

27



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO DE LA FUERZA DE ASOCIACION ENTRE
EL FACTOR DE RIESGO CONSUMO DE CALOSTRO
Y LECHE CONTAMINADOS CON EL VIRUS DE
ARTRITIS-ENCEFALITIS CAPRINA Y LA
SEROCONVERSION EN CABRITOS, ALIMENTADOS
EN LACTANCIA ARTIFICIAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

BERNARDO LUGO LLAMOSAS

ASESORES:

MVZ. ANDRES DUCOING WATTY

MVZ. GEORGINA GARCIA CURIEL

MEXICO, D.F.

2000

278918



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA:

A mis padres, Ernesto Lugo O. y Graciela Llamosas H., a mis hermanos Ernesto, Maru y Ale y a mis amigos Arturo, José Manuel y Juan.

A Jorge †

AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi más sincera gratitud a todas las personas que de alguna forma participaron en la elaboración de esta tesis, en particular a los doctores Andrés Ducoing Watty y Georgina García, así como los miembros del Jurado, especialmente al Dr. José A. Barajas Rojas, de quien aprendí mucho durante en tiempo en que tuve el honor de ser su ayudante. También deseo agradecer con mucho cariño al resto de los maestros que he tenido a lo largo de mis estudios.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	4
HIPOTESIS Y OBJETIVOS GENERALES	19
MATERIAL Y METODOS	21
RESULTADOS	24
DISCUSION	28
CONCLUSION	33
REFERENCIAS	47

I. RESUMEN.

LUGO LLAMOSAS, BERNARDO. Estudio de la fuerza de asociación entre el factor de riesgo consumo de calostro y leche contaminados con el virus de artritis-encefalitis caprina y la seroconversión en cabritos, alimentados en lactancia artificial (bajo la dirección de: Andrés Ducoing Watty y Georgina García Curiel).

Se realizó una lactancia artificial con 43 cabritos divididos en cuatro grupos. Los grupos 1 y 2 fueron expuestos al Factor de Riesgo (FR), mientras que los grupos 3 y 4 fueron alimentados con calostro y leche pasteurizados así como con sustituto comercial para becerros. Se obtuvieron muestras de sangre al mes, tres y seis meses de edad y se usó la prueba AGIDT para la detección de anticuerpos-anti VAEC. La información obtenida fue sometida a análisis estadístico descriptivo, cálculo de riesgo y pruebas de independencia (X^2 , g.l.=1, $P>0.05$), con el fin de determinar si existe una asociación estadística entre la ingestión de calostro y leche contaminados con el VAEC y la seroconversión. Los resultados obtenidos indicaron que no existió asociación estadística significativa entre ambas variables, en contraste con estudios previos. Se mencionan diversos factores que pudieron tener efecto en el estudio y que pudieron alterar sus resultados. Se recomienda un mayor estudio de la AEC y de los factores de riesgo que determinan su presentación. Se desalienta el uso de la AGIDT con fines de detección de anticuerpos anti-VAEC en cabritos < 3 meses de edad.

Palabras clave: Factor de Riesgo, AGIDT, VAEC, seroconversión.

ABSTRACT:

LUGO LLAMOSAS, BERNARDO. Study of association force between caprine-arthritis-encephalitis-virus-laden-colostrum-and-milk-ingestion risk factor and seroconversion in goat kids, fed in an artificial rearing (under direction of: Andrés Ducoing Watty and Georgina García Curiel).

An artificial rearing using 43 goat kids divided into 4 groups was carried out. Groups 1 and 2 were exposed to the Risk Factor (RF), while groups 3 and 4 were fed pasteurized colostrum and milk and commercial calf milk-sustitute. Blood samples were collected at one, three and

six months of kids' age, and AGID Test (AGIDT) was performed to detect CAEV-antibodies. Collected data were analyzed by descriptive statistical tests, risk assesment and Independence Tests (Chi-square, $df = 1$, $P > 0.05$) in order to determine whether an statistical association between VAEC-laden colostrum and milk ingestion and seroconversion exists or not. Results showed that there was no significant statistical association between both variables, in opposition to previous studies. Different factors that might had affected the experiment and thus altered its results are discussed. More research on CAEV infection and its risk factors is suggested. AGIDT use to detect CAEV-antibodies in <3 month-old kids is discouraged.

Key words: Risk Factor, AGIDT, CAEV, seroconversion.

II. INTRODUCCION.

Los factores de riesgo son fenómenos o eventos de cualquier naturaleza, a los cuales se expone el individuo en su ambiente, cuyo efecto puede ser la producción de una enfermedad ya sea por su presencia o por su ausencia. Pueden ser definidos también como cualquier variable que el investigador determina como “relacionada causalmente”(aunque no sea necesariamente una causa directa) y antecedente de un estado de enfermedad, con base en conocimiento o teoría y/o hallazgos previos en investigación (1,2). Los factores de riesgo están positivamente relacionados con el riesgo de desarrollo de una enfermedad, aunque no necesariamente son suficientes para causarla (3).

Cuando el factor de riesgo es conocido como tal, se le llama causa y cuando se sospecha que puede tener alguna relación con un efecto, se le denomina solamente factor de riesgo o factor de exposición, y una vez que deja el nivel de sospecha de que produce el efecto y se comprueba su acción en la producción de éste, a dicho factor pasa se le denomina entonces causal (1,4,5).

Para que un investigador pueda determinar la etiología de una enfermedad, debe identificar los criterios para la clasificación y definición de los factores de riesgo que se cree son responsables, así como conocer sus fuentes, medir su variación, compararlos en varios sujetos y asegurarse de la validez de su comparación (6).

Los factores de riesgo en muchas enfermedades animales son desconocidos o están poco definidos y sólo salen a la luz a través del estudio sistemático de casos que ocurren espontáneamente. Esto puede deberse ya sea a la larga latencia entre la infección y el desarrollo de la enfermedad, la alta prevalencia de factores de riesgo o de la enfermedad, ya que si la enfermedad es común entre una población animal y algunos de sus factores de riesgo son conocidos, se vuelve difícil distinguir un nuevo factor de los ya existentes. Por otro lado, una enfermedad de la que se registran pocos casos no provee al investigador de información suficiente para sospechar que existe una relación de causa y efecto (7)

En epidemiología se pueden realizar estudios en los que se mide la contribución relativa de cada uno de los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de una enfermedad determinada, así como la posible reducción correspondiente en ésta si se elimina cada uno de los factores (3). Sin embargo debe evitarse la confusión entre lo que es factor de riesgo, que es una posible causa o factor que se investiga como responsable de la enfermedad, y el riesgo de la enfermedad, que es la probabilidad de enfermar en un grupo dado (1).

Por otra parte, se conoce como fuerza de asociación a la frecuencia con que aparece o no el factor de riesgo en el caso de presencia o ausencia de la enfermedad (1,4). Así, la magnitud de la asociación observada entre la exposición a un factor de riesgo y la aparición de una enfermedad es útil cuando se quiere probar una hipótesis en un estudio epidemiológico, ya que se obtienen elementos para juzgar la posibilidad de que la exposición por sí misma afecte el desarrollo de la enfermedad y, por tanto de que exista una relación causa-efecto. Esto es, cuanto mayor sea la asociación, es menor la posibilidad de que ésta se deba meramente al efecto de alguna variable desconocida o no controlada, lo cual no implica sin embargo, que una asociación de pequeña magnitud no pueda ser considerada como de causa-efecto (8).

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC), es una enfermedad de curso crónico progresivo que afecta al ganado caprino y que se caracteriza por alteraciones neurológicas, artritis, neumonía intersticial y mastitis intersticial (9,10,11). El agente etiológico de la AEC, conocida también como Leucoencefalomielitis-artritis de las cabras es un virus ARN de cadena simple, perteneciente a la Familia Retroviridae, subfamilia Lentivirinae (11,12,13). El virus de artritis encefalitis caprina (VAEC) fue aislado por primera vez por Crawford en 1980 a partir de la membrana sinovial de cabras con artritis y por Narayan en el mismo año a partir del cerebro de un cabrito con encefalitis y fue reconocido posteriormente como lentivirus por Cork. En México se realizaron trabajos de aislamiento e identificación en

1986 (6,14).

Este retrovirus es una partícula de 90-130 nm. El VAEC tiene 2 subunidades de ARN de banda simple en un complejo de alto peso molecular (15,16); su genoma contiene tres genes que codifican proteínas estructurales:

gag: codifica las proteínas de la cápside (matriz, núcleo y nucleoproteínas).

pol: codifica la Transcriptasa reversa dependiente de Mg.

env: codifica las proteínas de la envoltura viral (proteína de superficie y transmembranales).

Además, el genoma viral contiene dos genes que codifican proteínas reguladoras de la expresión viral, que son los genes tat y rev, y un gen adicional llamado Q o vif, este último es transcrito al final del ciclo viral y sus proteínas están presentes en el citoplasma de células infectadas, y es necesario para la infectividad viral y para la transmisión de la infección, ya sea de célula a célula o del virus en forma libre a la célula (15,16,17).

La envoltura viral deriva de la membrana de la célula infectada y contiene la glucoproteína de superficie gp135 y la glucoproteína viral de envoltura gp 40-45, mientras que el núcleo viral comprende las poliproteínas gag y gag-pol (15).

El virus es difícil de cultivar en laboratorio, debido a que se reproduce lentamente y que sólo se liberan pequeñas cantidades de éste a partir de células infectadas (18). Existen varias cepas del VAEC, las cuales varían en virulencia y antigenicidad, siendo las más comunes la VAEC-Co y la VAEC-63 (6,19).

El VAEC se replica en los macrófagos y monocitos, aunque también infecta linfocitos y puede ser cultivado produciendo altos títulos en tejido sinovial, además ha sido hallado en células epiteliales de las criptas intestinales, túbulos renales y folículos tiroideos (13,20,21).

El VAEC es un inductor pobre de anticuerpos, debido al patrón de glucosilación de la glucoproteína viral de su envoltura. Los ácidos siálicos que se encuentran en la superficie

viral disminuyen la avidéz de unión entre el anticuerpo y el virus (16) . Los anticuerpos o inmunoglobulinas contra el virus tienen como blanco las glucoproteínas de la superficie y transmembranales codificadas por el gen env y su acción está dirigida contra epitopos inmunodominantes (9).

Algunas variedades antigénicas del virus son resistentes a los anticuerpos neutralizantes y se expanden clonalmente generando respuestas inmunes recurrentes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad; de ahí que la variación antigénica sea considerada un componente de la relación virus-hospedador involucrada en la patogenia de la enfermedad (22) . Las células infectadas en estado latente y las que tienen variantes antigénicas del VAEC proveen a éste de una expresión antigénica recurrente lo que provoca a su vez que los niveles de anticuerpos en sangre varíen con el tiempo y de animal a animal (21) . Estos anticuerpos contra el VAEC son muy lentos para causar la inactivación de la infectividad, ya que se necesitan más de 60 minutos a 37 C para causar un 99% de reducción de la infectividad, neutralización que es dependiente de la porción Fc del anticuerpo (16,23).

Un interferón (IFN- γ) único es producido por linfocitos co-cultivados con macrófagos infectados con el virus. Su producción inhibe la replicación viral en macrófagos e induce la expresión de los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) tipo II (Ia) en macrófagos. El IFN causa un posterior aumento de la expresión de este antígeno. La célula virus-positiva e la-positiva está en un estado de constante presentación antigénica, un factor que tal vez perpetua los procesos inflamatorios en el animal (24,25) .

El IFN inhibe la replicación viral frenando la proliferación y maduración de los monocitos, también inhibe el ciclo de replicación del VAEC en macrófagos en la etapa de transcripción del ARN viral y reduce la función de fusión del virus, reduciendo así la eficiencia de su diseminación . Este IFN se produce *in vitro*, aunque ha sido encontrado en líquido sinovial y en otros tejidos infectados. Su composición es la de una proteína no glucosilada y ácido-estable (25).

El IFN retarda la habilidad fagocítica del macrófago e induce la secreción de prostaglandina E2 (PGE2) por parte de los macrófagos, la cual tiene funciones inmunosupresoras, incluyendo la inducción de células del fenotipo supresor-citotóxico y la supresión de la proliferación de linfocitos T. El IFN inhibe, mediante la estabilización de las membranas celulares, la formación de células gigantes multinucleadas, que es un efecto citopático del VAEC y es mediado por la glucoproteína de la envoltura (25).

El IFN tiene efectos positivos y negativos sobre el animal ya que al inhibir la maduración de macrófagos, la replicación viral y la fusión celular, puede regular la replicación in vivo del virus, sin embargo esto puede contribuir al largo periodo de incubación de la enfermedad. Al inducir la expresión del antígeno Ia y de PGE2 no sólo refuerza la capacidad presentadora de antígenos de los macrófagos, sino que contribuye al influjo de las células LT8, que componen una gran parte del infiltrado mononuclear visto en tejidos afectados (25,26).

Por otra parte, el VAEC puede pasar directamente de macrófagos infectados productivamente a células no infectadas vía fusión, y comprometer al sistema inmunitario, por lo que muchas enfermedades en cabras infectadas por VAEC pueden deberse a una depresión de los linfocitos T (24,25,27,28).

La AEC ha sido reportada en varios países, mostrando seroprevalencias variables, que van desde 1.5% en Nueva Zelanda, 31% en Estados Unidos y hasta 80 % reportado en Francia (10,13,29,30). En México, los primeros estudios que se realizaron (1985) demostraron que los sueros de cabras criollas mexicanas fueron negativos en el 100% de los casos, sin embargo la seroprevalencia fue de 27% entre cabras importadas de los EUA (31). Esta enfermedad tiene un impacto económico fuerte en los países donde se presenta. En Suiza por ejemplo, anualmente es eliminado prematuramente entre el 15 y el 20% del total

del hato caprino debido a la AEC, lo que reporta pérdidas cada año por \$ 9 millones (32) .

Las cabras son el principal reservorio del virus (11,20,30) . El papel que juegan los ovinos es aún incierto; sin embargo, la inoculación experimental intra-articular de ovinos con el VAEC produjo artritis y el virus fue aislado de articulaciones inoculadas y no inoculadas hasta por un periodo de 4 meses (13,18) . En la literatura disponible hasta ahora se sugiere que los lentivirus ovinos en Norteamérica y Europa pueden haber tenido su origen en un virus similar al VAEC. En un estudio realizado en ovinos se aislaron virus cuyo ADN tenía una identidad del 86% con el VAEC, mientras que con el virus Maedi-Visna (VMV), la identidad era sólo del 72%. Esto puede deberse a las prácticas de manejo en muchos rebaños ovinos, en los que es muy frecuente el uso de leche de cabra como complemento en borregas que producen poca leche o en el caso de corderos huérfanos (6) .

El principal factor de riesgo asociado a la transmisión de la enfermedad es la alimentación de cabritos con calostro y leche contaminados con el VAEC, ya que un alto porcentaje de cabras infectadas eliminan el virus a través de la leche, tanto en forma libre o en células como linfocitos y macrófagos (33) . El porcentaje de macrófagos infectados en el calostro es mayor que en leche, por lo que se considera al primero como el principal acarreador del virus (34) .

Durante el tercer tercio del gestación se llevan a cabo cambios en la estructura mamaria. El aumento de hormonas lactogénicas estimula el desarrollo de tejido lobular-alveolar, y su efecto sobre las células infectadas en la ubre puede aumentar la expresión viral y estimular el desarrollo de la infección. La inoculación intramamaria de células infectadas con el VAEC lleva a infección generalizada y aparecen rápidamente células infectadas en la leche, inclusive antes de que aparezcan los anticuerpos detectables en la sangre (34) .

También se mencionan el contacto directo con cabras infectadas, secreciones urogenitales, saliva, heces y secreciones del aparato respiratorio como factores de riesgo (19,21,33-38) . El VAEC puede estar presente en la saliva y ser el responsable de hasta el

17% de las seroconversiones cuando la madre limpia al neonato (35) . También se ha sugerido que existe un contagio *in utero*, aunque el tipo de placentación de la cabra (sindesmo-corial) excluye teóricamente la posibilidad de todo contacto entre la sangre fetal y la materna (14) .

El virus también se transmite por vía intramamaria y sangre (19,34) , y se piensa que el uso de agujas hipodérmicas, tatuadores, y material quirúrgico contaminado pueden ayudar a la transmisión del virus (iatrogenias) (18) . De igual forma se menciona que puede existir predisposición genética para el contagio de la enfermedad, ya que se ha notado que las primaras de las razas Saanen y Toggenburg son 2.2 y 3.3 más susceptibles de seroconvertir que las primaras alpinas (13,32) . La edad está asociada al riesgo de seroconvertir en cabras >1 año de edad. Los animales de 3 ó >4 años de edad tienen 1.7 y 3.2 veces más riesgo de seroconvertir que las de 2 años, respectivamente (10,29,37,38) .

Aunque los estudios realizados hasta el momento no indican que pueda darse una transmisión de virus por vía venérea, se ha confirmado la presencia de células infectadas con el VAEC en el moco vaginal de hembras infectadas, en lavados prepuciales y semen de machos, lo que puede aumentar el riesgo de una transmisión por esta ruta (39) .

Al momento del parto, se incrementa la cantidad del virus en sangre debido a un aumento de monocitos sanguíneos. Una semana antes del parto, las células mononucleadas, macrófagos principalmente, afluyen a la glándula mamaria sana o enferma (40) .

Una vez que el cabrito ha ingerido el calostro y/o leche contaminados con el VAEC, el virus es absorbido en el intestino debido a la alta permeabilidad de este órgano en las primeras horas de vida del animal, e invade los leucocitos mononucleares de la sangre periférica, monocitos, macrófagos y linfocitos (14), siendo la dosis mínima infectante oral de 2×10^7 TCID₅₀ (35,39) .

El virus posteriormente infecta en forma consistente al sistema nervioso central (SNC) y las membranas sinoviales, debido posiblemente a la barrera hematoencefálica está mal desarrollada al momento del nacimiento, debido a lo cual puede haber un flujo distinto de leucocitos hacia el cerebro que permita la entrada de grandes cantidades de células infectadas al SNC (12). El VAEC también puede infectar al timo, bazo y linfonódulos (11,13)

La expresión del genoma viral depende del estado de maduración de la célula infectada, es decir que, sólo cuando un monocito infectado madura hacia macrófago, el genoma viral es transcrito, fenómeno conocido como replicación restringida, que permite al VAEC permanecer en los monocitos sin ser detectado por otras células inmunológicas (21,24)

Se calcula que hasta un 70-75% de los animales infectados pueden estar libres de cualquier signo clínico de enfermedad y permanecer así durante toda su vida (18,33,35).

Existen dos formas clínicas de la AEC, la primera aparece en cabritos de 2-6 meses de edad, presentándose con signología nerviosa, caracterizada por una leucoencefalomielitis. Entre el 10 y 15% de los cabritos infectados desarrollan lesiones en el SNC (12). Este cuadro inicia con ataxia o paresia de miembros posteriores, pérdida de condición corporal, pelo hirsuto y opaco y atrofia muscular, sin verse afectado el consumo de alimento. A continuación hay flexión del cuello y movimientos en círculos y pedaleo. En casos avanzados existen trastornos locomotores de miembros anteriores, lo que obliga a una postura de decúbito. La enfermedad generalmente es corta y fatal, aunque en algunos casos puede durar hasta un mes (18), y los pocos cabritos que llegan a sobrevivir muestran deficiencias neurológicas. Algunos cabritos pueden desarrollar neumonía (11,12,31,41).

El diagnóstico diferencial de la enfermedad en cabritos se realiza con otros padecimientos que causan problemas en el SNC como Listeriosis, Polioencefalomalacia, deficiencia de Cobre y Toxoplasmosis (18) .

A la necropsia pueden encontrarse lesiones en el SNC confinadas a la sustancia blanca, representadas por áreas multifocales asimétricas. Hay una infiltración perivascular no supurativa por linfocitos y células de la microglia, originada en las meninges y continúa a los vasos de la sustancia blanca, también hay desmielinización primaria con preservación de axones, con abundancia de células de microglia (células “Gitter”) y astrocitosis (11,12,18,31,36,41).

La segunda forma de la AEC comprende a las cabras adultas, en las que se desarrolla un proceso artrítico, con una aparición repentina o insidiosa. La artritis en estos casos está asociada a reacciones inmunes a antígenos virales, sobre todo a la glucoproteína de envoltura gp135 (9,22) . Los animales infectados pierden peso progresivamente y presentan pelaje hirsuto. Se desarrolla una artritis crónica, con exacerbaciones agudas de dolor, cojera y tumefacción de las articulaciones, especialmente las carpianas, además de otros signos como neumonías intersticiales y mastitis intersticial crónica con hipertrofia de los nódulos linfáticos retromamarios, emaciación generalizada, y anquilosis de los miembros torácicos. El diagnóstico diferencial se realiza con infecciones por *Mycoplasma* y *Chlamydia* (11-13,31,41). Se ha observado que cuando hay infección por VAEC en una cabra, el período de gestación es más corto y los cabritos tienen menor peso al nacimiento, además de que las cabras producen menos leche, lo cual hace que sus crías tengan menores ganancias de peso (27,42) .

La activación crónica de células B es la respuesta inmune dominante en cabras con artritis, mientras que la proliferación de linfocitos T es un componente significativo en la respuesta inmune en cabras que no presentan signos clínicos de AEC (43). La respuesta

inmune del tipo 2 refleja la activación de linfocitos T2 que producen la interleucina 4 (IL-4) y otras linfocinas que promueven la proliferación de células B específicas al antígeno y la producción de IgA, IgE e IgG1, siendo este último el tipo de inmunoglobulinas dominante en la respuesta contra el VAEC (43) .

Aunque las infecciones por lentivirus son “infecciones lentas”, en el sentido de que el lapso entre la infección y el desarrollo de la enfermedad puede ser largo (meses o años), la evidencia muestra que las lesiones patológicas aparecen tan solo unos días postinfección (12).

Al realizar la necropsia, se ha hallado que hasta el 50 % de las cabras adultas desarrollan lesiones subclínicas en el SNC (12), a su vez, las lesiones en las articulaciones varían de acuerdo a las condiciones de campo, edad y duración de la enfermedad clínica. En los animales jóvenes hay una sinovitis difusa crónica de la cápsula articular del carpo (20,21,31,41) . También puede presentarse una osteoporosis, lo que lleva a un colapso de las estructuras óseas subarticulares y deformación de las articulaciones. En el cartilago articular se producen alteraciones dadas por lesión vascular e inflamación (18) .

Microscópicamente se observa hiperplasia de células subsinoviales, inflamación subsinovial de células mononucleares, hipertrofia de las vellosidades, concreciones de fibrina y necrosis (21), y pueden haber osteofitos en las articulaciones carpianas (18) .

En los pulmones puede haber desde una neumonía intersticial discreta, hasta una severa, con marcada hiperplasia linfoide en septos alveolares y áreas perivasculares, con pleuritis fibrinosa ocasional (41) . Se piensa que tal vez se requiera de algún otro microorganismo que interactúe con el VAEC para poder generar lesiones en el pulmón . Estos aparecen de un color rosa-gris con focos blancos y no se colapsan, siendo los lóbulos caudales los más afectados (21) .

En la glándula mamaria se observa una infiltración intralobular extensiva por linfocitos entre los acinis, así como marcada hiperplasia linfoide adyacente que se protruye a los ductos lactíferos, lo que permite el egreso de leucocitos infectados al calostro y leche (12). La densidad de los infiltrados puede variar y llegar a ser nódulos linfocitarios más o menos organizados y pueden ser intralobulares o periféricos a los canales galactíferos. Puede presentarse una agalactia debida al bloqueo de los canales por la acumulación de linfocitos y fibrina (40). El parénquima mamario aparece indurado uniformemente y se observa una hipertrofia de linfonódulos retromamarios. No se modifica en aspecto de la leche. Además, las mastitis pueden recidivar en lactancias posteriores (14). También se ha notado que la infección por CAEV aumenta la susceptibilidad a infecciones bacterianas secundarias en la ubre (42,44).

También pueden encontrarse lesiones en otros órganos como riñones, donde hay glomerulonefritis difusa con depósito de amiloide en los glomerulos, puede haber hiperplasia de linfonódulos, necrosis y mineralización del músculo esquelético, principalmente el cuadriceps y el bíceps femoral, calcificación de arterias y amiloidosis en bazo y sinusoides hepáticos (18,41).

Otras lesiones menos frecuentes son pericarditis, pleuritis, células gigantes de cuerpo extraño, nefritis intersticial no supurativa e infiltración linfocitaria marcada en el intestino, riñones, pulmones y glándulas tiroideas (21).

El diagnóstico de la enfermedad en el laboratorio se realiza por pruebas como la inmunodifusión en agar gel (AGIDT); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), Westernblot, Radio Inmuno Análisis (RIA), la Reacción en cadena de polimerasa (PCR) o a través del aislamiento viral en cultivo de tejidos. (45,55).

Debido a que la infección por el VAEC persiste durante el resto de la vida del

animal, la presencia de anticuerpos, en términos generales puede considerarse como evidencia de infección (39) .

La AGIDT es una prueba sensible y muy específica comparada con otras. La prueba que utiliza la glucoproteína de superficie gp135 es más sensible que la que usa la proteína del núcleo p28 (48) . Sin embargo, la AGIDT tiene algunos inconvenientes que pueden presentarse, como resultados falsos negativos por bajos niveles de anticuerpos que puedan hacer evidente una reacción antígeno-anticuerpo, también por el período de latencia o incubación del virus o por una seroreactividad intermitente (38) . Se pueden presentar resultados negativos intermitentes en la prueba de inmunodifusión en gel de un animal positivo, por ejemplo animales que den resultados positivos a los 30 y 60 días pero den uno negativo a los 85 días (33,20) . Los resultados positivos en cabritos de <90 días de edad pueden reflejar una transferencia pasiva de anticuerpos por el calostro (39) .

Se pueden detectar anticuerpos a partir del día 21-35 post-infección usando la prueba de ELISA, los cuales alcanzan su máximo a los 49-77 días, para declinar hasta los 271 días (36,41, 50-52) . La prueba de ELISA es usada rutinariamente en Nueva Zelanda para la acreditación de rebaños libres de VAEC (54) . Es una prueba sensible, específica, rápida y puede ser semiautomatizada, por lo que puede servir para analizar grandes cantidades de muestras (54,56) . También se ha desarrollado una ELISA que utiliza la leche, lo cual es más fácil y barato que la obtención del suero, pero tiene como desventaja que el exceso de grasa en la leche de la cabra puede generar resultados falsos positivos (56) . También se pueden usar proteínas recombinantes de lentivirus ovino con una ELISA para el diagnóstico de infección por VAEC, obteniendo sensibilidad y especificidad similares a la ELISA-VAEC, con una concordancia del 89.3% (45) .

La prueba de PCR ha probado tener una sensibilidad del 91% y especificidad del 97% (53,55).

Una alternativa de laboratorio para el diagnóstico de la infección es el uso de antígenos recombinantes de parte del genoma del VAEC, usando partes de los genes gag y el env como proteínas de fusión para expresar en la bacteria *E. coli* y usando la prueba de ELISA(15).

El tratamiento contra la AEC no ha sido exitoso y sólo mejora algunos de los signos clínicos. La forma artrítica puede ser tratada colocando abundante cama y administrando ácido acetilsalicílico o corticosteroides (18) . Se han desarrollado vacunas pero sus resultados han sido desalentadores. En un estudio se usó una vacuna (rWR63) expresando glucoproteínas codificadas por el gen 63 de la envoltura. Todos los animales desarrollaron anticuerpos, pero estos no eran protectores (9) .

Los programas de control de la AEC se han centrado en tratar de formar “rebaños libres” del VAEC, mediante un programa que consiste en separar a los cabritos de sus madres desde el nacimiento y alimentarlos con calostro calentado a 56 C durante una hora (con lo cual se logra la inactivación viral), con calostro congelado de cabras negativas, calostro y leche de vaca o bien con sustitutos lácteos, lográndose importantes reducciones en la seroprevalencia, mas no la erradicación de la enfermedad, dado que se estima que los factores de riesgo distintos al consumo de calostro y leche contaminados con el VAEC pueden ser responsables de hasta un tercio de las infecciones (33,35) .

Se deben hacer muestreos cada 6 meses en el rebaño usando la prueba de inmunodifusión en gel agar para identificar animales seropositivos y proceder a separarlos del rebaño (19,20,37,38) . Se recomienda además llevar a cabo la pasteurización de la leche con que se alimentará a los cabritos (57) .

En Francia se realizó un estudio entre 1988 y 1990 en el que se logró reducir la seroprevalencia del 49.5% al 25% basándose en el método de alimentación con calostro

tratado térmicamente y leche pasteurizada (19) .

En México se han propuesto medidas para controlar y eventualmente erradicar la AEC del país. El Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal(CONASA) propone: El montaje de la prueba AGIDT en diversos laboratorios del país, difusión de información a técnicos y productores, declarar la campaña y prohibir la importación de animales afectados o seropositivos, realizar encuestas seroepidemiológicas en áreas de riesgo, promover procedimientos de control (eliminación de reactores, lactancias artificiales), control de ventas y de tránsito de reactores hembras para la cría y control en ferias y exposiciones ganaderas (58) .

Para poder llevar a cabo el control y eventual erradicación de la AEC en nuestro país, es preciso realizar estudios epidemiológicos para conocer de manera precisa qué factores participan en la diseminación de la enfermedad dentro del rebaño caprino nacional y saber también la importancia relativa de cada factor en el contagio del virus, de tal forma que se puedan diseñar programas enfocados de manera eficiente a evitar la presencia de tales factores y así disminuir la prevalencia de la infección. De tal manera que, en el presente estudio se buscó conocer la importancia del factor de un factor de riesgo, como es el consumo de calostro y leche contaminados con el virus, en la transmisión del VAEV.

III. HIPOTESIS.

IV. OBJETIVOS GENERALES.

HIPOTESIS:

Existe una fuerza de asociación significativa entre el consumo de calostro y leche contaminados con el VAEC y la seroconversión en cabritos.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la fuerza de asociación entre el factor de riesgo ingestión de calostro y leche contaminados con el virus de AEC y la seroconversión en cabritos.

V. MATERIAL Y METODOS.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Producción, Investigación y Extensión Rumiantes (CEPIER), dependiente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en la carretera a Topilejo, Tlalpan, Distrito Federal, que pertenece a la región climática Cw (Sub-húmedo templado con una temperatura media anual entre 12 y 18 °C).

Se utilizaron los cabritos (n=43) nacidos en los meses de febrero a mayo, cruza de las razas Alpina Francesa, Toggenburg, Saanen, Anglo-Nubia, Boer y Murciano-Granadina.

Se alimentó a los animales bajo un sistema de lactancia artificial, proporcionando leche o sustituto, dependiendo del grupo a que pertenecían, dos veces al día. A las cuatro semanas de vida se inició la alimentación sólida a base de alfalfa y concentrado a libre acceso. Al inicio de la lactancia fueron alojados en corraletas para 5 animales. Cuando los animales alcanzaron las dos semanas de edad se sustituyeron las corraletas por rodetes provistos de cama de paja. Los cabritos finalizaron su lactancia al alcanzar los 10 kg de peso vivo.

Los cabritos fueron divididos en cuatro grupos, dependiendo de la seropositividad o seronegatividad de la madre, de los cuales dos grupos fueron enfrentados al factor de riesgo consumo de calostro y leche presumiblemente contaminados con el VAEC (33,40); y los otros dos se alimentaron con calostro sometido a tratamiento térmico (56 °C/1hr.), leche pasteurizada (63 C/ 30 min.) y sustituto de leche comercial para becerros, con el fin de comprobar la efectividad en la transmisión del virus por este medio. La asignación de los grupos se realizó mediante muestreo aleatorio simple balanceado por sexos (59,60).

Grupo 1 (n=6): Hijos de cabras seropositivas alimentados con calostro y leche de madres seropositivas (sin pasteurizar).

Grupo 2 (n=15): Hijos de cabras seronegativas alimentados con calostro y leche de madres seropositivas.

Grupo 3 (n=11): Hijos de cabras seropositivas alimentados con calostro y leche de madres seronegativas (pasteurizada las primeras dos semanas y posteriormente sustituto).

Grupo 4 (n=10): Hijos de cabras seronegativas alimentados con leche de madres seronegativas.

Debido a que se calcula que las vías de transmisión del VAEC distintas a la ingestión de calostro y leche contaminados pueden ser responsables de hasta un 31% de todos los contagios, se tuvo cuidado en controlar estos factores, como separar a los cabritos de sus madres inmediatamente después del nacimiento, separando las membranas, colocando barreras físicas que separaran a los corrales de los cabritos hijos de hembras seropositivas de los hijos de las seronegativas y utilizando material de manejo y alimentación distinto para cada grupo, disminuyendo así el riesgo de un contagio por otras formas distintas a la ingestión de calostro y leche contaminados con el VAEC.

Se obtuvieron muestras de sangre extraída de la vena yugular, al mes, tres y seis meses de edad de los cabritos, las cuales fueron evaluadas con la prueba de inmunodifusión en agar gel (AGID), con antígeno específico de AEC, siguiendo el método que aparece en el Anexo (50).

La información obtenida fue evaluada mediante análisis estadístico descriptivo, cálculo de riesgo (riesgo relativo, riesgo atribuible) y pruebas de independencia (X^2) para determinar el efecto del consumo de leche de hembras seropositivas sobre la seropositividad en cabritos (1,8,59).

VI. RESULTADOS.

Los cabritos tuvieron un peso promedio de 2.62 kg (1.8-3.5kg) al nacimiento, siendo el peso promedio para los machos de 2.73 kg (2-3.5kg), y el de las hembras de 2.52 kg (1.8-3.3 kg).

Los resultados del estudio fueron expresados en tablas de contingencia (2 x 2). De los 43 cabritos que entraron al estudio inicialmente, 8 (18.6%) murieron antes del primer mes de edad. De los animales que fueron muestreados al primer mes de edad (n=35), 21 de ellos pertenecían a los grupos expuestos al factor de riesgo y los restantes 14 a los grupos alimentados con sustituto para becerros y leche pasteurizada.

De los cabritos del grupo 1 (n=6), uno (16.6% del grupo) seroconvirtió al primer muestreo. Del grupo 2 (n=15), 20% del grupo resultó positivo a AGIDT. En el grupo 3 (n=6) 16.6% dio positivo y en el grupo 4 (n=8), 37% resultaron seropositivos.

De tal forma que, al primer mes de edad, de los 21 animales expuestos al factor de riesgo, 4 (11% del total de cabritos), seroconvirtieron y los restantes 17 permanecieron negativos. Por su parte, de los animales no expuestos al factor de riesgo (n=14), 28% dieron positivos. Sumando los animales seropositivos de los cuatro grupos se obtiene una seroprevalencia de 22% (8/35).

En este muestreo el riesgo relativo (Rr) fue de .67. Este resultado indica que los cabritos expuestos al factor de riesgo (FR) tuvieron menores probabilidades de serconvertir en relación con aquellos que no fueron expuestos. Por su parte, el riesgo atribuible (RA) tuvo un valor negativo de -.09 y un porcentaje también negativo de -.47.36%, lo que significa que el FR tuvo una asociación negativa con la seroconversión. El resultado de X^2 para la prueba de independencia (1gl, $\alpha = .95$), fue .432, mientras que el valor tabulado era de 3.841 ($p > 0.05$), lo cual debe ser interpretado como que, al no ser rechazada la hipótesis nula implícita en la prueba de independencia, entonces la exposición al FR y la seroconversión son fenómenos independientes uno del otro.

En el segundo muestreo participaron 34 cabritos, 21 de los cuales fueron expuestos al factor

de riesgo, presentándose una seroprevalencia de 11%, de los cuales 5.9% fue expuesto al factor. La prevalencia entre los animales que consumieron leche contaminada con VAEC fue de 9.59%, mientras que entre los no expuestos fue de 15.4%.

Entre el primero y el segundo muestreo (3 meses de edad), se presentó una mortalidad de 1 cabrito (2.8%) en el grupo 4.

El grupo 1 siguió con un animal positivo (16.6% del grupo). Por su parte, el grupo 2 mostró positivo 6% del grupo, ya que dos de los 3 animales que habían dado positivo al mes de edad dieron negativos en esta ocasión.

En el grupo 3 se presentó seropositivo 16.6% del grupo, mientras que en el grupo 4 un animal se mantuvo seropositivo. Del total de animales que fueron alimentados con sustituto, 2 fueron positivos, el 6% del total.

El R_r tuvo un valor de .61, indicando que en este muestreo los cabritos expuestos al FR tuvieron también menores probabilidades de seroconvertir en comparación con los no expuestos. A su vez, el RA dio -.059, y porcentualmente dio -62.1% , esto representa que existe una asociación negativa entre exposición al FR y la seroconversión. El resultado de la prueba de X^2 fue .265, de tal suerte que se dice que no existe asociación estadística entre el factor de riesgo y la seroconversión.

Entre el segundo y el tercer muestreo (6 meses de edad) se presentó una mortalidad de 2.9% (1/34). En el grupo 1 ningún animal resultó seropositivo a la prueba de AGIDT. El único animal que había dado positivo en muestreos anteriores dio negativo en esta ocasión.

En el grupo 2 dio positivo 13% del grupo, de los cuales uno apareció como seropositivo por primera vez y el otro se mantuvo positivo en los tres muestreos. En el grupo 3 no se presentaron cabritos seropositivos, ya que el único animal que había seroconvertido en ocasiones anteriores, ahora dio negativo. En el grupo 4 se presentó un animal seropositivo (16.6 % del grupo), el cual había dado positivo en el primer muestreo y después negativo en el segundo.

En el muestreo de los 6 meses de edad, en los grupos de animales alimentados con leche contaminada con el VAEC se tuvo una prevalencia de 9.5%, mientras que en los no expuestos fue de 8.3%, de tal forma que la seroprevalencia general fue de 9.1%, de los cuales el 6% fue de los grupos 1 y 2.

El Rr fue de 1.14, mostrando aquí ya una mayor probabilidad de seroconversión en los animales expuestos en comparación con los no expuestos. El RA fue de .012, mostrando ya una pequeña asociación positiva entre exposición al FR y la seroconversión. El resultado de la prueba de X^2 fue de .013, lo que comparado con el valor tabulado (3.841) nos indica que a este nivel no se puede rechazar la Hipótesis nula.

VII. DISCUSSION.

Se pretendió corroborar que los cabritos detectados seropositivos al mes de edad coincidieran con los de los tres meses, lo que indicaría que es posible detectar a los animales positivos antes de los tres meses, con lo que se podrían eliminar los animales seropositivos a una edad más temprana dentro de un programa de control y erradicación de la enfermedad dentro de un rebaño.

Cabe aquí señalar sin embargo, que los resultados obtenidos al primer muestreo marcan que no hay asociación estadística entre el factor de riesgo y la seroconversión, por lo que se les considera como eventos independientes. Además resulta curioso observar que en los grupo 3 y 4, que teóricamente debían resultar negativos (en especial el grupo 4) se presentara una seroprevalencia mayor que en los grupos 1 y 2. Es importante destacar respecto del segundo muestreo que de los 4 animales seropositivos, la mitad se presentaron en los grupos no expuestos, aun cuando el tamaño de ambos grupos era menor que el de los de animales expuestos al factor de exposición.

Estos resultados contrastan con los de los realizados por otros autores y que se encuentran en la literatura disponible, en donde se detectó una fuerte asociación estadística entre la exposición al factor de riesgo y la seroconversión. En un estudio realizado en California, EUA se observó que las cabras que fueron alimentadas con leche no pasteurizada tenían entre 2.5-6.7 veces más riesgo de seroconvertir que aquellas alimentadas con leche pasteurizada, al cumplir un año de edad, contando con el 61.6-85% de las seroconversiones (37). Sin embargo, resulta difícil poder hacer comparaciones de este estudio con otros publicados, ya que no existen referencias disponibles sobre estudios en cabritos menores a tres meses de edad.

Cabe señalar que las muertes de cabritos antes del mes de edad se presentaron en los grupos alimentados con sustituto comercial, debido a que éste provocó problemas de timpanismo ruminal y abomasal. Esta alta mortalidad en los animales no expuestos al virus, pudo haber sido una posible causa de distorsión de los resultados.

Lo que salta a la vista es el hecho de que los grupos que supuestamente consumieron alimento libre de VAEC (grupos 3 y 4), fueron los que tuvieron una mayor seroprevalencia, comparados con los que sí consumieron alimento contaminado con el virus. Especialmente destacado el grupo 4, que estaba constituido con cabritos hijos de madres seronegativas y que, además, como ya se mencionó, fueron alimentados con calostro, leche y sustituto comercial que estaban libres del VAEC. Este grupo fue el que mayor seroprevalencia mostró al momento de realizar el primer muestreo (1 mes de edad), y se mantuvo alta en el segundo y el tercer muestreo.

Entre las posibles causas de los resultados obtenidos se pueden mencionar, probables falsos negativos debidos a la sensibilidad y especificidad de la AGIDT. Hay que mencionar que la prueba de AGIDT tiene una sensibilidad del 56% usando el antígeno OPPV-CAEV-AGIDT y de 91% en el caso del antígeno CAEV-AGIDT (32), por lo que es probable que algunas hembras negativas, estuvieran infectadas con el VAEC. Por otro lado, si bien se puso especial atención en inactivar el virus en el calostro y la leche a través de la pasteurización para la alimentación de los grupos 3 y 4, podría haberse dado el caso de que algunas partículas virales hayan permanecido con capacidad infectante (33).

Otra razón que podría explicar los resultados fue el hecho de que la prueba AGIDT es una prueba cualitativa y la lectura de sus resultados se realiza de manera visual, de tal suerte que pudieron presentarse sueros en que se formaran líneas de precipitación demasiado tenues para ser apreciadas a simple vista.

Muchos cabritos dieron positivos en el primer muestreo, pero posteriormente dieron resultados negativos, lo que pudo deberse a que el calostro con que fueron alimentados contenía probablemente IgG's anti-VAEC pero tal vez el virus no fue eliminado por esa vía o se encontraba en una concentración baja, por lo que pudo darse un resultado falso positivo.

No se debe olvidar que los factores de riesgo distintos a la ingestión de calostro y leche infectados con el VAEC pueden ser responsables hasta de un tercio de las seroconversiones (56). Solamente el hecho de que la hembra lama a su crío tras el nacimiento puede ser

responsable de hasta un 17% de las seroconversiones, debido a la presencia del virus en la saliva, por ello no debe descartarse esta razón como una causa de las seroconversiones (35). Tampoco debe olvidarse otras vías posibles de transmisión del VAFC, como lo es el contagio *in utero*, o por contacto con fluidos maternos en el canal cervical al momento del parto. Las iatrogenias pueden también desempeñar un papel importante en la transmisión del virus. Asimismo se ha reportado seroconversiones de hasta el 15% en cabritos que no fueron alimentados con leche de cabra (35). Por otra parte, se han reportado casos en que un 10% de cabritos menores de 6 meses de edad, alimentados con calostro y leche pasteurizados, presentan resultados positivos a AGIDT, cuyo origen fue “inexplicable”(39).

La baja seroprevalencia en los grupos alimentados con leche y calostro no pasteurizados pudo deberse a que, al momento de alimentar a los cabritos, la leche de las cabras positivas (se presume que una alta proporción de ellas eliminaba al virus) era mezclada con la de las cabras negativas, lo que hacía que se diluyera la concentración del virus en la leche y, por lo tanto que los cabritos no consumieran una cantidad suficiente de éste para ser infectados (la dosis oral mínima infectante es de 2×10^7 TCID₅₀). Esta práctica de mezclar leche de hembras positivas con la de las negativas tuvo como finalidad el reproducir las prácticas de manejo de granjas comerciales donde se realizan lactancias artificiales, de tal manera que los resultados pudieran ser considerados como obtenidos “bajo condiciones de campo”.

También debe tomarse en cuenta que, al tratarse de una infección por un lentivirus, el tiempo que se tardan los animales en seroconvertir puede variar de meses a años, lo que puede dar resultados falsos negativos (35). Tampoco se debe olvidar que en el caso de este virus pueden presentarse resultados que sean intermitentes usando la prueba AGIDT, es decir, que en una ocasión den positivos y a la siguiente negativos y viceversa, sin que esto signifique que los animales dejen de estar infectados al dar un resultado negativo (22).

Los resultados positivos a AGIDT obtenidos al primer muestreo pueden estar relacionados con la presencia de anticuerpos calostrales en la sangre de los cabritos.

Otro factor que hizo difícil el hacer comparaciones más precisas entre los distintos grupos que integraron el estudio, fue la diferencia en el tamaño de los mismos, originada como ya se dijo, por la alta mortalidad en los grupos 3 y 4.

Ocasionalmente un animal muy joven alimentado con calostro tratado térmicamente que contenga anticuerpos anti-VAEC puede resultar débil positivo y después negativo debido a la declinación de la cantidad de anticuerpos adquiridos pasivamente, usando la prueba de ELISA; sin embargo esto es poco comun usando la prueba AGID (46) .

VIII. CONCLUSION.

Los resultados obtenidos contrastan con la literatura disponible hasta el momento. Es posible que otros factores de riesgo distintos al consumo de calostro y/o leche contaminados con el VAEC hayan intervenido y sean por ello, fuente de sesgo.

No se considera aconsejable el uso de la AGIDT para la detección de infección por el VAEC en cabritos menores de tres meses de edad, debido a que los resultados no son concluyentes acerca de la utilidad de usar esta prueba a esa edad, ya que pueden estar afectados con los niveles de anticuerpos calostrales.

Se considera importante realizar estudios posteriores en que se analicen los distintos factores de riesgo involucrados en la transmisión del VAEC, bajo las condiciones en que se realiza la producción caprina en nuestro país, ya que la literatura disponible hace referencia a sistemas de producción que casi no se presentan en México y, por lo mismo, la utilidad de sus resultados tienen un alcance limitado dentro de la caprinocultura nacional. Hasta el momento se desconoce qué porcentaje de animales seropositivos al VAEC eliminan también el virus en la leche, ni en qué cantidades, por lo que se necesitaría realizar un estudio al respecto para determinar de manera más precisa la importancia de la leche y el calostro en la transmisión del VAEC.

Asimismo, sería recomendable contar con tamaños de muestras más representativas de la población caprina que se encuentra en México y de su distribución geográfica. Sería útil realizar estudios de largo plazo, con el fin de observar el comportamiento de la seroprevalencia con el tiempo y la intermitencia de los resultados positivos a lo largo de la vida del animal, así como conocer mejor la evolución de la enfermedad a través de la vida de un individuo.

Sería útil conocer la presencia geográfica de la enfermedad, con el fin de establecer controles eficientes y así poder llevar a cabo campañas exitosas de erradicación de la enfermedad.

También sería interesante realizar estudios para conocer qué serotipos del virus se encuentran en nuestro país.

Se aconseja el utilizar pruebas diagnósticas estandarizadas con mayor grado de sensibilidad y especificidad, como ELISA y PCR, para la detección de animales infectados con el virus , disminuir el número de animales falsos negativos y poder combatir mejor la diseminación de la enfermedad.

ANEXO . PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN GEL AGAR (AGIDT)

El antígeno para la prueba de inmunodifusión contiene dos glucoproteínas que reaccionan con los anticuerpos contenidos en el suero testigo positivo para formar líneas específicas de precipitación en la prueba de inmunodifusión en gel agar. En esta prueba se forma una reacción de precipitación entre la glucoproteína del antígeno y sus anticuerpos séricos específicos, visible entre el pozo del antígeno y el del suero problema.

El procedimiento para la realización de la AGIDT fue el siguiente:

1. Se preparó un buffer borato usando:

- Acido bórico.

- Hidróxido de Sodio.

- Agua destilada/desmineralizada.

- HCl (6.7N) para ajustar el pH a 8.6

2. Se preparó una solución de agarosa al 0.8% con el buffer borato.

3. Se puso el gel en una caja de Petri.

4. Una vez solidificado el gel, se cortaron 7 pozos, dispuestos a 2.4 mm de distancia unos de otros y con un diámetro de 5.3 mm. En cada pozo se colocaron 50 µl tanto de antígeno como de testigos positivos y sueros problema (ver esquema 1).

Se dejaron los platos por 24 horas a temperatura ambiente. Se realizó una lectura preliminar usando una fuente de luz intensa para observar minuciosamente cada pozo. Se dejó otras 24 horas a 2-8 °C.

Los resultados posibles son los siguientes (Esquemas 2 y 3):

Negativo: Se forman líneas de referencia, que se extienden hasta el pozo de la muestra problema sin formar una curva o gancho al final del lado del pozo.

Positivo:

1. Se forma una línea continua desde el suero problema hasta el testigo positiva a mitad de la

distancia entre el pozo del suero y el antígeno.

2. Se forma una línea independiente entre el suero y el antígeno.

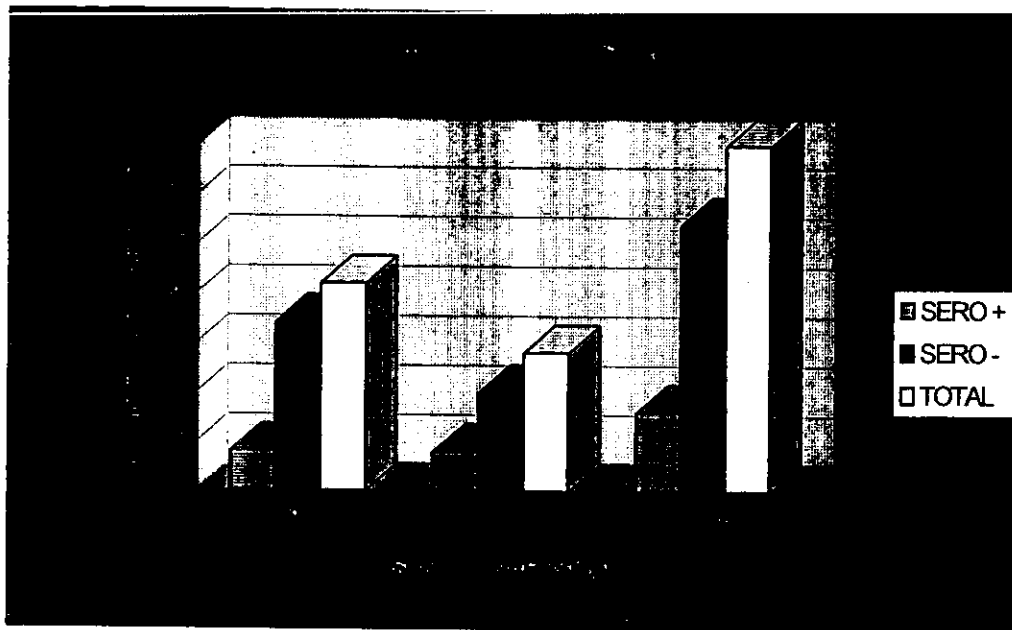
3. Las dos líneas están presentes.

Débil positivo: Parece negativo, pero presenta un gancho al final del lado del suero. Estos sueros deben volver a ser sometidos a AGIDT.

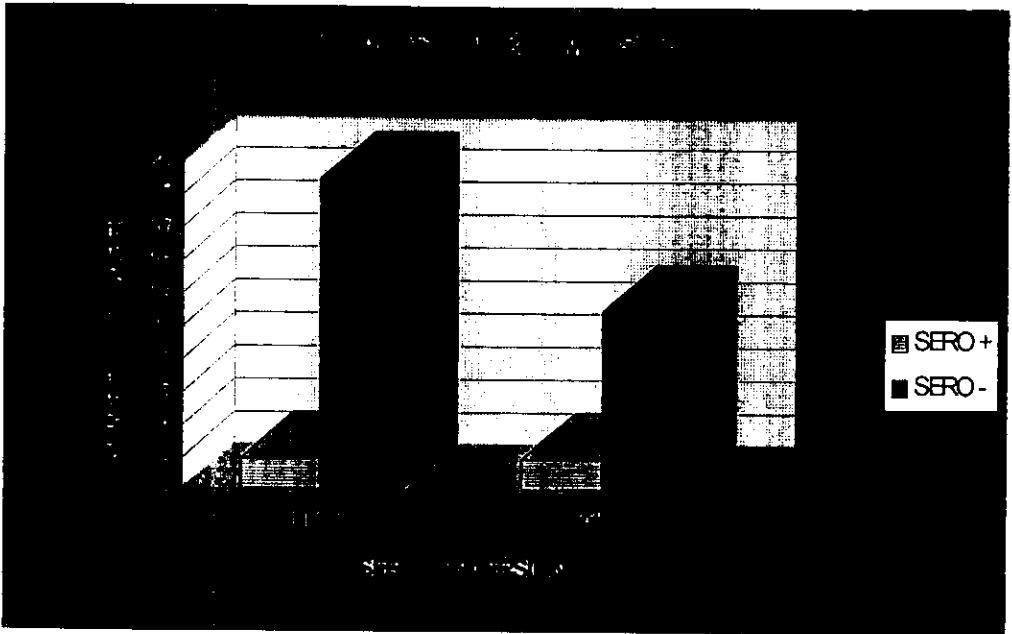
Líneas no específicas: Cuando las líneas no están claras a las 48 horas o cuando se forman líneas pero no son las diagnósticas (47,50).

Aunque la prueba AGID-VAEC tiene una menor sensibilidad (91%) que otras pruebas como la ELISA-VAEC (95.2%) (46,48), generando un mayor número de falsos negativos, los cuales pueden deberse a error humano, estado latente de la infección o por niveles insuficientes de anticuerpos para formar líneas de precipitación visibles (49), es una técnica accesible, barata y fácil de realizar en comparación con ELISA y permite a los productores tener un panorama de la presencia del VAEC en su rebaño (46,48-52).

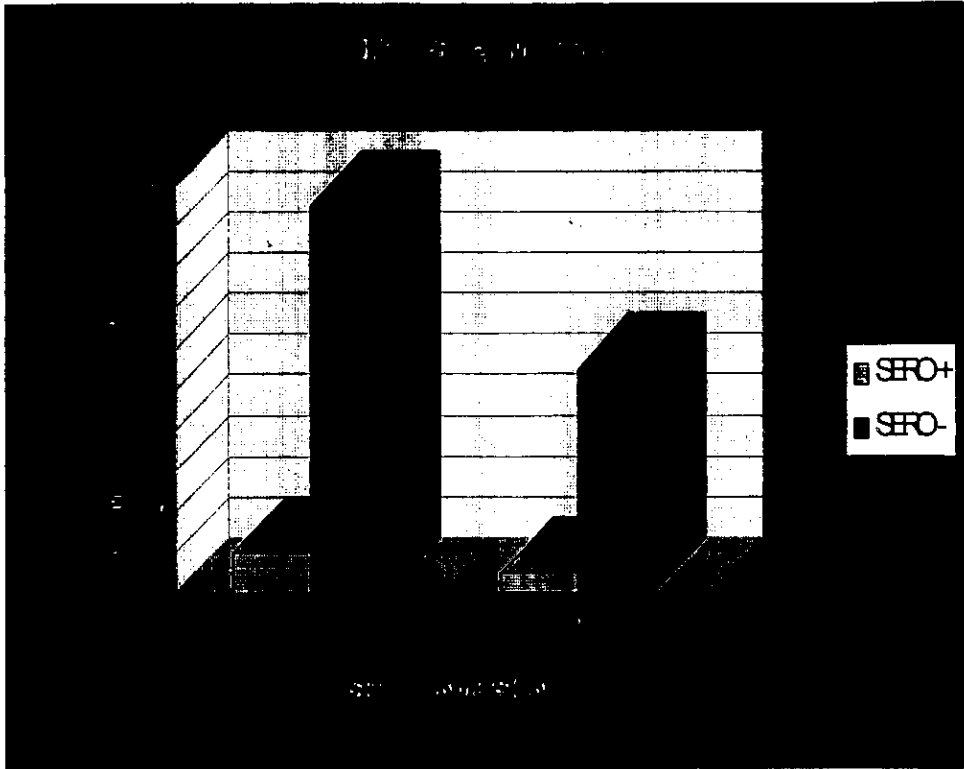
GRAFICAS.



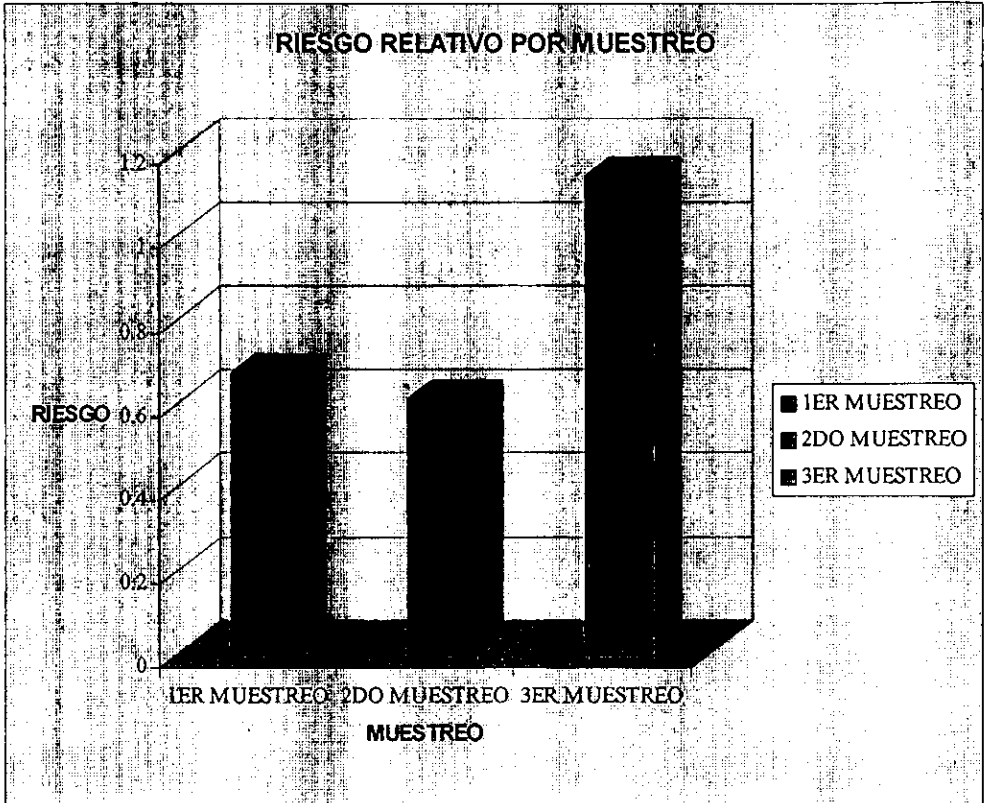
Gráfica 1. Número de cabritos que seroconvirtieron en el primer muestreo, donde FR+ son los animales expuestos al factor de riesgo y FR- son los cabritos alimentados con leche libre del virus.



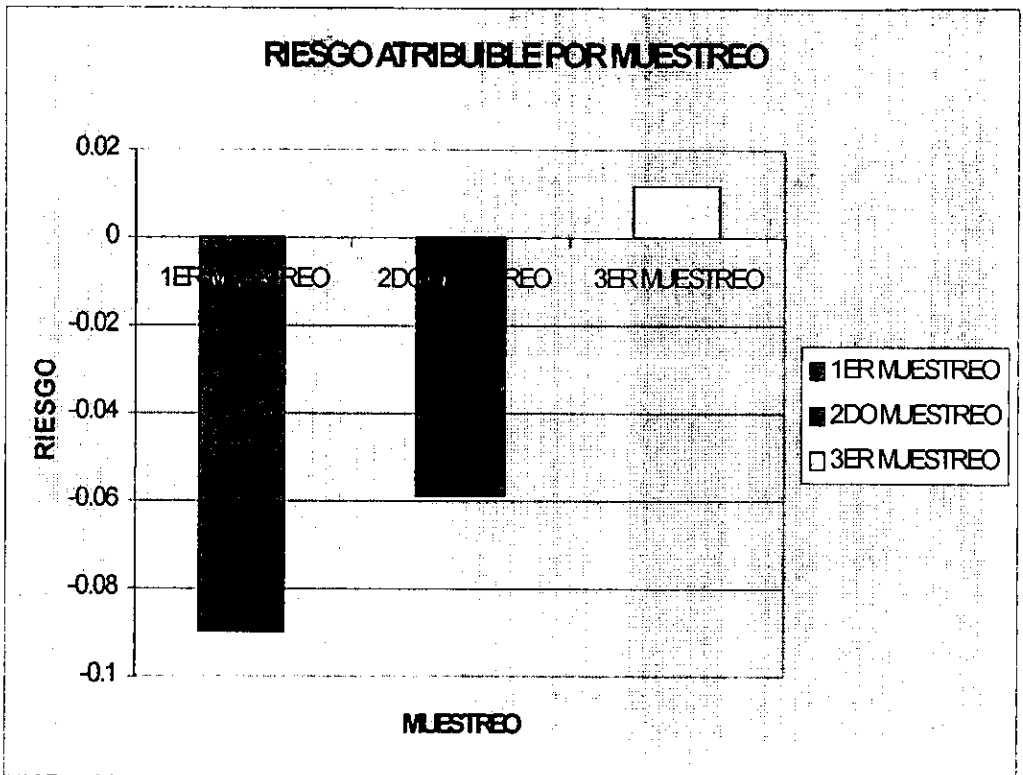
Gráfica 2. Animales seropositivos y seronegativos en el segundo muestreo, tanto del grupo expuesto al factor de riesgo (FR+) como del que no lo estuvo (FR-).



Gráfica 3. Animales seropositivos y seronegativos, por tipo de alimentación, donde FR+ son los expuestos al factor de riesgo y FR- los no expuestos.



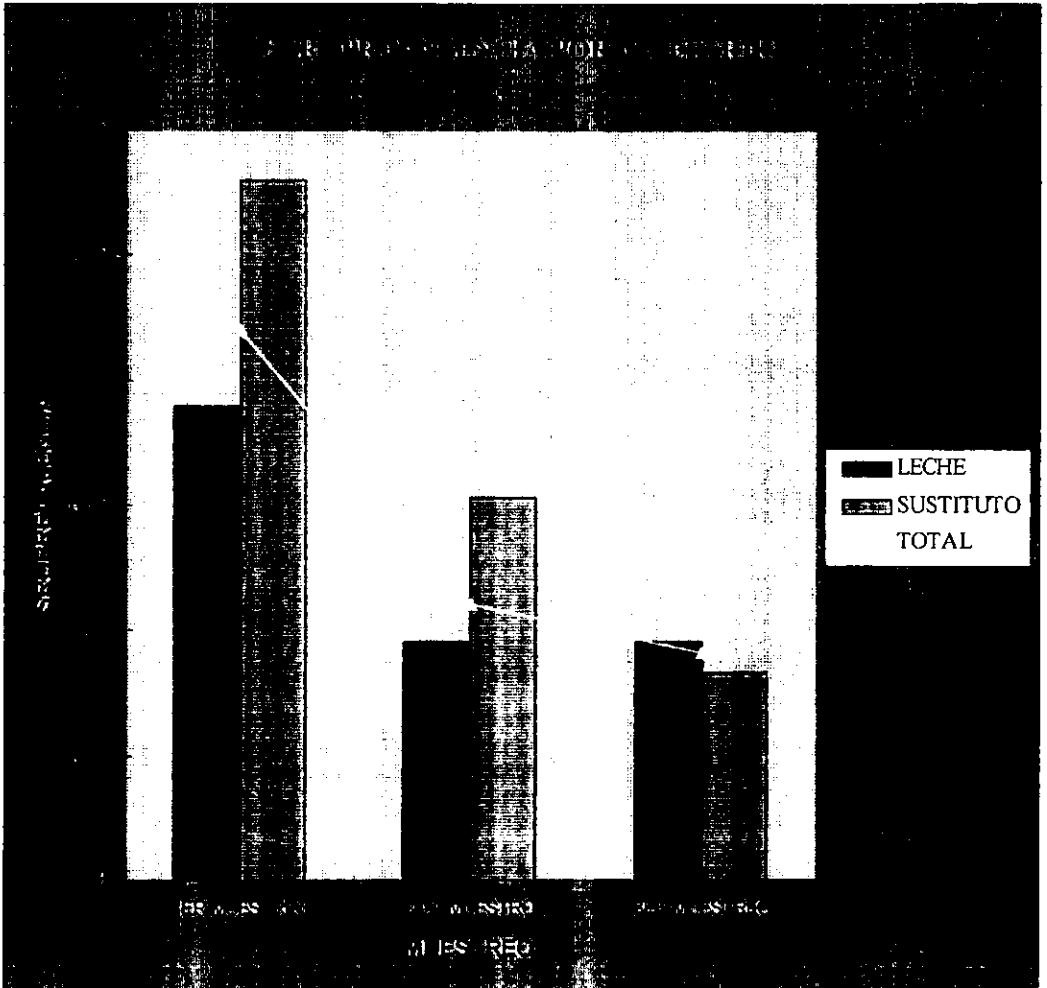
Gráfica 4. Riesgo relativo por muestreo.



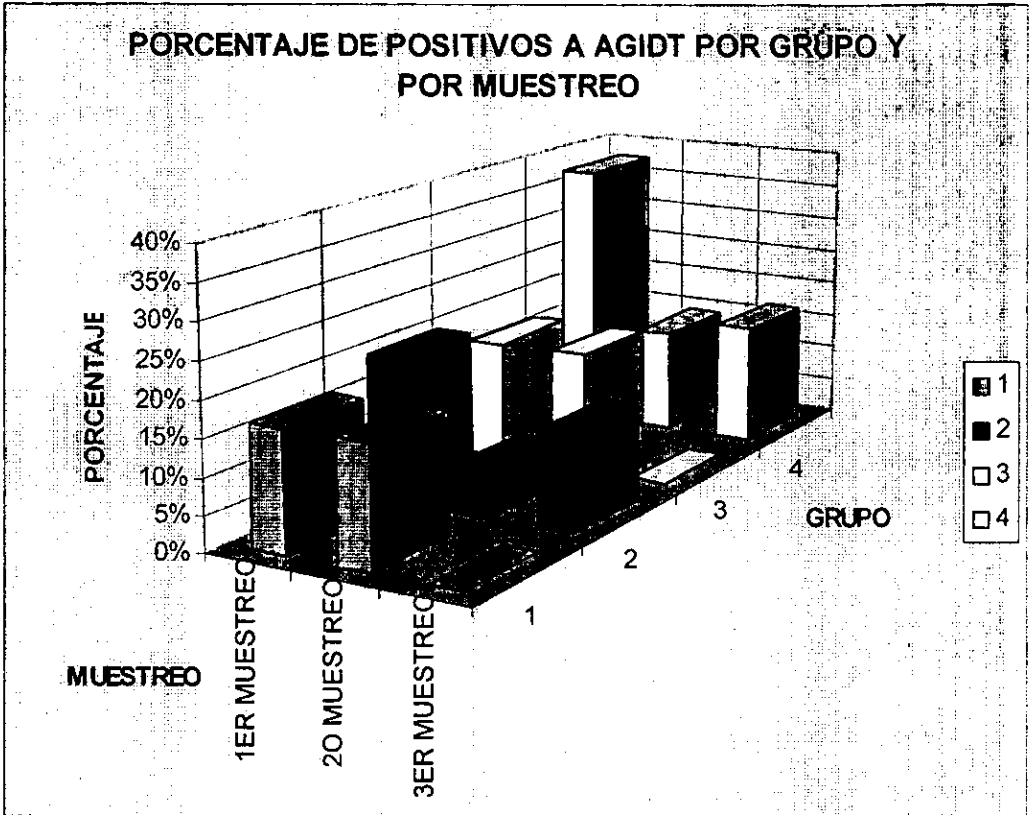
Gráfica 5. Riesgo atribuible por muestreo.



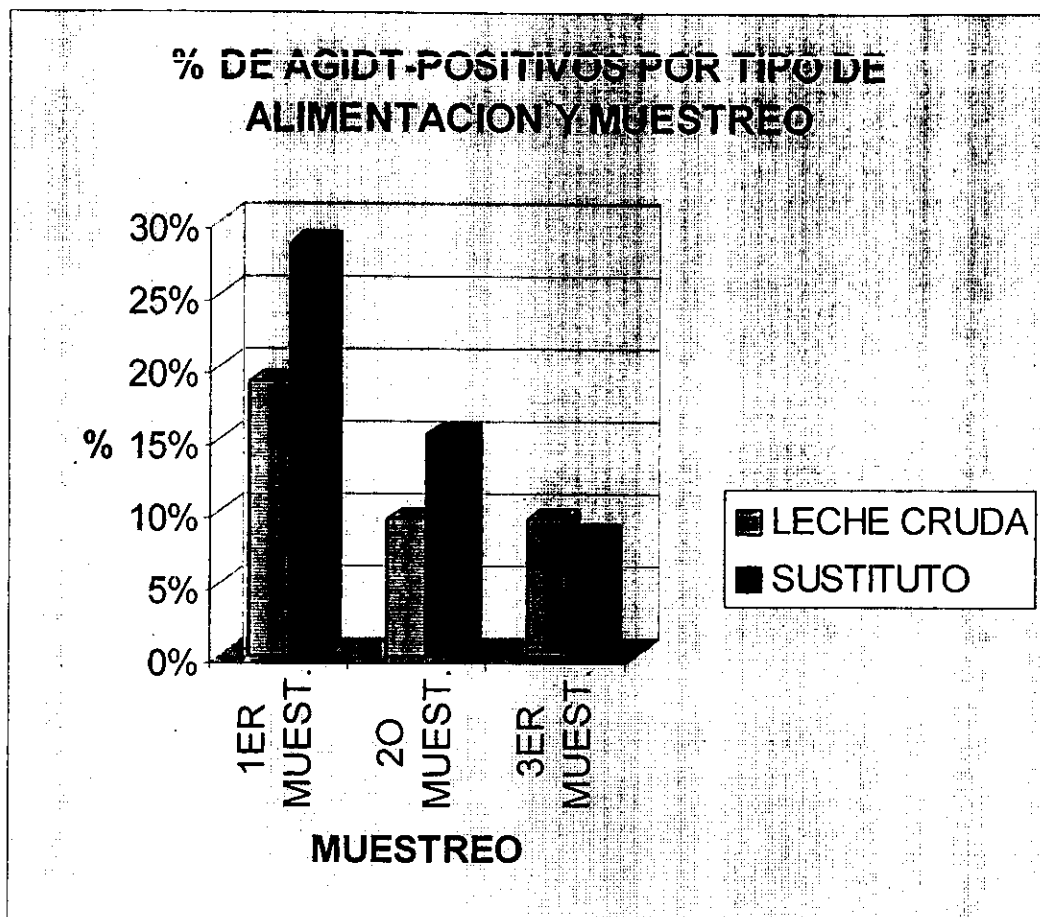
Gráfica 6. Valor de ji-cuadrada en cada muestreo.



Gráfica 7. Seroprevalencia por muestreo.



Gráfica 8. Porcentaje de animales positivos en la prueba de AGIDT, por grupo y muestreo.



Gráfica 9. Porcentaje de animales positivos en AGIDT según el tipo de alimentación y muestreo.

IX. REFERENCIAS.

1. Colimon K M. Fundamentos de Epidemiología. 1a Ed. España: De Díaz de Santos, 1990.
2. Kleinbaum DG, Kupper LL. Epidemiological Research. Von Nostrand. Rheinhold.USA.
3. Beaglehole B, Bonita R, Kjellström T. Epidemiología Básica. USA. OPS. 1994.
4. Guerrero R, Gonzalez CL y Medina E. Epidemiología. 1a ed. EUA: Adison Wesley Iberoamericana. 1986.
5. Toma B, Dufour B, Sanaa M, Bént J, Ellis P, Moutou F et Louzà A. Épidémiologie Appliquée. 1a ed. France. AEEMA. 1994.
6. Chebloune Y, Karr B, Sheffer D, Leung K, Narayan O. Variations in lentiviral gene expression in monocyte- derived macrophages from naturally infected sheep. J gen Virol 1996; 77: 2037-2051.
7. Smith R. Veterinary Clinical Epidemiology. A problem-oriented approach. (2nd Ed.). USA. CRC Press. 1995.
8. Hennekens ChH, Buring JE. Epidemiology in Medicine. (1st Ed.).USA. Little, Brown and Company. 1987.
9. Cheevers WP, Knowles DP, McGuire TC, Bazzler TV, Hullinger GA. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus (CAEV) challenge of goats immunized with recombinant vaccinia virus expressing CAEV surface and transmembrane envelope glycoproteins. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1994; 42: 237-251.
10. Cutlip RC, Lehlkuhl HD, Sacks JM, Weaver AL. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the United States. JAVMA 1992; 200: 802-805.
11. Jimenez C, Montero D, Villalobos P, Rojas JL, Cordero L, Morales JA, Rodríguez L. La artritis encefalomiелitis caprina; Primer diagnóstico de esta retrovirosis en cabras de Costa Rica. Ciencias Veterinarias. Costa Rica. 1992;14: 59-63.

12. Cork LC. Pathology and epidemiology of lentiviral infection of goats. In: Maedi-Visna and related diseases. 1st. USA: Kluwer Academic Publishers, 1990.
13. Smith MC, Sherman DM. Goat Medicine. 1st. De. Netherlands: *Lea and Febiger*, 1994.
14. Perrin GG. L' arthrite encéphalite caprine. *Point Vét* 1991; 139: 713-718.33.
15. 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* 1995; 56: 841-847.
16. Narayan O, Clements JE. Biology and Pathogenesis of Lentiviruses. *J of Gen Virol* 1989; 70: 1617-1639.
17. Harmache A, Bouyac M, Audoly G, Hieblot C, Pever P, Vigne R, Suzan M. The *vif* gene is essential for efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J of Virology* 1995; 69: 3247- 3257.
18. Trigo T FJ. La Artritis Encefalitis Caprina. *Ciencia Veterinaria* 5. 1a ed. México: UNAM-FMVZ, 1991.
19. Péretz G, Bugnard F, Calavas D. Study of a prevention programme for caprine arthritis-encephalitis. *Vet Res* 1994; 25: 322-326.
20. Hanson J, Hydbring E, Olsson K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta vet Scand* 1996; 37: 31-39.
21. Phelps SL, Smith MC. Caprine arthritis- encephalitis virus infection. *JAVMA* 1993; 203:1663-1666.
22. Cheevers W, Knowles D, Norton L. Neutralization- resistant antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus associated with progressive arthritis. *J of Inf Dis* 1991;164: 679-685.
23. Jolly PE, Huso D, Hart G, Narayan O. Modulation of lentivirus replication by antibodies. Non-neutralizing antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus enhance early stages of infection in macrophages. but do not cause increased production of virions. *J gen Virol* 1989; 70: 2221-2226.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

24. Zink MC, Yager JA. Pathogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J of Pathol* 1990; 136: 843-854.
25. Zink C, Narayan O. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. *J of Virol* 1989; 63: 2578-2584.
26. Sepp T, Tong-Starksen SE. STAT-1 pathway is involved in activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat in monocytes. *J of Virol* 1997; 71: 771-777.
27. Greenwood PL. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Preventive Veterinary Medicine* 1995; 22: 71-87.
28. Mdurwa EG, Ogunbiyi, Gakou HS, Reddy PG. Pathogenic mechanisms of caprine arthritis-encephalitis virus. *Vet Research Communications* 1994; 18: 483-490.
29. East NE, Rowe JD, Medewell BR, Floyd K. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. *JAVMA* 1987; 190: 182-186.
30. 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* 1994; 72: 341-345.
31. Nazara SJ, Trigo JF, Suberbie E, Madrigal V. Estudio clínico- patológico de la artritis encefalitis caprina en México. *Veterinaria México* 1985; 16: 91- 100.
32. Dolf G, Ruff G. A DNA fingerprinting band associated with the susceptibility to CAE virus-induced arthritis in goats. *Br Vet J* 1994; 150: 349-353.
33. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR. 14. Transmission and control of caprine arthritis- encephalitis virus. *Am J Vet Res* 1983;44: 1670-1675.
34. Lerondelle C, Greenland T, Jane M, Mornex JF. Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne arthritis-encephalitis virus. *J Dairy Sci* 1995; 78: 850-855.

35. East NE, Rowe JD, Dahlberg JE, Thelin GH, Pedersen NC: Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant Research* 1993; 10: 251-262.
36. Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, DeRock E, Pedersen NC. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1858-1862.
37. Rowe JD, East NE, Franti CE, Thurmond MC, Pedersen NC, Theilen GH. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats of California dairies. *Am J Vet Res* 1992; 53: 2396-2404.
38. Rowe JD, East NE, Thurmond MC, Franti CE. Risk factors associated with caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on California dairies. *Am J Vet Res* 1991; 52: 510-514.
39. Rowe JD, East EN. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet Clin of North Am Food Anim Pract* 1997; 13: 35-53.
40. Lerondelle C. L'infection de la mamelle par le virus de l'arthrite et de l'encephalite de la chevre (CAEV). *Sci Vet Med Comp* 1988; 90:139-143.
41. González L, Gelabert JC, Saez de Okariz C. Caprine arthritis-encephalitis in the Basque country, Spain. *The Veterinary Record* 1987; 120: 102-109.
42. Smith M, Cutlip R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *JAVMA* 1988; 193: 63-67.
43. 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. *J of Inf Dis* 1995; 171: 328-334.
44. Ryan D, Greenwoos PL, Nochols PJ. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl- β -glucosaminidase activity in dairy goats. *J of Dairy Res* 1993; 60: 299-306.
45. Kwang J, Keen J, Cutlip RC, Kim HS, de la Concha- Bermejillo A. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Ruminant Research* 1995; 16: 171-177.

46. En Internet: www.ics.uci.edu/~pazzani/4H/CAE.html. Caprine arthritis-encephalitis (CAE) virus. Washington Animal Disease Diagnostic Laboratory 1996.
47. Knowles JR, Evermann JF, Shropshire C, Schalie Van der J, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 243-245.
48. Rue La L. Serodiagnostic interpretation of CAEV: Pivotal to controlling this caprine pathogen. *Veterinary Medicine* 1986: 1039-1044.
49. Heckert RA, McNab BW, 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.
50. Bommeli AG. Mode d'emploi pour le test immunoenzymatique CHEKIT (Caprine arthritis encephalitis virus/ Maedi visna virus). (Monocupule). Distribué par Hoescht-Behring 1994.
51. Cutlip RC, Jackson TA, Laird GA. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am J Vet Res* 1977; 38: 1081-1084.
52. Reddy GP, Sapp WJ, Heneine W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by Polymerase Chain Reaction. *J of Clin Microbiol.* 1993; 31: 3042-3043.
53. Schroeder BA, Oliver RE, Cathcart A. The development and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat sera. *N Z vet J* 1985; 213-215.
54. Leroux C, Lerondelle C, Chastang J, Mornex JF. RT-PCR detection of lentivirus in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet Res* 1997; 28: 115-121.
55. Motha J, Ralston J. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Veterinary Microbiology* 1994; 38:359-367.
56. Rowe JD, East EN, 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: 2386- 2395.

57. Memoria de la cuarta reunion anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. 1995; 216-218.
58. Daniel W. Bioestadística. 1a ed. México: Limusa, 1991.
59. Scheaffer R, Mendelhall W, Ott L. Elementos de Muestreo.1a de. México: Iberoamericana, 1987.
60. Smith JH, Myers FL. CAE antibody test kit commercially available. Dairy Goat Journal 1991; 69:246-248.