

85
rej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“UTILIZACION DE CELULAS DE MEMBRANA
SINOVIAL DE FETO CAPRINO PARA LA
PRODUCCION DE ANTIGENO DEL VIRUS DE
ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA EN MEXICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

HUGO RAMIREZ ALVAREZ

ASESORES: MVZ MC HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ
MVZ PhD. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

265545

TESIS CON
FALLA DE CUBRIM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U N A M
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO. VOTOS APROBATORIOS

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN. Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Utilización de células de membrana sinovial de feto caprino para la
producción de antígeno del virus de Artritis Encefalitis Caprina en
México".

que presenta el pasante: Hugo Ramírez Alvarez.
con número de cuenta: 8811225-5 para obtener el TITULO de.
Médico Veterinario Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx., a 1 de Abril de 199 8

PRESIDENTE	<u>Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Humberto A. Martínez Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Fernando Alba Hurtado</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Raúl Badillo Rodríguez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Mvz. Victor Hugo Leyva Grado</u>	

DEDICATORIAS

Al amor de mi vida (Mirna):

Por haber estado conmigo todo este tiempo brindándome apoyo, comprensión, amor, amistad y ayuda desinteresadamente; por ser una parte de mi vida muy especial. TE AMO.

A mi madre (Leovigilda):

Por haberme dado la vida y enseñarme a enfrentarla. Gracias.

A mi padre (Carmelo):

Por haberme dado la vida, por su apoyo moral y económico, y por darme la mejor herencia de mi vida, mi carrera. Gracias.

A Ma Elena:

Por enseñarme y brindarme lo que una madre brinda a un hijo, por su apoyo que me ha dado toda la vida, viéndose reflejado en este trabajo. Gracias.

A mis hermanos (Tovias, Zenaida, Oscar, Elizabeth y Mari Carmen):

Por su compañía y amistad de toda la vida. Gracias.

A mis Asesores:

Alejandro Martínez, por haberme apoyado siempre en la realización de este trabajo, por brindarme sus conocimientos, consejos y sobre todo por brindarme su amistad. Mil gracias.

Juan Antonio Montaraz, por brindarme su amistad, sus conocimientos y orientación para que este trabajo pudiera concretarse. Gracias.

A la FESC:

Por haberme abierto las puertas y acogerme en su seno durante 5 años, siendo mi segunda casa. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

a Mirna:

Por ser una parte muy importante para que esta meta llegara a ser realidad, mi agradecimiento eterno.

*A mis compañeros del laboratorio de Virología (Alejandro, Victor, Lulu y Lupita):
Por su ayuda y amistad brindada desinteresadamente.*

*A mi sinodales (Alejandro, Fernando, Raúl, Tortora y Víctor) :
Por su sugerencias y opiniones para mejorar este trabajo. Gracias.*

*Al Dr. Trejo González:
Por el apoyo que me brindo para realizar este trabajo y por su amistad. Gracias.*

*A los profesores de la FESC:
Por enseñarme y darme las armas para desempeñarme con orgullo como profesional.*

*A mis amigos:
Carlos, Claudia, Heriberto, Humberto, José Luis, Laura, Rosa, Sandra, Sergio, Silvia, etc... Por su compañía y amistad.*

*A la generación 1992- 1996:
Por pertenecer y convivir con ellos.*

Y a todas y cada una de las personas que me apoyaron siempre.

ÍNDICE

PÁGINAS

RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	2
Distribución de la enfermedad de Artritis Encefalitis Caprina....	2
Etiología	3
Cuadro clínico	5
Patogenia	6
Patología	9
Respuesta inmune	11
Vías de transmisión	13
Diagnóstico	14
Diagnóstico diferencial	21
Tratamiento	21
Control y profilaxis	22
Importancia económica	24
OBJETIVOS.	25
MATERIAL Y MÉTODOS.	26
RESULTADOS.	31
DISCUSIÓN.	36
CONCLUSIONES.	40
APÉNDICES.	42
BIBLIOGRAFÍA.	46

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
No. 1 Proteínas que codifican los genes del virus de la AEC.....	4
No. 2 Principales pruebas diagnósticas para la AEC.	15
No. 3 Cantidad mínima de anticuerpos proteicos que se pueden detectar con ciertas pruebas inmunológicas	17
No. 4 Sensibilidad relativa de los análisis para la determinación de antígenos y anticuerpos.....	19

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMAS	PAGINA
No. 1 Ciclo de replicación viral.....	7
No. 2 Diseño experimental.	27

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	PAGINA
No. 1 Determinación de proteína (Proteína de p.m. de 100,000).....	32
No. 2 Determinación de proteína (Proteínas de p.m. de 10,000)	33

ÍNDICE DE FOTOS

FOTO	PAGINA
No. 1 Toma de muestra de membrana sinovial de feto caprino de la articulación carpometacarpiana.	34
No. 2 Crecimiento celular a partir del explante de membrana sinovial [10x].....	34
No.3 Monocapa de células de membrana sinovial no inoculadas, con un 100 % de confluencia [10x].....	34
No 4 Efecto citopático (formación de sincitios y vacuolización causado por el virus de la Artritis Encefalitis Caprina en células de membrana sinovial [40x]	34
No. 5 Sincitio (Célula gigante) causado por la inoculación del virus de Artritis Encefalitis Caprina (AEC) en células de membrana sinovial [40x]	35
No. 6 Célula gigante con números núcleos fusionados, causado por el virus de AEC, tinción de Giemsa [40x].....	35
No 7 Formación de sincitios con citoplasmas alargados dando la apariencia de células estrelladas y con numerosos núcleos fusionados, tinción de Giemsa [10x]	35
No 8 Evidenciación de proteínas virales de 100,000 y 10,000 daltons de peso molecular del virus de AEC con la técnica de dot blotting	35

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue mantener un cultivo de membrana sinovial de feto caprino y aislar el virus de Artritis Encefalitis Caprina (AEC), a partir de monocitos/macrófagos tomados del torrente sanguíneo de cabras seropositivas. Para lo cual se colectaron fetos caprinos de cabras criollas de donde se obtuvieron explantes de membrana sinovial que fueron colocados en botellas de Falcon, adicionados de medio de cultivo Eagle Dulbecco e incubándose con un 2-5% de CO₂ a 37° C, mostrando crecimiento aparente en 24 horas formando confluencia de la monocapa al 100% entre los 12 y 14 días. Estableciendo el cultivo celular con un total de 100 cajas obtenidas durante el desarrollo del trabajo. Estas cajas de cultivo fueron infectadas a partir del aislamiento de monocitos/macrófagos de 5 animales seleccionados por ser seropositivos a la AEC, con un kit de la prueba de ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas) comercial (CHEKIT). De estos animales se obtuvo sangre en jeringas con Heparina para luego centrifugar utilizando a partes iguales Ficoll - Hypaque con lo cual se separaron células leucocitarias que se colocaron en botellas de Falcon por 7 días para obtener al final monocitos/macrófagos a una concentración promedio de 10⁶ células/ml, que mostró ser la requerida para causar efecto citopático en más de un 30% de las botellas de cultivo infectadas (de un total de 70 botellas). El efecto citopático se pudo observar en un tiempo mínimo de 4 semanas, consistiendo en el daño característico que causa el virus de AEC, con células estrelladas refráctiles y procesos dendríticos, formación de células gigantes (sincitios) y conglomeración nuclear.

Una vez observado el efecto citopático del virus de AEC en la monocapa de células, se colectó el sobrenadante y se almacenó a -30° C; cuando se reunieron 800 ml de sobrenadante, se concentró por ultrafiltración con un equipo Amicon que utiliza membranas de filtración, con un valor de exclusión de peso molecular de 100,000 y 10,000 daltons (d), el grado de concentración fue de aproximadamente 100 veces. A este concentrado se le realizó la determinación de proteína por el método de Bradford encontrando para las moléculas mayores de 100, 000 d una concentración de 2 mg/ml de proteína y para las mayores de 10, 000 d una concentración de 0.12 mg/ml.

Se evidenció la presencia de antígenos virales con la técnica de dot blotting en una membrana de nitrocelulosa, probando antígenos mayores de 100,000 daltons (presuntamente la glicoproteína de superficie) y de 10,000 daltons (presuntamente proteína de cápside y transmembranal). Este trabajo demuestra el aislamiento de antígenos del virus de la AEC en México a partir de la infección de cultivos de membrana sinovial de feto caprino, estos pueden ser utilizados para el montaje de pruebas diagnósticas más específicas que utilicen antígenos de cepas virales que están presente en el país.

INTRODUCCIÓN

La cabra ha constituido una de las especies domésticas más importantes para el hombre, aportando carne y leche para alimentarse, pelo y pieles para confeccionar prendas con que vestirse, abono orgánico de alta calidad, como animal de ornato y, finalmente, inspiración poética y religiosa (Arbiza, 1986; Gallego, 1993).

Actualmente existen 696,514,300 cabras en el mundo (FAO, 1997). Aproximadamente el 6% se encuentra en países desarrollados y 94% en países en desarrollo, de las cuales 56.5 % están en Asia, 32.4% en África, 4.0% en Sudamérica, 2.8 % en América del Norte y Central, 2.7% en Europa, 1.3% en la desaparecida URSS y 0.3% en Oceanía (Arbiza, 1986, Smith y Sherman, 1994)

Las cabras pueden tener diferentes fines productivos, como el de obtener carne (Boer), leche (Saanen, Alpina), queso, fibra de Cashmere (Cabra Pasmína) y Mohair (Cabra Angora), cueros para preparación de pieles finas (cabra Red Sokoto); como animales de carga y tiro, animales de experimentación, producción de anticuerpos comerciales, y cada vez más, como mascotas (Gall, 1981; Smith y Sherman, 1994)

Las cabras son manejadas bajo todos los sistemas de producción imaginables, incluyendo la forma silvestre, trashumante, nómada, extensivo, intensivo, y en sistemas totalmente confinados (Gall, 1981, Smith y Sherman, 1994).

En países subdesarrollados, las zonas donde se crían las cabras se caracterizan por ser pobres en su capacidad de producción de alimento, lo que hace que las cabras tengan que ingerir los alimentos más inapropiados; asimismo mantienen una gran resistencia física y excelente tasa reproductiva (Arbiza, 1986).

Las cabras aún con su gran resistencia, son susceptibles a enfermedades, como la Artritis Encefalitis Caprina (AEC), la cual es un padecimiento viral que ha emergido con gran importancia en muchos países, sobre todo en aquellos dedicados a la producción láctea y que utilizan básicamente razas de origen europeo (Dawson, 1987).

DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA

El virus de la Artritis Encefalitis Caprina (AEC) fue reconocido a principio de los años 70s (Pawlisch y Maes, 1984; James, 1990; Putney y Montelaro, 1990) y aislado por primera vez en 1980a en los Estados Unidos por Crawford y cols, a partir de membrana sinovial de cabras afectadas con artritis. Posteriormente, el virus fue también aislado en Nueva Zelanda e Inglaterra. En México se presentaron evidencias preliminares del aislamiento e identificación del virus en 1986 (Gay y cols, 1986). La enfermedad de AEC, que también es conocida como Rodilla Grande, Leucoencefalomielitis-Artritis de las Cabras, Leucoencefalomielitis Viral, Infección por Retrovirus Caprino o Artritis Encefalitis Caprina Viral; es una enfermedad que afecta a diversos aparatos y sistemas de los caprinos domésticos de todas las edades y probablemente a todas las razas, se

manifiesta en forma persistente durante toda la vida del animal infectado (Crawford y Adams, 1981; Alvarez, 1984; Dinter y Morein, 1990; Dunn, 1990; Trigo, 1991)

La enfermedad esta presente en el Continente Americano {Brasil (Hotzel y cols, 1993) Canadá (Bélanger y Leboeuf, 1993), Estados Unidos (Cutlip y cols, 1992), Jamaica, México (Gay, 1986), Perú (Amerighno y cols, 1993), Trinidad y Tobago, Venezuela}, Europa {Alemania, Dinamarca, Francia (Vitu y Russo, 1988), Gran Bretaña (Dawson y Wilesmith, 1985), Grecia, Holanda, Suiza (Adams y cols, 1984), Suecia, Noruega (Adams y cols, 1984)}, África {Argelia (Achour y cols, 1994), Guinea-Bissau, Kenia (Adams y cols, 1984), Maputo (Lopes y cols, 1989), Mozambique (Lopes y cols, 1989), Túnez, Zaire}, Asia {Israel, Arabia Saudita (Alluwaimi y cols, 1990), Siria}, y Oceanía {Australia (Greenwood y cols, 1995b), Fiji (Adams y cols, 1984) y Nueva Zelanda (Surman y Daniels, 1985)}.

Existe el riesgo de que se difunda a muchos otros países, por el tránsito internacional de caprinos de países infectados como EUA, país donde la incidencia en algunos hatos es de cerca del 100% (Achour y cols, 1989, Dinter y Morein, 1990; Trigo, 1991; Cutlip y cols, 1992, Giangaspero y cols, 1992; González, 1994). En México se han realizado diversos estudios serológicos para determinar la seroprevalencia de la AEC, utilizando la prueba de inmunodifusión y estos estudios indican que los animales importados son seropositivos al virus de AEC (Trigo, 1991; González, 1994) Así por ejemplo, en un estudio de un total de 1,627 sueros de cabras criollas provenientes de 12 estados del país, ninguno presento anticuerpos contra el virus; sin embargo, a partir de 857 sueros de cabras lecheras provenientes en su mayoría de los Estados Unidos, 232 (27 %) fueron seropositivas; este estudio comprendió cabras de la zona norte, centro y sur del país (Nazara, 1991; Trigo, 1991)

ETIOLOGÍA

La AEC es producida por un virus RNA que se clasifica dentro de la familia Retroviridae y la subfamilia lentivirinae, caracterizados por causar enfermedades crónicas degenerativas de diversos sistemas u órganos. Otros retrovirus que se encuentran en esta familia son: el virus de la anemia infecciosa equina, el de maedi-visna o neumonía progresiva ovina (NPO); y virus que causan inmunodeficiencias, como el virus de la inmunodeficiencia humana, del simio, felina y bovina. Los retrovirus poseen una gran capacidad para mutar, siendo un millón de veces más rápidos que cualquier otro organismo conocido. Esto explica en parte, las dificultades del sistema inmunológico para detectarlos y eliminarlos, así como los problemas para desarrollar vacunas contra ellos. (Trigo, 1986; Mc Guire, 1987; Cheevers y Travis, 1988, Dinter y Morein, 1990; James, 1990; Pastoret y Portetelle, 1990, Putney y Montelaro, 1990; Trigo, 1991, Pétursson y cols, 1992; Ryan y cols, 1993, Olvera, 1994, Smith y Sherman, 1994).

Se postula que la morfogénesis del virus de la AEC es similar a la del virus de la NPO, ya que tiene proteínas estructurales similares, con reacción cruzada de los determinantes antigénicos donde está involucrada la proteína p30, además, de la similitud de ambos virus por crecer en líneas celulares de ovino. Sin embargo, los experimentos de hibridación con ácidos nucleicos, indicaron que los virus de la AEC y de la NPO son

diferentes, ya que comparten solo el 20% de la homología de secuencia entre sus genomas; no obstante son indistinguibles en reacciones de inmunodifusión donde esta involucrada la glicoproteína de superficie de un peso molecular de 135,000 daltons (GP 135) y la proteína interna, de un peso molecular de 28,000 daltons (P 28) (Roberson y cols, 1982; Pastoret y Portetelle, 1990; Angus y cols, 1994).

El virus es una partícula envuelta que mide entre 90 a 130 nm de diámetro. La envoltura viral se deriva de la membrana de la célula infectada durante el proceso de gemación (Cheevers y Travis, 1988, Pétursson y cols, 1992; Olvera, 1994; Clavijo y Thorsen, 1995a). Contiene en su núcleo una cadena sencilla de ácido ribonucleico, con un peso molecular de aproximadamente 5.5×10^6 daltons y una densidad de 1.14 a 1.16 g/ml en sacarosa; además, posee un RNA dependiente de magnesio y una transcriptasa reversa. Se han reportado diferentes cepas del virus de la AEC (Robinson y Ellis, 1986; Nermut y Steven, 1987; Clemens y cols, 1988; Ellis y cols, 1988b; Perrin, 1991; Smith y Myers, 1991; Amerighno y cols, 1993; Clavijo y Thorsen, 1996; Rowe y East, 1997).

Este virus está compuesto por aproximadamente 60% de proteína, 35% lípidos, 3% carbohidratos y 1% de RNA (Lichtensteiger y cols, 1991, Pétursson y cols, 1992). Contienen tres genes de codificación, gag, pol y env, los cuales codifican las proteínas del virus (cuadro 1)

CUADRO 1
PROTEÍNAS QUE CODIFICAN LOS GENES DEL VIRUS DE LA AEC

GENES	PROTEÍNAS QUE CODIFICAN	PESO MOLECULAR
gag	cápside	28,000 Daltons
	matriz	16,000 Daltons
	nucleoproteínas	14,000 Daltons
pol	Enzimas virales. ribonucleasa H, integrasa viral, proteasa viral, y transcriptasa reversa.	
env	glicoproteína de superficie	135,000 Daltons
	glicoproteína transmembranal	50,000 Daltons

Fuente: Putney y Montelaro, 1990; Narayan y cols, 1992; Pétursson y cols, 1992; Clavijo y Thorsen, 1995a, Perry y cols, 1995.

Además cuenta con dos genes que codifican la regulación de proteínas, el tat y rev y, un gen víf antes llamado Q; el cual es esencial para una rápida y eficiente replicación del virus en cultivo de membrana sinovial de cabra (Harmache y cols, 1995) También se ha demostrado que el gen codificador de la envoltura (env) GP 135 esta ligado a la infección de células sinoviales de cabra por el virus (Hullinger y cols, 1993)

CUADRO CLÍNICO

Este tipo de virus se caracteriza por presentar una infección lenta pero subclínica en la mayoría de las cabras infectadas, siendo estas capaces de transmitir el virus; aunque algunos individuos nunca presentan signos clínicos de la enfermedad. El período de incubación varía de días, meses, hasta años. Se estima que la enfermedad en su forma clínica ocurre solo en un 30% a 40% de los animales en un hato infectado (Motha y Ralston, 1994; OIE, 1996; Rowe y East, 1997).

Las manifestaciones clínicas más importantes de la AEC corresponden a la forma nerviosa en cabritos y a la forma articular en cabras adultas. En animales jóvenes de 2 a 6 meses de edad, los signos clínicos iniciales corresponden a cojeras y paresia o ataxia en el tren posterior que puede ser unilateral o bilateral (James, 1990; Pétursson y cols, 1992; Smith y Sherman, 1994; OIE, 1996; Rowe y East, 1997). Los miembros posteriores se tornan débiles y se desarrolla parálisis, que puede ser general; adicionalmente puede observarse opistótonos e hiperestesia. El animal se mantiene alerta y con buen apetito, puede haber ceguera y no se presenta fiebre. A continuación se presenta flexión del cuello, movimientos en círculos y de pedaleo en las patas y disfagia. La enfermedad es por lo general corta y fatal cuando los signos son severos, aunque en algunos casos la enfermedad se puede prolongar hasta por un mes. Los cabritos que sobreviven muestran deficiencias neurológicas. Algunos cabritos pueden además desarrollar neumonía, por lo cual se observa taquipnea y se perciben a la percusión sonidos mate en cavidad torácica. Se puede presentar atrofia muscular en los miembros afectados; pudiendo llegar a desarrollar problemas artríticos similares a los que se presentan en adultos (Pawlisch y Maes, 1984, Trigo, 1986 y 1991; Dinter y Morein, 1990, Leyva, 1994; Smith y Sherman, 1994).

En animales adultos de 2 a 9 años de edad se asocia con poliartitis. Los animales infectados inician con una ligera inflamación de la zona afectada, que puede ser unilateral o bilateral; pierden peso progresivamente y presentan una pobre condición física, pelaje hirsuto, áspero y sin brillo (Pétursson y cols, 1992, Amerighno y cols, 1993, Leyva, 1994). El proceso inflamatorio de tejidos blandos periarticulares, produce cojeras y disminuye la movilidad de los animales afectados, las cabras severamente lesionadas caminan apoyadas en sus carpos. La inflamación periarticular inicial de las articulaciones cárpales es evidente entre los 12 a 15 meses después de la infección y después la artritis crónica sigue un curso progresivo e irreversible. Las articulaciones afectadas presentan en etapas iniciales, un aumento de volumen, consistencia blanda, dolorosa y caliente a la palpación. Con el transcurso de la enfermedad, se endurece el tejido periarticular, tendones y la cápsula sinovial debido a una mineralización de los tejidos blandos, además hay erosión de la superficie articular. Se observa anquilosis en los miembros anteriores y posibles deformaciones de la pezuñas. Los tendones y los ligamentos pueden llegar a romperse, lo que provoca que el animal no pueda levantarse (Narayan y Cork, 1990, Trigo, 1991, Leyva, 1994; Olivera, 1994, Perry y cols, 1995). El líquido sinovial se torna rojo y pardusco, además aumenta de volumen (Trigo, 1991, Leyva, 1994).

Otra patología asociada, puede ser la presencia de neumonía intersticial crónica, afectando principalmente los lóbulos caudales y craneoventrales. Los animales presentan

un cuadro de pérdida progresiva de peso, dificultades respiratorias, con apetito y temperatura normal. Se ha intentado reproducir esta neumonía experimentalmente sin éxito (Ellis y cols, 1988b; Trigo, 1986 y 1991; Leyva, 1994). Otro cuadro posible es la mastitis intersticial ("Ubre de Madera" o "Teta de Madera") que ocasiona endurecimiento y atrofia unilateral de la glándula al momento del parto principalmente en primíparas. La glándula se presenta inflamada en un principio pero sin edema, lo que afecta la producción de leche y calostro; sin embargo puede causar mastitis subclínica. Los nodos linfáticos retromamarios se detectan hipertrofiados, en algunos casos se ha encontrado que la mastitis también se puede presentar en cabras en la etapa de pubertad. En raras ocasiones desarrollan encefalitis caracterizada por disnea, parálisis, sin fiebre y sin pérdida de apetito. La AEC puede causar metritis y endometritis caracterizada por ser afebril, sin pérdida de apetito, aumento de la respiración y actitud de alerta (Ali, 1987; Dinter y Morein, 1990; Knowles y cols, 1990; Jackson y cols, 1991; Heckert y col, 1992; Gallego, 1993; Ryan y cols, 1993. Leyva, 1994).

La mayor parte de cabras infectadas no presentan signos clínicos de la enfermedad, las lesiones de la articulación pueden ser indetectables o limitadas a un ligero engrosamiento de la membrana sinovial con células mononucleares dispersas. Estas cabras clínicamente normales persisten infectadas de por vida (seroreactores) (Trigo, 1991; Amerighno y cols, 1993; Perry y cols, 1995). Durante la fase subclínica las células infectadas están presentes en médula ósea, sangre y bazo pero raramente en los compartimientos sinoviales; estos animales no desarrollan viremia (Narayan y cols, 1992).

A excepción de cabras y posiblemente ovejas en las que inoculaciones experimentales por vía intra-articular con el virus de AEC produjeron artritis, así como inoculaciones intracerebrales e intravenosas reprodujeron la infección, no se conoce otro hospedador para este virus. También se ha demostrado experimentalmente la infección de cabras por el lentivirus ovino (Dinter y Morein, 1990; Trigo, 1991; Pétursson y cols, 1992; Rowe y East, 1997). Se ha reportado una baja seroprevalencia en cabras de raza Angora, Saanen, Golden Guernsey y no se a reportado seroprevalencia en la raza Pygmy y Toggenburg, se debe considerar que posiblemente no todas las razas han estado en las mismas circunstancias de exposición a el virus de AEC (Cutlip y cols, 1992, Bélanger y Leboeuf, 1993; Rowe y East, 1997).

PATOGENIA

El virus de la AEC es absorbido en el intestino a través de las células de la descendencia monocito-macrófago, siendo estas las células blanco del virus. El virus reside en forma latente en los monocitos (contienen el genoma viral, en forma de provirus DNA) y no es sino con motivo de la transformación del monocito en macrófago que se induce la transcripción del RNA, provocando así la replicación y la excreción extracelular de nuevas partículas que van a estimular la respuesta inmunitaria del huésped (diagrama 1) (Zink y cols, 1987, Zink y Narayan, 1989, Nazara, 1991; Werling y cols, 1994).

DIAGRAMA 1

CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

La envoltura viral se fusiona con la membrana celular.



El material genético del virus (doble cadena de RNA) penetra en la célula.



El RNA viral es transcrito a una cadena de DNA por la acción de la transcriptasa reversa .



La cadena de DNA es transformada a una doble cadena de DNA proviral.



La doble cadena de DNA entra al núcleo de la célula, donde esta se integra a el DNA celular (monocitos).



El genoma viral queda latente



La reactivación ocurre cuando el DNA viral es transcrito por el RNAm a RNA viral

(Fenner y cols, 1993, Peretz y cols, 1993)

Se ha demostrado que el RNA viral es capaz de pasar directamente de una célula infectada a una célula no infectada, previo a la producción de partículas maduras del virus (Zink y Narayan, 1989).

También se ha identificado la transcriptasa reversa en células epiteliales de las criptas del intestino, células endoteliales, células sinoviales, túbulos renales, folículos de la tiroides, pulmones, sistema nervioso central (SNC), glándula mamaria y se sugiere también en el útero (Ali, 1987; Pétursson y cols, 1992; Rimstad y cols, 1993, Rowe y East, 1997). Posteriormente el virus infecta en forma consistente el sistema nervioso central principalmente en cabritos, y las membranas sinoviales en animales adultos, así como las articulaciones y estructuras adyacentes; siendo las cárpales (rodilla), las que presentan daño más severo denominándose coloquialmente "rodilla hinchada", las que le siguen

en orden de importancia son, las articulaciones tibio-tarsianas (corvejón), femoro-tibio rotulianas (patela), menudillo, la bursa atlanto-occipital, vaina del tendón, coxo-femoral (cadera) y finalmente la articulación húmero-escapular (hombro) (Trigo, 1986; Alluwaimi y cols, 1990; Dinter y Morein, 1990, Pétursson y cols, 1992; Amerighno y cols, 1993, Smith y Sherman, 1994).

Las alteraciones en la permeabilidad de los vasos sinoviales se consideran un cambio anatómico fundamental, el cual resulta en una artritis crónica. Estas se observan una semana después de la infección experimental y consisten en pequeños acúmulos de células mononucleares perivasculares y edema del tejido subcutáneo cercano a las cápsulas articulares. Alrededor del día 20 post-infección, los vasos sanguíneos están rodeados por una fuerte infiltración de células inflamatorias y la hipertrofia de las células endoteliales parece invadir el lumen vascular (Robinson y Ellis, 1986, González y cols, 1987; Gaskin, 1990; Nazara, 1991).

El incremento de la permeabilidad vascular permite la exudación del plasma sanguíneo, incluyendo fibrinógeno, dentro de las cavidades sinoviales. Los productos inflamatorios como la fibrina, conducen a la hipertrofia e hiperplasia de las células de recubrimiento sinovial siendo un factor importante que contribuye a la formación de vellosidades sinoviales (Pétursson y cols, 1990; Knowles y cols, 1992). Las células mesenquimales emigran dentro de las masas de fibrina y los fibroblastos sintetizando colágeno. La masa puede incrementar su tamaño por deposición de fibrina e invadir los vasos sanguíneos o liberarse situándose en la cavidad bursal o articular, teniendo una apariencia blanquecina por lo que se denomina "cuerpos de arroz" (González y cols, 1987, Nazara, 1991).

Muchas vellosidades sinoviales son hipocelulares de apariencia hialina y no están recubiertas por células sinoviales (Nazara, 1991; Knowles y cols, 1992). En el cartilago articular también se presentan alteraciones debido al daño vascular, y a la inflamación que también altera la composición del líquido sinovial. La exudación inflamatoria dentro de la cavidad articular incrementa la viscosidad del líquido articular y disminuye la difusión al cartilago articular. El exudado también altera el contenido enzimático del líquido articular, la superficie de los mucopolisacáridos de la lámina se disgrega, desenmascarando a los paquetes de colágeno, los cuales se pueden fracturar por movimiento mecánico, produciendo fisuras en la superficie articular (Nazara, 1991).

La organización de la fibrina en la cavidad articular o fosa sinovial conduce a la formación del tejido de granulación. Este tejido de granulación es celular y se convierte

en un panus fibrótico que cubre gradualmente al cartilago erosionado y también penetra a las fisuras en la superficie articular. El tejido de granulación que prolifera promueve la destrucción local del hueso esponjoso y altera la circulación normal. La destrucción del hueso subcondral es continua lo que conduce a una anquilosis ósea (Nazara, 1991; Heckert y cols, 1992; Knowles y cols, 1992).

El número de linfocitos, macrófagos y el nivel de inmunoglobulinas en el fluido sinovial se incrementa por encima de los niveles normales en los primeros meses subsecuentes a la infección. Una porción significativa de la inmunoglobulina IgG presente en el fluido sinovial, actúa directamente contra el antígeno viral (Robinson y Ellis, 1986).

PATOLOGÍA

En el líquido cefalorraquídeo se observa una pleocitosis de ligera (300 a 3900 células/mm³) a moderada o severa (4,000 a 70,000 células/mm³), eritrocitos y aumento de la proteína total que puede alcanzar de 40 a más de 700 mg/dl (Crawford y Adams, 1981; Trigo, 1991). El líquido sinovial de las articulaciones afectadas, presenta un color rojizo o pardusco con volumen variable, baja viscosidad y la cuenta celular varía de 500 a 500,000 células/mm³, con más de 90% de células mononucleares, principalmente linfocitos y en menor número macrófagos, células plasmáticas y sinoviales (Narayan y Cork, 1990; Trigo, 1991, Leyva, 1994).

En sistema nervioso central, al examen macroscópico se observan áreas multifocales asimétricas en la sustancia blanca, de coloración rosácea y pardusca. Las lesiones son más prominentes en el cerebelo, tallo cerebral y en la porción cervical y lumbosacra de la médula espinal (Pawlisch y Maes, 1984; Trigo, 1991). Al examen histopatológico, se aprecia una inflamación perivascular no supurativa; los principales componentes celulares del infiltrado, son linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Las meninges y el plexo coroideo a veces se encuentran afectados con formación de folículos linfoides y centros germinales. Otros hallazgos comunes son una desmielinización primaria con preservación de axones, con abundancia de células de microglia (células "Gitter"), así como astrocitosis. En la médula espinal las lesiones son básicamente alrededor del canal central con algunas áreas con desmielinización (Nazara y cols, 1985; Trigo, 1991; Knowles y cols, 1992; Pétursson y cols, 1992; Storset y cols, 1997).

Las lesiones articulares varían, pero se puede ver hipertrofia e hiperplasia de vellosidades de la membrana sinovial con una extensa angiogenesis, hiperplasia de las células sinoviales, acompañadas de una infiltración difusa de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en el espacio subsinovial y en áreas perivasculares, y organización de células linfoides con formación de folículos linfoides en casos avanzados (Mc Guire y cols, 1986; Cheevers y cols, 1988; Trigo, 1991, Narayan y cols, 1992; Amerighno y cols, 1993; Perry y cols, 1995). Conforme progresa la enfermedad, en la membrana sinovial y en el tejido conectivo periarticular, se presenta fibrosis, necrosis y mineralización. Las superficies cartilaginosas son frecuentemente corroidas, además se puede encontrar destrucción del hueso subcondral (Nazara y cols, 1985; González y cols, 1987; Cheevers y cols, 1988; Cheevers y Travis, 1988; Trigo, 1991; Knowles y cols, 1992; Pétursson y cols, 1992; Amerighno y cols, 1993).

Las lesiones pulmonares varían desde una neumonía intersticial discreta a severa con marcada hiperplasia linfoide, más pronunciada en lóbulos linfáticos mediastínicos. En el examen macroscópico, el órgano dañado presenta una consistencia como de caucho. Los alvéolos se encuentran casi obliterados por exudado proteico intralveolar, sustancia surfactante y fibrina. Ocasionalmente se aprecia una pleuritis fibrinosa. También se observa infiltración focal o difusa de células linfocitarias, macrófagos y células plasmáticas e infiltración del septo alveolar, organizada en forma de folículos perivasculares y peribronquiales (Brugere - Picoux, 1984; Ali, 1987; Zink y cols, 1987; Ellis y cols, 1988a; Trigo, 1991; Pétursson y cols, 1992).

En la glándula mamaria, en las etapas iniciales se observa una infiltración moderada de células mononucleares e histiocitos en el estroma periductal, y en casos más avanzados se puede observar una inflamación no supurativa con infiltración intralobular y periductal extensa por linfocitos, una marcada hiperplasia linfoide adyacente a los ductos galactóforos, así como un aumento del tejido conectivo (Trigo, 1991; Pétursson y cols, 1992; Zarate, 1993; Leyva, 1994; Storset y cols, 1997)

En el riñón se pueden apreciar áreas blanquecinas de 1 a 2 mm. de diámetro; al examen histológico se aprecia una glomerulonefritis difusa, observándose una infiltración linfocitaria subepitelial en la pelvis renal, que va de moderada a severa, con infiltración de células linfoides a nivel perivascular y tejido intersticial tanto en corteza como en médula. Además, se pueden encontrar depósitos de amiloide en los glomérulos (enfermedad crónica). La corteza del timo presenta una depleción linfoide, mientras que los ganglios linfáticos mediastínicos, supramamarios y los relacionados con las articulaciones, se observan hiperplásicos; se pueden encontrar folículos corticales secundarios, que pueden ser escasos o abundantes, conteniendo acumulaciones de macrófagos (Trigo, 1991; Amerighno y cols, 1993; Leyva, 1994).

En útero se aprecia endometritis; en el examen microscópico se observa una infiltración e hiperplasia linfoide difusa folicular, lesionando el endometrio, aparentemente el miometrio y la serosa del órgano no están involucrados; se denota un infiltrado linfocitario que va de focal a difuso, siendo más abundante en la capa subepitelial, en el tejido conectivo interglandular y en menor grado alrededor de los vasos sanguíneos que están congestionados (Ali, 1987). En algunas cabras se ha descrito una necrosis focal y mineralización del músculo esquelético, sobre todo en el cuádriceps y en el bíceps femoral. La porción subíntima y la porción interna de la capa media de las arterias, se calcifica severamente. Depósitos de amiloide e hiperplasia linfoide se encuentran también en el bazo y en los sinusoides hepáticos, así como infiltración grasa centrolobulillar en el hígado. En corazón se ha reportado infiltración grasa, atrofia de miofibrillas e infiltrado linfocitario a nivel de miocardio, así como un infiltrado de células mononucleares a nivel perivascular en epicardio (Adams y cols, 1980b; Carroll y cols, 1982; Brugere - Picoux, 1984, Kennedy y cols, 1985, Dawson, 1987; Trigo, 1991).

RESPUESTA INMUNE

Durante la infección inicial de los monocitos inmaduros (promonocitos) y monocitos maduros, la replicación viral es restringida; pero durante la diferenciación de monocitos infectados a macrófagos ocurre un incremento de la expresión viral, la velocidad de replicación del virus se incrementa de 50 a 1000 veces más cuando maduran los monocitos a macrófagos tisulares y por lo consiguiente en las respuestas inflamatorias. Esta regulación de la expresión del virus de AEC durante la diferenciación del monocito es un paso esencial para la patogénesis de la enfermedad. El incremento en la replicación viral conduce a la secreción de una cantidad considerable de interferón- γ (IFN γ) por los linfocitos T y células asesinas naturales; lo que induce a la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo I y II, de antígenos de la superficie viral, en macrófagos tisulares infectados y finalmente, a la producción de citocinas y otros mediadores inflamatorios por el sistema inmune. Las citocinas son moléculas inmunorreguladoras con actividad múltiple, incluyendo la estimulación y proliferación de fibroblastos y células epidermales, maduración de células T y activación de células B. La interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral son citocinas producidas en macrófagos (derivados de monocitos). La infección por el virus a los monocitos/macrófagos ocasiona variaciones en la producción y actividad de las citocinas, por lo que causa una desregulación en la respuesta inmune; esto puede contribuir a la patogénesis de la AEC. (Zink y cols, 1987; Jackson y cols, 1991; Pétursson y cols, 1992, Werling y cols, 1994; Lechner y cols, 1997).

El interferón secretado por el incremento en la replicación viral, inhibe la proliferación y maduración de monocitos, además causa una dramática reducción en la fusión del virus con las células del hospedador, en la que esta involucrada la GP 50 y debido a ello reduce la eficiencia de diseminación del virus. Sin embargo, el interferón en macrófagos incrementa la expresión antigénica, además induce a la secreción de prostaglandina E_2 (PGE_2) por los macrófagos, la cual tienen funciones inmunosupresoras, incluyendo la inducción de células de el fenotipo supresor-citotóxico y la supresión de la proliferación de células T (Zink y cols, 1987; Zink y Narayan, 1989, Fenner y cols, 1993). La secreción local de PGE_2 por macrófagos en órganos blancos puede explicar porque se encuentra en el exudado de estos órganos un gran número de células $T8^+$ (linfocitos T citotóxicos) y un reducido número de células $T4^+$ (linfocito T cooperador). Curiosamente la PGE_2 también inhibe la proliferación de fagocitos mononucleares, por lo que se sugiere la posibilidad de un lazo de retroalimentación, incrementando el efecto inhibitorio del interferón en estas células (Zink y Narayan, 1989, Narayan y cols, 1992).

Como se mencionó anteriormente el interferón tiene un potente efecto en la inhibición de la fusión de célula a célula. La resistencia a la fusión puede ser debida a un mecanismo que involucra la estabilización que induce el interferón a las membranas plasmáticas. Se sabe que si hay fusión celular esto conduce a la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios), siendo esto, característico del efecto citopático que causan los lentivirus; este mecanismo esta mediado por la glicoproteína de superficie del virus. En un animal vivo la producción local de interferón puede inhibir la transmisión del virus de célula a célula, esto puede explicar por que raramente se encuentran células

multinucleadas en los tejidos blanco inflamados de rumiantes infectados con lentivirus (Zink y Narayan, 1989)

Estudios más recientes encontraron que el incremento en la replicación viral esta regulado por la porción repetitiva terminal larga (LTR) del virus de AEC, la cual es activada en los monocitos inmaduros por el interferón gama (IFN γ) (Tong-starksen y cols, 1996, 1997).

La glicoproteína GP 135 y la proteína P 28, revisten un gran interés por su importancia en la respuesta inmune humoral del huésped y por la inducción de la artritis en cabras infectadas con el virus, como resultado de un proceso inmunopatológico por la expresión de este Aunque estudios recientes han confirmado que la proteína de transmembrana también juega un papel importante en la respuesta inmune y desarrollo de la artritis (Ellis y cols, 1986, Lichtensteiger y cols, 1991, Perrin, 1991, Bertoni y cols, 1994, González, 1994; Rosati y cols, 1995).

Se ha analizado la respuesta inmune de cabras infectadas con la prueba de inmuno blot, obteniéndose que la concentración de anticuerpos contra la glicoproteína viral en líquido sinovial es de 10 a 100 veces mayor que la concentración de anticuerpos contra la proteína del núcleo; esto correlaciona con la presencia y severidad de lesiones en la articulación, además los nódulos linfoides regionales presentan una extensa hiperplasia cortical y la formación de folículos linfoides con un gran número de células plasmáticas en la sinovial afectada. Estos son indicadores adicionales de la activación de una respuesta inmune dominante tipo 2; por lo que se desprende que el desarrollo de la artritis carpal y lesiones en otros tejidos como pulmón y sistema nervioso central, están asociados a una respuesta inmune contra la glicoproteína de superficie (Trigo, 1986 y 1991, Mc Guire y cols, 1987; Knowles y cols, 1990; Jackson y cols, 1991, Lichtensteiger y cols, 1993, Clavijo y Thorsen, 1995a, Perry y cols, 1995).

La respuesta inmune dominante tipo 2, revela la activación de los linfocitos T tipo 2, los cuales producen interleucina - 4 y otras linfocinas que promueven a un cambio de clase de inmunoglobulinas en favor de Ig A, Ig E e Ig G1, además de la proliferación de células B específicas al antígeno Mientras que la respuesta inmune tipo 1 revela la activación de linfocitos T tipo 1, los cuales promueven las funciones inmunes mediadas por células, además de producir interleucina - 2 e interferón. Se sugiere que la restricción en la expresión del virus en cabras asintomáticas es mediada primariamente por células T citotóxicas y una respuesta inmune dominante de tipo 1, y en cabras artríticas se encuentra una respuesta inmune tipo 2, la cual no es propicia para el control de la replicación del virus; además de los cambios antigénicos en los epítopes reconocidos por linfocitos T citotóxicos como sucede con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Jackson y cols, 1991, Lichtensteiger y cols, 1993; Clavijo y Thorsen, 1995a, Perry y cols, 1995)

Cabras infectadas experimentalmente con el virus de la AEC producen una respuesta humoral, usualmente detectada en los primeros 40 a 60 días usando la prueba de ELISA, aunque se presentan algunas respuestas tempranas a los 21 días, alcanzando un título máximo entre 49 y 77 días, con una disminución progresiva pero quedando presente por lo menos 9 meses Se sabe que estos virus usualmente no inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, pero si una fuerte producción de anticuerpos precipitantes (Adams y cols, 1980a, Cheevers y cols, 1988, Vitu y cols, 1993). En cabritos con pocas

semanas de nacidos, cuando la inmunidad pasiva desaparece, los anticuerpos contra las proteínas codificadas gag, son los primeros que se detectan en animales infectados, seguidos por anticuerpos contra proteínas codificadas env; por lo que los anticuerpos contra la proteína de transmembrana son detectados después de los anticuerpos contra la p25 (Rosati y cols, 1995).

Se a comprobado que la seroconversión, de animales serologicamente negativos a animales serologicamente positivos, puede ser demorada por muchos meses después de la infección natural con el virus de AEC; y considerando que en muchos hatos caprinos se tiene entre 65 y 81% de animales seropositivos a el virus de AEC, se puede pensar que todos los animales de un hato en un determinado tiempo van a presentar la infección (Rimstad y cols, 1993).

VÍAS DE TRANSMISIÓN

La vía de transmisión más importante es la oral, a través de la ingestión de calostro, debido por una parte, a la importante concentración de células de la línea monocito macrófago susceptibles de hospedar al virus y, por otra parte, a la gran permeabilidad de la mucosa intestinal del cabrito recién nacido. Los anticuerpos presentes no proveen protección para el cabrito. Otra fuente importante de transmisión es la leche (después de que deja de ser calostro) de hembras infectadas, por lo que el virus infecta al cabrito durante el amamantamiento (Ellis y cols, 1983; Oliver y cols, 1985; Dinter y Morein, 1990; Trigo, 1991; Rowe y cols, 1992; Rimstad y cols, 1993; Smith y Sherman, 1994; Mérida, 1995). No hay datos que indiquen la transmisión transplacentaria (periodo fetal), si es que ocurre, es un suceso raro. El virus de la AEC generalmente se encuentra como un provirus DNA en estado latente en una pequeña fracción de monocitos/macrófagos circulando en sangre, siendo del 3% en cabras menores de 5 años y en cabras mayores de 5 años el 8%, por lo que el paso de pequeñas cantidades de sangre probablemente represente un bajo riesgo de transmisión (Ali, 1987; Olvera, 1994). Otras probables formas de transmisión son contacto directo con adultos infectados, exposición a secreciones, como saliva, heces, secreciones urogenitales (se ha demostrado la presencia del virus en células del moco estral) o del aparato respiratorio que contaminen el alimento o agua; aerosoles, equipo, agujas contaminadas con sangre, lesiones cutáneas y tatuajes; siendo esto más probable en poblaciones caprinas con alta densidad, a lo que se agregan factores como estrés e inmunosupresión (Trigo, 1991; Rowe y cols, 1992; Olvera, 1994, Smith y Sherman, 1994, Mérida, 1995, Rowe y East, 1997). También se sabe que existe transmisión entre hembras en lactación a partir de la utilización de la máquina ordeñadora, por el deficiente manejo de la maquina ordeñadora, desinfección incompleta de las pezoneras y las manos del ordeñador, aplicación de inyecciones sin cambio previo de aguja entre cada animal y principalmente por ordeñar cabras infectadas y cabras sanas al mismo tiempo (Perrin y Polack, 1987; Peretz y Cimarosti, 1990, Perrin, 1991, Peretz y cols, 1993; Rowe y East, 1997). Es posible encontrar el virus de AEC en el esperma de machos infectados, pero parece que el riesgo de transmisión es extremadamente reducido, tanto en las condiciones de monta natural

como en las de inseminación artificial. Las conductas durante el apareamiento son una fuente importante de infección, como el lamido del ojo, el olfateo y el consumo de orina del macho; así como el mordisqueo y succionamiento de los pezones (Pétursson y cols, 1992; Olvera, 1994; Greenwood y cols, 1995b; Rowe y East, 1997). Otra posible vía de infección es el contacto con loquios postparto de hembras infectadas, debido a que se han detectado células infectadas con el virus de AEC utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rowe y East, 1997).

Algunos autores sugieren que la transmisión sexual puede ser posible debido a que el virus se replica preferentemente dentro de monocitos-macrófagos y son los responsables de la transmisión del virus de esta manera elude al sistema inmune, por lo que los macrófagos infectados de la superficie de las mucosas pueden transferir el virus a un animal susceptible (Dinter y Morein, 1990; Guiguen y cols, 1990; Lichtensteiger y cols, 1991; Gazit y cols, 1992; Gopal y cols, 1993; Rimstad y cols, 1993).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico representa un problema complejo, debido al largo período de incubación de la enfermedad ya que no todos los animales que se encuentran infectados con el virus de AEC presentan anticuerpos o lesiones clínicas. En el cuadro 2 se citan las pruebas diagnósticas que pueden servir para esta enfermedad (Trigo, 1991).

Signos clínicos

La presencia de una artritis clínica que afecta animales adultos principalmente, con un estado de emaciación crónica, dolor e inflamación de articulaciones preferentemente en el carpo, tarso, articulación atlantoidea y supraespinosa así como cojeras. En animales jóvenes presencia de signos nerviosos, así como problemas neumónicos crónicos; y mastitis indurativa con cambios nodulares y difusos. Esta puede ser la causa de la caída en la producción de leche, en un animal aparentemente sano, con buen apetito, sin cambio aparente en la calidad de la leche y negativo al examen bacteriológico. Todos estos datos pueden sugerir la enfermedad de AEC en el hato (Kennedy y cols, 1985; Dawson, 1987; Trigo, 1991; Pétursson y cols, 1992).

Otro parámetro utilizado para el diagnóstico clínico es el llamado "índice clínico de artritis" (IC). Este índice clínico ha sido calculado y utilizado por investigadores franceses para facilitar el diagnóstico; se calcula al obtener la diferencia entre el diámetro o circunferencia del carpo más grande, menos la medida de la circunferencia en el metacarpo más pequeño, todo esto expresado en centímetros. Se considera un animal clínicamente negativo cuando el resultado es igual o inferior a 5.5 cm, un resultado entre 6 y 6.5 cm, se considera sospechoso y un resultado igual o superior a 7 cm se considera clínicamente positivo (Vitu y Russo, 1988; García y cols, 1992; Russo y cols, 1993).

CUADRO 2
PRINCIPALES PRUEBAS DIAGNOSTICAS PARA LA AEC

PRUEBA	DETERMINACIÓN
1) Examen del Líquido Sinovial	Observación de una Monocitosis y Linfocitosis.
2) Poblaciones de Linfocitos	Aumento del % de Linfocitos T y B.
3) Microscopía Electrónica	Morfología e Identificación Viral.
4) Activación Policlonal de Células B	Detección de Anticuerpos en Animales aparentemente seronegativos.
5) Inmunodifusión	Detección de Anticuerpos vs la GP 135 y P 28.
6) ELISA	Detección de Anticuerpos.
7) Inmunotransferencia	Detección de Anticuerpos vs la P 28, P 70 y GP 135 y Ácido Nucleico del Virus.
8) Inmunoperoxidasa	Detección de Antígenos GP 135 y P 28 Utilizando Anticuerpos Peroxidados vs la IgG Caprina
9) Radioinmunoensayo	Detección de Antígenos GP 135 y P 28 Utilizando Anticuerpos Marcados con Iodo.
10) Transcriptasa Inversa	Detección de Antígeno a través de la Actividad de la Transcriptasa Reversa del Virus.
11) Reacción en Cadena de la Polimerasa	Detección del Ácido Nucleico del Virus y Producción de Antígenos Recombinantes Para Usarlos en otras Pruebas
12) Hibridación de Slot Blot	Determinación de Ácido Nucleico del Virus y Diferenciación de Cepas
13) Quimioluminiscencia	Detección de Antígeno Utilizándola en la Prueba de Hibridación de Slot Blot
14) Cultivo Celular	Detección del virus por Efecto Citopático, Inmunofluorescencia, Microscopía Electrónica

Estudios radiológicos

En animales artríticos revela inicialmente distensión de la cápsula articular, aunada a mineralización de tejidos blandos y en casos avanzados, también en los ligamentos y tendones. Las bolsas articulares supraespinosas se hacen prominentes debido a la distensión, necrosis y calcificación. Se pueden encontrar además osteocitos en las articulaciones carpianas. Las superficies articulares muestran rugosidad e irregularidad, y en casos avanzados ocurren cambios degenerativos que producen el colapso del hueso subcondral, se puede llegar a observar una degeneración severa y anquilosis (Trigo, 1991, Leyva, 1994)

Examen de líquido sinovial

Se encuentra una viscosidad normal o disminuida, color normal, rojizo o pardusco; un volumen variable y de 1000 a 20,000 células/mm³, dependiendo de la etapa de la enfermedad. Las células presentes son de tipo mononuclear en más de un 90% (Crawford y Adams, 1981; Trigo, 1991).

Determinación de poblaciones de linfocitos T y B

Esta prueba se basa en la determinación del porcentaje de poblaciones de linfocitos T y B en sangre periférica y líquido sinovial de cabras con signos clínicos de artritis, en la que se utiliza la técnica de rosetas con glóbulos rojos. En estas cabras se encuentra un incremento de las poblaciones celulares en un 33.83 % de linfocitos T y un 85% de linfocitos B, en comparación con los valores celulares normales de un 27.1% de linfocitos T y un 68.81% de linfocitos B (Banks y Greenlee, 1982; De Martini y cols, 1983, Mérida, 1995)

Patología macroscópica y microscópica

El animal se encuentra emaciado, las articulaciones, bolsas sinoviales y vainas tendinosas, están aumentadas de tamaño debido a un exceso de líquido sinovial. La membrana sinovial está hiperplásica con abundante proliferación de tejido conjuntivo que puede estar mineralizado. La superficie de la membrana sinovial muestra un color pardusco y aterciopelado con proyecciones de vellosidades. En las articulaciones, vainas tendinosas y bolsas sinoviales, se pueden encontrar concreciones fibrinosas de 2 mm a 2 cm. de diámetro de forma esférica, ovoide o irregular. Las superficies articulares se encuentran ásperas y erosionadas; en casos severos el hueso subcondral prolifera y se fusiona la articulación (Trigo, 1991; Leyva, 1994). Histológicamente se observa una sinovitis hiperplásica crónica en la vaina del tendón y bursa, con hipertrofia de membrana sinovial y vellosidades, con infiltrados subsinoviales de células mononucleares sobre todo linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Además se encuentran áreas extensas de necrosis celular y necrobiosis del colágeno en las vellosidades. En algunos casos se aprecian concreciones fibrinosas dentro del espacio sinovial, aunado a una mineralización en áreas de necrosis en las vellosidades y en el tejido conjuntivo adyacente. Cuando hay lesiones en el sistema nervioso central se observa una meningoencefalitis no supurativa aunada a una desmielinización con preservación de axones, los tejidos a examinar son el cerebro y el cordón espinal (Crawford y cols, 1980b; Trigo, 1991; Castro y Heuschele, 1992; OIE, 1996). La lesión en pulmón más común es una neumonía intersticial con marcada hiperplasia linfoide e infiltración de células mononucleares (Brugere - Picoux, 1984, Zink y cols, 1987, Ellis y cols, 1988a, Pétursson y cols, 1992).

En caso de infecciones subclínicas en glándula mamaria (mastitis), solo se detectan las lesiones por examen histológico (Giangaspero y cols, 1992,).

Microscopía electrónica

Al realizar estudios de microscopía electrónica en cultivos celulares infectados, así como en tejidos de animales infectados con el virus de AEC y fijados con los métodos convencionales, se observa en el microscopio electrónico la presencia de partículas virales tipo C de lentivirus, éstas tienen la característica de ser envueltas, con partículas extracelulares, con un núcleo central y condensado, y unos spikes poco prominentes. Estas partículas miden entre 90 y 120 nm de diámetro y se observan procesos de gemación viral en las células (Dalhberg y col, 1981; Ellis y cols, 1988b; Perk, 1990, Hötzel y col, 1993; Leyva, 1994).

A) PRUEBAS QUE SE UTILIZAN PARA EL DIAGNOSTICO SEROLÓGICO

Inmunodifusión en agar-gel (IDAG)

Es aún la técnica más utilizada, en particular en los exámenes médicos de grupo o de hato. Es la técnica de referencia o referida en el cuadro de los controles oficiales en Estados Unidos y Francia (Adams y cols, 1984; Narayan y Cork, 1990; Perrin, 1991; Castro y Heuschle, 1992, Peretz, 1992; East y cols, 1993). Se basa en una difusión pasiva a través del agar permitiendo la unión del antígeno y el anticuerpo en la zona de equivalencia, observándose una línea de precipitación (Stites y Hugh, 1983). Esta prueba detecta primariamente anticuerpos anti GP 135 Y P 28. La similitud antigénica de la AEC y de Maedi-Visna o Neumonía Progresiva Ovina (NPO) posibilita el uso de antígeno de este último en los kits de diagnóstico de ambas enfermedades; no obstante la sensibilidad de la prueba utilizando antígeno de AEC para la detección de anticuerpos es 35 % mayor que con el uso de antígeno de NPO. Esta prueba es poco costosa y fácil de realizar. Es ligeramente menos sensible (detecta < de 1 mg/100 ml) que la técnica de ELISA (cuadro 3) (Stites y Hugh, 1983, Heckert y cols, 1992; García y cols, 1992, Knowles y cols, 1994, OIE, 1996).

CUADRO 3

Cantidad mínima de anticuerpos proteicos que se puede detectar con ciertas pruebas inmunológicas.

Técnica	µg de proteína/ml
ELISA	0.0005
Radioinmunoanálisis	0.00005
Inmunodifusión	30
Fijación del complemento	0.05

Fuente Tizard, 1989, Roitt, 1980.

ELISA

La prueba de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) indirecta, se basa en la utilización de anticuerpos que han sido unidos a enzimas, los cuales se ponen en contacto con un sustrato para detectar la reacción antígeno-anticuerpo por medio de un método visual (diferencias en la coloración) o por medición de la densidad óptica. Esta prueba ha demostrado mayor sensibilidad comparada con la de IDAG, permitiendo detectar entre 6 y 7% de animales positivos no revelados por la IDAG (Russo, 1984; Kennedy y cols, 1985; Biberstein y Chang, 1990; Krieg y Hans, 1990; Shópe y Scönbauer, 1990). Heckert y cols, (1992) reportan una sensibilidad de 98.3% y una especificidad del 97.9%, en la detección de anticuerpos contra el virus de la AEC, utilizando suero sanguíneo. Recientemente la prueba ha sido descrita para encontrar anticuerpos en leche con una sensibilidad de 96.4% y una especificidad 97.3% (Motha y Ralston, 1994). Esta sensibilidad y especificidad de la ELISA indirecta depende de la calidad del antígeno (OIE, 1996).

Se ha descrito el uso para esta prueba de proteínas recombinantes de la cápside (P25) y proteína de transmembrana (GP 40) de NPO, proteínas recombinantes de transmembrana del virus de AEC (con buenos resultados en animales con artritis clínica) y virus completo de la AEC (Kwang y cols, 1995; Rosati y cols, 1995; OIE, 1996).

Se sabe que en las preparaciones de antígenos de la AEC se encuentran principalmente proteínas codificadas por el gen gag y la inclusión de la proteína de transmembrana puede incrementar la validez de las pruebas de ELISA para el diagnóstico serológico de la AEC (Rosati y cols, 1995). Esta es una prueba fácil de aplicar a un gran número de muestras, rápida y económica (cuadro 4) (Motha y Ralston, 1994; OIE, 1996).

Inmunotransferencia

La técnica de Inmunotransferencia (ITA) en su variedad Western Blot, es una prueba para detectar antígenos. En la AEC detecta las proteínas P 28, P 70 y GP 135 (Heckert y cols, 1992, Vitu y cols, 1993). Esta prueba es más específica que la de ELISA, minimizando los resultados falsos - positivos por lo que se considera como una técnica de validación (Pétursson y cols, 1992; Rimstad y cols, 1993; Clavijo y Thorsen, 1995a).

Se ha utilizado la ITA para detectar virus a partir de cultivos celulares infectados, en estos casos se han podido detectar proteínas virales 5 días después de la infección (Zanoni y cols, 1990). También se ha utilizado la variante Southern Blotting para el reconocimiento del ácido nucleico específico de el DNA proviral del virus (OIE, 1996).

Immunoperoxidasa

La prueba de inmunoperoxidasa es una técnica inmunoenzimática, en la cual se han utilizado anticuerpos específicos para la GP 135, la P 17 (proteína de la Matriz) y la P 28 y un segundo anticuerpo anti Ig G de cabra acoplado a la enzima peroxidasa o a la biotina, con esta prueba se hace evidente la presencia de antígeno en tejidos procedentes de animales que padecieron la enfermedad o en cultivos celulares infectados con el virus. Se ha comprobado que se obtiene mayor sensibilidad en las muestras fijadas con etanol absoluto que en las muestras fijadas en formalina al 10% (Heckert y cols, 1992; Storset y cols, 1997)

Radioinmunoensayo (RIA)

En esta técnica se utiliza un marcador radioactivo, generalmente Iodo-125, el cual se une a los anticuerpos específicos que después van a reaccionar con los antígenos de membrana o internos. Esta prueba se ha utilizado para detectar antígenos virales de articulaciones artríticas *in vivo* (cuadro 4) (Dahlberg y cols, 1981; Weilushenker y cols, 1990, Papageorges y cols, 1992; East y cols, 1993).

CUADRO 4

Sensibilidad relativa de los análisis para la determinación de antígenos y anticuerpos.

Técnica	Sensibilidad aproximada (por 100 ml)
Electroforesis de proteínas séricas (Electroforesis zonal)	100 mg
Inmunodifusión	< 1 mg
Fijación del complemento	1 µg
Inmunofluorescencia cuantitativa	< 1 pg
Radioinmunoanálisis	< 1 pg

Fuentes Stites y Hugh, 1983.

B) OTRAS PRUEBAS DE LABORATORIO

Existen diversas pruebas que se han utilizado para el diagnóstico de la AEC dentro de las cuales se encuentra

Transcriptasa inversa: La cual es utilizada para detectar la actividad de la transcriptasa inversa y poder identificar la presencia de un retrovirus en casos sospechosos (Zink y cols, 1990).

Activación policlonal de células B: Esta prueba se utiliza para detectar pequeñas cantidades de anticuerpos en animales seronegativos permitiendo una temprana detección (East y cols, 1993)

Slot-Blot: El uso de la prueba de hibridación de RNA Slot-Blot permite una conveniente y más rápida confirmación del aislamiento del virus de AEC (un día post infección) en células susceptibles a la cepa viral, comparándola con el método convencional en el cultivo celular, que es la formación de sincitios (Clavijo y Thorsen, 1995b) Esta prueba es usada con el fin de identificar y diferenciar cepas virales (Zink y cols, 1990).

Quimiluminiscencia: Se ha utilizado para la prueba de hibridación de Slot Blot, para la detección del DNA proviral o el RNA viral de la AEC a partir de cultivos celulares de membrana sinovial infectados (Clavijo y Thorsen, 1995b)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta prueba ha sido evaluada a partir de células mononucleares extraídas de leche y de sangre, detectando en éstas últimas la presencia del provirus de la AEC, para lo cual requiere la presencia de por lo menos el DNA de 15,000 células, con una sensibilidad y especificidad de 97% (Gopal y cols, 1993; Rimstad y cols, 1993)

También se ha utilizado esta prueba para detectar el virus en cultivos celulares infectados pudiéndose detectar el DNA proviral en 100 ng de DNA de células de membrana sinovial de cabra, después del primer día de infección. Además puede detectar el DNA proviral en aproximadamente 15 células infectadas o 188 partículas virales (Zanoni y cols, 1990; Clavijo y Thorsen, 1996).

La PCR provee un método rápido, sensible y específico para la detección de ácidos nucleicos virales en animales seronegativos (Clavijo y Thorsen, 1996)

Cultivo celular

Para el aislamiento del virus de la AEC se utilizan órganos de cabras adultas con lesiones clínicas o el macerado de estos órganos como bazo, glándula mamaria, nódulos linfoides, médula ósea, membrana sinovial, plexo coroideo, pulmón y SNC (Belov y Whalley, 1988, Ellis y cols, 1988a; Kirkland y Batty, 1989; Amerighno y cols, 1993, OIE, 1996)

Otra forma de aislamiento viral es a partir de co-cultivos de células de la línea monocito/macrófago obtenidos de sangre periférica (se sabe que la persistencia de macrófagos infectados en sangre periférica es del 3% y del 8% en cabras mayores de 5 años) y sembradas en cultivos tisulares (Ellis y cols, 1988a, Ellis, 1990) También se

puede realizar el aislamiento desde macrófagos alveolares, calostro, leche y líquido sinovial (Pawlisch y Maes, 1984; Belov y Whalley, 1988; Ellis y cols, 1988a; Gazit y cols, 1992; Amerighno y cols, 1993; Rimstad y cols, 1993, Tong-starksen y cols, 1996).

Para la obtención de antígeno del virus se han utilizado cultivos de membrana sinovial caprina, células de testículo y células de músculo fetal caprino como substratos para el crecimiento viral (Surman y Daniels, 1985; Trigo, 1991; Hotzel y cols, 1993)

Además se han utilizado líneas celulares ovinas de cornea de cordero y células de ovario de Tahr del Himalaya, con excelentes resultados. La forma clásica de evidenciar la replicación viral es por el efecto citopático que causa el virus a las células dando formas estrelladas refráctiles con procesos dendríticos y formación de sincitios (células gigantes multinucleadas), numerosos núcleos fusionados y vacuolización (Crawford y cols, 1980a; Belov y Whalley, 1988; Kirkland y Batty, 1989, Narayan y Cork, 1990; Gazit y cols, 1992; Amerighno y cols, 1993; Rimstad y cols, 1993; OIE, 1996; Tong-starksen y cols, 1996).

La prueba de inmunofluorescencia se ha utilizado para detectar la presencia del virus en cultivos celulares de membrana sinovial, músculo fetal de cabras y cornea de cordero, con buen éxito (Belov y Whalley, 1988, Hotzel y cols, 1993). Además se ha utilizado la prueba de transcriptasa reversa en el sobrenadante de cultivo celular para evidenciar la presencia de los lentivirus (Zink y cols, 1990)

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Hay que considerar las enfermedades que producen lesiones en el sistema nervioso central de cabras jóvenes y en estas se incluyen traumatismos en columna vertebral, abscesos en vértebras, listeriosis, toxoplasmosis, enterotoxemia, poliencfalomalacia, deficiencia de cobre. La forma artrítica de la AEC debe diferenciarse de la artritis bacteriana que puede ser producida entre otras por bacterias de los géneros: *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Erysipelatrix*, *Brucella*, *Mycoplasma* y *Chlamidias*, así como de otras condiciones sépticas, nutricionales y traumáticas. La neumonía producida por la AEC, debe de ser diferenciada de aquellas causadas por otros virus, neumonías bacterianas, parasitarias y por *Micoplasmas* (Cork, 1976; Brugere, 1984; Ellis y cols, 1988a, Gaskin, 1990; Nayak y Bhowmik, 1990, Trigo, 1991, Castro y Heuschele, 1992; Zarate, 1993)

TRATAMIENTO

El tratamiento contra la AEC no ha sido exitoso y sólo es de naturaleza sintomática. Las cabras pueden ser tratadas con antibióticos de amplio espectro para evitar complicaciones por bacterias oportunistas. La forma artrítica de la AEC puede ser mejorada transitoriamente con una buena alimentación, poniendo una capa más gruesa de

cama y administrando sustancias antiinflamatorias como los corticoesteroides; también puede recurrirse a la administración de complejo B, como tratamiento paliativo. Sin embargo los animales tratados recuperan sus actividad física normal y esto exacerba el daño en las articulaciones inflamadas (Davis, 1987; Trigo, 1991; Narayan y cols, 1992). Estudios realizados con la administración de biotina en cabras infectadas con el virus de la AEC y con manifestaciones clínicas, produjo un mejoramiento notable; así también la adición de biotina en una vacuna inactivada resultó en una elevación de los títulos de anticuerpos en cabras con y sin signos clínicos (Zanoni y cols, 1992; Straub y Frigg, 1992). Algunas drogas pueden inhibir la replicación viral en cultivos celulares tal como los didesoxinucleosidos (AZT y 2'3'-didesoxicidina) y la suramina, los cuales actúan sobre la replicación viral e inhiben la actividad de la transcriptasa inversa. A pesar de lo anterior no hay indicios de que el tratamiento con estas drogas pueda tener un valor práctico en el futuro (Beaussoleil, 1991; Pétursson y cols, 1992).

CONTROL Y PROFILAXIS

A la fecha, no existe una vacuna que proteja contra la infección por el virus de la AEC; de hecho se ha comprobado que la vacunación conduce a una mayor severidad de la enfermedad debido a la respuesta inmune contra el virus (Mc Guire y cols, 1986; Pétursson y cols, 1992, Russo y cols, 1993; Vitu y cols, 1993; OIE, 1996, Rowe y East, 1997). En aquellos hatos donde ocurre una alta morbilidad, la mejor recomendación es eliminar a los animales afectados paulatinamente e iniciar un rebaño libre de AEC. Esto puede lograrse de la siguiente manera.

- 1.- Eliminar a los animales positivos.
- 2 - Separar inmediatamente a los recién nacidos, teniendo cuidado de no permitir el contacto con las secreciones de la madre, particularmente con la ingestión de calostro y separar las cabras infectadas
- 3 - Proporcionar calostro, previamente calentado a 56°C por 1 hora ó proveniente de hembras que se tiene la certeza que son negativas, ó colocar a los cabritos con hembras que acaben de parir pero que estén libres de la enfermedad, también se puede utilizar calostro de vacas. Teniendo en cuenta que existen animales seronegativos y sin signos clínicos de la enfermedad
- 4 - Proporcionar sustitutos de leche ó leche de hembras libres del virus ó leche pasteurizada de cabra ó vaca
- 5 - Evitar ó corregir prácticas de manejo que permiten la transferencia de fluidos y sangre entre los animales (tatuajes, cirugías menores, castraciones, etc).

6.- Monitorear serológicamente el rebaño cada 6 meses y separar los seropositivos de los seronegativos. Dos pruebas serológicas negativas a intervalos de 6 meses indican que el rebaño es libre del virus de la AEC, siempre y cuando no haya ocurrido contacto con cabras infectadas durante los 12 meses previos al muestreo.

Para las cabras adultas se pueden realizar lo siguiente.

- 1.- Organizar la ordeña para tratar y ordeñar a los animales seronegativos antes que los seropositivos.
- 2.- Mejorar las condiciones generales de higiene para reducir las causas que pueden provocar un proceso inflamatorio, incidentes de ordeña, mal ambiente de la construcción, etc.
- 3.- Utilización de material desechable para tomas sanguíneas y otras fuentes que impliquen contaminación por sangre de un animal a otro.
- 4.- Utilizar la inseminación artificial, con semen de machos serologicamente negativos, para reducir el riesgo de transmisión por los sementales
- 5.- Separación por 2 a 3 metros de animales seropositivos de seronegativos, si es posible realizar grupos de encierro por edad.

(Adams y cols, 1983; Ellis y cols, 1983; Alvarez, 1984; Russo, 1984; Robinson y Ellis, 1986, Mackenzie y cols, 1987; Dalvit y cols, 1991, Trigo, 1991; Wierschem, 1991; Padilla y cols, 1992, Peretz, 1992, Greenwood y col, 1995b; Rowe y East, 1997)

Lo anteriormente citado es muy importante ya que en ausencia de toda medida de profilaxis médica, los únicos medios de control de la enfermedad residen en las medidas de profilaxis sanitarias. Se puede seleccionar la progenie de hembras seropositivas y separarla (Pétursson y cols, 1992)

Algo que se debe considerar es que el uso de una sola prueba serológica para la detección de cabras infectadas con el virus de AEC, pueden resultar en una erradicación incompleta de la enfermedad (Rimstad y cols, 1993). Se debe restringir el movimiento de animales entre rebaños y controlar la importación, o traer animales de países o rebaños libres de la infección apoyados en pruebas de laboratorio certificadas (Pétursson y cols, 1992).

Debe recordarse al adquirir animales jóvenes, que éstos aunque clínicamente sanos, pueden estar infectados y años después empezarán a surgir los problemas artríticos, pulmonares o nerviosos en el hato caprino. Se sabe que el control de esta enfermedad es difícil por las implicaciones sociales, técnicas, de cultura y económicas que implica (Brugère-Picoux, 1984; Trigo, 1986, Bel Khala y cols, 1991)

IMPORTANCIA ECONÓMICA

Se ha reportado una reducción del 10% en la producción de leche de cabras infectadas con esta enfermedad en Suiza y efectos adversos en la exportación de cabras debido a la alta prevalencia de la enfermedad (60%) (Pétursson y cols, 1992). Otros autores mencionan que rebaños afectados por la AEC presentan una disminución en la producción láctea de 25% a 30%, además de una baja en la calidad de sólidos grasos (Smith y Cutlip, 1988; Peretz y Cimarosti, 1990; Olvera, 1994; Greenwood, 1995a). La producción de leche puede no ser suficientemente baja para ser considerada económicamente importante, de cualquier modo, es posible que ciertas cabras infectadas puedan ser incapaces de expresar su potencial genético para producir leche y que el costo económico de la AEC pueda centrarse alrededor de la eliminación temprana, costo de reposición y un lento mejoramiento genético del hato (Smith y Cutlip, 1988; Clavijo y Thorsen, 1996)

OBJETIVOS

1) ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO DE CÉLULAS DE MEMBRANA SINOVIAL A PARTIR DE FETOS CAPRINOS.

2) AISLAMIENTO DEL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA A PARTIR DE CÉLULAS DE LA LÍNEA MONOCITO/MACRÓFAGO TOMADAS DEL TORRENTE SANGUÍNEO DE ANIMALES SEROPOSITIVOS.

3) PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO VIRAL DE LA ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA A PARTIR DE LA INFECCIÓN DEL CULTIVO DE MEMBRANA SINOVIAL.

MATERIAL Y MÉTODOS

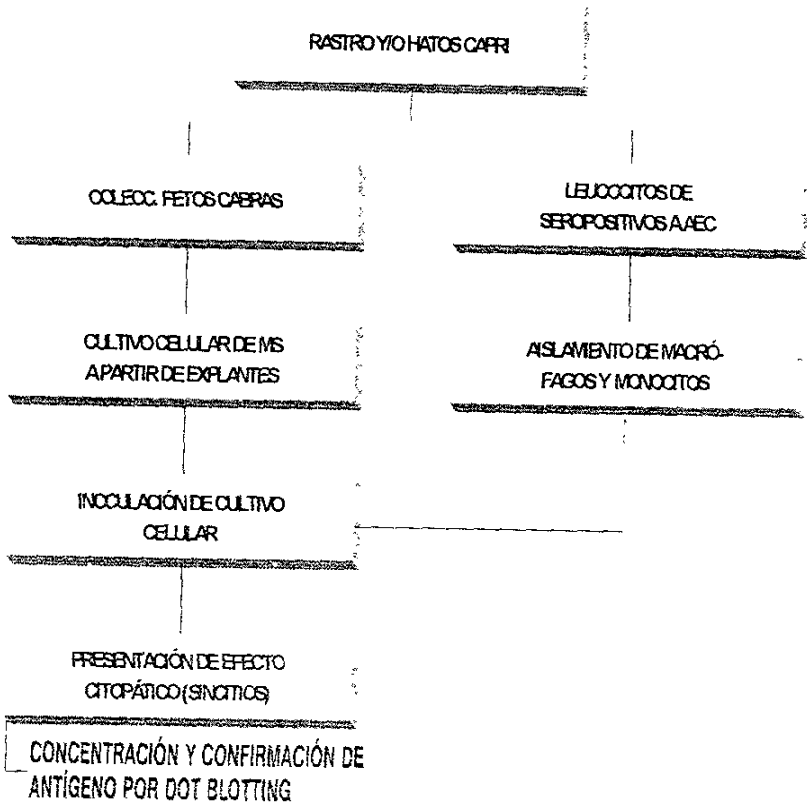
CULTIVO CELULAR

Para la realización del cultivo celular se colectaron fetos de cabras criollas, aproximadamente en el último tercio de gestación, en un rastro ubicado en el Estado de México y se trasladaron en refrigeración al Laboratorio de Virología de la FESC - C4, para su procesamiento (Diagrama 2)

El feto fue colocado sobre un recipiente previamente desinfectado con formaldehído al 2%, dentro de una área estéril y entre dos mecheros. Posteriormente se procedió a abrir la articulación carpometacarpiana asépticamente con material de cirugía estéril, disecando y separando los tejidos superficiales así como los tendones que cubren la membrana sinovial (foto 1), para luego por medio de un bisturí obtener fragmentos de membrana de aproximadamente 0.5-1 mm de diámetro, los cuales fueron depositados en una caja de petri estéril, conteniendo solución salina bufferada (PBS pH 7.2) adicionada con antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 0.01 mg/ml). Con la finalidad de eliminar contaminantes y detritus celulares, se realizaron de 2 a 3 lavados con la solución de PBS, dentro de una campana de flujo laminar; los fragmentos de tejido sinovial se colocaron dentro de botellas de Falcon (Nunc, Dinamarca) con capacidad de 50 ml, para posteriormente adicionar sobre cada fragmento una gota de suero fetal caprino homólogo, previamente descomplementado y esterilizado por filtración con membranas millipore de 0.22 μ de diámetro. Esperando de 5 a 10 minutos para que se fije el tejido a la caja de cultivo, e inmediatamente se adicionó medio de cultivo Eagle Dulbecco suplementado con 20% de suero fetal bovino (Sigma-Chemical), Penicilina 100 UI/ml, Estreptomycinina 0.01 mg/ml para favorecer la velocidad de crecimiento de las células; cubriendo solo la base del explante de membrana sinovial con medio de cultivo para evitar desprendimiento e incubando con un 2 a 5 % de CO₂ a 37° C. Pequeños volúmenes de medio se adicionaron cada 2 días hasta su fijación y crecimiento celular aparente, después de lo cual se desprendieron por agitación los fragmentos de tejido, adicionando nuevamente medio de cultivo celular y estableciendo un monoestrato completo en un tiempo de 12 a 14 días. Aproximadamente cada dos semanas se realizaba un pase celular teniendo el 100% de confluencia del monoestrato, para esto se utilizaba una solución de tripsina al 0.25%, la cual era usada a una temperatura de 37° C y adicionada directamente a la caja de cultivo sin medio, y se dejaba actuar un máximo de 5 minutos, observándose constantemente al microscopio para ver el desprendimiento total de las células, una vez desprendidas estas eran divididas a partes iguales y colocadas en 2 cajas de cultivo celular de Falcon y les era adicionado medio de cultivo con suero fetal bovino al 20% (Crawford y cols, 1980a, Pawlisch y Maes, 1984, Modificados). Estos pases celulares permitieron obtener una buena producción de células, de las cuales una parte se almacenó en alícuotas para tener una fuente constante cuando se requiriera

Diagrama 2

DISEÑO EXPERIMENTAL



MS: MEMBRANA SINOVIAL
CAPRI: CAPRINOS

su uso. Para conservarlas (criopreservación) se utilizó un 10% de DMSO (dimetilsulfoxido) como crioprotector y un 90% de suero fetal bovino; en esta solución de congelación, las células fueron colocadas en viales que posteriormente fueron introducidos muy lentamente en un tanque de nitrógeno líquido (con una temperatura de -196°C) (Ian, 1987)

INFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES Y AISLAMIENTO VIRAL

Con el fin de poder infectar los cultivos celulares y obtener antígeno del virus de AEC; se seleccionaron 5 animales seropositivos a AEC, mediante el kit comercial de la prueba de ELISA (CHEKIT de Laboratorios. Bommeli; Suiza) De los animales seleccionados se obtenían células mononucleares cada 7 días, tomando sangre periférica con ayuda de heparina (20 UI x ml); para luego centrifugar durante 40 minutos a 2500 r.p.m., y obtener la capa de células blancas con ayuda de una pipeta Pasteur, la cual se colocaba en otro tubo a partes iguales de Ficoll - Hypaque ($D = 1.077 \text{ g/ml}$ (Sigma - Chemical)) a una cantidad de 3-5 ml, centrifugándose nuevamente durante 40 minutos a 2500 r.p.m. Para que posteriormente se obtuviera la capa de células blancas sin contaminación. Enseguida se realizaban 3 lavados a las células con solución salina balanceada de Hanks, y se colocaban en una caja de Falcon con Medio Mínimo Esencial Eagle (Sigma - Chemical), suplementado con 2% de suero fetal bovino, penicilina 100 UI x ml y estreptomycin 0.01 mg x ml; durante 7 días, esto con el fin de que los monocitos/macrófagos se adhirieran y de esta manera obtener una concentración promedio de 5×10^6 células/ml; cambiándose el medio cada tercer día para eliminar las células no adherentes. Para realizar el conteo de células viables se utilizó la tinción de azul tripan y una cámara de Neubauer

A los 7 días, los monocitos/macrófagos se desprendían con un escalpelo y se inoculaban en una monocapa de células de membrana sinovial, que por lo menos tuviera 3 pases celulares. Con el fin de observar el efecto citopático característico (sincitios) en un tiempo de 20-60 días; se renovaba la mitad de medio de cultivo a intervalos de 3 - 4 días y se observaba por lo menos dos veces por semana (Ellis, 1990, Guiguen y cols, 1990, Rimstad y cols, 1993; Werling y cols, 1994; Clavijo y Thorsen, 1995b y 1996. Modificados)

CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO VIRAL

Una vez que se observaba el efecto citopático se colectaba el sobrenadante (la mitad del medio que se cambiaba cada 3 ó 4 días) y se almacenaba a -30°C hasta su procesamiento. Después de acumular una cantidad de 800 ml entre sobrenadante y células, se procedió a descongelarlos y concentrarlos por ultrafiltración, utilizando un equipo Amicon, adaptado para utilizar una membrana de filtración, con un valor de exclusión de peso molecular (PM) de 100,000 daltons (d) (Amicon, Irlanda). El sobrenadante concentrado se lavó con una cantidad de 100 ml de PBS y se almacenó a -30°C

El filtrado descargado se volvió a concentrar de manera similar al anterior con la diferencia que el pm de exclusión fue de 10,000 d (Amicon, Irlanda) (Kirkland y Batty modificado, 1989).

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Una vez identificada la presencia del virus por la formación de sincitios, se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad, 1997) de la siguiente manera:

No	Curva (μg)	Albúmina Sérica Bovina(μl)	PBS (μl)
1	0	0	1000 (blanco)
2	10	10	990
3	20	20	980
4	40	40	960
5	60	60	940
6	80	80	920
7	100	100	900

Lectura en microplaca:

40 μl Antígeno de peso molecular arriba de 10,000 d y en otro pozo el de 100,000 d
160 μl Reactivo de Bradford

200 μl por pozo

La albúmina sérica bovina (ASB) se preparó a una concentración de 1 mg/ml

La lectura se realizó en un lector de ELISA con un filtro de 630 nm.

TÉCNICA DE DOT BLOTTING

Para evidenciar la presencia del antígeno viral se realizó una técnica, utilizando un kit de Immun-Blot (Bio-Rad) Desarrollándolo de la siguiente manera.

DESARROLLO

A partir de un rectángulo de una membrana de nitrocelulosa de 3 x 5 cm. se procedió a realizar la siguiente metodología:

- 1 - La membrana fue remojada en Tris Buffer Salino (TBS) y secada sobre papel filtro durante 5 minutos.
- 2.- El antígeno de peso molecular superior a 10,000 d, 100,000 d, suero positivo, suero negativo, obtenidos con el kit de la prueba de ELISA comercial (CHEKIT) y medio de cultivo celular se colocaron en cada cuadro de la membrana de nitrocelulosa marcado; y se dejaron secar (foto 8).
- 3.- Se bloqueo con TBS con 3% de gelatina, por una hora a temperatura ambiente
- 4.- La solución bloqueadora fue decantada y se agregó Tween Tris Buffer Salino (TTBS) con 1% de gelatina a la membrana, manteniéndola en agitación durante 10 minutos
- 5 - El TTBS fue decantado y se agregó un suero positivo (sin azida de sodio) en el buffer del anticuerpo con 1% de gelatina y TTBS quedando a una dilución de 1:100
- 6.- Se incubó toda la noche a temperatura de laboratorio.
- 7 - La membrana fue lavada con Tween Citrato Buffer Salino (TCBS) durante 5 minutos, dos veces y se decantó esta solución.
- 8.- 3 3 µl de la proteína G peroxidada de rábano (G-HRP, diluida 1 50) se agregaron en 10 ml de TCBS con 1% de gelatina, y se dejó incubar por dos horas en agitación.
- 9.- Se lavó con TTBS durante 5 minutos, dos veces
- 10 - Antes del desarrollo del color se lavó la membrana con TBS durante 5 minutos en agitación.

DESARROLLO DEL COLOR

- 1.- Se adicionaron 60µl de peróxido de hidrogeno a 10 ml del buffer desarrollador del color y se adiciono esta solución a 2 ml de 4-cloro-1-naftol en dietilen glicol momentos antes de ser usada.
- 2 - La membrana de nitrocelulosa fue sumergida en la solución antes preparada durante 30 minutos en agitación.
- 3 - Para detener el desarrollo del color, se sumergió la membrana en agua desionizada durante 10 minutos en agitación generosa

RESULTADOS

CULTIVO CELULAR

Los explantes obtenidos de membrana sinovial de feto caprino (foto 1) mostraron crecimiento aparente en un lapso de 24 horas (foto 2) y se fijaron firmemente en 2 días; formando confluencia de la monocapa en un 70% entre 7 y 10 días, y un monoestrato completo en un periodo de 12 a 14 días (foto 3). Se logró mantener las células hasta por un lapso de 30 días, sin cambios morfológicos aparentes; permitiendo varios pases celulares (6 en promedio), los cuales confluían al 100% entre 10 y 12 días. Se logró establecer el cultivo celular, logrando obtener un total de 100 cajas de cultivo en 6 meses, su criopreservación a -190°C y la recuperación del monoestrato nuevamente.

INFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES Y AISLAMIENTO VIRAL

El aislamiento de monocitos/macrófagos de sangre de animales seropositivos, se pudo realizar con éxito, inoculando a los cultivos celulares una concentración promedio de 5×10^6 células/ml. Siendo esta concentración la adecuada para causar efecto citopático en más de 70 cajas de cultivo infectadas (30 %). Se pudo observar efecto citopático en un tiempo mínimo de 4 semanas, caracterizado por formación de células gigantes (sincitios), de forma estrellada y de aspecto refringente a la luz, así como vacuolización (fotos 4 y 5). Con la tinción de Giemsa se pudo observar la conglomeración de 5 a 10 núcleos acidófilos en las células gigantes y las prolongaciones del citoplasma de estas células que les confieren la morfología de células estrelladas (fotos 6 y 7).

CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO VIRAL

El grado de concentración por ultrafiltración del sobrenadante con antígeno viral fue de aproximadamente 100 veces, obteniendo dos lotes por separado, unos con la membrana de PM de exclusión de 100,000 y otro con el de 10,000, en los cuales se obtuvieron volúmenes similares (8 ml).

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Comprobada la presencia del antígeno viral en el cultivo celular se realizó la determinación de proteína por el método de Bradford, obteniendo para los antígenos de más de 100,000 d una cantidad de 2 mg/ml (Gráfica 1), y para los antígenos mayor de 10,000 d la cantidad de 0.12 mg/ml (Gráfica 2). Siendo más evidente la concentración de proteína en los antígenos de más de 100,000 d.

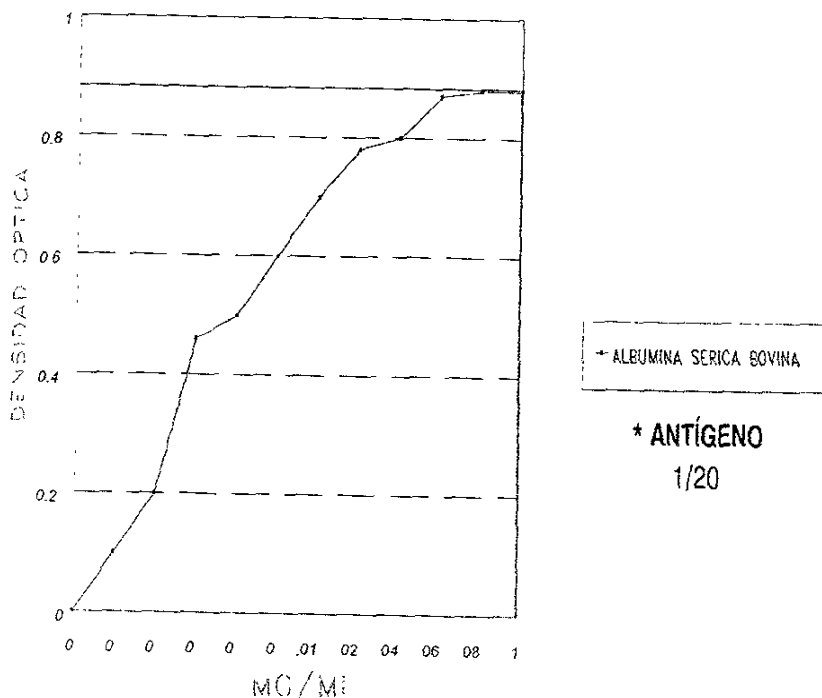
TÉCNICA DE DOT BLOTTING

Se utilizó esta técnica para evidenciar la presencia de las proteínas virales más importantes antigénicamente, las cuales son la GP 135, P 28 y TM 50; estas se hicieron evidentes al observar una coloración oscura en la membrana de nitrocelulosa, por lo que se deduce la obtención de antígenos mayores de 100,000 d principalmente la glicoproteína de superficie (GP 135,000 d) y 10,000 d principalmente proteína de cápside y transmembranal (P 28,000 d y TM 50,000 d), que fueron reconocidas por los anticuerpos del suero positivo de AEC (foto 8).

Gráfica 1

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

PROTEÍNAS DE P.M 100,000

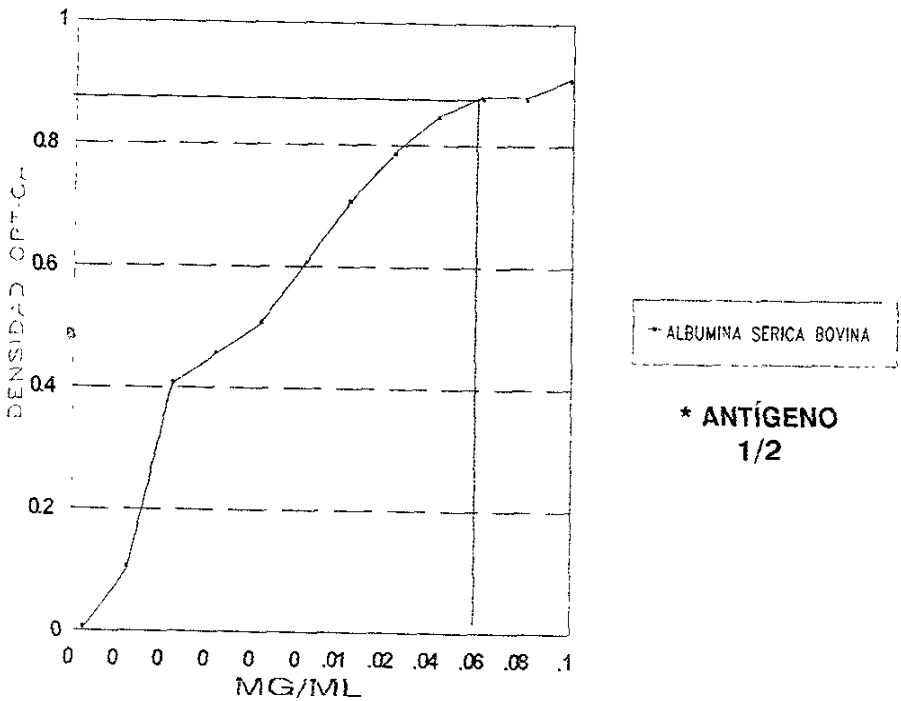


Gráfica 1 - Determinación de proteína del extracto de cultivo celular de membrana sinovial infectado con el virus de Artritis Encefalitis Caprina y ultrafiltrado con membranas que retienen moléculas de peso molecular mayores de 100,000 daltons, obteniendo una concentración de 0.1 mg/ml de proteínas antigénicas en una dilución de 1/20.

Gráfica 2

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

PROTEÍNAS DE P.M 10,000



Gráfica 2 - Determinación de proteínas del extracto de cultivo celular de membrana sinovial infectado con el virus de Artritis Encefalitis Caprina y ultrafiltrado con membranas que retienen moléculas de peso molecular mayores de 10,000 daltons, obteniendo una concentración de 0.06 mg/ml de proteínas antigénicas en una dilución de 1/2



Foto 1.- Toma de muestra de membrana sinovial de feto caprino de la articulación carpometacarpiana



Foto 2.- Crecimiento celular a partir del explante de membrana sinovial [10x]

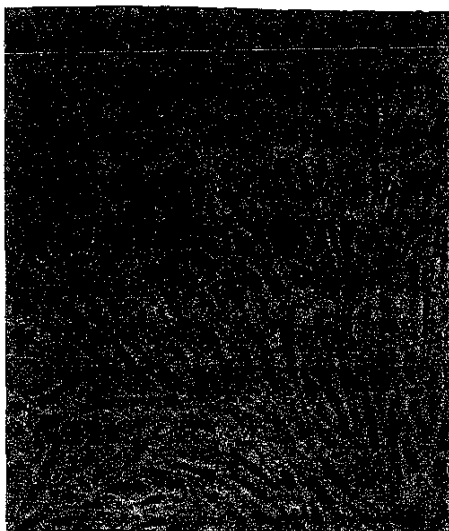


Foto 3.- Monocapa de células de membrana sinovial no inoculadas, con un 100 % de confluencia [10x]



Foto 4 - Efecto citopatico (formación de sincitios y vacuolización (↑)) causado por el virus de Artritis Encefalitis Caprina en células de membrana sinovial [40x]



Foto 5 - Sincitio (Célula gigante) (↑) causado por la inoculación del virus de Artritis Encefalitis Caprina (AEC) en células de membrana sinovial. [40x]



Foto 6 - Célula gigante con numerosos núcleos fusionados (↑), causado por el virus de AEC, tinción de Giemsa [40x]

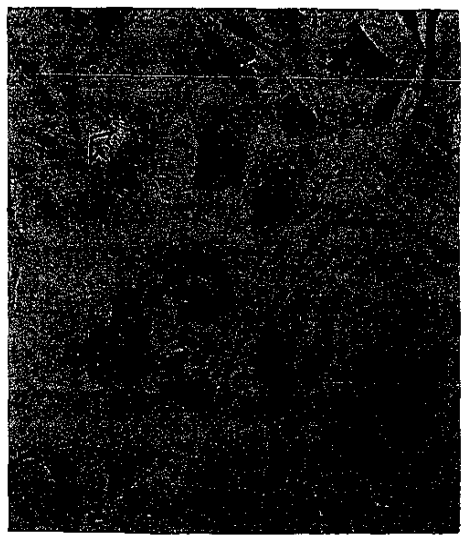


Foto 7 - Formación de sincitios con citoplasmas alargados dando la apariencia de células estrelladas (↑) y con numerosos núcleos fusionados (↑); tinción de Giemsa. [10 x]

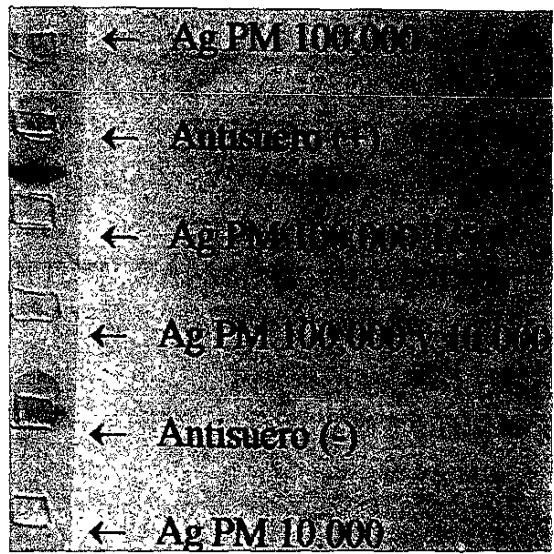


Foto 8 - Evidenciación de proteínas virales de 100,000 y 10.000 daltons de peso molecular del virus de AEC con la técnica de dot blotting

DISCUSIÓN

Como medio de crecimiento del VAEC se han utilizado explantes de los órganos en que se desarrollan lesiones patológicas o de animales seropositivos, como pulmón, membrana sinovial, SNC, plexo coroideo, glándula mamaria, nódulos linfoides y bazo, principalmente (Belov y Whalley, 1988; Ellis y cols, 1988a; Kirkland y Batty, 1989; Amerighno y cols, 1993; OIE, 1996). Otro tipo de cultivo celular que se ha utilizado para soportar el crecimiento del virus de AEC son, las células fetales caprinas derivadas de testículo y músculo; así como células de cornea de corderos y células de membrana sinovial de feto caprino (Surman y Daniels, 1985, Kirkland y Batty, 1987; Hötzel y cols, 1993)

El cultivo celular en este trabajo se realizó a partir de membrana sinovial de feto caprino, debido a su especificidad para el virus de AEC, ya que cuenta con la presencia de receptores para la glicoproteína de superficie del virus, así como la capacidad de este tipo de células para mantenerse por largos periodos de tiempo (30-40 días) sin cambios morfológicos aparentes, esto es importante debido a que el virus requiere mucho tiempo para evidenciar su efecto (Hullinger y cols, 1993) No se utilizaron animales con lesiones patológicas, debido a que esto implicaba el sacrificio de los mismos, siendo estos animales seropositivos parte importante para la continuidad del trabajo obteniendo de ellos las células de la línea monocitos/macrófagos. Los fetos colectados eran obtenidos en el ultimo tercio de gestación y retirados de la madre al momento del sacrificio, muy similar a la metodología de Pawlisch y Maes, 1984; aunque estos autores solo obtenían fetos de 145 días de edad por medio de cesárea

El medio de cultivo utilizado fue Eagle Dulbecco, suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos, diferente al utilizado por Pawlisch y Maes, el cual fue Medio Mínimo Esencial de Eagle, suplementado con 20% de SFB y antibióticos. Con el uso de este medio se obtuvo una confluencia de la monocapa de células en un 100% entre 17 y 21 días; lo cual implicó un tiempo mayor en comparación al que se obtuvo con medio Eagle Dulbecco, siendo este entre 12 y 14 días, como se puede observar en la foto 3. Esto puede deberse al contenido de glucosa de el medio Eagle Dulbecco, la cual proporciona una mayor fuente de energía para el metabolismo celular, además la adición de suero fetal caprino homólogo al momento de colocar el explante en la botella de Falcon, con el cual se proporcionaron factores de crecimiento, lográndose así un aumento en la división celular (Ian, 1987). Otros autores (Kirkland y Batty, 1987) reportan el uso de Medio Mínimo Esencial de Eagles suplementado con 5% de suero fetal de ternero (SFT) en cultivo de células de córnea de cordero, obteniendo monocapas completas entre el día 14 y 21, es evidente que el lapso de tiempo mínimo (14 días) fue similar al obtenido con medio Eagle Dulbecco, utilizando un 75% menos de suero fetal, pero no se puede comparar con los resultados de este ensayo debido a que se utilizó otro tipo celular y el lapso en el que obtuvieron monocapas completas fue más amplio (8 días) al obtenido en este trabajo (3 días).

Otros medios de cultivo que son utilizados para el crecimiento celular es el Medio Mínimo Esencial con sales de Hank o con sales de Earle con 10% de suero fetal bovino y

antibióticos (Clavijo y Thorsen, 1995b, 1996) y Medio Mínimo Esencial modificado de Dulbecco con 2% de SFT y antibióticos (Adams y cols, 1980; Rimstad y cols, 1993).

Generalmente se realizaron los pases celulares a los 14 días (100% de confluencia de la monocapa), logrando hasta 6 pases celulares. La tripsinización y los pasajes seriados no tuvieron dificultad (Pawlsch y Maes). En otro trabajo se ha reportado hasta 40 pases celulares en cultivos de cornea de corderos y el mejor cultivo celular para soportar la replicación viral fue con pasajes bajos (4 a 8) y proveían una buena producción de virus hasta el pasaje 40 (Kirkland y Batty, 1987). En este trabajo no se pudo evaluar que pasaje pudiera ser el óptimo para la replicación viral, debido a que el objetivo no fue producir antígeno a gran escala como en el trabajo antes citado. Aunque esta deberá ser una meta para poder obtener grandes cantidades de antígeno e implementar pruebas diagnósticas, además como lo mencionan estos autores el uso de la producción de antígeno a gran escala reduce el costo de producción de antígeno aproximadamente 20 veces. Con los pases celulares se obtuvo una gran cantidad de células, lo que permitió su criopreservación para su posterior utilización.

Se ha reportado el aislamiento del virus a partir de macrófagos alveolares, macrófagos de calostro, leche y líquido sinovial (Pawlsch y Maes, 1984; Belov y Whalley, 1988, Ellis y cols, 1988a, Gazit y cols, 1992; Amerighno y cols, 1993, Rimstad y cols, 1993, Tong-Starksen y cols, 1996). Además se ha aislado de células de la línea monocito/macrófago obtenidas de sangre periférica de animales adultos y cabritos (Ellis y cols, 1986, 1988, 1990; Rimstad y cols, 1993).

El aislamiento del virus en este trabajo se realizó a partir de la obtención de sangre de animales adultos; aunque valdría la pena evaluar las otras opciones de aislamiento para establecer cual sería la mejor alternativa

Para la obtención de sangre se utilizó heparina como anticoagulante, similar a lo reportado en la literatura (Pawlsch y Maes, 1984; Rimstad y cols, 1993). Aunque se menciona el uso de EDTA y Citrato Trisódico al 5% (Ellis, 1990, Clavijo y Thorsen, 1995b, 1996).

Para la obtención de las células blancas (leucocitos) se utilizó el Ficoll-Hypaque como gradiente de concentración, lo que facilita la separación de la capa de células blancas (Clavijo y Thorsen, 1995b, 1996). Aunque Ellis en 1986, no reporta su uso, y la manera en que obtuvo la capa de células blancas fue aumentando las revoluciones por minuto al realizar la centrifugación, con lo cual se dificulta su separación.

El presente estudio se realizó basándose en la técnica de Crawford y cols, 1980a; Pawlsch y Maes, 1984, Clavijo y Thorsen, 1995b y 1996 etc., los cuales citan la obtención de explantes de feto caprino para conseguir monocapas con 100% de confluencia e inocular los co-cultivos de monocitos/macrófagos incubados por 7 días. La literatura reporta el uso de co-cultivos de monocitos/macrófagos sin incubación en células de membrana sinovial con 75% de confluencia (Rimstad y cols, 1993), así como el co-cultivo de monocitos/macrófagos incubados por 7 días, pero agregando a estas células de membrana sinovial a una concentración de 3×10^4 (Clavijo y Thorsen, 1995b, 1996). Pawlsch y Maes reportan el uso de co-cultivos con una concentración celular de 1 a 2×10^6

Ellis y cols, 1990 mencionan que la persistencia de macrófagos infectados en sangre periférica es del 3% y del 8% en cabras mayores de 5 años, pero a partir de las células obtenidas del torrente sanguíneo se logró aislar el virus y se observó la concentración de células viables con tripan azul similar a lo reportado por Ellis, 1990 y Rimstad y cols, 1993

En el presente estudio no se requirió utilizar controles negativos en los cultivos celulares de membrana sinovial infectados con el virus de AEC, debido a que uno de los objetivos era la producción de antígenos virales; además por el efecto citopático que el virus causa en las células infectadas y el tiempo en que estas células no infectadas permanecieron sin cambios morfológicos (más de dos meses), se establece que estaban exentos de virus contaminantes. Para confirmar la presencia del virus de AEC se utilizó la técnica de dot blotting, una prueba bastante sensible y específica.

Existen muchas alternativas para evidenciar la presencia del virus en cultivo celular, de las cuales se pueden mencionar inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, presencia de la transcriptasa reversa en el sobrenadante, PCR y microscopía electrónica (Ellis y cols, 1983, Pawlisch y Maes, 1984, Ellis y cols, 1988b, Achour y cols, 1989; Heckert y cols, 1991; Pétursson y cols, 1992; Clavijo y Thorsen, 1995a; Perry y cols, 1995; OIE Manual, 1996)

La literatura menciona que se puede también evidenciar la replicación viral por el efecto citopático que causa el virus a las células; dando una morfología de células estrelladas refráctiles, con procesos dendríticos, formación de células gigantes (sincitios) con numerosos núcleos fusionados (de 5 a 10) y vacuolización. Esto es muy similar a lo obtenido en este trabajo como se observa en las fotos 4 y 5 (Crawford y cols, 1980a, Pawlisch y Maes, 1984; Belov y Whalley, 1988, Kirkland y Batty, 1989, Gazit y cols, 1992; Amerighno y cols, Rimstand y cols, 1993; Achour y cols, 1994; OIE, 1996; Tong-starksen y cols, 1996).

Para evidenciar mejor la presencia de efecto citopático se realizó la tinción de Giemsa observando mejor lo antes descrito (fotos 6 y 7), aunque la literatura reporta la tinción de hematoxilina y eosina para examinar la formación de sincitios (Grewal y cols, 1986).

El tiempo mínimo en el que se observaron sincitios fue de 4 semanas, similar a lo reportado por Crawford y cols, 1980a; aunque su trabajo fue realizado con explantes directos de membrana sinovial de cabras artríticas seropositivas; estos mismos autores reportan el desarrollo de sincitios en menos tiempo (3-6 días) inoculando los cultivos de membrana sinovial con explantes primarios. Otro trabajo reporta la tripsinización y subpasaje del cultivo celular, realizando tres pases antes de considerar negativo el cultivo (Adams y cols, 1980; Grewal y cols, 1986). Pawlisch y Maes reportan la presencia de efecto citopático en 58 5 días en promedio y al realizar el pasaje de cultivos infectados se puede observar la presentación de sincitios entre 2 a 7 días. Aunque esto no se evaluó en el presente trabajo, al parecer esta metodología reduce el tiempo de presentación del efecto citopático.

La literatura menciona que las células afectadas se destruyen y se reparan en el cultivo celular, lo que hace más difícil poder observar el efecto citopático en etapas tempranas con baja concentración viral (Pawlisch y Maes, 1984). La concentración de sobrenadante una vez observado el efecto citopático en los cultivos celulares de membrana sinovial de feto caprino, fue muy similar a la reportada por Kirkland y Batty. Aunque Grewal y cols, 1986 mencionan que la concentración del sobrenadante puede realizarse por medio de diálisis, utilizando Polietileno Glicol con un peso molecular de 70,000 daltons a 4 grados centígrados. Al sobrenadante ya filtrado se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford, obteniendo una concentración de 2 mg/ml para antígenos mayores de 100,000 d y 0 12 mg/ml para el antígeno mayor de 10,000 d como se observa en la gráfica 2 y 3. Esto no se reporta en la literatura, siendo un aspecto importante por la cantidad de proteínas virales en extracto crudo, que requiere el montaje de diversas pruebas diagnósticas. Aunque no se cuantificaron las proteínas del medio de cultivo celular en el presente trabajo, es un aspecto importante que debe ser considerado (Hudson y Hay, 1980).

Como ya se mencionó existen varios métodos para detectar la presencia del virus de la AEC en sobrenadantes de cultivos infectados, en este trabajo se corroboró la presencia de proteínas antigenicas en el sobrenadante y lisado celular, utilizando una prueba inmunoenzimática (dot blotting), técnica no citada en la literatura consultada para AEC. Es una prueba que detecta antígenos específicos en niveles de picogramos, utilizando primeramente un suero específico contra la P 28 y GP 135 del virus y posteriormente una proteína G peroxidada la cual se une a las IgGs presentes en el suero (afinidad a IgG1 e IgG2 caprina). Las proteínas inmovilizadas sobre membranas de nitrocelulosa; evidencian esta reacción inmunológica al agregar el sustrato para la peroxidasa unida a la proteína G tomando una coloración oscura como se observa en la foto 8. En el presente estudio no se utilizó proteína A (Afinidad a la IgG) por ser menos específica que la proteína G a las inmunoglobulinas de cabra (Ternyck y Avrameas, 1991; Bio-Rad, 1996).

Los antígenos de mayor importancia inmunologica para la enfermedad de AEC, que cita la literatura son las proteínas codificadas por los genes gag (P 25 y P 28) y env (TM 50 y GP 135) (Clavijo y Thorsen, 1995a; Rosati y cols, 1995) Aunque comercialmente existen anticuerpos monoclonales originados en líneas celulares (CAEPSA1, CAEP10A1, CAEP8B7 y CAEP1381) del isotipo IgG1, contra las proteínas de la cápside CAEV - 63 y 60 (Kellner, 1997).

El aislamiento del virus de AEC se realizó con el fin de estandarizar una metodología para la producción de antígeno viral con fines de estudios epidemiológicos en el país. Las pruebas diagnósticas que existen comercialmente en México hasta hoy en día, contienen antígenos del virus de Maedi Visna, que aunque comparte determinantes antigénicos lo más apropiado es la utilización de antígenos del virus de AEC. La literatura menciona que la mejor prueba para el diagnóstico de AEC es la de inmunoprecipitación junto con un buen diagnóstico clínico por lo que se debe trabajar en la implementación de esta prueba o alguna prueba inmunoenzimática como la de ELISA, para el diagnóstico de la Artritis Encefalitis Caprina en México (Knowles, 1997).

CONCLUSIONES

SE LOGRÓ OBTENER Y MANTENER UN MONOESTRATO CELULAR DE MEMBRANA SINOVIAL DE FETO CAPRINO, UTILIZANDO UNA METODOLOGÍA SENCILLA.

ES FACTIBLE EL AISLAMIENTO DEL VIRUS DE AEC A PARTIR DE CÉLULAS DE LA LÍNEA MONOCITO/MACRÓFAGOS OBTENIDAS DEL TORRENTE SANGUÍNEO DE ANIMALES SEROPOSITIVOS A LA ENFERMEDAD EN MÉXICO.

CON LA TÉCNICA DE DOT BLOTTING ES POSIBLE EVIDENCIAR LA PRESENCIA DE ANTÍGENOS DEL VIRUS DE AEC EN SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE MEMBRANA SINOVIAL.

CON LA OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS DEL VIRUS DE AEC DE CEPAS QUE EXISTEN EN EL PAÍS SE PUEDEN MONTAR TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO SEROLÓGICO PARA CONOCER LA SITUACIÓN ACTUAL DE LA AEC EN LOS REBAÑOS CAPRINOS NACIONALES.

CON EL PRESENTE TRABAJO SE REPORTA POR PRIMERA VEZ LA PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS DEL VIRUS DE LA ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA EN MÉXICO.

RECOMENDACIONES

CONOCIENDO EL VERDADERO IMPACTO E IMPORTANCIA DE LA AEC POSIBLEMENTE LAS AUTORIDADES TRABAJEN EN PROGRAMAS DE CONTROL PARA ESTA ENFERMEDAD Y PUEDA EN UN FUTURO ERRADICARSE DEL PAÍS.

EVALUAR LOS ANTÍGENOS DE LA AEC EN PRUEBAS INMUNOENZIMATICAS O DE INMUNOPRECIPITACIÓN EN REBAÑOS INFECTADOS POR EL VIRUS.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución para lavado de leucocitos

Concentrado de Hanks 10X.

Solución A:

	1 litro
NaCl	80.0 gr.
KCl	4.0 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0 gr.
MgCl ₂ 6H ₂ O	1.0 gr
CaCl ₂	1.4 gr.
Glucosa	10.0 gr
H ₂ O	800.0 ml

Solución B.

Na ₂ HPO ₄	0.6 gr.
KH ₂ PO ₄	0.6 gr
H ₂ O	200.0 ml

- 1.- Disolver los componentes en agua desmineralizada de acuerdo al orden listado.
- 2 - Esterilizar las soluciones A y B separadamente a 15 libras, por 15 minutos.
- 3 - Mezclar A y B cuando estén frías. Poner B dentro de A lentamente. pH final 7.0 a 7.2

Solución Salina Balanceada de Hanks.

	1 litro
Agua desmineralizada estéril	889.0 ml
Concentrado de Hanks 10X	100.0 ml
NaHCO ₃ (7.5%)	7.0 ml
Fenol rojo (0.5%)	4.0 ml
Penicilina 200,000 unidades/ml	1.0 ml
Estreptomina 500,000 µg/ml	0.4 ml

- 1 - Combinar cada solución en el orden listado, mezclar bien. pH 7.0 a 7.2.

Solución para lavar el sobrenadante en la ultrafiltración

Buffer Salino de Fosfatos (PBS).

Solución A

	1 litro
NaCl	8.0 gr.
KCl	0.2 gr.
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.132 gr.
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.1 gr.
Agua desmineralizada	800.0 ml

Solución B

Na ₂ HPO ₄	1.15 gr.
KH ₂ PO ₄	0.2 gr
Agua desmineralizada	200.0 ml

- 1.- Disolver cada sal en el orden listado.
- 2 - Esterilizar la solución A y B por separado a 15 libras por 15 minutos.
- 3.- Mezclar A y B cuando estén frías, poner B dentro de A lentamente. pH 7.0

Determinación de proteína

Reactivo de Bradford

Azul de Coomasie (G-250)	50 mg
Etanol Absoluto	25 ml
Ácido Ortofosfórico	50 ml
Agua desmineralizada	CBP 500 ml

Técnica de Dot Blotting

Tris Buffer Salino (TBS)

	1 litro
Tris	20 mM
NaCl	500 mM
Agua desmineralizada	1000 ml

Se mezclan en el orden listados, pH 7.5

Solución de Bloqueo (TBS, 3% de gelatina).

Adicionar 3.0 g de gelatina a 100 ml de TBS y calentar a 50° C, hasta disolver.

Solución de lavado.

Tris Buffer Salino Tween (TTBS)

Adicionar 200 µl de Tween-20 (precalentado a 37° C) a 400 ml de TBS, pH 7.5.

Buffer del primer anticuerpo.

Tris Buffer Salino Tween con 1% de gelatina (TTBS, 1% de gelatina).

Adicionar 1.0 g de gelatina a 100 ml de TTBS y calentar a 50° C hasta disolver.

Citrato Buffer Salino (CBC 3X).

A 100.0 g de Citrato Buffer Salino adicionar un litro de agua desmineralizada.

Citrato Buffer Salino (CBS).

Adicionar 100 ml de CBS 3X (20mM de Citrato, 500 mM de NaCl) a 200 ml de agua desmineralizada; pH 5.5.

Solución de lavado para la Proteína G Peroxidasa de Rábano (G-HRP).

Tween Citrato Buffer Salino (TCBS)

A 300 ml de CBS adicionar 150 µl de Tween-20; pH 5.5. Conservar a 4° C

Buffer del conjugado (Proteína G-HRP), segundo anticuerpo.

TCBS con 1% de gelatina.

Adicionar 1.0 g de gelatina a 100 ml de TCBS, calentar a 50° C hasta disolver, pH 5.5.

Soluciones para el desarrollo del color.

4-cloro 1-naftol en dietilen glicol.

Peróxido de Hidrógeno.

Buffer desarrollador de color HRP 10X.

Diluir el buffer desarrollador de color HRP 10X, adicionando 90 ml de agua desmineralizada a 10 ml de buffer.

Nota: Todas las soluciones antes preparadas se conservaron a 4° C, solo el 4-cloro 1-naftol en dietilen glicol se conservó a -20° C.

BIBLIOGRAFÍA

Achour HA, Azizen S, Ghemmam Y, Mazari B. Arthritis-encéfalite caprine en Algérie. *Revue Élev Méd vét Pays trop* 1994; 47 (2) : 159-161.

Achour HA, Markoua K, Ghemmam Y. Isolement et caractérisation du virus de l'arthrite et de l'encéfalite des caprins en Algérie. *Maghreb Vétérinaire* 1989; 4 (18): 15-17.

Adams DS, Crawford TB, Banks KL, Mc Guire TC, Perryman LE. Immune responses of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Inf Immunity* 1980a; 28: 421-427.

Adams DS, Crawford TB, Klevjer-Anderson P. A pathogenetic study of early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. *Am J Pathol* 1980b; 99 (2): 257-278.

Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, Mc Guire TC, Gorham JR. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 1983, 44: 1670-1675.

Adams DS, Oliver RE, Amerighno E, De Martini JC, Verwoerd DW, Houwers DJ, Waghela S, Gorham JR, Hyllseth B, Dawson M, Trigo FJ, Mc Guire TC. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection *Vet Rec* 1984; 115: 493-495

Agraz GA. Caprinotecnia I. México: Editorial Limusa, 1984

Ali OA. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of a goat *Vet Rec* 1987; 121: 131-132.

Alluwaimi AM, Abu Elzein EME, Hassanein MM. Caprine arthritis-encephalitis antibodies in indigenous sheep in Saudi Arabia. *Revue Élev Méd vét pays trop* 1990, 43 (4): 444-445.

Alvarado HMT. Comportamiento inmunológico de la cabra frente al virus de artritis encefalitis caprina (aislamiento del virus) (Informe de Servicio Social Titulación). México (Estado) México. *Facultad de Estudios superiores Cuautitlán. UNAM*, 1995.

Alvarez Del VIL. Seroprevalencia de la artritis encefalitis caprina en algunos estados de la república (Tesis de licenciatura) México (Estado) México. *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM*, 1984

Amerighno E, Rivera H, Rosadio R, De Martini J. La artritis encefalitis caprina viral (AECV) en el Perú: estudio clínico, serológico, histopatológico y aislamiento. *Rev Latamer Peq Rumin* 1993, 1(1): 63-75.

- Angus AA, Gordon DH, Neil JW Quantitative analysis of immunohistological changes in the synovial membrane of sheep infected with maedi- visna virus. *Clin Immun Immunopath* 1994, 72 (1): 21-29
- Arbiza AS Producción de caprinos. México: *AGT Editor*, 1986.
- Banks KL, Greenlee A. Lymphocyte subpopulations of the goat. Isolation and identification *Am J Vet Res* 1982, 43 (2). 314-317.
- Beaussoleil S, Bosgiraud C, Nicolas JA. Inhibition in vitro du virus visna parl'azt, la 2'3'-didésoxycytidine et la suramine. *Revue Méd Vét* 1991; 142 (7): 557-560
- Bel Kahla A, Tainturier D, Zaiem B. Apparition du syndrome arthrite encéphalite dans un troupeau de chèvres en Tunisie. *Revue Méd Vét* 1991; 142 (2) 111-113.
- Belov L, Whalley M. Virus-specific polypeptides of caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to virion proteins P 24 and P 14. *J Gen Virol* 1988; 69 1097-1103
- Bertoni G, Zahno LM, Zanoni R, Vogt HR, Peterhans E, Ruff G, Cheevers WP, Sonigo P, Pancino G Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus GP 38 transmembrane protein associates with the development of arthritis *J Virol* 1994; 68 (11) 7139-7147.
- Bio-Rad Laboratories Immun-Blot assay kit, protein G, horseradich peroxidase , 1996.
- Bio-Rad Laboratories. Life science, *Research Products*, 349-354, Catálogo, 1997.
- Biberstein E, Chung I Review of veterinary microbiology. London: *Blackwell Scientific Publication*, 1990.
- Bélangier D, Leboeuf A. CAE virus seroprevalence in a mixed goat herd *Vet Rec* 1993, 328
- Brugère-Picoux J Le complexe arthrite-encéphalite caprine (C A-E.C.). *Recueil de Médecine Vétérinaire* 1984; 160 (4): 319-327.
- Castro AE, Heuschele WR. Caprine arthritis encephalitis 1er ed U S A: *Veterinary Diagnostic Virology* Moasby-Year Booking, 1992.
- Carroll WJ, Gaskin J, Poulos PW, MacKay RJ, Burridge MJ. Caprine arthritis-encephalitis. Clinicopathologic study. *Am J Vet Res* 1982; 43(12): 2085-2096
- Cheevers WP, Knowles DP, Mc Guire TC, Cunningham DR, Adams DS, Gorham JR. Chronic diseases in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus *Laboratory Investigation* 1988; 58 (5): 510-517.

- Cheevers WP, Travis CM. The lentiviruses. Maedi visna, caprine arthritis encephalitis and equine infectious anemia. *Adv Vir Res* 1988; 34: 189-215.
- Clavijo A, Thorsen J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Rum Res* 1996, 22: 69-77.
- Clavijo A, Thorsen J. Bacterial expression of the caprine arthritis-encephalitis virus gag and env proteins and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res* 1995a; 56 (7): 841-848.
- Clavijo A, Thorsen J. Chemiluminescent detection of caprine arthritis encephalitis virus with a PCR-generated single stranded nonradiolabelled probe. *Vet Microb* 1995b; 43: 295-305.
- Clements JE, Gdovin SL, Monteralo RC, Narayan O. Antigenic variation in lentiviral diseases. *Ann Rev Immunol* 1988, 6: 139-159
- Cork LC. Differential diagnosis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. *JAVMA* 1976, 169: 1303-1306.
- Crawford TB, Adams PS. Caprine arthritis encephalitis: Clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *JAVMA* 1981, 178 (7) 713-719
- Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC. Chronic arthritis in goats caused by retrovirus. *Science*. 1980a, 207 (29): 997-999
- Crawford TB, Adams DS, Sande, RD, Gorham JR, Henson JB. The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. *Am J Path* 1980b; 100: 443-450
- Cutlip RC, Lehnkuhl HD, Sacks JM, Weaver AL. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the United States. *JAVMA* 1992; 200 (6): 802-805.
- Dahlberg JE, Gaskin JM, Perk K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J Virol* 1981; 39 (3). 914-919
- Dalvit P, Cazzola L, Fent P, Galeazzo M. (Caprine arthritis encephalitis (CAE) control by administering bovine immunoglobulin or bovine colostrum at birth: Performance and mortality in kids) arthritis encefalite virale caprina (CAEV). Risanamento mediante somministrazione alla nascita di immunoglobuline bovine o calostro bovino. prestazione productive e mortalità dei capretti. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 1991, 12 (4): 53-56
- Davis EW. CAE In goats: Part II. *Dairy Goat J* 1987; 65 (9) 580-581.

Dawson, M. Caprine arthritis-encephalitis. *Inpractice* 1987, 8-11.

Dawson M, Wilesmith JW. Serological survey of lentivirus (maedi-visna/caprine arthritis-encephalitis) infection in British goat herds. *Vet Rec* 1985; 86-89

De Martini JC, Banks KL, Greenlee A, Adams DS, Mc Guire TC. Augmented T lymphocyte numbers in goats chronically infected with the retrovirus causing caprine arthritis-encephalitis *Am J Vet Res* 1983; 44 (11): 2064-2069.

Dinter Z, Morein B. Virus infections of ruminants. Netherlands: *El Sevier Science Publishers B.V.*, 1990.

Dunn P. The goatkeeper's veterinary book In. *Farming Press*. London, 1990.

East NE, Rowe JE, Theilen GH, Pedersen NC. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant Research* 1993; 10. 251-262

Ellis TM Blood leukocyte infection rates in caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Aust Vet J* 1990; 67 (8): 302-303.

Ellis TM, Carman H, Robinson WF, Wilcox GE. The effect of colostrum-derived antibody on neo-natal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Aust Vet J* 1986; 63 (8): 242-245

Ellis TM, Robinson WF, Wilcox GE. Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection *Aust Vet J* 1983, 60 326-329.

Ellis TM, Robinson WF, Wilcox GE. The pathology and aetiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus *Aust Vet J* 1988a; 65 (3). 69-73

Ellis, T.M., Robinson, W F , Wilcox, G E Comparison of caprine arthritis encephalitis viruses from goats with arthritis and goats with chronic interstitial pneumonia *Aust. Vet. J* 1988b, 65 (8) 254-257.

Food and Agriculture Organization. Octubre 1997 *Internet*

Fenner FJ, Mc Auslan BR, Mims, CA, Sambrook J, White DO *Veterinary Virology*. 2nd ed. USA: *Academic Press Inc*, 1993

Gail C *Goat production* London *Academic Press Inc, LTD*, 1981

Gallego GJ *La cabra* España. *Ediciones Mundi-Prensa*, 1993

García M, Rossini AJ, Gallardo M, De Araujo WP, De Santis Bastos PA Índice clínico no diagnóstico e profilaxia da artrite-encefalite caprina (AEC) *Arq Bras Med Vet Zoot* 1992, 43 (4) 263-270

Gaskin JM. Testing for caprine arthritis-encephalitis (CAE). *Dairy Goat J* 1990, 68 (4): 231-237.

Gay GM, Valdivieso, NGN, Tron, FMJ, Enriquez OJ. Informe preliminar del aislamiento e identificación del virus productor de la Artritis-Encefalitis Caprina en México. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México; 1986, México. SARH, 1986: 215.

Gazit A, Sarid R, Mashiah P, Archambault D, Dahlberg JE, Tronick SR, Yaniv A. Defective viral particles in caprine arthritis encephalitis virus infection. *Virology* 1992; 189. 344-349.

Gianguaspero M, Vanopdenbosch E, Nishikawa H. Lentiviral arthritis and encephalitis in goats in north-west Syria. *Revue Élev Méd Vét Pays trop* 1992; 45 (3-4): 241.

Gonzalez J, Gelabert JL, Marco JC, Saez de Okariz C. Caprine arthritis-encephalitis in the Basque country, Spain *Vet Rec* 1987; 120: 102-109.

González RMG. Estudio de la enfermedad viral: Artritis encefalitis caprina por medio de la prueba de inmunodifusión, frotis de líquido sinovial y biopsia de muestras obtenidas a partir de cabras de rastro y de algunos casos clínicos (tesis de licenciatura) México (Edo) México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1994.

Gopal RP, Walter SJ, Walid H. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction *J Clin Microbiol* 1993; 31 (11). 3042-3043

Greenwood PL. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia *Preventive Veterinary Medicine* 1995a; 22: 71-87.

Greenwood PL, North RN, Kirkland PD. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. *Aust Vet J* 1995b; 72: 341-344.

Grewal AS, Greenwood PE, Burton RW, Smith JE, Batty EM, North R. Caprine retrovirus infection in New South Wales. Virus isolations, clinical and histopathological findings and prevalence of antibody *Aust Vet J* 1986, 63(8) 245- 248.

Guiguen F, Lerondelle C, Favier C. Réponses du chevreau à des monocytes infectés in vitro par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre. *Am Rech Vét* 1990, 21. 179-185.

Harmache A, Bouyac M, Audoly G, Hieblot C, Peveri P, Vigne R, Suzan M. 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* 1995; 69 (6) 3247-3257

Heckert RA, McNab WB, Richardson SM, Briscoe MR. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Can J Vet Res* 1992; 56: 237 - 241.

Hötzel I, Bastos E de S, Ravazzolo AP, Moojen V. Caprine arthritis-encephalitis virus: Isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26: 1175-1179

Hullinger GA, Knowles DP, Mc Guire TC, Cheevers WP. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology* 1993; 192: 328-331

Hudson L, Hay FC Practical immunology. 2nd ed. Australia: *Blackwell Scientific Publications*, 1980.

Ian FR. Culture of animal cells, a manual of basic technique. 2nd ed. U.S.A. *Edit. Wiley-liss*, 1987

Jackson MK, Knowles DP, Stem TA, Harwood WG, Robinson MM, Cheevers WP. Genetic structure of the pol-env region of the caprine arthritis encephalitis lentivirus genome. *Virology* 1991; 180: 389-394

James FE. Comparative features of retroviral infections of livestock. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1990, 13 (3): 127-136

Kellner PT. Marketing and technical service. U.S.A. 1997.

Kennedy SS, Narayan O, Strandberg JD. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis encephalitis virus. *J Comp Path* 1985, 95: 600-617.

Kirkland PD, Batty EM. Caprine arthritis-encephalitis virus; an efficient method for the large scale production of serological antigens. *J Virol Methods* 1987; 16: 323-326.

Knowles PD. Laboratory diagnostic test for retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary clinics of northamerica: Food animal Practice* Vol 13, No 1 March 1997

Knowles DJr, Cheevers W, Mc Guire T, Stem T, Gorham J. Severity of arthritis is predicted by antibody response to GP 135 in chronic infection with caprine arthritis encephalitis virus. *J Virol* 1990, 64 (5) 2396-2398.

Knowles DP, Evermann JF, Shropshire C, Schalie JV, Bradway D, Gezon HM, Cheevers WP. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J Clin Microbiol* 1994, 32 (1): 243-245

Knowles DP, Mc Guire TC, Cheevers WP. Caprine arthritis-encephalitis. In: Castro AE, Heuscheir WR, editors *Veterinary Diagnostic Virology: Mosby-Year Booc Inc*, 1992: 202-205.

Krieg A, Hans PE. Caprine arthritis encephalitis in Switzerland: Epidemiological and clinical studies. *Schweizer Archiv. For Tierheil Kunde* 1990, 132 (7): 345-352

Kwang J, Keen J, Cutlip RC, Kim HS, Bermejillo A. de la C Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Rum Res* 1995; 16: 171-177.

Lechner F, Machado J, Bertoni G, Seow HF, Dobbelaere DA, Peterhans E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J. Virol* 1997; 71 (10): 7488-7497

Leyva GVH Estudio radiológico, hematológico, patológico y al microscopio electrónico, de cabras seropositivas al virus de la artritis encefalitis caprina (tesis de licenciatura). México (Edo) México: *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM*, 1994.

Lichtensteiger, CA, Cheevers WP, Davis WC. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis virus *J Gen Virol* 1993; 74. 2111-2116.

Lichtensteiger CA, Knowles DP, Mc Guire TC, Cheevers PW Recombinant GP 135 envelope glycoproteins of caprine arthritis-encephalitis lentivirus variants inhibit homologous and heterologous variant-specific neutralizing antibodies. *Virology* 1991; 185: 2-9.

Lopes PC, Baule C, Costa R, Langa A. Ocurrence of caprine arthritis-encephalitis in Mozambique *Trop Anm Hlth Prod* 1989, 21: 237-238

Mackenzie RW, Oliver RE, Rooney JP, Kagei H. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in an endemically infected goat herd *N Z Vet J* 1987; 35: 184-186.

Mc Guire TC. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus infection *Vet Immunol Immunopathol* 1987, 17: 465-470.

Mc Guire TC, Adams DS, Johnson GC, Anderson PK, Barbee DD, Gorham JR. Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infeted goats *Am J Vet Res* 1986, 47 (3) 537-540

Mérida MJA Determinación de linfocitos T y B en sangre periférica de cabras seropositivas al virus de artritis encefalitis caprina (AEC) (tesis de licenciatura) México (Edo) México *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM*, 1995.

Motha M J, Ralston C J Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk *Vet Microbiol* 1994, 38 359-367.

Narayan O, Cork L Caprine Arthritis-Encephalitis virus. Vol 3 In: Virus infection of ruminants New York USA *Elsevier Amsterdam*, 1990, 441-452

Narayan O, Zink MC, Gorrell M, Mc Entee M, Sharma D, Adams R. Lentivirus induced arthritis in animals. *J Rheumatol* 1992, (supplement 32) 19. 25-32.

Nayak N, Bhowmik M. Caprine bacterial arthritis: Haematological, biochemical, pathological and certain histochemical studies *Indian Journal of Animal Sciences* 1990; 60 1170-1173

Nazara CS De J Estudio de la artritis encefalitis caprina en México (Tesis de maestría) México (DF) México. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM*, 1991

Nazara CS De J, Trigo FJ, Suberbie E, Madrigal V. Estudio clínico-patológico de la artritis- encefalitis caprina en México. *Vet Méx* 1985; 16: 91-100.

Nermut MV, Steven AC Perspectives in medical virology Vol 3 De. *Eisevier*, USA, 1987

Office International des Epizooties Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Lists A and B diseases of mammals, birds and bees 1996 Chapter 3 3 4/5.

Oliver R, Cathcart A, Mc Niven R, Poole W, Robati G Infection of lambs with caprine arthritis encephalitis virus by feeding milk from infected goats. *Vet Rec* 1985; 19 83

Olvera AMA. Revisión bibliográfica sobre la enfermedad de artritis encefalitis caprina de 1980-1992 (tesis de licenciatura) México (DF) México: *Facultad de Estudio Superiores Cuautitlán. UNAM*, 1994

Padilla RG, García CJ, De León TM Transferencia de embriones de cabras seropositivas a la artritis encefalitis caprina y su efecto en las crías nacidas de cabras receptoras seronegativas. *Memorias IX Congreso Nacional Caprino*; 1992; FAUA, Nuevo León (Monterrey) México Monterrey N.L., México, 1992. 28-30.

Papageorges M, Gavin PR, Barbee DD, Knowles DP, Cheevers WP, Sande RD. Nonspecific accumulation of TC-99m immunoglobulins in chronic and acute arthritis. *Vet Rad Utl* 1992; 33 (1) 55-61

Pastoret PP, Portetelle D Les infections des animaux par rétrovirus. *Ann Méd Vét* 1990, 134 361-383

Pawlisch RA, Maes RK Caprine arthritis-encephalitis virus isolated from Michigan goats *Am J Vet Res* 1984, 45 (9) 1808-1811

Péretz G. Prevention des arthrites des chevres dues au C.A.E.V Centre d'écopathologie animale, 1992, (5) 6-29

Peretz G, Asso J, Devillechaise P Le C A E V Revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. *Revue Méd Vét* 1993, 144 (2): 93-98

Peretz G, Cimarosti I Conséquences de l'arthrite-encéphalite caprine sur la production laitière 41^{ème} Reunion Annuelle de la Fédération Européenne de Zootechnie; 1990 Juillet 9-12, Toulouse, France, 1990 1-9

Perk K Presence of virus particles in neural cells of goats with caprine arthritis encephalitis *Res Vet Science* 1990, 49: 367-369

Perrin GG L'arthrite encéphalite caprine *Point Vét* 1991, 23 713-718.

Perrin GG, Polack B L'arthrite encéphalite caprine *Bull Acad Vet France* 1987, 60 125-136

Perry LL, Wilkerson MJ, Hullinger GA, Cheevers WP Depressed CD4⁺ T lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis *JID* 1995; 171 328-334

Pétursson G, Andrésdóttir V, Andrésón ÓS, Georgsson G, Pálsson PA, Rafnar B, Torsteinsdóttir S. Lentivirus diseases of sheep and goats: Maedi-Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis In: Progress in sheep and goat research Oxford: Speedy, A.W, 1992 107-129

Pétursson G, Georgsson G, Pálsson PA Maedi-Visna and related disease Vol 3 In Virus infections of ruminants New York USA Elsevier Amsterdam, 1990: 431-440

Putney SD, Montelaro RC Lentivirus In: Regenmortel, MHV, Neurath AR, editors Immunochemistry of viruses II The basis for serodiagnosis and vaccines: Elsevier Science Publishers B V, 1990 307-344.

Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, De Rock E, Pedersen NC Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats *Am J Vet Res* 1993; 54 (11) 1858-1862

- Roberson SM, Mc Guire TC, Klevjer-Anderson P, Gorham JR, Cheevers WP. Caprine arthritis-encephalitis virus is distinct from viral and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. *J Virol* 1982; 44: 755-758.
- Robinson WF, Ellis TM. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication *Aust Vet J* 1986; 63 (8): 237-241.
- Roitt IM. Essential immunology. 4th ed. Australia: *Blackwell Scientific Publications*, 1980
- Rosati S, Pittau M, Tolari F, Erre G, Kwang J. Genetic and antigenic characterization of CAEV (Caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Vet Microbiol* 1995; 45: 363-370
- Rowe JD, East NE, Thurmond MC, Franti CE, Pedersen NC. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy *Am J Vet res* 1992; 53 (12): 2386-2395
- Rowe JD, East NE. Risk factor for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Food Animal Retroviruses* 1997; 13 (1): 35-53.
- Russo P Virus de l'arthrite encephalite caprine (CAEV). Breve revue caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). *Short Review Ann Rech Vét* 1984; 15 (11): 3-6.
- Russo P, Vitu C, Fontaine JJ, Vignoni M Arthrite-encephalite caprine: Essai d'une preparation vaccinale adjuvee-I. Etude clinique et virologique *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1993, 16 (2). 131-136.
- Ryan PD, Greenwood LP, Nicholls JP Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl- β -glucosaminidase activity in dairy goats. *J Dairy Res* 1993, 60: 299-306
- Schöpe K, Schönbauer M. Serological survey for caprine arthritis in Tyrol, Austria. Bundesanstalt *Vet Med* 1990, 77 (8): 249-252.
- Smith CM, Cutlip R Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats *JAVMA* 1988; 193 (1) 63-67
- Smith JH, Myers FL. CAE antibody test kit commercially available. *Dairy Goat J* 1991, 69 (4): 42-43.
- Smith MC, Sherman DM. Goat medicine. USA: *Lea & Febiger*, 1994

- Stites DP, Hugh HF. Inmunología básica y clínica. 4ta ed México. *El Manual Moderno*, 1983.
- Storset AK, Evensen Ø, Rimstad E. Immunohistochemical identification of caprine arthritis-encephalitis virus in paraffin-embedded specimens from naturally infected goats. *Vet Pathol* 1997; 34: 180-188.
- Straub OC, Frigg M. The effects of Biotin in the treatment and prevention of caprine arthritis encephalitis. *Tierärztliche Umschau. Vet Med* 1992, 47: 12.
- Surman P, Daniels E. Retrovirus infection of goats with arthritis in south Australia. In: Della-Porta editor. Veterinary viral diseases. *J Aust Acad Press*, 1985. 533-534.
- Suzanne KS, Narayan O, Strandberg JD. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis encephalitis virus. *J Comp Path* 1985, 95: 609-617.
- Tizard I. Inmunología veterinaria. 3er ed. México *Interamericana, Mc Graw-Hill*, 1989.
- Ternynch TH, Avrameas S. Técnicas inmunoenzimáticas. Detección de las proteínas de transferencia sobre nitrocelulosa México: *Grupo Editorial Iberoamérica*, 1991.
- Trigo JF. Artritis-encefalitis caprina y neumonía progresiva ovina (Maedi-Visna). en: *Pijoan P, Tortora J, Editores. Principales enfermedades de los ovinos y caprinos México*, 1986.
- Trigo JF La artritis-encefalitis caprina. *Ciencia Veterinaria* 1991, 5. 49-66.
- Tong-Starksen ES, Sepp T, Pagtakhan SA. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat by gamma interferon. *J Virol* 1996; 70 (1): 595-599.
- Tong-Starksen ES, Sepp T, Pagtakhan SA. STAT pathway is involved in activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat in monocytes *J Virol* 1997; 71 (1): 771-777.
- Vitu C, Russo P. L'arthrite-encephalite enzootique caprine en France: Recherches epidemiologiques et experimentales *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1988; 11(1). 27-34.
- Vitu C, Russo P, Vignoni M. Arthrite-encephalite caprine. Essai d'une preparation vaccinale adjuvee-II. Etude de la reponse anticorps *Comp Immun Microbiol Infect dis* 1993; 16 (2): 137-144.
- Weilushenker MD, Dekaban G, Rice GPA. Retrovirus and multiple sclerosis. I. Analysis of seroreactivity by western blot and radioimmune assay. *Neurology* 1990; 40 1251-1253.

- Wierschem J. CAE-Prevention and control whose responsibility is it *Dairy Goat J* 1991, 69 (4). 55-56.
- Werling D, Langhans W, Geary N. Caprine arthritis encephalitis virus infection changes caprine blood monocyte responsiveness to lipopolysaccharide stimulation in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 43: 401-411
- Zanoni RG, Nauta IM, Kuhnert P, Pauli U, Pohl B, Peterhans E. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet Microbiol* 1992; 33 (1-4): 341-351.
- Zanoni R, Pauli U, Peterhans E. Caprine arthritis-encephalitis (CAE) and Maedi-Visna viruses detected by the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Microbiol* 1990; 23: 329
- Zarate RJJ. Artritis y padecimientos articulares en caprinos. Memorias del Seminario Nacional sobre Producción y Comercialización del Ganado Caprino; 1993 Noviembre 10-12; Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León) México. México (DF): Asociación Mexicana de Producción Caprina ,AC, 1993: 78-83
- Zink MC, Narayan O, Kennedy PGE, Clements JE. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: New leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol Immunopathol* 1987, 15: 167-180
- Zink MC, Narayan O. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol* 1989; 63 (6) 2578-2584
- Zink MC, Yager AJ, Myers DJ. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am J of Path* 1990, 136 843-854