



Detección molecular de un fragmento del virus de lengua azul en borregos de diferentes regiones de México



Edith Rojas Anaya ^a

Fernando Cerón-Téllez ^b

Luis Adrián Yáñez-Garza ^c

José Luis Gutiérrez-Hernández ^b

Rosa Elena Sarmiento-Salas ^c

Elizabeth Loza-Rubio ^{b*}

^a Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro Nacional de Recursos Genéticos. México.

^b INIFAP. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), Campus Ciudad de México. Carretera México-Toluca Km 15.5, Colonia Palo Alto. 05110. Alcaldía Cuajimalpa de Morelos. Ciudad de México. México.

^c Universidad Nacional Autónoma de México, FMVZ. México.

*Autor de correspondencia: eli_rubio33@hotmail.com; loza.elizabeth@inifap.gob.mx

Resumen:

La enfermedad de la lengua azul (LA) afecta diferentes especies de rumiantes silvestres y domésticos. En México, la enfermedad producida por el virus de la lengua azul (VLA), aún es reconocida como exótica, a pesar de que, en diferentes ocasiones se han detectado anticuerpos. El objetivo fue establecer técnicas moleculares usando un gen sintético que incluye los genes NS1 y NS3 como control positivo para establecer el diagnóstico del VLA en muestras de ovinos de diferentes regiones del país, mediante técnicas moleculares. Se obtuvieron 320 muestras totales de sangre completa de ovinos. Las muestras obtenidas se

evaluaron mediante RT-PCR punto final y RT-PCR en tiempo real estableciendo las condiciones por el grupo de trabajo. Se encontraron 12 muestras positivas de ovinos a la detección de NS1; estas muestras se secuenciaron obteniendo un fragmento de 101 pares de bases. Al realizar el alineamiento se obtuvieron identidades con secuencias reportadas en el GenBank con fragmentos de NS1 desde 89 % ($p= 1e-12$) a 98 % ($p= 4e-13$), correspondientes a los serotipos 10, 11 y 12. De estas muestras, se obtuvieron dos muestras positivas de ovinos mediante el PCR tiempo real (PCR-tr), uno proveniente de Chiapas (raza Chiapas) y el otro de Tamaulipas (raza Suffolk). Los resultados de la PCRtr fueron corroborados por la CPA-SENASICA. Este trabajo, aporta por primera vez en México, la importancia de usar un gen sintético como control positivo, para realizar la detección en laboratorios oficiales BSL-2, lo cual en una emergencia sanitaria es de suma importancia.

Palabras clave: Lengua azul, Ovinos, Diagnóstico, Gen sintético, Genes NS1 y NS3.

Recibido: 01/07/2021

Aceptado: 31/08/2022

Introducción

El virus de lengua azul (VLA) pertenece al género *Orbivirus* y familia *Reoviridae*, es causante de la enfermedad de la lengua azul (ELA) afectando rumiantes tanto domésticos como silvestres⁽¹⁾. El virus posee un genoma ARN de doble cadena (dsRNA) sentido negativo conformado por 10 segmentos⁽²⁾. Es un virus sin envoltura, de cápside icosaédrica, con un diámetro aproximado de 90 nm. El genoma codifica para las proteínas estructurales que conforman la cápside externa e interna o *core* (VP1 - VP7), y las cuatro proteínas no estructurales, denominadas no estructurales (NS) que están involucradas en la replicación, maduración o salida del virión de las células infectadas). Los genes no estructurales son altamente conservados a través del género^(3,4). El gen NS1 codifica para una proteína del mismo nombre, la cual se expresa en mayor cantidad durante la replicación del VLA y es la proteína citoplasmática más abundante. Por otro lado, el gen NS3 codifica para la proteína NS3 que tiene función de viroporina, relacionada con la lisis celular^(3,4). Debido a lo anterior, los dos genes se han utilizado como blanco en ensayos tamiz para la identificación de VLA⁽⁵⁾. El virus se transmite por medio de la picadura de mosquitos del género *Culicoides spp*; por lo anterior, la presentación de la enfermedad está asociada a la diseminación de dicho vector, aunque se ha informado de otros vectores como las garrapatas⁽⁶⁾; se sabe que el virus puede permanecer viable durante toda la vida del vector.

Actualmente, se han descrito 28 serotipos diferentes de VLA en todo el mundo⁽⁷⁾ y el virus está distribuido prácticamente en todos los países que se dedican a la ganadería bovina y ovina. La enfermedad de la lengua azul (ELA) se puede presentar tanto en forma subclínica y clínica, especialmente en ovinos, ya que en bovinos la mayoría de las veces es asintomática. En los países en donde la enfermedad es endémica causa severas pérdidas económicas a los productores⁽⁸⁾. El nombre “lengua azul” fue atribuido por africanos que observaron cianosis en la lengua de algunos animales, aunque este signo no se observa en todos los animales infectados, ya que los signos varían entre especies y es dependiente de la cepa. Las lesiones como hiperemia y edema de los labios y cara; erosiones y úlceras orales y la típica cianosis en lengua son debidas a la infección de las células endoteliales que permiten aumento de la permeabilidad celular⁽⁹⁾.

La Organización Mundial de Salud Animal (OIE)⁽¹⁰⁾ clasifica a la enfermedad de lengua azul como un padecimiento de declaración obligatoria, por lo que el diagnóstico oportuno es importante. El grado de severidad de la enfermedad depende del serotipo, la cepa del virus, la especie, la edad y el estado inmunológico del animal, siendo los más afectados las ovejas y los venados cola blanca⁽¹¹⁾; en los ovinos el periodo de incubación del VLA es de seis a ocho días, sin embargo el ganado bovino rara vez muestra signos clínicos, pero mantienen una viremia prolongada⁽¹²⁾. Los cérvidos también pueden ser infectados por un orbivirus estrechamente relacionado responsable de la enfermedad hemorrágica epizootica⁽¹³⁾. La ELA no es contagiosa y solo se transmite a través de insectos Culicoides, la distribución está asociada por tanto a la prevalencia del vector. En América del Norte se han identificado hasta cinco serotipos, sin embargo, solamente en Estados Unidos se ha informado de la presencia de siete⁽¹⁴⁾. La presentación del virus en América está asociado principalmente a la presencia de dos especies del vector *C. sonorensis* y *C. insignis*⁽¹⁵⁾. En cuanto a México, a pesar de que la enfermedad es considerada exótica; en los años 80s se informó serología positiva al virus tanto en ovinos como bovinos en diferentes regiones del país^(16,17). Por otro lado, en el año 2015 se publicó la detección de un fragmento genoma viral en tres especies de Culicoides (*C. variipennis*, *C. sonorensis* y *C. occidentalis*)⁽¹⁸⁾. Para poder definir los veintiocho serotipos del VLA hasta ahora descritos se utiliza el gen VP2⁽⁷⁾.

Finalmente, en el mes de febrero de 2021 se realizó la notificación de lesiones orales de ovinos por la Secretaria de Desarrollo Agropecuario, Pesca y Acuicultura (SEDPA) de Oaxaca en el Municipio de San Pedro Mixtepec. La CPA detectó dos muestras positivas al virus de lengua azul, utilizando la técnica de RT-PCR y la notificación se hizo en el Boletín Informativo de la CPA AVISE⁽¹⁹⁾.

La ELA es de notificación obligatoria a la OIE, principalmente porque los nuevos brotes implican restricciones de circulación y comercio, lo que provoca graves pérdidas económicas. No obstante, a nivel mundial se implementa una vigilancia activa para detectar la infección por VLA mediante diferentes pruebas como el aislamiento del virus u otra prueba

de detección o serología⁽¹¹⁾. El método de detección por excelencia es el aislamiento del virus en cultivos celulares permisivos, para posteriormente realizar el análisis genético del virus, que permita determinar el serotipo presente en la muestra del animal afectado. En las zonas endémicas del virus, se recomienda el control de los vectores para impedir la diseminación, además de programas de vacunación. En Estados Unidos y Europa, se han empleado vacunas vivas atenuadas. El objetivo de este trabajo fue establecer técnicas moleculares utilizando un gen sintético como control positivo que incluyera los genes NS1 y NS3, para posteriormente evaluar muestras de ovinos, de diferentes regiones del país.

Material y métodos

Muestras

Se realizó un muestreo por conveniencia de ovinos aparentemente sanos, obteniendo 3 ml de sangre completa con anticoagulante (heparina) de 320 individuos, provenientes de cinco estados del país (Chiapas, Coahuila, Estado de México, Morelos y Tamaulipas). Las muestras se obtuvieron durante el verano del 2016 al 2018. El muestreo se realizó en machos y hembras reproductoras de entre uno y cinco años. El total de muestras analizadas se encuentran descritas en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Muestras de sangre obtenidas de ovinos en cinco Estados de la República Mexicana y analizadas para la detección molecular del virus de lengua azul por RT-PCR

Estado	Especie	Sexo	Raza	Total
Chiapas	Ovinos	H	Criollo	20
		M	Criollo	5
		S/D	S/D	66
			Cruza	70
Coahuila	Ovinos	H	Dorper	37
			Suffolk	13
			Blackbelly	1
Morelos	Ovinos	H	Criollo	29
			Pelibuey	1
			S/D	62
Tamaulipas	Ovinos	H	Pelibuey	8
			Dorset	4
			Suffolk	4
Total				320

H= hembra; M= macho; S/D= sin dato.

Gen sintético

Debido a que la ELA se considera exótica en México, se diseñó un gen sintético para posteriormente ser usado como control positivo, con la finalidad de no utilizar al virus inactivado o material genético del mismo en un laboratorio BSL2. Para lo anterior, fueron insertados en el vector pUC57 (GeneScript, USA), dos fragmentos del genoma viral, uno correspondiente al gen NS1 (354 pb) y otro correspondiente al gen NS3 (300 pb) tomando como base las secuencias del BTV-11 reportadas en el GenBank (KF986511 y KM580467, respectivamente). Para su uso como control positivo en los ensayos moleculares, la concentración del plásmido fue ajustado a 100ng/μl.

Extracción de material genético

El ARN viral fue extraído a partir de 250 μl de la muestra de sangre utilizando Trizol LS® Reagent (Ambion, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones en el protocolo. El ARN obtenido se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Ensayos moleculares

Gen constitutivo. Con la finalidad de verificar la calidad del ARN obtenido, se amplificó mediante RT-PCR un fragmento del gen constitutivo GAPDH utilizando los iniciadores y condiciones reportados por González-Arto M, *et al*⁽²⁰⁾. Como plantilla se utilizó ADN complementario sintetizado a partir del ARN viral utilizando el kit MMLV Retrotranscriptase (Invitrogen, USA).

Detección de un fragmento del gen NS3. El ARN extraído de las muestras fue utilizado como plantilla para la detección de un fragmento del gen NS3 de los orbivirus utilizando un par de iniciadores y la sonda recomendados en el Manual de la OIE¹⁰. La RT-PCR se llevó a cabo mediante un protocolo de amplificación en un solo paso establecido en el laboratorio utilizando el kit iTaq universal probe one step (Bio-Rad, USA).

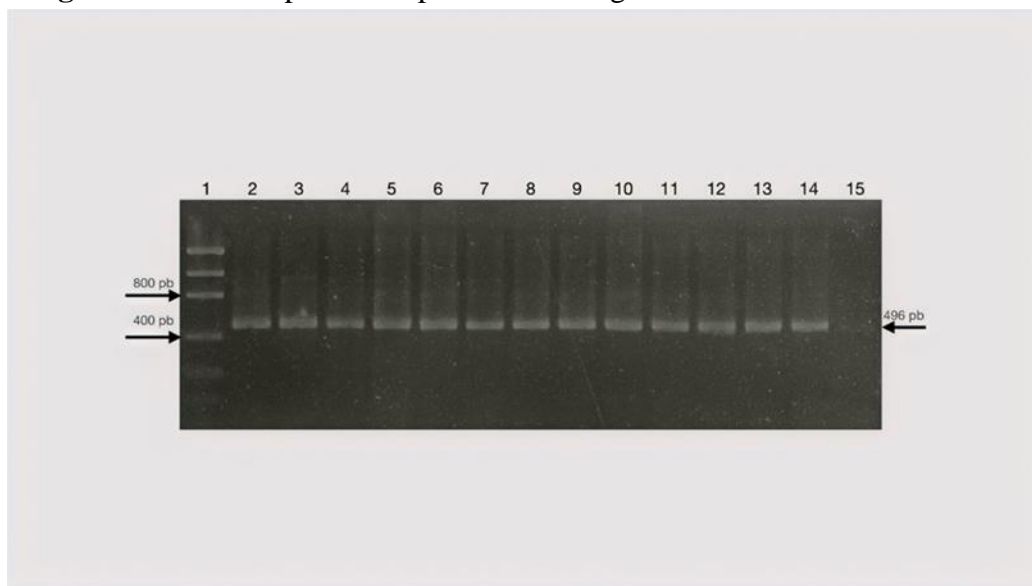
Detección de un fragmento gen NS1. Con la finalidad de corroborar la presencia del genoma del VLA en las muestras positivas a la RT-PCR en tiempo real, se estableció un protocolo para la detección de un fragmento del gen NS1, utilizando iniciadores descritos en el Manual de la OIE⁽¹⁰⁾. Para lo anterior se utilizó el Kit iProof HF Master Mix (Bio-Rad, USA). Los productos de amplificación de positivos a dicho protocolo se purificaron en geles de agarosa y fueron secuenciados por el método de Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM.

Secuenciación. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con la herramienta BLAST del NCBI. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con 29 secuencias reportadas en el Gene Bank del virus de lengua azul y con la secuencia AM745001.1 del virus de la fiebre epizoótica hemorrágica como *outgroup*. El alineamiento fue realizado utilizando el “*Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences*” (MAFFT ver 7, AIST). Se realizó el análisis filogenético utilizando métodos bayesianos (Markov Chain Monte Carlo) y el alineamiento se llevó a cabo con Mesquite en el software Mr. Bayes (Open source).

Resultados

Como un ensayo de evaluación de la calidad del material genético se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de aproximadamente 400 pb del gen GAPDH ovino, como se describe previamente. Todas las muestras utilizadas para la detección de un fragmento genoma viral fueron positivas a la amplificación de GAPDH por RT-PCR, lo que indica que el material genético estaba íntegro y en buen estado para su uso en los ensayos de RT-PCR (Figura 1).

Figura 1: RT-PCR para la amplificación del gen constitutivo GAPDH Ovino



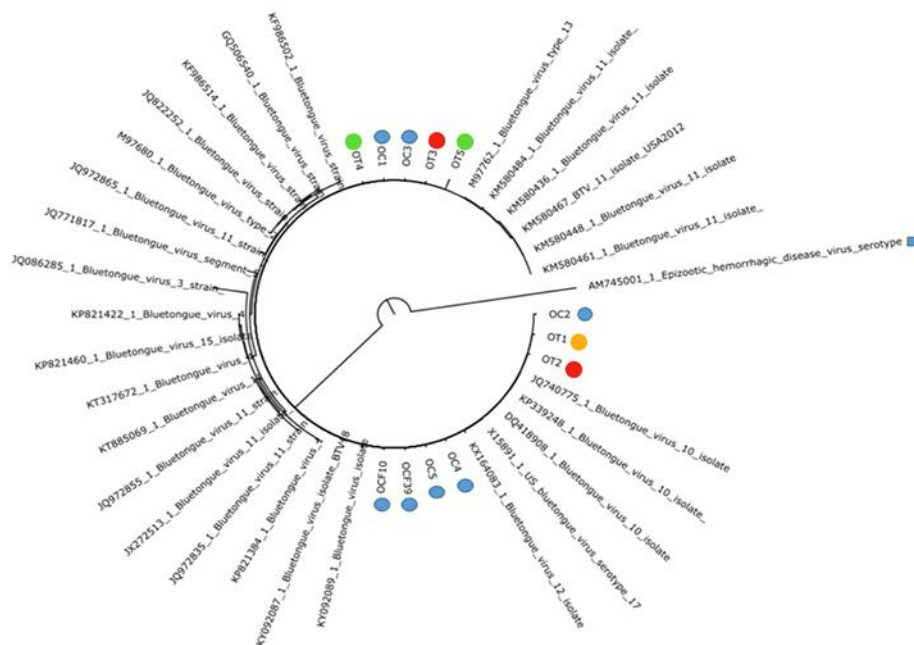
Carril 1, Marcador de tamaño de fragmento 50pb (Low Mass ladder); Carril 2-7, muestras de ovino. Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%.

En cuanto al ensayo de detección de un fragmento del gen NS1 mediante el RT-PCR punto final, se obtuvo la identificación de dicho gen en 12 muestras de sangre de ovinos proveniente de los estados de Chiapas, Coahuila y Tamaulipas. Con la finalidad de armonizar los métodos, se decidió utilizar iniciadores sugeridos por la OIE, como se describe previamente. El análisis de las secuencias obtenidas mostró en el alineamiento identidad con secuencias

reportadas en el GenBank con el fragmento del NS1 desde 89 % ($p= 1e-12$) a 98 % ($p= 4e-13$), correspondientes a los serotipos 10, 11 y 12.

Los resultados de la inferencia filogenética se observan en la Figura 2 en donde se muestra el agrupamiento de las muestras primordialmente con los serotipos 10 y 11. Los resultados positivos se corroboraron por el método de RT-PCR en tiempo real en dos de las muestras una de Chiapas y otra de Tamaulipas; como se ha mencionado el RT-PCRtr utiliza el gen NS3.

Figura 2: Inferencia filogenética de muestras de ovinos positivas al gen NS1 del virus de lengua azul



El dendograma fue obtenido utilizando el alineamiento de 100 pb del gen NS1 de las secuencias de las muestras positivas en este estudio y de 30 secuencias obtenidas del GenBank pertenecientes a los serogrupos 10, 11 y 12. Las muestras positivas de ovinos mediante el RT-PCR en punto final están identificadas como: OT=Ovinos Tamaulipas: OT1, OT2, OT3, OT4, OT5. OC=Ovinos Chiapas: OC1, OC2, OC3, OCF10, OCF39, OC5, OC4. Las razas están indicadas por color: Criollo (blue circle) Pelibuey (green circle) Suffolk (red circle) y Dorper (yellow circle). Las muestras fueron tomadas entre 2016 y 2017. Como outgroup se utilizó la secuencia del virus de la fiebre epizootica hemorrágica (AM745001) indicado con (blue square).

El resultado positivo a la detección por RT-PCRtr fue corroborado por el laboratorio de CPA del SENASICA y notificado al SIVE. En dicho laboratorio se utiliza de igual manera la detección de un fragmento del gen NS3, como control positivo se utiliza ARN viral que se obtiene a partir de sobrenadante de cultivos celulares infectados con el virus que

posteriormente se inactivan (comunicación personal CPA). Con respecto a los ensayos realizados en colaboración con el laboratorio oficial, para corroborar los resultados de los animales que resultaron positivos, el control sintético propuesto en este trabajo mostró que podría utilizarse sin problema en cualquier laboratorio BSL2 para realizar la detección del virus en laboratorios oficiales BSL2.

Discusión

Como se ha mencionado, la ELA en diferentes hospederos puede ser subclínica y por tanto la detección del agente causal en poblaciones ovinas puede ser compleja⁽²¹⁾. Por lo anterior, para este estudio en el muestreo fueron considerados animales clínicamente sanos, donde el estado de la viremia en los animales y los signos pueden o no ser observados, dependiendo de la carga viral o de los subtipos de los que se trate. Adicionalmente, se consideró para el muestreo Entidades Federativas del país en zonas donde el vector transmisor del virus está presente con un clima idóneo para su desarrollo⁽²²⁾, así como que los borregos estuvieran cercanos a explotaciones de ganado bovino, ya que esta especie puede ser portadora sana del virus.

Respecto al diagnóstico del agente causal de la ELA, el método recomendado es por aislamiento del virus en cultivo celular o huevos embrionados⁽²³⁾, sin embargo, se han desarrollado diferentes versiones de RT-PCR que pueden emplearse para detectar el VLA específicamente el serogrupo de los Orbivirus y para determinar el serotipo del VLA. Estos enfoques moleculares son mucho más rápidos que los métodos virológicos e inmunológicos tradicionales, que pueden tardar hasta cuatro semanas en suministrar información sobre serogrupos y serotipos, actualmente, existen ensayos dirigidos principalmente para las proteínas VP1, NS1, NS2, VP6 y NS3. Ninguna de estas proteínas tiene relación con la serotipificación del virus, y son fuertemente conservadas entre serotipos de VLA, algunas, como el caso de NS3 tiene mayor grado de conservación entre Orbivirus. Y, por tanto, estos ensayos carecen de potencial para clasificar los aislados⁽²⁴⁾.

Adicionalmente, cada técnica tiene un rango de detección del virus o del genoma, por ejemplo, Bonneau *et al*⁽²⁵⁾ informan que el ensayo de RT-PCR es capaz de detectar el genoma desde 3 hasta 122 días. Por lo que, es de relevancia hacer la recomendación de realizar muestreos y campañas de vigilancia no solo en rumiantes, sino además en los posibles vectores que están reportados como transmisores del virus.

En México, la ELA es considerada como exótica, sin embargo, este estatus debería ser reconsiderado tomando en cuenta las diferentes notificaciones realizadas desde los años 80s a la fecha en diferentes regiones del país; esto permitiría evaluar la presencia del virus en diferentes hospederos y vectores utilizando varios métodos. En 1981 con el trabajo de

Moorhead *et al*⁽²⁶⁾, se determinó la presencia de anticuerpos por inmunoprecipitación en ovinos sacrificados en el rastro encontrando 8.5 % de positividad en suero. Posteriormente, Vilchis *et al* (1986)⁽²⁷⁾ utilizando inmunodifusión demostraron 27.4 % de seropositividad en los animales muestreados. Stott *et al*⁽²⁸⁾ informaron seropositividad de 6 %, 35 % y 60 % en tres estudios independientes en ganado de diferentes estados del país. La publicación científica más reciente fue informada por Lozano-Rendón JA y su grupo de trabajo⁽¹⁷⁾ donde se demostró un 14.4 % en la detección molecular del gen NS1 del VLA en vectores *Culicoides* en estado de Nuevo León.

En cuanto a los resultados presentados en esta investigación se detectó un 3.75 % de positividad en las muestras de ovinos clínicamente sanos, utilizando el mismo gen NS1 que Lozano-Rendón *et al*⁽¹⁵⁾; sin embargo, este estudio se realizó en el vector, en donde la probabilidad de demostrar la presencia del virus es mayor que en los ovinos, en donde el tiempo de viremia es más corto. Dicho gen NS1, como ya se ha mencionado, es uno de los más conservados, entre los diferentes serotipos de VLA⁽²⁹⁾. Los resultados de la detección de un fragmento del genoma viral en muestras de ovino en este estudio coinciden con lo notificado este año por la CPA⁽¹⁹⁾.

Por otro lado, el porcentaje de detección es similar a lo descrito en los reportes más antiguos en donde se utilizan muestras de rumiantes. Los resultados informados en el presente trabajo, así como los presentados por otros autores, hacen manifiesta la necesidad de cambiar el estatus de la enfermedad, así como de implementar sistemas de vigilancia del virus, tanto en los vectores, como en los principales hospederos del virus, sean animales domésticos, como silvestres.

Conclusiones e implicaciones

Se presenta como una alternativa el uso de un control positivo sintético que evitaría el uso de ARN viral, que solo puede ser utilizado en laboratorio BSL3 de las instancias oficiales del país. Con el uso del control positivo sintético se aumentaría la red de laboratorios capaces de implementar la técnica de detección viral y por tanto determinar el estatus real de la enfermedad en el país.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del M en C Roberto Navarro López, Dra. Marcela Villarreal Silva, MC Mariana García Plata y al MVZ Martín García Osorio por su colaboración en corroborar resultados en el Laboratorio de CPA-SENASICA. La presente investigación fue financiada por el proyecto INIFAP No. 12583634008 y la ficha validada 914545716.

Literatura citada:

1. Qing-Long G, Wang Q, Yang XY, Li DL, Zhao B, Ge GY, *et al.* Seroprevalence and risk factors of the bluetongue virus in cattle in China from 1988 to 2019: A comprehensive literature review and meta-analysis. *Front Vet Sci* 2021;7:550381 doi: 10.3389/fvets.2020.550381.
2. Maclachlan NJ. Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. *Prev Vet Med* 2011;102(2):107– 111.
3. Chacko N, Mohanty NN, Biswas SK, Chand K, Yogisharadhya R, *et al.* A coiled-coil motif in non-structural protein 3 (NS3) of bluetongue virus forms an oligomer. *Virus Genes* 2015;51(2):244–251 doi 10.1007/s11262-015-1230-9.
4. Roy P. Bluetongue virus proteins and particles and their role in virus entry, assembly and release. *Adv Virus Res* 2015;64:69–123. doi.org/10.1016/S0065-3527(05)64004-3.
5. Schwartz-Cornil PP, Mertens V, Contreras B, Hemati F, Pascale E, Breard *et al.* Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res* 2008;39(5):46. doi: 10.1051/vetres:2008023.
6. Sperlova A, Zendulkova D. Bluetongue: a review. *Vet Med* 2011;56:430–452.
7. Bumbarov V, Golender N, Jenckel M, Wernike K, Beer M, Khinich E, Zalesky O, Erster O. Characterization of bluetongue virus serotype 28. *Transb Emer Dis* 2020;67(1):171–182. doi.org/10.1111/tbed.133338.
8. Maclachlan NJ, Drew CP, Drew CP, Darpel KE, Worwa G. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J Comp Pathol* 2009;141:1-16. doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.04.003.
9. Drew CP, Heller MC, Mayo C, Watson JL, Maclachlan NJ. Bluetongue virus infection activates bovine monocyte-derived macrophages and pulmonary artery endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;136(3–4):292–296. doi:10.1016/j.vetimm.2010.03.006.
10. OIE. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2019. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>. Consultado 16 Nov, 2019.
11. Rojas JM, Rodríguez-Martín D, Martín V, Sevilla N. Diagnosing bluetongue virus in domestic ruminants: current perspectives. *Vet Med Res Report* 2019;10:17–27.

12. Barratt-Boyes SM, Maclachlan NJ. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Vet Microbiol* 1994;40(3-4):361-371. doi.org/10.1016/0378-1135(94)90123.
13. Falconi C, López-Olvera JR, Gortázar C. BTV infection in wild ruminants, with emphasis on red deer: a review. *Vet Microbiol* 2011;151(3-4):209-219. doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.011.
14. Drolet S, Rijn P, Howerth E, Beer M, Mertens P. A review of knowledge gaps and tools for Orbivirus research. *Vector-borne Zoon Dis* 2015;15(6): 339-347. doi: 10.1089/vbz.2014.1701.
15. Gay GC. Orbiviruses: A gap analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis*- 2015;15(6):333-334. doi:10.1089/vbz.2015.28999.cgg.
16. Suzan VM, Misao O, Romero EA, Yosuke M. Prevalence of bovine herpesvirus-1, paraenfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhoea, bovine adenovirus 7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn J Vet Res* 1983;31(3-4): 125-132.
17. Vilchis C, Gay J, Batalla D. Determinación de anticuerpos contra el virus de lengua azul en ovinos por la técnica de inmunodifusión. *Tec Pecu Méx* 1986;51:116-121.
18. Lozano-Rendón JA, Contreras-Balderas AJ, Fernández-Salas I, Zarate-Ramos J, Avalos-Ramírez R. Molecular detection of bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in captured *Culicoides* spp. in the northeastern regions of Mexico. *Afr J Microbiol Res* 2015;9(45):2218-2224.
19. Boletín Informativo de la CPA. AVISE. No 9 Febrero, 2021. https://issuu.com/boletinavise/docs/boletin_avise_ed09_febrero.
20. Gonzalez-Arto M, Hamilton dos STR, Gallego M, Gaspar-Torrubia E, Aguilar D, Serrano-Blesa E, *et al*. Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology* 2016;4(1):167-171. doi: 10.1111/andr.12117.
21. Celma CC, Bhattacharya B, Eschbaumer M, Wernike K, Beer M, Roy P. Pathogenicity study in sheep using reverse-genetics-based reassortant bluetongue viruses *Vet Microbiol* 2014;174(1-2):139-47. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.09.012.
22. SIAP. Producción por Estado. 2016. http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/apecnal.jsp?id=5.
23. McHolland LE, Mecham JO. Characterization of cell lines developed from field populations of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol* 2003;40(3):348-51. doi: 10.1603/0022-2585-40.3.348.

24. Maan S, Maan NS, Belaganahalli MN, Potgieter AC, Kumar V, Batra K, *et al.* Development and evaluation of Real Time RT-PCR assays for detection and typing of Bluetongue Virus. PLoS ONE 2016;11(9): e0163014. doi: 10.1371/journal.pone.0163014.
25. Bonneau KR, DeMaula CD, Mullens BA, Maclachlan NJ. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co; 2002.
26. Moorhead JR. Estudio de la presencia de anticuerpos precipitantes contra el virus de la Lengua Azul en ovinos y bovinos sacrificados en el Rastro de Ferrería de la Ciudad de México, DF [tesis]. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México;1981.
27. Vilchis CM, Gay GJ, Batalla D. Determinación de anticuerpos contra el virus de lengua azul en ovinos por la técnica de inmunodifusión. Tec Pecu Méx 1986;51:116-121.
28. Stott JL, Blanchard-Channell M, Osburn BI, Riemann HP, Obeso RC. Serologic and virologic evidence of bluetongue virus infection in cattle and sheep in Mexico. Am J Vet Res 1989;50(3):335–340.
29. Mertens PP, Diprose J, Maan S, Singh KP, Attoui H, *et al.* Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. Vet Italiana 2004;40(4):426-437.