivel mundial basadas en el diagnóstico serológico mono-estirpe y apunta a la necesidad de optimizar el diagnóstico en la implantación de planes de control, el estudio de las pérdidas derivadas de la infección o la instauración de programas de selección genética.

Fruto de los resultados de esta Tesis se están desarrollando algunas líneas futuras de investigación que se discuten a continuación:

Efectos adversos de los adyuvantes vacunales:

La aparición de las vacunas ha tenido un impacto sin precedentes en la salud tanto humana como animal, representando el avance médico más importante de la historia. Las vacunas contienen diferentes tipos de adyuvantes, que son sustancias que aumentan la eficacia de las mismas al mejorar la inmunogenicidad del antígeno (Coffman et al., 2010; Leroux-Roels, 2010). Ciertos adyuvantes pueden aumentar específicamente la respuesta de anticuerpos o la respuesta mediada por células, reduciendo significativamente el número de inmunizaciones requeridas, la cantidad de antígeno y el tiempo necesario para la respuesta (Gerdt, 2015). En los últimos años, el estudio y desarrollo de adyuvantes de vacunas se ha convertido en un pilar básico en la vacunología veterinaria (Burakova et al., 2018; Coffman et al., 2010).

En 2019 (Asín et al., 2019) se publicó el primer artículo que describía la aparición de granulomas persistentes en ovejas tras la vacunación repetida con inóculos en base de aluminio. Este estudio también demostró que en los granulomas hay macrófagos cargados de aluminio y que éstos pueden migrar a órganos distantes como el ganglio linfático, y posiblemente al sistema nervioso central. Otro estudio posterior, utilizando estos mismos

animales, mostró la activación de mRNA y microRNA específicos, asociada a procesos neurológicos y autoinmunes (Varela-Martínez et al., 2020, 2018).

En la línea de estos trabajos, en el primer capítulo de esta Tesis se describe por primera vez la presencia y replicación de SRLV en granulomas inducidos por aluminio en ovejas naturalmente infectadas por dichos lentivirus (Echeverría et al., 2020a). La infección de los macrófagos que forman los granulomas podría ofrecer diferentes ventajas al virus, como la de aumentar su distribución en el organismo o aprovechar la activación debida al aluminio, de tipo M2 (Shardlow et al., 2018), que facilita la replicación de los SRLV (Crespo et al., 2013). Por tanto, los granulomas son un lugar adecuado para la replicación viral y podría tener implicaciones importantes en la patogénesis y epidemiología de los SRLV. Resultados preliminares obtenidos recientemente muestran una mayor respuesta de anticuerpos junto con una menor carga proviral en monocitos sanguíneos en animales inoculados con hidróxido de aluminio (**Figura 1**). Esto podría indicar que la respuesta de anticuerpos es efectiva, hecho poco común en las infecciones por SRLV, o bien que la disponibilidad de monocitos infectados es menor en la circulación sanguínea debido a su migración hacia los granulomas.

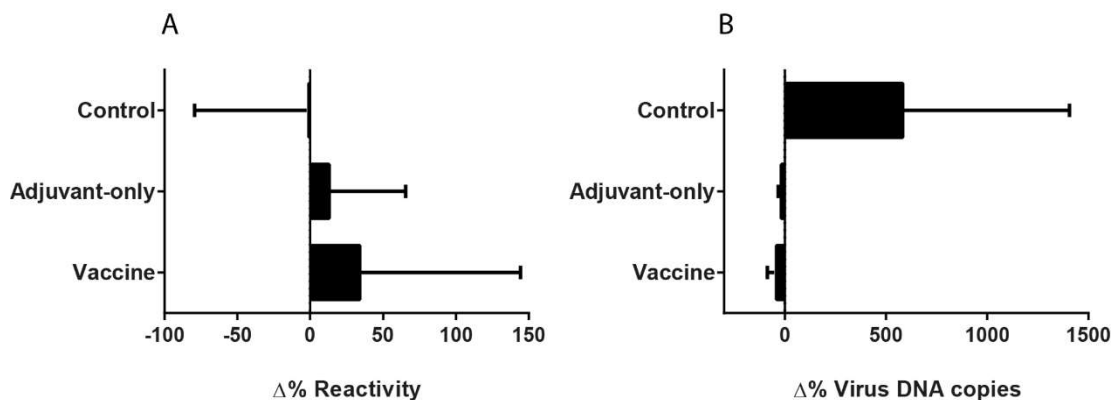


Figura 1. Cambios en la respuesta de anticuerpos (A) y en la carga proviral de monocitos sanguíneos (B) de animales vacunados, inoculados con adyuvante y control. La respuesta serológica y la carga proviral se midieron con métodos desarrollados en el laboratorio, basados en ELISA y PCR cuantitativa, respectivamente.

Revelar el papel de los granulomas en la patogénesis de los SRLV y la epidemiología puede explicar la mayor seroprevalencia de SRLV notificada después de la vacunación en el campo (Valas et al., 2011). Estudios más amplios deberían esclarecer la posible activación de los SRLV y otros patógenos macrofagotrópicos tras la vacunación con aluminio, lo que

sustentaría la necesidad de desarrollar adyuvantes alternativos. La presencia de secuencias del genotipo B2, hasta el momento con un marcado tropismo por la articulación (Pinczowski et al., 2017), en el encéfalo de animales que han recibido o bien vacunas o bien adyuvante solo, no se había observado en estudios previos de los mismos investigadores. Podría ser interesante determinar si en animales inoculados con AIOH, los patógenos macrofagotrópicos son capaces de aumentar su biodistribución, potencialmente causando signos en nuevos órganos diana, como el sistema nervioso central, lo que podría aumentar considerablemente su patogenicidad.

Sin duda, el futuro de las vacunas debería pasar por el estudio y empleo de adyuvantes alternativos que mejoren la seguridad y la eficacia, y al mismo tiempo, eviten la formación de granulomas. El uso de vectores virales y de sales de fosfato de calcio son dos posibles alternativas que presentan numerosas ventajas. El fosfato de calcio es un adyuvante que fue muy utilizado en medicina humana y que todavía está aprobado (Masson et al., 2017), pero que fue reemplazado en los años 80 por las sales de aluminio. Hay estudios en diferentes modelos animales en los que se ha demostrado que es un adyuvante eficaz y biocompatible, con capacidad de generar una respuesta inmunitaria similar a la del aluminio, pero causando un daño tisular menos prolongado (Masson et al., 2017; Relyveld and Chermann, 1994). A pesar de que en veterinaria hay pocas vacunas que incluyan este adyuvante, la patente de este producto ya es pública (Relyveld and Chermann, 1994) y su uso no supondría un coste económico extra. En la actualidad no disponemos de estudios que analicen su eficacia, seguridad y efectos a largo plazo en modelos animales ovinos.

Por otro lado, el uso de vectores virales se está convirtiendo en una práctica habitual en la terapia celular y en ensayos de inmunización (Draper et al., 2008; El Garch et al., 2008; Jas et al., 2012; Tartaglia et al., 1993; Ura et al., 2014). En la actualidad, ya se han analizado vectores virales basados en paramixovirus, como el virus Sendai, y se ha visto que inducen protección frente a SIV (Matano et al., 2001), el virus respiratorio sincitial (Takimoto et al., 2005), tuberculosis en ratones (Hu et al., 2017) o el HIV (Seki and Matano, 2016). Su aplicación en ovino ha sido contrastada y ofrece un gran abanico de ventajas, como los niveles altos de producción de inmunógeno *in vivo* o la falta de inmunidad frente al vector (Griesenbach et al., 2011). En el grupo ya se ha comenzado a trabajar con este virus y es un buen candidato para el diseño de una vacuna, ya que puede actuar como

inductor de la respuesta innata (de Pablo et al., 2020) y como portador de genes de SRLV para desencadenar una respuesta específica contra la infección.

Diagnóstico de SRLV:

En los últimos años, la constante descripción de nuevas variantes, subgrupos e incluso genotipos desconocidos ha aumentado considerablemente el espacio filogenético que ocupan las distintas estirpes de SRLV. Nuevos enfoques, como los basados en técnicas de secuenciación masiva, indican que la diversidad genética y antigénica de los SRLV puede ser aún mayor de lo previsto, ya que las estirpes caracterizadas clásicamente mediante aislamiento en cultivo celular podrían no reflejar completamente la realidad *in vivo* (Colitti et al., 2019).

La técnica más utilizada actualmente para la detección de la infección por SRLV es el diagnóstico serológico mediante ELISA. Sin embargo, como hemos podido comprobar en el capítulo II de esta tesis, la utilización de un solo test no resulta efectiva para detectar el total de la población infectada (Echeverría et al., 2020b). Esto es debido principalmente a la diversidad antigénica que presentan dichos lentivirus (Barquero et al., 2013; Cardinaux et al., 2013; Herrmann-Hoesing, 2010), a los mutantes de escape que se generan (Andrésdóttir et al., 2002; Cardinaux et al., 2013; Ritchie and Hosie, 2010) y al tiempo necesario para que un animal seroconvierta (Carrozza et al., 2009; Kaba et al., 2013).

Para optimizar el diagnóstico serológico con las herramientas disponibles en la actualidad sería necesario llevar a cabo un estudio preliminar que describiera el espectro antigénico de las diferentes cepas circulantes en la población a analizar y, posteriormente, utilizar el método comercial que más se ajustase, o bien, diseñar nuevos métodos acordes a las cepas circulantes. De hecho, diferentes estudios demuestran que la detección es mejor cuando se emplean antígenos homólogos a las cepas circulantes (Lacerenza et al., 2006). Aunque este procedimiento podría resultar efectivo, tanto el análisis molecular previo, como el diseño de un nuevo ELISA requieren de la utilización de técnicas complejas y costosas en tiempo y dinero. Por tanto, es necesario analizar la conveniencia de su aplicabilidad desde un punto de vista práctico y económico, en cada población.

Las técnicas moleculares basadas en PCR, que detectan el DNA viral, también pueden utilizarse para el diagnóstico de los SRLV. Debido a la diversidad genética, el diseño de los *primers* es un punto crítico para la sensibilidad y especificidad de la PCR (Brajon, 2012;

Brinkhof et al., 2008; Kuhar et al., 2013). Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de las PCRs, en los últimos años se ha incrementado el uso de *primers* degenerados (Eltahir et al., 2006), de PCRs dobles y/o anidadas (Chassalevris et al., 2020) y de qPCRs (Li et al., 2013). Además, la baja carga viral asociada a la infección por SRLV dificulta la detección del virus en la sangre (Haase, 1986). Como se ha demostrado en los capítulos II y III de esta tesis, el empleo de kits comerciales para la detección de los SRLV mediante qPCR es eficiente y podría, en algunos casos, superar el diagnóstico serológico. Sin embargo, en el caso de los SRLV circulantes en ovinos de la raza Churra (capítulo III), la detección por PCR de animales infectados fue significativamente menos eficaz que con las técnicas serológicas. Por ello, con las técnicas disponibles actuales, la forma de conseguir un “gold standard” sería combinando diferentes ELISAs con PCRs (de Andrés et al., 2005; Minguijón et al., 2015).

Algunos de los desarrollos tecnológicos alcanzados en los últimos años incluyen la técnica llamada Luminex, que podría revolucionar el diagnóstico serológico de los lentivirus. Esta nueva técnica se basa en la utilización de un conjunto de esferas conjugadas con un reactivo específico para cada analito de interés, con un código de color diferente asignado a cada una de ellas. El potencial de esta metodología se basa en que en un mismo ensayo y con un reducido volumen de muestra, empleando una batería de péptidos sintéticos o de proteínas recombinantes, todos los anticuerpos pueden ser detectados simultáneamente. En este sentido, ya se emplean péptidos sintéticos en la detección por ELISA de anticuerpos frente a los SRLV, demostrando su viabilidad (Cardinaux et al., 2013; de Andrés et al., 2013; Sanjosé et al., 2015). En 2001 se llevó a cabo el primer estudio para cuantificar distintas citoquinas pro-inflamatorias en muestras de plasma humano estimuladas con lipopolisacárido bacteriano. Los resultados obtenidos por la técnica LabMAP™ (Luminex™) fueron comparables a los obtenidos por ELISA y por tanto, los autores consideraron que es factible utilizar en el futuro esta tecnología para detectar y cuantificar citoquinas y otros biomarcadores potenciales (Prabhakar et al., 2002). En estudios posteriores, otros autores re-afirmaron el potencial de esta técnica para la evaluación de la mayoría de las citoquinas y para la caracterización del estado del sistema inmunitario (DuPont et al., 2005; Khan et al., 2004; Mountjoy, 2020; Ray et al., 2005). Pang et al (Pang et al., 2005) compararon esta técnica con la de ELISA para detectar la presencia de 6 auto-anticuerpos en muestras de suero humano y demostraron que los resultados eran comparables a los obtenidos por ELISA. En un estudio posterior, Anderson et al. (Anderson et al., 2011) compararon la utilización de esta técnica con ELISAs ya existentes para la detección de anticuerpos frente

a diferentes virus bovinos (virus del herpes bovino 1 (BHV-1), virus parainfluenza 3 (PI3V), virus de la diarrea bovina viral (BVDV) y virus respiratorio sincitial (BRSV)). Para ello, los mismos antígenos utilizados previamente en los ELISAs se unieron mediante enlaces covalentes a las esferas fluorescentes. Para el BHV-1 y PI3V, se obtuvieron resultados similares con la técnica Luminex, en cuanto a sensibilidad y especificidad, a los de las técnicas ELISA, indicando que puede ser una herramienta útil y efectiva para la detección de anticuerpos. Sin embargo, a pesar de las innumerables ventajas, también hay que tener en cuenta que los kits y los equipos necesarios para la realización de esta técnica son más caros y sofisticados que los necesarios para los ELISAs y que para su utilización en el campo de los SRLV sería necesario una puesta a punto.

Además de la posibilidad de multiplexar para detectar un amplio rango de reacciones antígeno-anticuerpo, existen otros desarrollos tecnológicos basados en la técnica ELISA que aumentan significativamente la capacidad de detección. Entre ellos, el uso de la plataforma Meso Scale Discovery (MSD), que puede incrementar la sensibilidad por encima de 5 veces respecto a los ELISAs convencionales, como se demuestra en un estudio comparativo de diferentes tecnologías para el análisis del perfil de citoquinas en sobrenadantes de cultivo (Platchek et al., 2020) o la detección de antígenos del virus de la enfermedad mano-pie-boca en muestras clínicas (Morioka et al., 2014). La única diferencia de este sistema es la utilización de placas que contienen electrodos en el fondo de los pocillos junto con anticuerpos de detección conjugados con SULFO-TAG, una etiqueta quimio-luminiscente. Tras la reacción ELISA, las placas son estimuladas con electricidad y se mide la luz emitida. Así, la conversión de un ELISA existente a la plataforma MSD se puede llevar a cabo de manera directa con una mínima optimización, obteniendo en muy poco tiempo un método de diagnóstico mucho más sensible. Además, la plataforma permite el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de respuestas inmunitarias frente a agentes infecciosos, ya que se pueden multiplexar varios antígenos en un solo pocillo sin perder sensibilidad, debido al bajo ruido de fondo y al amplio rango dinámico de la técnica que permite el uso de una misma dilución para estudiar varios analitos. Recientemente se han desarrollado herramientas basadas en MSD para detectar anticuerpos contra diferentes epitopos generados tras la vacunación frente al parásito causante de la malaria (Bolton et al., 2020) o determinar niveles de anticuerpos frente a diferentes antígenos de SARS-COV-2 y su actividad funcional neutralizante (Johnson et al., 2020). En la actualidad, la puesta a punto de un ensayo MSD multiplex sería factible de forma sencilla, que permitiría, además

de aumentar la sensibilidad del diagnóstico de los SRLV, la caracterización de los virus circulantes, ya que se ha testado un gran número de antígenos basados en secuencias de diferentes estirpes de SRLV en formato ELISA convencional, que podrían adecuarse a la tecnología MSD. Aunque los reactivos empleados son los habituales, las placas son sensiblemente más costosas y es necesario contar con un lector de placas MSD específico.

La plataforma Single Molecule Array (Simoa) supone un salto sustancial en la sensibilidad de los inmunoensayos, aumentando la capacidad de detección hasta 1000 veces en comparación al ELISA convencional o hasta 100 veces en comparación al MSD, como quedó demostrado en el desarrollo de un test para detectar GDF11 (factor de diferenciación del crecimiento 11) (Myzithras et al., 2016). El ELISA se realiza en miles de esferas paramagnéticas, formándose un único inmuno-complejo en cada una, que se depositan de manera individual en micropocillos, lo que permite una lectura digital al detectar positividad/negatividad de cada esfera. Basándose en esta técnica, se ha puesto a punto un ensayo multiplex para la detección de tres isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) frente a cuatro proteínas inmunogénicas de SARS-CoV-2 (Norman et al., 2020), permitiendo caracterizar la seroconversión de pacientes en estadios muy tempranos de la infección y abriendo la posibilidad a investigar la interacción virus-hospedador. Además de anticuerpos, la plataforma Simoa se puede utilizar también para detectar de forma directa la presencia de lentivirus. Así, se ha desarrollado un test que detecta la proteína p24 con una sensibilidad 4000 veces superior que ensayos convencionales y equivalente a test de ácidos nucleicos, que es capaz de detectar el virus HIV en muestras de pacientes que aún no han seroconvertido (Cabrera et al., 2015). El desarrollo de esta técnica en el campo de los SRLV supondría un gran avance en el diagnóstico y control de la infección, aunque de momento no sea una opción muy realista debido a la complejidad y alto coste.

Importancia económica de la infección y rentabilidad de su control epidemiológico:

Desde el descubrimiento de la enfermedad producida por el virus Maedi Visna en 1954 (Sigurdsson, 1954), numerosos autores han tratado de asociar la infección a pérdidas económicas directas o indirectas en rebaños ovi-caprinos (Barquero et al., 2013; Dohoo et al., 1987; Martínez-Navalón et al., 2013). Sin embargo, hay una gran controversia entre los resultados obtenidos por los diferentes autores, lo cual, como hemos comentado en el

capítulo II de esta Tesis, puede deberse a la dificultad de realizar una correcta clasificación entre animales infectados y no infectados. De ahí también la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico que nos permitan detectar la infección de manera más precisa.

La presencia de los SRLV fue detectada por primera vez en España en los años 80, y hasta la actualidad, no se ha conseguido frenar ni disminuir su propagación. El hecho de que sea una enfermedad que fácilmente pasa “desapercibida” en el rebaño y de que sólo se identifiquen signos clínicos cuando la explotación presenta una elevada tasa de infección, hace que la mayoría de los ganaderos no sean conscientes del peligro que presenta esta infección en la ganadería. En la actualidad no hay planes de control oficiales a nivel nacional, sino que las diferentes comunidades presentan sus propios planes, que son voluntarios para los ganaderos. Los diferentes planes que se han llevado a cabo han resultado efectivos a la hora de disminuir la prevalencia (Pérez et al., 2010); sin embargo, su efecto no ha podido ser cuantificado a nivel económico. No hay que olvidar que una explotación ganadera debe ser rentable económicamente y, para que los ganaderos sean conscientes del efecto que tiene la infección en su explotación y las ventajas de un plan de control para erradicar los SRLV, es importante tener en cuenta la vertiente económica y actualmente eso resulta muy complicado para los investigadores y veterinarios de campo.

Una posible solución a estos problemas podría residir en el diseño de un algoritmo capaz de predecir las pérdidas directas e indirectas asociadas a cada porcentaje de prevalencia en los diferentes sistemas productivos. Para ello, sería necesario realizar un meta-análisis en los diferentes sistemas productivos (extensivos, intensivos, semi-extensivos, de producción lechera o cárnica, ovinos, caprinos o mixtos...) en el que se asegure una correcta clasificación de los animales infectados y se determinen los diferentes parámetros productivos asociados a esos animales (cantidad de corderos, edad de destete, peso de destete, cantidad y calidad de leche). Como se ha indicado, un factor determinante para el éxito de esta propuesta sería la correcta clasificación de la cabaña en cuanto a la infección por SRLV, clasificación que se podría realizar satisfactoriamente mediante la metodología seguida en esta Tesis (combinación de diferentes test ELISA y PCR).

La realización de estudios que ayuden a poner de manifiesto el daño que causa la infección por SRLV en los rebaños y productores ovinos y caprinos contribuirá de manera determinante a la concienciación de instituciones y asociaciones de criadores para el cumplimiento de la legislación actual, por ejemplo, en la exportación a países que exijan

pruebas negativas, y para la mejora de la productividad de las explotaciones. La situación epidemiológica de nuestro país constituye un ejemplo fundamental para todos los países de la cuenca Mediterránea, por lo que un estudio a nivel nacional que permita testar esta hipótesis sería pionero a nivel mundial.

Estrategias de control alternativas al diagnóstico:

Una alternativa al control clásico mediante diagnóstico precoz es la selección genética. Investigaciones en Estados Unidos proponen la selección de animales que presenten determinados genotipos de TMEM154 (Heaton et al., 2012), por la que animales homocigotos en la posición 35 codificando una K (lisina) serían resistentes a la infección, y aquéllos heterocigotos serían susceptibles. Investigaciones realizadas en razas Europeas y Asiáticas parecen validar esta asociación entre el genotipo del hospedador y la susceptibilidad a los SRLV (Molaei et al., 2019, 2018; Yaman et al., 2019).

En el capítulo III de esta Tesis se ha comprobado una falta de asociación entre el genotipo del TMEM154 en la posición E35K y la susceptibilidad a la infección en diferentes razas (Ramírez et al., 2021). Esto tal vez pueda deberse a que existen otras mutaciones en el gen TMEM154, como D33N, T44M, N701 o G38R que pueden relacionar dicho gen con la susceptibilidad a SRLV en las razas que se han estudiado. Además, la implicación de estos polimorfismos debería ser analizada de forma individual y conjunta (Yaman et al., 2019).

Otro factor a tener en cuenta es la prevalencia de la infección en el rebaño, que en el caso del presente estudio era superior al 50% y puede diluir el efecto del TMEM154. Sin embargo, en un estudio realizado en Alemania se ha demostrado asociación en animales con una prevalencia similar (Molaei et al., 2018). Esto puede deberse a que otros estudios clasifiquen de manera inexacta los animales o a que el efecto del TMEM154 dependa de la estirpe del virus con el que esté infectado el rebaño. Por ello, en los próximos estudios se debería tener en cuenta otras mutaciones del gen, la prevalencia de infección en el rebaño y el genotipo del virus circulante, además de realizar una correcta clasificación de los animales infectados.

Teniendo en cuenta la complejidad de las interacciones hospedador-patógeno, la plasticidad genética de los lentivirus y el gran abanico de manifestaciones clínicas, así como de células susceptibles, la selección genética de animales resistentes a los SRLV difícilmente puede basarse en un solo carácter.

Aunque la función de TMEM154 es desconocida, su localización en la membrana plasmática hace pensar que puede tener un papel en la entrada de los SRLV a las células (Clawson et al., 2015). Sin embargo, los SRLV presentan una alta variabilidad especialmente en regiones de la proteína Env, encargada de reconocer al receptor/es celular/es, pudiendo infectar un gran número de células de diferentes especies, siendo mecanismos posteriores a la entrada los responsables de la restricción específica de especie (Hötzel and Cheevers, 2002). Además, se piensa que los SRLV pueden emplear más de un receptor específico para la entrada en las células del hospedador (Crespo et al., 2012).

Una estrategia paralela podría ser la de caracterizar en profundidad la respuesta inmunitaria en determinados animales que presenten bajos niveles de carga viral dentro de un rebaño infectado. Crespo et al observan que una proporción de los individuos pertenecientes a un mismo rebaño e infectados con los mismos SRLV de manera natural, es capaz de mantener niveles bajos de virus, a pesar de mostrar reacción serológica (Crespo et al., 2016). Las células procedentes de estos animales muestran un perfil restrictivo en comparación con las mismas células procedentes de animales del mismo rebaño pero que presentan una alta carga viral, implicando a factores de restricción como TRIM5 α o A3Z1 en el proceso. El estudio de estos potencialmente “long-term non-progressors” podría ser clave en la selección de castas o estirpes familiares capaces de controlar la infección por SRLV. Uno de los puntos clave en estos animales no progresores podría ser el desarrollo de respuestas inmunitarias capaces de controlar la infección por lentivirus (Crespo et al., 2016; Sanjosé et al., 2016).

Recientemente se ha publicado que el virus Sendai, un estimulador clásico de la respuesta innata antiviral, es capaz de estimular células ovinas y conferir protección frente al desafío con SRLV (de Pablo-Maiso et al., 2020). Los resultados indican que el virus Sendai es capaz de infectar todas las células de un cultivo de macrófagos ovinos de una forma no productiva, es decir, sin generar nuevos virus ni comprometer la viabilidad de las células. La infección con este virus estimula la respuesta antiviral y las células se vuelven refractarias a una posterior infección por SRLV (de Pablo-Maiso et al., 2020). Esta capacidad del virus Sendai para llegar a un gran número de macrófagos podría usarse para diseñar virus recombinantes con capacidad vacunal ya que, presentando fragmentos de proteínas en su superficie, los macrófagos son capaces de estimular determinados linfocitos e impulsar la

respuesta inmunitaria adaptativa, que tiene una capacidad de memoria a largo plazo y es más específica frente a patógenos concretos.

Inmunidad innata:

La cascada de señalización que se activa tras la infección con virus Sendai en células ovinas, podría ser muy parecida a la de otras especies. Los PAMPs presentes en el virus son detectados por los PRRs, principalmente receptores RIG-I, que inducen una señalización intracelular desencadenando la producción de genes antivirales (Ishii et al., 2008). La producción de IFN de tipo I impulsa una mayor inducción de genes en una cascada de señalización secundaria, que amplifica y regula el estado celular antiviral. Entre los genes que se inducen con IFN y que presentan mecanismos de restricción intracelular frente a SRLV, encontramos APOBEC3 (de Pablo-Maiso et al., 2017) y TRIM5 α (Jauregui et al., 2012). Ambos conducen a la degradación vía proteasoma de proteínas virales. Entre estos genes se encuentra también la teterina que interrumpe el ciclo viral en la última fase, impidiendo la liberación del virus. Las isoformas A y B de la teterina ovina juegan un papel importante en la restricción de otros retrovirus endógenos (Arnaud et al., 2010) y exógenos (Murphy et al., 2015) pero en la actualidad no hay estudios que evalúen su acción frente a los SRLV.

Otra proteína que en los últimos años ha suscitado interés por su actividad antiviral es SAMHD1, que es capaz de reducir la susceptibilidad a la infección por HIV1 en células que no se encuentran en división, como son los monocitos, macrófagos que derivan de monocitos, células dendríticas y células T no activadas (Baldauf et al., 2012; Descours et al., 2012; Laguette et al., 2011; Laguette and Benkirane, 2012). Aunque el mecanismo que subyace no está completamente descrito, su actividad dNTPasa reduce los niveles intracelulares de dNTPs, bloqueando la replicación viral en el momento de la transcripción reversa. Esta actividad enzimática está regulada por la fosforilación del amino ácido T592, determinando una disminución de su actividad antiviral frente a HIV (Cribier et al., 2013). Sin embargo, en ratones la fosforilación no influye en la actividad antiviral frente al virus de la leucemia felina (FeLV) (Wang et al., 2016). El estudio de esta proteína podría ser interesante especialmente en el caso de los SRLV ya que no se ha descrito la proteína accesoria capaz de neutralizar su acción, siendo Vpx en HIV (Hrecka et al., 2011). Por el momento no se conoce la secuencia de SAMHD1 en monocitos/macrófagos ovinos, si su expresión resulta en una menor infectividad de los SRLV y si la fosforilación de T592 juega algún papel en la restricción (Wang et al., 2016). Sería interesante estudiar la interacción de

SAMHD1 con los genes accesorios *vpr* y *vif* presentes en los SRLV, ya que tal vez, éstos desempeñen las funciones de Vpx degradando SAMHD1.

REFERENCIAS

- Anderson, S., Wakeley, P., Wibberley, G., Webster, K., Sawyer, J., 2011. Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods. *J. Immunol. Methods* 366, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.010>
- Andrésdóttir, V., Skraban, R., Matthíasdóttir, S., Lutley, R., Agnarsdóttir, G., Thorsteinsdóttir, H., 2002. Selection of antigenic variants in maedi-visna virus infection. *J. Gen. Virol.* 83, 2543–2551. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2543>
- Arnaud, F., Black, S.G., Murphy, L., Griffiths, D.J., Neil, S.J., Spencer, T.E., Palmarini, M., 2010. Interplay between Ovine Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2/Tetherin and Endogenous Retroviruses. *J. Virol.* 84, 4415–4425. <https://doi.org/10.1128/jvi.00029-10>
- Asín, J., Molín, J., Pérez, M., Pinczowski, P., Gimeno, M., Navascués, N., Muniesa, A., de Blas, I., Lacasta, D., Fernández, A., de Pablo, L., Mold, M., Exley, C., de Andrés, D., Reina, R., Luján, L., 2019. Granulomas Following Subcutaneous Injection With Aluminum Adjuvant-Containing Products in Sheep. *Vet. Pathol.* 56, 418–428. <https://doi.org/10.1177/0300985818809142>
- Baldauf, H.M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., Panitz, S., Flory, E., Landau, N.R., Sertel, S., Rutsch, F., Lasitschka, F., Kim, B., König, R., Fackler, O.T., Keppler, O.T., 2012. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* 18, 1682–1687. <https://doi.org/10.1038/nm.2964>
- Barquero, N., Domenech, A., Arjona, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Gomez-Lucia, E., 2013. Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* 94, 817–819. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.004>
- Barquero, Nuria, Gomez-Lucia, E., Arjona, A., Toural, C., Las Heras, A., Fernández-Garayzábal, J.F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Doménech, A., 2013. Investigation of risk factors associated with infections caused by small ruminant lentiviruses. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 57, 473–478. <https://doi.org/10.2478/bvip-2013-0082>
- Bolton, J.S., Chaudhury, S., Dutta, S., Gregory, S., Locke, E., Pierson, T., Bergmann-Leitner, E.S., 2020. Comparison of ELISA with electro-chemiluminescence technology for the qualitative and quantitative assessment of serological responses to vaccination. *Malar. J.* 19. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03225-5>
- Brajon, G., 2012. Development and Field Testing of a Real-Time PCR Assay for Caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV). *Open Virol. J.* 6, 82–90. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010082>
- Brinkhof, J.M.A., van Maanen, C., Wigger, R., Peterson, K., Houwers, D.J., 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 147, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.013>
- Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J.R., Shi, J., 2018. Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunol.* <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>
- Cabrera, C., Chang, L., Stone, M., Busch, M., Wilson, D.H., 2015. Rapid, Fully Automated Digital Immunoassay for p24 Protein with the Sensitivity of Nucleic Acid Amplification for Detecting Acute HIV Infection. *Clin. Chem.* 61, 1372–1380. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.243287>
- Cardinaux, L., Zahno, M.L., Deubelbeiss, M., Zanoni, R., Vogt, H.R., Bertoni, G., 2013. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet. Microbiol.* 162, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.017>
- Carrozza, M.L., Mazzei, M., Lacerenza, D., Del Chiaro, L., Giammarioli, M., Marini, C., Rutili, D., Rosati, S., Tolari, F., 2009. Seroconversion against SU5 derived synthetic peptides in sheep experimentally infected with different SRLV genotypes. *Vet. Microbiol.* 137, 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.032>
- Chassalevris, T., Chaintoutis, S.C., Apostolidi, E.D., Giadinis, N.D., Vlemmas, I., Brellou, G.D., Dovas, C.I., 2020. A highly sensitive semi-nested real-time PCR utilizing oligospermine-conjugated degenerate primers for the detection of diverse strains of small ruminant lentiviruses. *Mol. Cell. Probes* 51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101528>
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity.* <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
- Colitti, B., Coradduzza, E., Puggioni, G., Capucchio, M.T., Reina, R., Bertolotti, L., Rosati, S., 2019. A new approach for small ruminant lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212585>
- Crespo, H., Bertolotti, L., Juganaru, M., Glaria, I., De Andrés, D., Amorena, B., Rosati, S., Reina, R., 2013. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet. Res.* 44, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-83>

- Crespo, H., Bertolotti, L., Proffitti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Acutis, P.L., de Andrés, D., Reina, R., Rosati, S., 2016. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Vet. Microbiol.* 192, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.008>
- Crespo, H., Jauregui, P., Glaria, I., Sanjosé, L., Polledo, L., García-Marín, J.F., Luján, L., De Andrés, D., Amorena, B., Reina, R., 2012. Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Vet. Res.* 43, 43. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-43>
- Cribier, A., Descours, B., Valadão, A.L.C., Laguette, N., Benkirane, M., 2013. Phosphorylation of SAMHD1 by Cyclin A2/CDK1 Regulates Its Restriction Activity toward HIV-1. *Cell Rep.* 3, 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.017>
- de Andrés, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdóttir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 107, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.012>
- de Andrés, X., Ramírez, H., Bertolotti, L., San Román, B., Glaria, I., Crespo, H., Jáuregui, P., Minguijón, E., Juste, R., Leginagoikoa, I., Pérez, M., Luján, L., Badiola, J.J., Polledo, L., García-Marín, J.F., Riezu, J.I., Borrás-Cuesta, F., de Andrés, D., Rosati, S., Reina, R., Amorena, B., 2013. An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.017>
- de Pablo-Maiso, L., Echeverría, I., Rius-Rocabert, S., Luján, L., Garcin, D., de Andrés, D., Nistal-Villán, E., Reina, R., 2020. Sendai Virus, a Strong Inducer of Anti-Lentiviral State in Ovine Cells. *Vaccines* 8, 206. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020206>
- de Pablo-Maiso, L., Glaria, I., Crespo, H., Nistal-Villán, E., Andrésdóttir, V., de Andrés, D., Amorena, B., Reina, R., 2017. Characterization of Ovine A3Z1 Restriction Properties against Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs). *Viruses* 9, 345. <https://doi.org/10.3390/v9110345>
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., Benkirane, M., 2012. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4 + T-cells. *Retrovirology* 9, 87. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-87>
- Dohoo, I.R., Heaney, D.P., Stevenson, R.G., Samagh, B.S., Rhodes, C.S., 1987. The effects of maedi-visna virus infection on productivity in ewes. *Prev. Vet. Med.* 4, 471–484. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(87\)90032-8](https://doi.org/10.1016/0167-5877(87)90032-8)
- Draper, S.J., Moore, A.C., Goodman, A.L., Long, C.A., Holder, A.A., Gilbert, S.C., Hill, F., Hill, A.V.S., 2008. Effective induction of high-titer antibodies by viral vector vaccines. *Nat. Med.* 14, 819–821. <https://doi.org/10.1038/nm.1850>
- DuPont, N.C., Wang, K., Wadhwa, P.D., Culhane, J.F., Nelson, E.L., 2005. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: Determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J. Reprod. Immunol.* 66, 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.03.005>
- Echeverría, I., de Miguel, R., Asín, J., Rodríguez-Largo, A., Fernández, A., Pérez, M., de Andrés, D., Luján, L., Reina, R., 2020a. Replication of small ruminant lentiviruses in aluminum hydroxide-induced granulomas in sheep: a potential new factor for viral dissemination. *J. Virol.* 95. <https://doi.org/10.1128/jvi.01859-20>
- Echeverría, I., De Miguel, R., De Pablo-Maiso, L., Glaria, I., Benito, A.A., De Blas, I., De Andrés, D., Luján, L., Reina, R., 2020b. Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Front. Vet. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00182>
- El Garch, H., Minke, J.M., Rehder, J., Richard, S., Edlund Toulemonde, C., Dinic, S., Andreoni, C., Audonnet, J.C., Nordgren, R., Juillard, V., 2008. A West Nile virus (WNV) recombinant canarypox virus vaccine elicits WNV-specific neutralizing antibodies and cell-mediated immune responses in the horse. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.002>
- Eltahir, Y.M., Dovas, C.I., Papanastassopoulou, M., Koumbati, M., Giadinis, N., Verghese-Nikolakaki, S., Koptopoulos, G., 2006. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J. Virol. Methods* 135. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.010>
- Gerds, V., 2015. Adjuvantien für veterinäripfstoffe – Typen und wirkweise. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 128, 456–463. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-128-456>
- Griesenbach, U., McLachlan, G., Owaki, T., Somerton, L., Shu, T., Baker, A., Tennant, P., Gordon, C., Vrettou, C., Baker, E., Collie, D.D.S., Hasegawa, M., Alton, E.W.F.W., 2011. Validation of recombinant Sendai virus in a non-natural host model. *Gene Ther.* 18, 182–188. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.131>
- Haase, A.T., 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 322, 130–136. <https://doi.org/10.1038/322130a0>
- Heaton, M.P., Clawson, M.L., Chitko-Mckown, C.G., Leymaster, K.A., Smith, T.P.L., Harhay, G.P., White, S.N., Herrmann-Hoesing, L.M., Mousel, M.R., Lewis, G.S., Kalbfleisch, T.S., Keen, J.E., Laegreid, W.W., 2012. Reduced Lentivirus Susceptibility in Sheep with TMEM154 Mutations. *PLoS Genet.* 8, e1002467. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002467>

- Herrmann-Hoesing, L.M., 2010. Diagnostic Assays Used to Control Small Ruminant Lentiviruses. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 843–855. <https://doi.org/10.1177/104063871002200602>
- Hötzel, I., Cheevers, W.P., 2002. Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: Host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology* 301, 21–31. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1575>
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., Skowronski, J., 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658–661. <https://doi.org/10.1038/nature10195>
- Hu, Z., Wong, K.W., Zhao, H.M., Wen, H.L., Ji, P., Ma, H., Wu, K., Lu, S.H., Li, F., Li, Z.M., Shu, T., Xu, J.Q., Lowrie, D.B., Fan, X.Y., 2017. Sendai Virus Mucosal Vaccination Establishes Lung-Resident Memory CD8 T Cell Immunity and Boosts BCG-Primed Protection against TB in Mice. *Mol. Ther.* 25, 1222–1233. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.018>
- Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., Akira, S., 2008. Host Innate Immune Receptors and Beyond: Making Sense of Microbial Infections. *Cell Host Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.003>
- Jas, D., Coupier, C., Toulemonde, C.E., Guigal, P.M., Poulet, H., 2012. Three-year duration of immunity in cats vaccinated with a canarypox-vectored recombinant rabies virus vaccine. *Vaccine* 30, 6991–6996. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.09.068>
- Jauregui, P., Crespo, H., Glaria, I., Lujan, L., Contreras, A., Rosati, S., de Andres, D., Amorena, B., Towers, G.J., Reina, R., 2012. Ovine TRIM5 Can Restrict Visna/Maedi Virus. *J. Virol.* 86, 9504–9509. <https://doi.org/10.1128/jvi.00440-12>
- Johnson, M., Wagstaffe, H.R., Gilmour, K.C., Mai, A.L., Lewis, J., Hunt, A., Sirr, J., Bengt, C., Grandjean, L., Goldblatt, D., 2020. Evaluation of a novel multiplexed assay for determining IgG levels and functional activity to SARS-CoV-2. *J. Clin. Virol.* 130, 104572. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104572>
- Kaba, J., Czapowicz, M., Ganter, M., Nowicki, M., Witkowski, L., Nowicka, D., Szaluś-Jordanow, O., 2013. Risk factors associated with seropositivity to small ruminant lentiviruses in goat herds. *Res. Vet. Sci.* 94, 225–227. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.018>
- Khan, S.S., Smith, M.S., Reda, D., Suffredini, A.F., McCoy, J.P., 2004. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: Comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* 61, 35–39. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20021>
- Kuhar, U., Barlič-Maganja, D., Grom, J., 2013. Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. *BMC Vet. Res.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-172>
- Lacerenza, D., Giammaroli, M., Grego, E., Marini, C., Profiti, M., Rutili, D., Rosati, S., 2006. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.016>
- Laguette, N., Benkirane, M., 2012. How samhd1 changes our view of viral restriction. *Trends Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.11.002>
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., Benkirane, M., 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657. <https://doi.org/10.1038/nature10117>
- Leroux-Roels, G., 2010. Unmet needs in modern vaccinology. Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>
- Li, Y., Zhou, F., Li, X., Wang, J., Zhao, X., Huang, J., 2013. Development of TaqMan-based qPCR method for detection of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *Springer* 158, 2135–2141. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1728-1>
- Martínez-Navalón, B., Peris, C., Gómez, E.A., Peris, B., Roche, M.L., Caballero, C., Goyena, E., Berriatua, E., 2013. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet. J.* 197, 311–317. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2012.12.020>
- Masson, J.D., Thibaudon, M., Bélec, L., Crépeaux, G., 2017. Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? *Expert Rev. Vaccines*. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1244484>
- Matano, T., Kano, M., Nakamura, H., Takeda, A., Nagai, Y., 2001. Rapid Appearance of Secondary Immune Responses and Protection from Acute CD4 Depletion after a Highly Pathogenic Immunodeficiency Virus Challenge in Macaques Vaccinated with a DNA Prime/Sendai Virus Vector Boost Regimen. *J. Virol.* 75, 11891–11896. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.23.11891-11896.2001>
- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J.J., García-Marín, J.F., de Andrés, D., Luján, L., Amorena, B., Juste, R.A., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.* 181, 75–89. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.08.007>
- Molaee, V., Eltanany, M., Lühken, G., 2018. First survey on association of TMEM154 and CCR5 variants with serological maedi-visna status of sheep in German flocks. *Vet. Res.* 49, 36. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0533-y>

- Molaee, V., Otarod, V., Abdollahi, D., Lühken, G., 2019. Lentivirus Susceptibility in Iranian and German Sheep Assessed by Determination of TMEM154 E35K. *Animals* 9, 685. <https://doi.org/10.3390/ani9090685>
- Morioka, K., Fukai, K., Sakamoto, K., Yoshida, K., Kanno, T., 2014. Evaluation of Monoclonal Antibody-Based Sandwich Direct ELISA (MSD-ELISA) for Antigen Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus Using Clinical Samples. *PLoS One* 9, e94143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094143>
- Mountjoy, K.G., 2020. ELISA versus LUMINEX assay for measuring mouse metabolic hormones and cytokines: sharing the lessons I have learned. Taylor Fr. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1838924>
- Murphy, L., Varela, M., Desloire, S., Ftaich, N., Murgia, C., Golder, M., Neil, S., Spencer, T.E., Wootton, S.K., Lavillette, D., Terzian, C., Palmarini, M., Arnaud, F., 2015. The Sheep Tetherin Paralog oBST2B Blocks Envelope Glycoprotein Incorporation into Nascent Retroviral Virions. *J. Virol.* 89, 535–544. <https://doi.org/10.1128/jvi.02751-14>
- Myzithras, M., Li, H., Bigwarfe, T., Waltz, E., Gupta, P., Low, S., Hayes, D.B., Macdonnell, S., Ahlberg, J., Franti, M., Roberts, S., 2016. Development of an ultra-sensitive Simoa assay to enable GDF11 detection: A comparison across bioanalytical platforms. *Bioanalysis* 8, 511–518. <https://doi.org/10.4155/bio.16.17>
- Norman, M., Gilboa, T., Ogata, A.F., Maley, A.M., Cohen, L., Busch, E.L., Lazarovits, R., Mao, C.P., Cai, Y., Zhang, J., Feldman, J.E., Hauser, B.M., Caradonna, T.M., Chen, B., Schmidt, A.G., Alter, G., Charles, R.C., Ryan, E.T., Walt, D.R., 2020. Ultrasensitive high-resolution profiling of early seroconversion in patients with COVID-19. *Nat. Biomed. Eng.* 4, 1180–1187. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00611-x>
- Pang, S., Smith, J., Onley, D., Reeve, J., Walker, M., Foy, C., 2005. A comparability study of the emerging protein array platforms with established ELISA procedures. *J. Immunol. Methods* 302, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.04.007>
- Pérez, M., Biescas, E., de Andrés, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Reina, R., Bolea, R., de Andrés, D., Juste, R.A., Cancer, J., Gracia, J., Amorena, B., Badiola, J.J., Luján, L., 2010. Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón (Spain). *Vet. J.* 186, 221–225. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2009.07.031>
- Pinczowski, P., Sanjosé, L., Gimeno, M., Crespo, H., Glaria, I., Amorena, B., de Andrés, D., Pérez, M., Reina, R., Luján, L., 2017. Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Vet. Pathol.* 54, 413–424. <https://doi.org/10.1177/0300985816688742>
- Platchek, M., Lu, Q., Tran, H., Xie, W., 2020. Comparative Analysis of Multiple Immunoassays for Cytokine Profiling in Drug Discovery. *SLAS Discov.* 25, 1197–1213. <https://doi.org/10.1177/2472555220954389>
- Prabhakar, U., Eirikis, E., Davis, H.M., 2002. Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP™ assay. *J. Immunol. Methods* 260, 207–218. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00543-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00543-9)
- Ramírez, H., Echeverría, I., Benito, A.A., Glaria, I., Benavides, J., Pérez, V., de Andrés, D., Reina, R., 2021. Accurate Diagnosis of Small Ruminant Lentivirus Infection Is Needed for Selection of Resistant Sheep through TMEM154 E35K Genotyping. *Pathogens* 10, 83. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010083>
- Ray, C.A., Bowsher, R.R., Smith, W.C., Devanarayan, V., Willey, M.B., Brandt, J.T., Dean, R.A., 2005. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 1037–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.05.024>
- Relyveld, E., Chermann, J.C., 1994. Humoral response in rabbits immunized with calcium phosphate adjuvanted HIV-1 gp160 antigen. *Biomed. Pharmacother.* 48, 79–83. [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0753-3322(94)90080-9)
- Ritchie, C., Hosie, B., 2010. Health schemes: Increase in maedi-visna breakdowns. *Vet. Rec.* 389.
- Sanjosé, L., Crespo, H., Blatti-Cardinaux, L., Glaria, I., Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E., Amorena, B., De Andrés, D., Bertoni, G., Reina, R., 2016. Post-entry blockade of small ruminant lentiviruses by wild ruminants. *Vet. Res.* 47, 1. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0288-7>
- Sanjosé, L., Pinczowski, P., Crespo, H., Pérez, M., Glaria, I., Gimeno, M., de Andrés, D., Amorena, B., Luján, L., Reina, R., 2015. Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. *Vet. J.* 204, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.012>
- Seki, S., Matano, T., 2016. Development of a Sendai virus vector-based AIDS vaccine inducing T cell responses. *Expert Rev. Vaccines.* <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1105747>
- Shardlow, E., Mold, M., Exley, C., 2018. Unraveling the enigma: Elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0305-2>
- Sigurdsson, B., 1954. Maedi, A Slow Progressive Pneumonia of Sheep: An Epizootological and a Pathological Study. *Br. Vet. J.* 110, 255–270. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)50273-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)50273-0)
- Takimoto, T., Hurwitz, J.L., Zhan, X., Krishnamurthy, S., Prouser, C., Brown, B., Coleclough, C., Boyd, K., Scroggs, R.A., Portner, A., Slobod, K.S., 2005. Recombinant Sendai Virus as a Novel Vaccine Candidate for Respiratory Syncytial Virus. *Viral Immunol.* 18, 255–266. <https://doi.org/10.1089/vim.2005.18.255>

- Tartaglia, J., Jarrett, O., Neil, J.C., Desmettre, P., Paoletti, E., 1993. Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J. Virol.* 67.
- Ura, T., Okuda, K., Shimada, M., 2014. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines* 2, 624–641. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030624>
- Valas, S., Le Ven, A., Croise, B., Maquigneau, M., Perrin, C., 2011. Interference of vaccination against bluetongue virus serotypes 1 and 8 with serological diagnosis of small-ruminant lentivirus infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 513–7. <https://doi.org/10.1128/CVI.00343-10>
- Varela-Martínez, E., Abendaño, N., Asín, J., Sistiaga-Poveda, M., Pérez, M.M., Reina, R., de Andrés, D., Luján, L., Jugo, B.M., 2018. Molecular Signature of Aluminum Hydroxide Adjuvant in Ovine PBMCs by Integrated mRNA and microRNA Transcriptome Sequencing. *Front. Immunol.* 9, 2406. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02406>
- Varela-Martínez, E., Bilbao-Arribas, M., Abendaño, N., Asín, J., Pérez, M., de Andrés, D., Luján, L., Jugo, B.M., 2020. Whole transcriptome approach to evaluate the effect of aluminium hydroxide in ovine encephalon. *Sci. Rep.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71905-y>
- Wang, F., St Gelais, C., de Silva, S., Zhang, H., Geng, Y., Shepard, C., Kim, B., Yount, J.S., Wu, L., 2016. Phosphorylation of mouse SAMHD1 regulates its restriction of human immunodeficiency virus type 1 infection, but not murine leukemia virus infection. *Virology* 487, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.024>
- Yaman, Y., Keleş, M., Aymaz, R., Sevim, S., Sezenler, T., Önalı, A.T., Kaptan, C., Başkurt, A., Koncagül, S., Öner, Y., Öztürk, E.E., İriadam, M., Ün, C., Heaton, M.P., 2019. Association of TMEM154 variants with visna/maedi virus infection in Turkish sheep. *Small Rumin. Res.* 177, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.006>

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Sobre la replicación de Lentivirus de Pequeños Rumiantes en granulomas inducidos tras la inoculación de hidróxido de aluminio:

1. La inoculación de hidróxido de aluminio, solo o en combinación con antígenos vacunales, induce en ovinos infectados con Lentivirus de Pequeños Rumiantes (SRLV) la formación de granulomas subcutáneos, que persisten tras la vacunación y están principalmente compuestos por macrófagos.
2. Los macrófagos que forman los granulomas post-vacunales presentan aluminio en su interior y albergan la replicación de los SRLV, según se ha demostrado mediante inmunohistoquímica, cultivo celular y PCR.
3. Los genotipos virales presentes en los granulomas coinciden con los circulantes en monocitos sanguíneos, apuntando un origen común. Sin embargo, en algunos animales inoculados con hidróxido de aluminio, se detectaron variantes adicionales, incluyendo virus recombinantes entre los genotipos A y B, sugiriendo que la replicación en los granulomas puede ampliar la diversidad genética de los SRLV.
4. La estirpe responsable de la infección natural, con tropismo definido por las articulaciones, se encontró en el sistema nervioso central de los animales inoculados con hidróxido de aluminio.
5. Los granulomas post-vacunales representan un foco de infección no considerado hasta el momento desde el que los patógenos que replican en macrófagos, como los SRLV, podrían alcanzar diferentes tejidos modificando su patogénesis.

Sobre el empleo de estrategias multiplataforma para el diagnóstico de los SRLV y la evaluación de las pérdidas productivas asociadas a la infección:

1. El empleo de un único método ELISA tan solo asegura la detección de la mitad de los animales seropositivos a SRLV en un rebaño. La inclusión de la PCR como método diagnóstico aumenta la detección de animales infectados, ya que evidenció la infección en un 10% de los animales seronegativos.
2. La combinación de métodos serológicos y moleculares permite una clasificación de los animales en infectados y no infectados de una manera precisa, permitiendo el estudio de rasgos productivos o de determinantes de resistencia genética asociados a la infección.

3. Tanto los rebaños de aptitud lechera como los de cárnica presentan pérdidas productivas asociadas a la infección por SRLV. Los animales infectados muestran un descenso en la producción de leche de un 6% y un aumento en el recuento de células somáticas del 26%. Por otro lado, se observó una menor ganancia media diaria de peso en corderos procedentes de madres infectadas, así como un menor peso del cordero en el nacimiento.
4. Los animales seropositivos, que además muestran carga proviral en sangre, presentan peores valores productivos, tanto en explotaciones de leche como de carne, indicando un posible papel protector de los anticuerpos.

Sobre el empleo de estrategias multiplataforma para el diagnóstico de los SRLV y el estudio de la resistencia genética asociada al polimorfismo E35K de la proteína TMEM154:

1. La caracterización genética del polimorfismo E35K de la proteína ovina TMEM154, candidato a gen marcador de resistencia frente a SRLV, puede realizarse empleando sondas fluorescentes y aplicando análisis de discriminación alélica.
2. La prevalencia de los genotipos sensibles (E/E o E/K) y resistentes (K/K) difiere en las razas estudiadas, siendo la proporción de genotipos resistentes muy alta (>75%) en las razas Churra y Raza Navarra, y muy baja en Assaf (<25%).
3. Los rebaños de la raza Assaf mostraron valores altos de seroprevalencia (>95%), mientras que el resto de razas mostró una seropositividad media (45-65%) frente a la infección por SRLV. Se evidenció el valor diagnóstico de los métodos moleculares, ya que alcanzó a detectar un 30% de animales seronegativos.
4. La asociación descrita entre el alelo 35 de la proteína TMEM154 y la resistencia a los lentivirus no se ha confirmado en las razas estudiadas, exceptuando la Latxa Navarra. Así, la relación entre el genotipo y la resistencia a los SRLV muy probablemente implique otros genes o polimorfismos.

