



11622

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

4

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN "IN VITRO" DE PROTEÍNAS ANTIGENICAS DE UN VIRUS DE
ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA (AEC) AISLADO EN MÉXICO, USANDO
LAS TÉCNICAS DE ELISA E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA
(WESTERN BLOT).**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :

HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

TUTOR:
DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO.

COMITÉ TUTORIAL:
DR. ÁLVARO AGUILAR SETIÉN.
DR. JOSÉ ALFONSO BARAJAS ROJAS.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2003

A



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.

PAGINACION DISCONTINUA

DEDICATORIAS

A mi esposa (Mirna Margarita): Por su paciencia y apoyo para la culminación de este trabajo. Te amo.

A mi hijo (Nathanael): Quien me ha enseñado lo maravilloso que es una nueva vida, espero que esto pueda contribuir en un futuro a lograr sus metas. E superarme cada día para brindarle siempre lo mejor.

A Carmelo Ramírez: Quien me ha enseñado el valor de la vida y como enfrentarla.

A Leovigilda Alvarez: Quien en su momento me enseñó a trabajar y a valerme por mi mismo.

A Elena Tapia: Por los buenos momentos y su apoyo moral.

Al grupo de la UIRH, en especial a Amalia Barquet y Carmen Soler por el apoyo que siempre me brindaron en la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros: Suemi Rodríguez, Paty Ramírez, Mine, Rafa, Rodrigo, Lulú, Gerardo, Alma y Adela; por su gran ayuda desinteresada y paciencia. Mil gracias.

A mi querida FESC. por todo lo que en ella he aprendido y me ha brindado.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de la VIRJI: Dra. Carmen Soler y a la QFB. Amalia Barquet por el apoyo técnico para realizar este trabajo. En especial por su amistad y confianza.

A la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal por el apoyo para la realización de este trabajo

A Mirna por el apoyo que siempre me ha brindado y que en esta ocasión fue decisivo.

A Gerardo por el apoyo técnico otorgado en la realización de los esquemas. Gracias

A Alejandro Martínez por su ayuda y apoyo brindado.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

A la Dr. Suemi Rodríguez Romo por creer en mi y darme la oportunidad de trabajar con ella.

A mi tutor Dr. Juan Antonio Montaraz por el apoyo brindado y por la asesoría de este trabajo.

A mi comité tutorial por sus sugerencias para mejorar este trabajo al Dr. Álvaro Aguilar Setién y al Dr. José Alfonso Barajas Rojas.

A mi jurado por el apoyo para la revisión de este trabajo y sus comentarios que fueron importantes para mejorarlo: Dr. Antonio Morilla González y el Dr. Juan Antonio Montaña Hirose.

A todos mis compañeros y amigos de la oficina que sin su apoyo hubiera sido más difícil: Mine, Rafa, Rodrigo, Remy, Paty, Silvia.

RESUMEN

La artritis encefalitis caprina (AEC) es una enfermedad crónica degenerativa que afecta principalmente a cabras en sistemas de producción intensivos, existiendo reportes que confirman su presencia en México. Se han publicado diversos trabajos que describen los pesos moleculares de las proteínas del virus de AEC, siendo esto desconocido para la cepa del virus que circula en rebaños nacionales, lo cual posiblemente tiene implicaciones en el diagnóstico de la enfermedad. El diagnóstico en nuestro país se realiza con pruebas comerciales que contienen antígeno del virus de maedi visna el cual esta relacionado antigénicamente con el virus de AEC. El objetivo del presente estudio fue aislar, identificar y estandarizar pruebas serológicas (ELISA e inmunoelectrotransferencia o Western blot (WB) con proteínas del virus de AEC aislado en México y comparar su comportamiento con pruebas comerciales. El aislamiento del virus se realizo de cabras infectadas cocultivando monocitos/macrófagos con células de membrana sinovial (CMS), observando sincitios a los 20 días y confirmando el genoma del virus de AEC por la detección de un segmento específico de 258 pb del gen gag utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Se estableció una cinética de producción viral en CMS y empleando la técnica de WB se demostró la producción de todas las proteínas virales, identificando once proteínas específicas del virus de AEC con pesos moleculares de 135, 90, 70, 45, 37, 32, 28, 25, 19, 16 y 14 kilodaltons (kDa). Se encontró diferencia en el peso molecular de la proteína de matriz (peso de 16 kDa) del virus aislado con respecto a un virus de referencia de ATCC. El WB estandarizado se utilizó como estándar de oro para evaluar el desempeño comparativo de la ELISA estandarizada y los estuches de uso comercial (ELISA CHEKIT, Bommeli, Suiza e Inmunodifusión Veterinary Diagnostic Technology, USA); Tomando como criterio de positividad para el WB la presencia de reactividad a 5 proteínas virales de 3 genes diferentes (135, 90 (gen env), 19 (gen rev), 14 y 16 (gen gag)). Se obtuvo una sensibilidad de 44.1, 75.5 y 98.8 %, una especificidad de 100, 100 y 54.5 % y un valor de κ de 0.244, 0.557 y 0.633 para las pruebas de: Inmunodifusión, ELISA (comerciales) y ELISA estandarizada respectivamente. Con esto se puede concluir que el uso de proteínas del virus aislado de AEC mejora la sensibilidad de las pruebas para el diagnóstico de la enfermedad, contrario a lo que se obtiene con los kits comerciales que utilizan antígeno de Maedi-Visna. Esto tiene implicaciones importantes en el control de la AEC ya que es la única alternativa para la posible eliminación de la enfermedad.

Palabras claves: Artritis encefalitis caprina, aislamiento, cultivo celular, ELISA inmunoelectrotransferencia, reacción en cadena de la polimerasa,

ABSTRACT

The caprine arthritis encephalitis (CAE) is a chronic degenerative disease that mainly affects goats in intensive production systems. Existing data corroborate its presence in Mexico. Diverse reports have been published describing the molecular weight of the viral proteins of the CAE. Being this unknown for the viral strains that circulates in national flocks and its possible implication in the diagnosis of the disease. Currently the diagnosis is carried out in our country with commercial tests that contain antigen of the Maedi-Visna virus that this related to the first. The objective of the present study was to isolate and identify CAE strains that circulate in region and use them to standardize serologic diagnostic tests: (ELISA and immunoelectrotransference or Western blot (WB) with the viral proteins of CAE isolates from Mexico, and to evaluate the comparative performance with commercial tests. The isolation of the virus was carried out of infected goats, in cell cultures, where monocytes/macrophages were co-cultivated with synovial membrane cells (SMC). Virus isolation was verify by observation of the cytopathic effects syncytia at 20 days, and the confirmation of CAE genome, by the detection of the specific segment (258 pairs of bases), of the gene gag, with a polymerase chain reaction (PCR) assay. A kinetic viral multiplication in SMC was established. WB technique was used to detect the production of eleven specific proteins of the CAE virus with molecular weights of 135, 90, 70, 45, 37, 32, 28, 25, 19, 16 and 14 kilodaltons (kDa); a difference was found in the molecular weight of the matrix protein (16 kDa) in the isolated virus with regard to the ATCC reference CAE strain. The standardized WB was utilized as the gold standard technique, to evaluate the comparative performance of the standardized ELISA and the commercial assays (ELISA CHEKIT, Bommeli, Swiss and Immunodiffusion Veterinary Diagnostic Technology, USES). Positive results were defined as the reactivity to 5 viral proteins of 3 of different genes (135, 90 (gene env), 19 (gene rev), 14 and 16 (gene gag) in the WB .A sensitivity of 44.1, 75.5 and 98.8%, a specificity of 100, 100 and 54.5% and a kappa value of 0.244, 0.557 and 0.633 was obtained for the tests. Immunodiffusion, ELISA (commercial) and ELISA standardized respectively. The experience acquired in the diagnosis AIDS can be practical for the CAE, using a screening test with very high sensitivity as the standardized ELISA and subsequently, confirm it with a second highly specific test like (WB). The best results were obtained with the standardized assays containing the CAE virus, contrary to what was obtained with the commercial ones (Maedi-Visna virus base). The detection of CAE infected animals with an adequate diagnostic methodology is important for the control of the disease and is the only alternative for the possible eradication in national flocks.

Key words: Caprine arthritis encephalitis (CAE), virus isolation, cell culture, ELISA immunoelectrotransference, polymerase chain reaction (PCR).

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
ANTECEDENTES	1
CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS DE AEC	2
GENOMA DE LOS RETROVIRUS	5
<i>ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL DEL AEC</i>	5
<i>GENES ESTRUCTURALES Y SUS PRODUCTOS</i>	5
<i>OTRAS ENZIMAS</i>	7
<i>GENES AUXILIARES</i>	9
GENOMA DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES	11
PROTEÍNAS VIRALES	13
CICLO VIRAL	16
EPIDEMIOLOGÍA	20
SIGNOLOGÍA CLÍNICA	21
PATOLOGÍA	23
PATOGÉNESIS	24
INMUNOLOGÍA	25
MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	27
<i>CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL DIAGNÓSTICO</i>	
<i>DE LENTIVIRUS</i>	27
<i>EXAMINACIÓN DEL FLUIDO SINOVIAL</i>	29
<i>EXAMEN HISTOLÓGICO DE ARTICULACIONES</i>	29
<i>HALLAZGOS MACROSCÓPICOS POSTMORTEN EN</i>	
<i>ARTICULACIONES</i>	29
<i>PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS EN CULTIVO CELULAR</i>	29
<i>PRUEBAS SEROLÓGICAS</i>	30
<i>INMUNODIFUSIÓN</i>	31
<i>PRUEBA DE ELISA</i>	31
<i>ETAPAS BÁSICAS DE LA TÉCNICA DE ELISA</i>	
<i>INDIRECTA</i>	33
<i>PRUEBA DE ELISA PARA VAEC</i>	34
<i>REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</i>	36
<i>INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)</i>	38

TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD	40
IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD	40
PREVENCIÓN Y CONTROL	41
JUSTIFICACIÓN	43
HIPÓTESIS	45
OBJETIVOS GENERALES	46
<i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	<i>46</i>
MATERIAL Y MÉTODOS	47
<i>LUGAR</i>	<i>47</i>
<i>COLECCIÓN DE MUESTRAS</i>	<i>47</i>
<i>IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICAS DE CABRAS INFECTADAS</i>	<i>47</i>
<i>CULTIVO CELULAR</i>	<i>47</i>
<i>AISLAMIENTO DEL VIRUS DE AEC</i>	<i>48</i>
<i>CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES</i>	<i>48</i>
<i>IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE AEC POR PCR</i>	<i>49</i>
<i>SEMIPURIFICACIÓN DEL VIRUS A PARTIR DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS INFECTADAS</i>	<i>51</i>
<i>INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)</i>	<i>51</i>
<i>DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DE ELISA</i>	<i>52</i>
<i>ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA</i>	<i>52</i>
<i>WESTERN BLOT (WB) DEL BANCO DE SUEROS</i>	<i>53</i>
<i>COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE WB CON DOS PRUEBAS COMERCIALES (INMUNODIFUSIÓN Y ELISA) Y LA ELISA ESTANDARIZADA</i>	<i>53</i>
<i>SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA</i>	<i>54</i>
<i>ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA</i>	<i>55</i>
<i>VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA POSITIVA</i>	<i>55</i>
<i>VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA NEGATIVA</i>	<i>55</i>
<i>CALCULO DEL VALOR KAPPA</i>	<i>55</i>
RESULTADOS	57
<i>IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA DE CABRAS INFECTADAS</i>	<i>57</i>
<i>INMUNODIFUSIÓN</i>	<i>57</i>
<i>ELISA COMERCIAL (CHEKIT)</i>	<i>57</i>
<i>AISLAMIENTO DEL VIRUS DE AEC Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES</i>	<i>60</i>
<i>IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS POR PCR</i>	<i>67</i>
<i>INMUNOELECTROTRANSFERENCIA Y ELISA CON VIRUS DE AEC AISLADO</i>	<i>67</i>
<i>WB DEL BANCO DE SUEROS</i>	<i>74</i>

*SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO DEL
TEST POSITIVO, VALOR PREDICTIVO DEL TEST NEGATIVO
Y PRUEBA KAPPA; DE LAS PRUEBAS DE WB, ELISA
ESTANDARIZADA, INMUNODIFUSIÓN Y ELISA
COMERCIAL*

80

DISCUSIÓN

88

APÉNDICE I

100

APÉNDICE II

103

BIBLIOGRAFÍA

109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organización genética del VAEC.	6
Figura 2. Transcriptasa reversa.	8
Figura 3. Mapa genómico del Virus de AEC.	15
Figura 4. Ciclo de replicación del VAEC.	18
Figura 5. Fundamento de la técnica de ELISA indirecta para la detección de animales seropositivos a VAEC.	35
Figura 6. Técnica de inmunoelectrotransferencia para la detección de anticuerpos contra VAEC.	39
Figura 7. Prueba de inmunodifusión mostrando dos bandas de precipitación.	58
Figura 8. Inmunoelectrotransferencia de las proteínas del virus de AEC reconocidas por sueros controles de los estuches comerciales de ELISA e Inmunodifusión.	59
Figura 9. Cabra infectada con el VAEC, presentando signos clínicos de artritis en las articulaciones de las rodillas.	58
Figura 10. Células de membrana sinovial de feto caprino sin infectar, monocapa con 100% de confluencia.	61
Figura 11. Células de membrana sinovial de feto caprino infectadas con el virus de AEC formando células gigantes multinucleadas.	62
Figura 12. Proteínas obtenidas del sobrenadante de células infectadas con el VAEC aislado en México y probado por WB.	63
Figura 13. Cinética de producción de proteínas virales obtenidas a diferentes días, del sobrenadante de células infectadas con el VAEC aislado en México, probados por WB.	64
Figura 14. Cinética de producción de proteínas virales obtenidas a diferentes días, del sobrenadante de células infectadas con el VAEC aislado en México, probados por WB.	65
Figura 15. Cinética de producción en cultivo celular de proteínas del virus de AEC aislado en México	66
Figura 16. Productos de PCR del ADN del virus de AEC, con la amplificación de una banda específica de 258pb.	68
Figura 17. Productos de PCR del ADN del virus de AEC, con la amplificación de una banda específica de 258pb.	69
Figura 18. Sueros caprinos evaluados por la técnica de ELISA estandarizada (1) con virus de AEC aislados	71
Figura 19. Sueros caprinos evaluados por la técnica de ELISA estandarizada (2) con virus de AEC aislados	72
Figura 20. Sueros caprinos evaluados por la técnica de ELISA estandarizada (3) con virus de AEC aislados	73
Figura 21. Inmunoelectrotransferencia de los sueros evaluados, donde se observa reacción cruzada con la proteína de 25 kDa en los sueros negativos y los sueros positivos presentan reacción a las proteínas de 135,90, 19, 16 y 14 kDa del VAEC.	75

Figura 22. Esquematización del reconocimiento de proteínas del VAEC por sueros Positivos y negativos en la prueba de inmunoelectrotransferencia o WB	76
Figura 23. Proteínas reconocidas en inmunoelectrotransferencia por 220 sueros caprinos.	77
Figura 24. Proteínas reconocidas en inmunoelectrotransferencia por sueros caprinos considerados positivos	78
Figura 25. Proteínas reconocidas en inmunoelectrotransferencia por sueros caprinos considerados negativos	79

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación del género <i>Lentivirus</i> , familia <i>Retroviridae</i> .	2
Tabla 2. Descripción de las proteínas reportadas del virus de artritis encefalitis caprina por diferentes autores.	14
Tabla 3. Resultados de 220 sueros caprinos evaluados con las pruebas de ELISA e ID comerciales para detectar anticuerpos contra la AEC, en cabras del estado de México y Querétaro	60
Tabla 4. Proteínas reconocidas a diferentes días en el sobrenadante de las células de membrana sinovial infectadas con virus de AEC aislado en México.	67
Tabla 5. Detección de animales seropositivos a las pruebas de ELISA estandarizada y Western Blot con virus de AEC aislado; comparada con las pruebas de inmunodifusión y ELISA que utilizan virus de Maedi-Visna. En las diferentes pruebas se evaluaron un total de 220 sueros.	70
Tabla 6. Resultados de 220 sueros evaluados de cabras del Estado de México y Querétaro por las técnicas de ELISA estandarizada y sus tres variantes y por Western blot.	70
Tabla 7. Sensibilidad y especificidad de las pruebas de ELISA estandarizada con virus de AEC, ELISA comercial e Inmunodifusión que utilizan virus de maedi-visna; con relación a WB estandarizado con virus de AEC.	86
Tabla 8. Sensibilidad, especificidad, valor de predicción positivo, valor de predicción negativo y valor k de las pruebas de ELISA estandarizada con virus de AEC aislado, Elisa comercial e Inmunodifusión que utilizan virus de maedi-visna; con relación a WB estandarizado con virus de AEC aislado.	87
Tabla 9. Criterios para la interpretación de un WB positivo a VIH-1	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Azino 2,2 dietil bentiazolina del ácido sulfónico
AEC	Artritis encefalitis caprina
AP	Proteína activadora
ASTPHLD/CDC	Asociación de directores de laboratorios de salud pública locales y del estado/centro de control de enfermedades
CA	Cápside
CMF	Células mononucleares periféricas
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CRSS	Consortio para la estandarización serológica de retrovirus
DO	Densidad óptica
ELISA	Prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas
env	Envoltura
gag	Antígeno específico de grupo
gp	Glicoproteína
H2OUP	Agua ultra pura
ID	Inmunodifusión
IDAG	Inmunodifusión en agar gel
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
Il	Interleucina
IN	Integrasa
INDRE	Instituto nacional de referencias epidemiológicas
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
Kpb	Kilopares de bases
LTR	Secuencias repetidas
LVPR	Lentivirus de pequeños rumiantes
MA	Proteína de matriz
MS	Membrana sinovial
MV	Macdi/visna
NC	Nucleocápside
Nm	Nanómetros
OPD	Orto-fenildiamina
OMS	Organización mundial de la salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer salina fosfatada
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PI	Post inoculación
pol	Polimerasa
PPT	Segmentos polipurinas
Pr	Precursor
pr	Proteasa
rev	Regulador de la expresión de proteínas del virión
RRE	Elemento de respuesta de rev

RT	Transcriptasa reversa
SNC	Sistema nervioso central
SU	Glicoproteína de superficie
TM	Proteína transmembranal
UIMSA	Unidad de investigación multidisciplinaria en salud animal
UIRH	Unidad de investigación en retrovirus humanos
VAEC	Virus de la artritis encefalitis caprina
VAIE	Virus de la anemia infecciosa equina
VIB	Virus de la inmunodeficiencia bovina
VIF	Virus de la inmunodeficiencia felina
Vif	Factor de infectividad viral
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia del simio
VMV	Virus de maedi/visna
VNPO	Virus de la neumonia progresiva ovina
WB	Western blot
3,3 DXDH	Clorhidrato de 3,3 dimetoxibencidina
5 – AS	5 amino salicilico

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

La familia Retroviridae (de retro, hacia atrás, invertida y transcriptasa) se caracteriza porque todos sus miembros poseen una transcriptasa inversa (polimerasa de ADN dependiente de ARN) (Pétursson et al., 1992; Murphy et al., 1999). Se subdivide en 7 géneros: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Lentivirus y Spumavirus. Dentro del género lentivirus se encuentran 8 especies: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 y tipo 2, virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), virus maedi/visna (VMV), virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) y virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) (Pétursson et al., 1992; Hullinger et al., 1993; Murphy et al., 1999).

Los lentivirus presentan diferencias en el tropismo celular y en el desarrollo de la enfermedad, por lo que se divide en dos grupos: el primero comprende a VIH, VIS y VIF, los cuales se replican en linfocitos y macrófagos causando un síndrome de inmunodeficiencia adquirida y una enfermedad órgano específica de los pulmones, sistema nervioso central (snc) y tracto gastroentérico; el segundo grupo de VAIE, VAEC y VMV, en contraste sólo se replica predominantemente en macrófagos, no afecta linfocitos y causa una enfermedad órgano específica del SNC, pulmón y articulaciones (**Tabla 1**) (Bructt et al., 2000).

La primera clasificación de los retrovirus se basó en su especie hospedera y en la morfogénesis del virión, de la cual se reconocieron 4 tipos de partículas designadas A, B, C y D. La morfogénesis de los retrovirus tipo C en los que se cataloga al VAEC se distingue por la presencia de un núcleo en forma de cono en el virión maduro. Con una apariencia densa, cuya envoltura se forma al cerrarse la membrana celular durante el proceso de gemación. (Ellis et al., 1988; Pétursson et al., 1992; Murphy et al., 1999).

El aislamiento y caracterización del lentivirus de cabra son relativamente reciente (Crawford et al., 1980). Lesiones previas parecidas a las causadas por maedi-visna pero en cabras habían sido descritas en 1964 (India), 1969 (Alemania) y 1974 (Estados Unidos).

Tabla 1. Clasificación del género *Lentivirus*, familia *Retroviridae*.

Virus	Hospedero	Infecta Tipo de célula primaria	Manifestación clínica
Grupo lentivirus equino Virus de la anemia infecciosa equina (VAIE)	Caballo	Monocito/Macrófago	Infección cíclica en el primer año: anemia hemolítica y algunas veces encefalopatías
Grupo lentivirus ovino/caprino Virus visna Virus maedi visna	Borrego	Monocito/Macrófago	Neumonía, encefalitis, mastitis y artritis
Grupo lentivirus ovino/caprino Virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC)	Cabra	Monocito/Macrófago	Neumonía, encefalitis, mastitis y artritis
Grupo lentivirus bovino Virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) Virus de la leucemia bovina (VLB)	Vaca	Macrófago Linfocito T ($\gamma\delta$) y B	Linfadenopatía y deficiencia inmune (?). Infección subclínica
Grupo lentivirus felino Virus de la inmunodeficiencia felina (VIF)	Gato	Linfocito T Linfocito B, Monocito/Macrófago	Deficiencia inmune e infecciones oportunistas
Grupo lentivirus primates Virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS)	Primate	Linfocito T Monocito/Macrófago	Deficiencia inmune, encefalopatía e infecciones oportunistas
Grupo lentivirus primates Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	Humano	Linfocito T Monocito/Macrófago	Deficiencia inmune, encefalopatía, mielopatía e infecciones oportunistas

(?)= No está comprobado

Referencia Pépin et al (1998).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS DE AEC

Los lentivirus se componen aproximadamente de 60% de proteína, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN (Pétursson et al., 1992).

Los viriones son envueltos, con un diámetro de 80 a 130 nanómetros (nm) y tienen una única estructura tridimensional. El genoma se encuentra en el interior de la nucleocápside (NC), la cual incluye cerca de 30 moléculas de transcriptasa reversa (RT)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

con simetría helicoidal. La cápside (CA) es de morfología icosaédrica, de cerca de 60 nm de diámetro, rodeada por una capa de proteína de matriz (MA). Finalmente, el virión presenta una envoltura externa (SU) compuesta por una bicapa de lípidos que contiene la proteína transmembranal (TM) en la cual se proyectan peplómeros de glicoproteínas (la envoltura deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera). Los lentivirus presentan 72 protuberancias (peplómeros), cada una con 10 nm de longitud con una protuberancia distal ovoide (Pétursson et al., 1992; Clavijo y Thorsen, 1996; Murphy et al., 1999).

El genoma es diploide y consiste en un dímero invertido de moléculas lineales de ARN de sentido positivo. La cadena de ARN tiene un extremo 5' cap (operculado) y un 3' poliadenilado final y es dependiente de Mg^{2+} . El virión tiene una densidad Buoyante de 1.15 g/cm^3 en centrifugación isopícnica en sacarosa (Crawford et al., 1980; Anderson y Cheevers, 1981; Dahlberg et al., 1981; Ellis et al., 1988).

El virus de la AEC *in vitro* tiene predilección por células de membrana sinovial (MS), aunque otros cultivos obtenidos por explante también pueden soportar la replicación del virus, como es el caso de cerebro, plexo coroideo, pulmón y riñón de cabra, pero con una reducida eficiencia comparados con las células de MS (Ellis et al., 1988; Anderson y Cheevers, 1981). Otras células permisivas para VAEC son la línea celular de ovario y pulmón del Tahr del Himalaya (con muy buena producción) (Kalinski et al., 1991), células de bazo fetal de cordero, células de córnea fetal de ovino (Belov y Walley, 1988), células de testículo de cabra y células mononucleares (Dahlberg et al., 1981; Guiguen et al., 2000).

En los cultivos de células de MS se ha determinado la cinética de replicación de VAEC usando partículas virales marcadas con (H^3). La síntesis de la progenie viral es exponencial con un pico a las 96 horas postinoculación (PI). La comparación del virus asociado a células con el virus extracelular muestra una fase latente de 15 a 20 horas. (Anderson y Cheevers, 1981).

La formación de células multinucleadas (5-30 núcleos por célula) o sincitios se observa en un máximo de 5-6 días PI (poco tiempo después de la máxima producción de virus). Los sincitios son el resultado de un mínimo nivel de replicación del virus que ocurre en las células vecinas, causando la fusión de membranas celulares yuxtapuestas. Una

característica general de los sincitios o células gigantes es la forma de estrella o de araña con un cuerpo celular redondeado y retráctil y muchas extensiones citoplasmáticas filiformes (Anderson y Cheevers, 1981; Pétursson et al., 1992). En contraste, la reducción en la formación de sincitios es consecuencia de la inhibición de la síntesis de provirus y la subsecuente replicación del virus. Se ha demostrado que no se requiere la síntesis de ADN celular para establecer la infección de VAEC, como tampoco la división de células está involucrada en el proceso de multinucleación celular. En algunos casos las células infectadas pueden continuar dividiéndose mientras geman un gran número de viriones. La mayor concentración de antígeno viral y ARN viral se encuentra en células multinucleadas (71%) (Anderson y Cheevers, 1981; Pawlisch y Maes, 1984; Pétursson et al., 1992).

A diferencia de la alta producción viral en células permisivas en el cultivo *in vitro*, la replicación de los lentivirus en los tejidos de los animales es altamente focal y no productiva. Se encuentran pocas células que contengan ADN viral y muchas de éstas producen poco o nada de ARN viral o cuando menos antígeno viral detectable. Esta restricción parece depender del estado fisiológico y del desarrollo de las células. Se ha visto en las células blanco monocitos/macrófagos, que cuando los monocitos infectados que tienen una baja producción de virus se diferencian en macrófagos, la restricción de las células hospederas se eleva permitiendo incrementar la producción viral (Guiguen et al, 1990). La expresión de los genes virales y la replicación de los lentivirus son estrictamente controlados por una compleja interacción de genes virales y de genes de la célula hospedera. La restricción de la replicación viral en el hospedero es considerado el mayor factor de lentitud de las enfermedades lentivirales (Saltarelli et al., 1990; Pétursson et al, 1992).

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) han sido clasificados con base en sus propiedades estructurales, genéticas y de replicación, derivando 2 tipos: tipo I o virus con composición de proteínas similares al VMV y tipo II o virus con composición de proteínas similares a VAEC, Querat et al. (1984). Los virus tipo I tienden a ser altamente citopáticos, causando lisis en cultivos celulares, altamente patogénicos *in vivo* y además inducen la producción de anticuerpos neutralizantes. Por otro lado, el tipo II no produce lisis y ocasiona infecciones persistentes en cultivo celular, exhibe baja patogenicidad en animales

infectados y no induce la formación de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo se han encontrado virus muy relacionados genéticamente con propiedades patogénicas diferentes (Gogolewski et al., 1985; Pasick, 1998). Los genomas de cepas de VAEC relacionados presentan una diversidad sorprendente, mientras que las cepas del virus visna son más estrechamente relacionados y aparecen cambios solamente bajo presión antigénica (Saltarelli et al., 1990).

GENOMA DE LOS RETROVIRUS

El genoma de los retrovirus es único en varios aspectos: 1) es el único diploide, 2) es el único que presenta un ARN viral que es sintetizado por la maquinaria que procesa el ARNm de la célula hospedera, 3) es el único asociado con una transferencia del ARN específico que funciona como un iniciador de la replicación, 4) es el único que presenta un ARN de una sola cadena de sentido positivo que no funciona como ARNm poco después de la infección y 5) es el único virus ARN que codifica una RT, la cual por sí misma es única (Murphy et al., 1999).

Entre sus variadas funciones la RT sirve como una polimerasa de ADN dependiente de ARN, una polimerasa de ADN dependiente de ADN, una integrasa y una ARNasa. Estas diferentes funciones son realizadas por cada una de las distintas partes de la molécula de proteína (Murphy et al., 1999).

ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL DE LA AEC

El genoma del VAEC consiste de 9189 bases y contiene tres genes estructurales principales, cada uno de los cuales codifica dos o más proteínas: el gen *gag* (antígeno específico de grupo) de un tamaño de 1343 bases; el gen *pol* (polimerasa) de un tamaño de 3314 bases y el gen *env* (envoltura) de un tamaño de 2597 bases (Saltarelli et al., 1990; Pétursson et al., 1992; Pepin et al., 1998) (Figura 1).

GENES ESTRUCTURALES Y SUS PRODUCTOS

1.- El gen *gag* (situado en las bases 512 a 1855) codifica 3 proteínas derivadas del precursor Pr55gag: la CA (p25 (bases 941 a 1615), la NC (p14 (bases 1616 a 1855) y la

Organización genética del VAEC

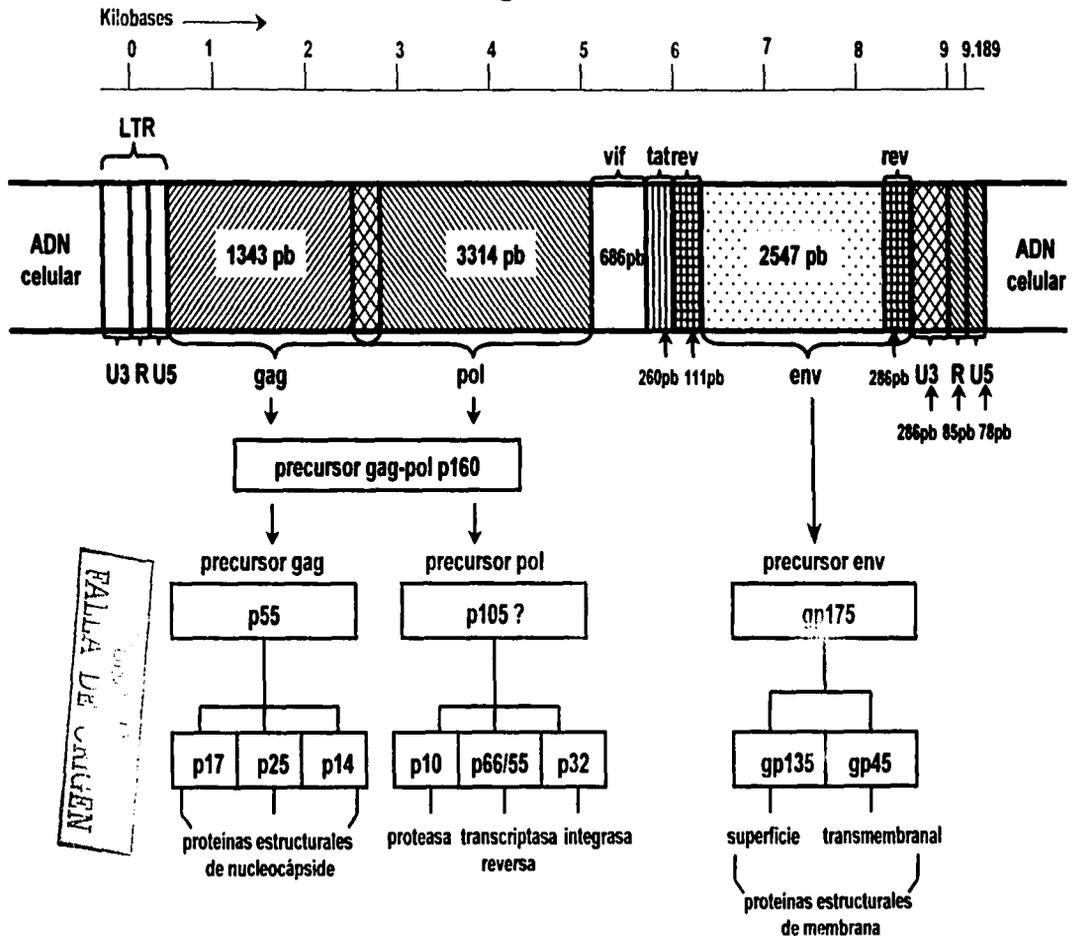


Figura 1. Esquema del genoma del virus de artritis encefalitis caprina (VAEC) integrado al genoma de la célula hospedera en forma de provirus (ADN). Se muestran los 6 genes del virus y su tamaño en pares de bases (pb), así como el producto de los genes principales y los precursores de las proteínas estructurales; cabe mencionar que el precursor de pol (?) no se ha descrito.

MA (p17 (bases 512 a 940) la cual asegura la unión entre la cápside y la envoltura. La MA es la responsable de la asociación del precursor *gag* con la membrana de la célula. La proteína de cápside es la más abundante del virión y es la responsable de estimular una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección, la cual es utilizada para el diagnóstico. Entre la proteína de cápside y la proteína de nucleocápside se une el genoma de ARN (Saltarelli et al, 1990; Pétursson et al, 1992).

2.- El gen *pol* codifica la pieza clave de las enzimas de los retrovirus, la RT (polimerasa de ADN dependiente del ARN, la cual tiene actividad de ribonucleasa H, renovando el templete de ADN) (Coffin, 1990; Pépin et al, 1998) (Figura 2).

OTRAS ENZIMAS

1.- dUTPasa: En el genoma de los lentivirus, el gen que codifica la enzima dUTPasa se localiza en el fragmento de lectura *pol* entre la ARNasa H y la región que codifica la integrasa. Las dUTPasas celulares son enzimas ubicuas que ayudan a mantener una baja proporción de dUTP a TTP y por lo tanto minimizan la incorporación de residuos de uracilo dentro del ADN: una dUTPasa codificada viralmente debe ser presumiblemente ventajosa para la replicación en células que no se dividen como los macrófagos, principales células blanco de los lentivirus de ungulados *in vivo* y donde los niveles de dUTPasa endógena y el "pool" de desoxinucleótidos es bajo. La función de la dUTPasa asociada al virión de la AEC es la de hacer eficiente la prevención de la incorporación de dUTP dentro de la síntesis de las cadenas de ADN por la transcriptasa reversa endógena. La dUTPasa también disminuye la frecuencia de mutaciones de G a A *in vitro*. Se sospecha que la deficiencia de la dUTPasa en el virus de AEC resulta en una replicación más lenta en macrófagos; *in vivo* apenas si se puede apreciar, pero puede conferir alguna ventaja en la replicación y patogenia donde se puede comprobar que la dUTPasa se requiere para que con el tiempo se desarrollen lesiones artríticas bilaterales del carpo (Turelli et al., 1997; Pépin et al, 1998).

Transcriptasa reversa.

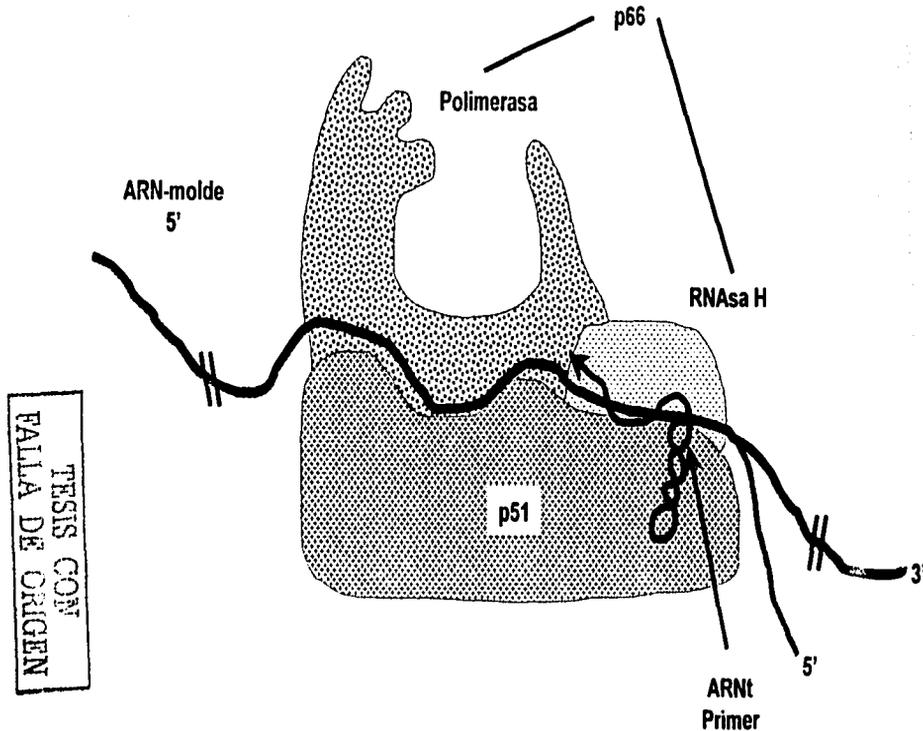


Figura 2. Esquema de la molécula de transcriptasa reversa, presentando sus múltiples dominios funcionales; conformado como un heterodímero compuesto de una molécula de 66 kilodaltons (p66) y una de 51 kilodaltons (p51). Existe una pequeña unión entre el dominio de la transcriptasa reversa y el dominio de la RNAsa H. El template de ARN viral y el iniciador del ARNt se posicionan entre la molécula. (Tomado de veterinary virology. Murphy et al., 1999)

II.- Integrasa (IN): En cada virión numerosas moléculas de RT e IN están asociadas con el ARN viral. Seguida de la RT, los provirus migran hacia el núcleo, y el genoma ADN de doble cadena es integrado en el ADN de la célula hospedera, por un mecanismo mediado por la IN. Esta integración involucra repetidas secuencias invertidas presentes en la terminación denominada secuencias repetidas (LTR) (Pépin et al, 1998; Murphy et al, 1999).

III.- Proteasa (PR): Es esencial para la infectividad y maduración del virus, divide el precursor de *gag* y la poliproteína de *gag-pol* y ensambla las proteasas del ácido aspártico celular en su estructura tridimensional (Clavijo y Thorsen, 1995a; Pépin et al, 1998).

3.- El gen *env* codifica las glicoproteínas del virus. Como en otros retrovirus, la glicoproteína es sintetizada como un precursor y es cortada por proteasas de las células hospedadoras en dos subunidades: la glicoproteína de superficie (SU; gp135) y la glicoproteína transmembranal (TM; gp45). La TM es parte de la envoltura viral siendo el anclaje de la glicoproteína de superficie en la bicapa de lípidos. La SU no está ligada covalentemente a la TM. La SU contiene los epítopes reconocidos por los anticuerpos neutralizantes que sirven para la interacción del virus con el receptor de la célula hospedadora (Pértursson et al 1992, Clavijo y Thorsen, 1995a; Murphy et al, 1999).

GENES AUXILIARES

El VAEC posee tres genes auxiliares o accesorios mayores que son: *vif* (factor de infectividad viral, previamente llamado gen Q), *tat* (antes llamado S), y *rev* (regulador de la expresión de proteínas del virión) (Harmache et al., 1995).

1.- *Vif*: El gen *vif* codifica una proteína de 28 kilodaltons (kDa) (factor de infectividad viral) que es requerida en algunos pasos de la morfogénesis de la nucleoproteína viral que determina la infectividad y/o liberación. Es el único gen accesorio conservado en el genoma de los LVPR que induce una débil respuesta inmune *in vivo* que puede ser detectada por inmunoelectrotransferencia (Western Blot). Existen reportes de que el gen *vif* es esencial *in*

in vitro para permitir una rápida y eficiente replicación del virus en macrófagos primarios infectados con VAEC y que se requiere para una eficiente replicación y patogenicidad del virus *in vivo*. El fragmento de lectura abierta del gen *vif* (5006-5692 nucleótidos) se encuentra entre los genes *pol* y *env* (Saltarelli et al., 1990; Pétursson et al., 1992; Harmache et al., 1995; Harmache et al., 1996; Murphy et al., 1999).

2.- **Tat:** El gen *tat* codifica una proteína de 11 kDa, derivada de un ARNm de 1.8 kDa. También codifica un potente transactivador que en asociación con los factores celulares que recluta y modula; incrementando la eficiencia de transcripción 100 veces por la polimerasa de ARN celular (durante el proceso de maduración monocito/macrófago), principalmente previniendo la terminación prematura de la transcripción. Esto permite el incremento de la expresión génica viral *in vivo*. La proteína *tat* media la acumulación de ARNm viral vía AP-1 (proteína activadora-1) y los sitios de unión AP-4 en la región de los LTRs. Se ha determinado para VAEC que éste es un gen no esencial para la replicación del virus *in vitro*. El fragmento de lectura abierta del gen *tat* (5688-5948 nucleótidos) se encuentra entre los genes *pol* y *env* (Saltarelli et al., 1990; Jackson et al., 1991; Pétursson et al., 1992; Murphy et al., 1999).

3.- **Rev:** Codifica una proteína que regula la expresión de las otras proteínas virales vía un mecanismo post-transcripcional y se considera esencial para una eficiente replicación viral en cultivo celular. El producto del gen *rev* es una proteína de 18 kDa, derivada de un ARNm de 1.4- 1.5 nucleótidos (Saltarelli et al., 1990; Coffin, 1991). Esta proteína está involucrada en los empalmes (“splicing”) de los transcritos de ARN viral, estabilizándolos para su exportación del núcleo al citoplasma y eficientizando la carga en los polisomas, con lo que se prepara el rango completo de ARNm disponibles para la traducción. La proteína *rev* contiene señales de exportación nuclear, lo cual permite que las proteínas pasen a través de la membrana nuclear al citoplasma y emplea su papel regulatorio vía elemento de respuesta de *rev* (RRE) localizado en el gen *env*. El RRE (7907- 8108 nucleótidos) es capaz de unir el ARN a través de un sitio de unión. El gen *rev* es bipartita localizado en una pequeña región de la extremidad 5' del gen *env* (6012-6123 nucleótidos) y una región más

grande en la región 3' del gen *env* (8514-8800 nucleótidos) (Coffin, 1991; Pétursson et al., 1992; Saltarelli et al., 1994; Murphy et al., 1999).

GENOMA DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES

La denotación más adecuada para referirse a los virus de MV, AEC y neumonía progresiva ovina (denominación que se da a los virus de Macdi Visna aislados en Norteamérica) es lentivirus de pequeños rumiantes de ovinos (Gogolewski et al., 1985; Kwang et al., 1995).

El prototipo de los lentivirus en el caso de los borregos es el VMV y para las cabras es el VAEC, del cual han descrito al menos 6 cepas (Kwang et al., 1995). De las cepas caracterizadas y reportadas del VAEC se conocen: la cepa 75-G63 que es un aislamiento obtenido por explante de membrana sinovial de una cabra lechera adulta con artritis por Crawford et al. (1980) y la cepa Co que fue aislada de explante de timo de una cabra inoculada con una suspensión de cerebro de un caso de leucoencefalomielitis caprina por Narayan et al. (1980) (Gogolewski et al., 1985).

El genoma de VAEC es de 9.2 kilobases aproximadamente, al igual que para el VMV, por lo que basado en la secuencia nucleotídica se han construido árboles filogenéticos en los que se ilustra la relación genética entre numerosos aislamientos de LVPR. En un primer análisis, los LVPR fueron divididos en 4 grupos genéticos. Las cepas de VMV K1514 (aislada en Islandia) y SA-OMVV (aislada en Sudáfrica) para las cuales está disponible la información de sus secuencias completas, fueron colocadas en el grupo IV, esto debido a que al comparar la cepa VAEC Co con la VMV K1514 se encontró un 74.8%, 77.5% y 60.0% de homología en la secuencias de aminoácidos de sus respectivas proteínas de gag, pol y env (Chebloune et al., 1996 y Pasick, 1998). La cepa VAEC Co fue asignada al grupo II, en el cual están comprendidos sólo 2 aislamientos de LVPR de origen caprino y para los cuales solamente hay información disponible de una secuencia parcial de pol. Finalmente los miembros de los LVPR de los grupos genéticos I y III fueron los originarios de borregos y cabras.

Sorpresivamente el análisis de 303 y 475 fragmentos nucleotídicos del gen pol, no mostró diferencias entre los LVPR franceses miembros del grupo I (originarios de

borregos), mostrando más homología con la cepa VAEC Co, que con la cepa VMV K1514. Cuando los virus del grupo I fueron comparados con VAEC Co y VMV K1514, la secuencia de aminoácidos presentó una homología de 87% a 100% y 83% a 88% respectivamente. En un segundo informe se compararon las secuencias de ADN de porciones amplificadas de los genes *gag* y *pol* de seis aislamientos de VMV y VAEC originarios de América, Holanda y Suiza. Encontrando una relación estrecha entre estos aislamientos y la cepa VMV K1514 (Zanoni et al., 1992; Leroux et al., 1997).

En un tercer análisis utilizando como iniciadores secuencias del gen *env*, se encontró en 21 aislamientos de LVPR franceses 78% y 79% de homología con respecto a VAEC Co y VMV K1514 respectivamente. Estos hallazgos no parecen ser los únicos con los LVPR de origen francés; dos distintos fenotipos de lentivirus ovinos de origen norteamericano también fueron genotípicamente más parecidos en el gen *env* a VAEC que a VMV. Esto permite sugerir que los lentivirus ovinos franceses y norteamericanos pueden tener un origen común en VAEC o de virus parecidos a VAEC, lo cual es apoyado por las evidencias experimentales que demuestran que los borregos pueden infectarse con VAEC y las cabras con VMV, lo que posibilita la transmisión interespecies quedando descartada la especificidad de especie, aunque es escasa la evidencia directa de que esto ocurra en la naturaleza (Pasick, 1998; Kwang et al., 1995). Existe un informe reciente de la infección experimental del VAEC en un borrego híbrido doméstico-Muflon. (Guiguen et al., 2000).

La considerable homología que presentan los genes estructurales de los virus de ovino y cabra explica la reactividad cruzada entre los dos virus, principalmente entre las proteínas p25 y gp135 en las pruebas de inmunodifusión y ELISA con virus completo. De cualquier modo los genes *env* de estos virus sólo presentan 60% de identidad en los aminoácidos (Pétursson et al, 1992).

Al parecer la variación de razas de cabras juega un papel importante en la susceptibilidad de la infección viral e influencia la manifestación de la enfermedad (Pétursson et al, 1992) como se demuestra en el trabajo de Dolf y Ruff, 1994. Donde por medio de una impresión digital del ADN se observa una clara asociación a la susceptibilidad de artritis inducida por VAEC en cabras Saanen.

PROTEÍNAS VIRALES

Las proteínas virales en los viriones de VAEC son nombradas usando la nomenclatura estándar propuesta para los Retrovirus por Leis. Se denomina poliproteína precursora de env a una proteína de 175 kDa (pPr 175 env) la cual no es un componente estructural, sino una proteína que se produce durante la infección y posteriormente es cortada por una proteasa para formar la glicoproteína de superficie gp135 y la glicoproteína TM de la envoltura viral denominada gp40 o gp45. La glicoproteína de superficie contiene regiones conservadas y variables, y es uno de los componentes del virus más importante que involucra la respuesta de anticuerpos (Clavijo y Thorsen, 1995). También se reporta una proteína de 70 kDa que se produce en bajos niveles (Belov y Whalley, 1988).

Por otro lado la molécula precursora de gag-pol es una proteína de 160 kDa (pPr 160 gag-pol), de la cual deriva una proteína de 55 kDa (Pr 55 gag) que es el producto inicial del gen gag en el VAEC y posteriormente se corta para formar las proteínas del núcleo MA (p17), CA (p28) y NC (p14) según Clavijo y Thorsen (1995). Por otro lado Pétursson et al. (1992) mencionan que los pesos moleculares de las proteínas de MA, CA y NC son de 16, 25 y 14 kDa respectivamente, y la glicoproteína de envoltura presenta una aparente variación de peso molecular (110-135).

Una vez que la molécula precursora de gag-pol es cortada para obtener el precursor de gag, se deriva también el precursor de pol del cual no se ha descrito su peso molecular para el VAEC. Los productos de restricción forman la PR (p10), RT (p66-55) e IN (p32) (**Figura 3**).

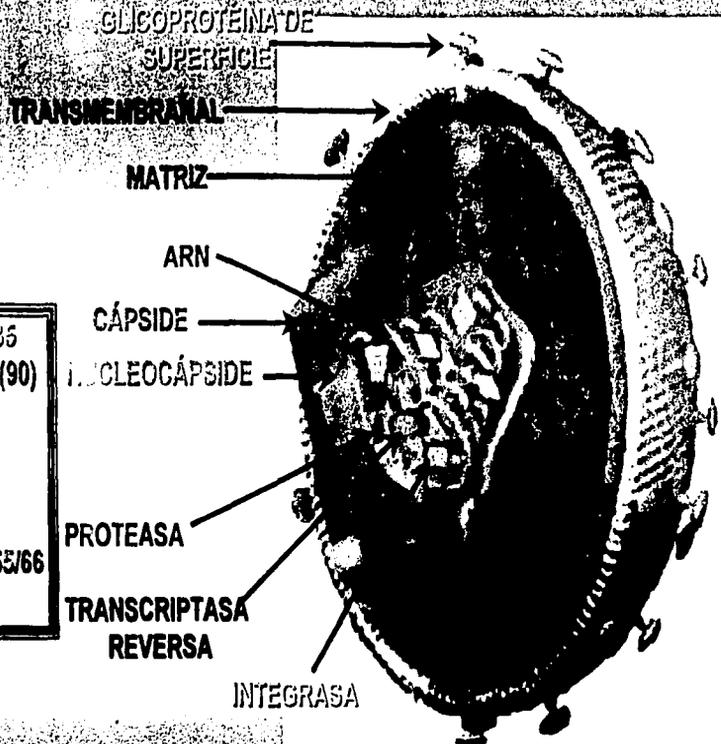
La variación encontrada en el peso molecular de las proteínas codificadas por el VAEC con diferentes técnicas se pueden observar en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Descripción de las proteínas reportadas del virus de artritis encefalitis caprina por diferentes autores.

PROTEÍNAS	VIRUS	TÉCNICA	AÑO	REFERENCIA
14,15,28, 51,65, 105, 135, 140,155	Aislado de E.U	Inmunoprecipitación	1981	J. Virol. Dahlberg et al.
135, 92, 70,45,28,19,16,14	75-G63 CAEV-Co	Inmunoprecipitación	1985	J.gen.Virol. Gogolewski et al
125, 90, 45, 28, 15	-----	Western Blot	1987	Vet Immunol and Immunophatol. McGuire.
130, 24	Aislado Australiano	-----	1987	J Virol. Methods Kirkland y Batty
140, 110, 90, 66, 62, 45, 42, 14	Aislados de Australia	Geles teñidos con plata	1988	Aust Vet J. Ellis et al.
155, 120, 70, 55, 41, 33,31, 27, 24, 23, 21, 18, 16, 14	Aislados de Australia	Western Blot	1988	J. gen. Virol. Belov y Walley
135, 90, 46, 38, 28, 19, 16	75-G63	Inmunoprecipitación	1991	J. Virol. Knowles et al.
25, 17, 14	CAEV-Co	Western Blot	1993	Am J Vet Res. Rimstad et al.
130-135, 42-45, 34-36, 27-28, 18,14.5	Aislado Frances	Western Blot	1993	Comp.Immun. Microbiol. Infect. Dis. Vitu et al.
135, 90, 46, 38, 28	75-G63	Inmunoprecipitación	1993	Virology. Hullinger et al
170, 135, 55, 25	75-G63 CAEV-Co	Inmunoprecipitación	1996	Virology. Chebloune et al

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

Mapa genómico del virus de AEC



Envoltura	env	gp135
Transmembranal	env	gp45(90)
Cápside	gag	p26
Matriz	gag	p17
Nucleocápside	gag	p14
Integrasa	pol	p32
Transcriptasa reversa	pol	p55/66
Proteasa	pol	p10

TESIS CON
FALLA DE CARGEN



CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

El virus entra a la célula hospedera (monocitos/macrófagos y células tipo fibroblásticas) por fusión o por endocitosis mediada por receptores vía glicoproteína de envoltura (gp135, SU), la cual ha sido identificada como el ligando del VAEC (Pétursson et al., 1992; Hullinger et al., 1993). Actualmente poco se conoce acerca de los receptores de LVPR (VMV y VAEC) y se han propuesto 2 candidatos para el receptor del VMV; una proteína de 30 kDa del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y dos proteínas de 15 y 45 kDa, que se han identificado en la actualidad como proteínas asociadas a membrana pero que no pertenecen al complejo mayor de histocompatibilidad. En el caso del VAEC y de VMV se ha comprobado que ambos utilizan diferentes receptores celulares (Hullinger et al., 1993; Bruett et al., 2000; Hötzel y Cheevers, 2000).

Una vez que se da la penetración del virus al citoplasma, libre de su envoltura comienza la replicación con la RT del ARN del virión en una doble cadena de ADN; la cual permanece dentro de la cápside. El evento transcripcional es modulado por la unión de ciertas proteínas regulatorias como Tat y Rev, no para el provirus ADN si no para sus transcritos ARN. Inmediatamente abajo de la región U5 está un sitio de unión inicial con una secuencia complementaria a la secuencia 3' del ARNt, estos sitios marcan el comienzo de la síntesis de la cadena negativa de ADN viral; cuando esta cadena es completada, se sintetiza la cadena extra del ADN. Iniciando esta síntesis en dos secuencias ricas en purinas o segmentos polipurinas (PPT), una se localiza hacia del final de 3' del genoma inmediatamente arriba de la región U3 y la otra es localizada a la mitad del genoma en el final del gen *pol*; este segundo PPT se localiza en una sola cadena de la región del ADN viral lineal no integrado (Saltarelli et al., 1990; Pétursson et al., 1992).

En el proceso de transcripción es adicionado a cada extremo de la molécula de ARN genómico la terminación LTR. La cápside es removida y el ADN de doble cadena es llevado al núcleo de la célula. Este ADN lineal de doble cadena intermedio es circularizado por uniones no covalentes de los LTRs, integrado en el ADN cromosomal del hospedero y entonces es usado para la transcripción por la polimerasa del ARN celular iniciando en el 5' LTR y finalizando en el 3'LTR, generando nuevos ARNs genómicos y varios ARNm (Coffin, 1991; Pétursson et al., 1992; Clavijo y Thorsen, 1995).

La extremidad 5' del ARN viral comienza con una región llamada R (85 nucleótidos) seguida por una secuencia única llamada U5 (78 nucleótidos) mientras que en la extremidad 3' hay una única secuencia U3 (286 nucleótidos) seguida por una región R. Esta región contiene la señal y el sitio de unión de una poli-A final, característica del ARNm de las células eucariotas. De esta manera la organización general de la molécula de ARN viral es R-U5-gag-pol-env-U3-RAAAA.... (Saltarelli et al, 1990; Kalinski et al., 1991).

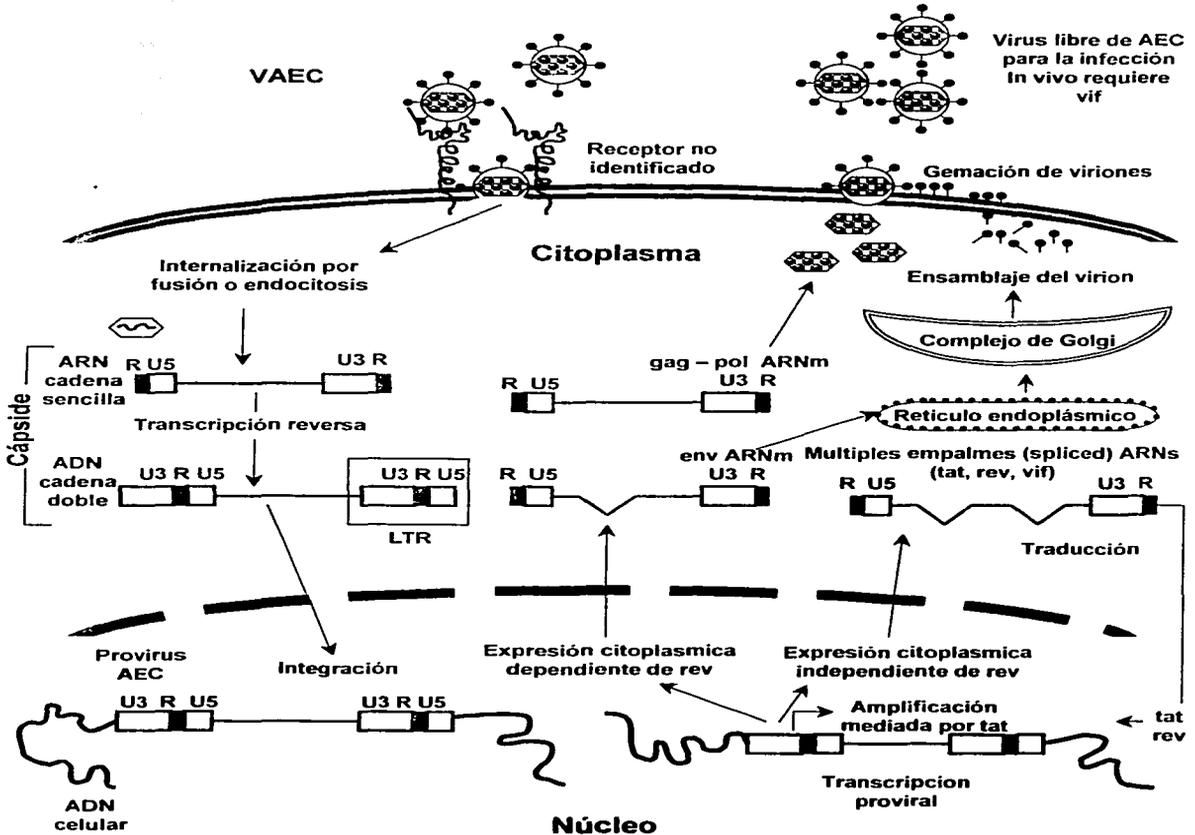
Cuando el ARN viral entra a una célula permisiva, éste es transcrito en una doble cadena de ADN en el cual los genes virales son adicionados a los costados por repeticiones terminales idénticas como sigue: U3-R-U5-gag-pol-env-U3-R-U5. La región U3 contiene secuencias promotoras y secuencias que incrementan la especificidad viral que regulan la iniciación y la velocidad de síntesis de ARN en la célula infectada (Saltarelli et al., 1990).

También incluye el reconocimiento de la caja TATA por la polimerasa II del ARN celular que cataliza la síntesis de ARN viral a partir del ADN viral (Pétursson et al., 1992).

La síntesis de las proteínas virales sucede una vez que es sintetizado el ARN del virión y 2 ARNm principales, son transcritos: (1) Un ARN de 35s que probablemente es el ARN del virión completo, codifica la proteína Gag; el mismo ARN es traducido en diferentes fragmentos de lectura para producir la proteína Pol. (2) Un ARNm de 25s, empalmado (spliced) del ARN de 35s, es traducido para producir el precursor de la proteína Env, esta traducción también involucra diferentes fragmentos de lectura. Las principales poliproteínas son separadas post transcripcionalmente por una proteasa viral para producir proteínas virales maduras (Murphy et al., 1999).

La proteína Env entra a la cisterna del retículo endoplásmico durante la síntesis y es llevada al complejo de Golgi donde es glicosilada y luego llevada a la membrana plasmática. Una fracción de la poliproteína de gag sigue la misma ruta glicosilandose y alcanzando la membrana plasmática. Junto con el ARN viral, los precursores de *gag* y *gag-pol* comienzan el ensamble de la nucleocápside en la parte interna de la membrana plasmática y las poliproteínas son separadas durante el proceso. Posteriormente se da la gemación con la unión de la nucleocápside a proteínas Env ya fijadas como peplómeros en la membrana plasmática (Pétursson et al., 1992; Murphy et al., 1999) (**Figura 4**).

Figura 4. Ciclo de replicación del VAEC.



Propuesta del ciclo de replicación del virus de AEC. La infección comienza con la unión del virión vía la gp 135 a el receptor celular todavía no conocido; esta unión permite que se interne el virus al citoplasma y posteriormente se realice la transcripción reversa y enseguida se adicionen las secuencias repetidas (LTR) a cada extremo del ARN viral. El ADN viral es integrado al núcleo de la célula hospedera. Una vez que comienza la actividad transcripcional, se codifican proteínas regulatorias como tat y rev que controlan la regulación de la traducción de las proteínas y el genoma viral. Una vez codificadas las proteínas y el nuevo genoma viral, se lleva a cabo el ensamble y gemación de nuevos viriones.

En contraste con los retrovirus oncogénicos, el ADN lentiviral es replicado en el núcleo de la célula, explicando porque los lentivirus pueden replicarse en células que no están en división. En las células infectadas por lentivirus mucho del ADN viral está en forma lineal y aparentemente muy pocas moléculas de ADN viral están integradas al ADN de la célula hospedera, posiblemente en el orden de 1 a 2 moléculas en promedio por célula (Pétursson et al., 1992).

Por otro lado, 100-200 copias de moléculas de ADN lineal de doble cadena libre se encuentran en células infectadas con lentivirus, por esto se sugiere que este alto número de moléculas de ADN viral libres en células infectadas puede estar asociado con el efecto citolítico de los lentivirus, que no se observa en células infectadas con oncovirus (Pétursson et al., 1992).

La replicación de los retrovirus es acompañada por una alta frecuencia de mutaciones insertacionales, puntuales y deleciones estimadas en 3×10^{-5} mutaciones por nucleótido por ciclo de replicación. Sugiriendo frecuentes errores por la RT. Los sitios de mutación son distribuidos indistintamente; los genes *gag* y *pol* se conservan como ciertas partes del gen *env*. Así mismo otras partes de *env*, principalmente las regiones codificadas en los sitios en los cuales se unen los anticuerpos, son altamente variables (Pétursson et al., 1992; Murphy et al., 1999).

Hay también un alta frecuencia de recombinaciones entre genomas de retrovirus en células doblemente infectadas. La recombinación es un evento temprano que ocurre antes de la integración, durante la transcripción reversa para formar ADN viral. Juntas la frecuencias de mutaciones y recombinaciones exceden por mucho cualquier otro virus animal (Murphy et al., 1999).

El concepto de quasi especies fue propuesto por Manfred Eigen y se define como una compleja población que se perpetua por si misma de diversas entidades que actúan como un todo. El factor por lo que, los virus ARN en general, y los lentivirus en particular existen las quasi especies es atribuido al hecho de las polimerasas de ARN que tienen intrínsecamente altos porcentajes de errores y un deficiente mecanismo de corrección. El resultado es que los virus RNA reproducen por si mismos sus errores, el porcentaje de error de la polimerasa del RNA viral es directamente responsable para determinar el tamaño e

integridad de la quasi especie; un porcentaje de error bajo esta asociado con quasi especies que ocupan volúmenes pequeños de espacios en la secuencia. Por otro lado un porcentaje de error alto resulta en una quasi especie que ocupa grandes volúmenes de espacio en la secuencia (Murphy et al., 1999).

Se sabe que el tipo de virus que infecta originalmente persiste en el animal coexistiendo con las nuevas variantes y que la progresión de la enfermedad no esta ligada con la aparición de nuevas variantes. El virus de VAEC presenta considerable variación de cepas (Ellis et al., 1987; Pasick, 1998; Murphy et al., 1999).

Esta variabilidad no es solo un instrumento en la habilidad del lentivirus para evadir la respuesta inmune del hospedero e incrementar la infección persistente; también pudiera estar involucrado en la posibilidad de cruzar la barrera de especies para el caso del VMV y del VAEC; lo que con lleva a la idea de que empiece a emerger para los LVPR no una colección de especies distintas, pero si de grupos heterogéneos poseyendo, un rango variable de hospederos y capacidades patogénicas. Esta visión tiene obvias implicaciones para el diseño de las pruebas de diagnóstico, desarrollo de vacunas y drogas para la implementación de las medidas de control de la enfermedad (Pasick, 1998; Murphy et al., 1999).

EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la infección de VAEC varia considerablemente de rebaño a rebaño y de país a país; típicamente los rangos de prevalencia van de 65 a 80% pero prevalencias cercanas a 100% se han reportado en rebaños y países con razas de cabras de origen Europeo. Prevalencias bajas (18-24%) han sido reportadas por Alemania y Australia, y prevalencias de aproximadamente 40% han sido reportadas en Estados Unidos, países de Europa Occidental y Suiza mientras que prevalencias del 95% han sido reportadas para Canadá. A pesar de estas altas prevalencias de infección, la presentación de infección clínica de VAEC raramente excede del 15-30% y la seroconversión puede retrasarse o nunca ocurrir (Rowe y East, 1997; Guiguen et al., 2000).

La enfermedad se encuentra presente en todo el mundo pero principalmente se localiza en sistemas intensivos de producción de leche. La mayor ruta de transmisión de la

AEC ocurre principalmente a través de la ingestión de calostro y leche de hembras infectadas como se ha comprobado con trabajos realizados por Ellis et al., 1986 y Rimstad et al., 1993. La transmisión horizontal también ocurre. La práctica de mezclar la leche de varias madres para la alimentación puede facilitar la diseminación de la enfermedad a través de la población de cabritos (Pétursson et al., 1992; Rowe y East, 1997; Matthews, 1999).

Otras fuentes de transmisión de la enfermedad pueden ser por el proceso de ordeño de cabras en producción de leche, por transferencia de sangre de una cabra infectada a una no infectada por ejemplo a través de tatuajes o por uso múltiple de una aguja. Por contacto directo entre cabras se requeriría un contacto prologado para que el virus pase en los fluidos orgánicos como la saliva, secreciones urogenitales, heces y secreciones del tracto respiratorio principalmente (Pétursson et al., 1992; Rowe y East, 1997; Matthews, 1999).

La transmisión en útero probablemente no ocurra o es en niveles muy bajos (Reddy et al., 1993; Kwang et al., 1995). El virus es muy lábil en el medio ambiente y la transmisión vía pastura o instalaciones, posiblemente no sea factible (Matthews, 1999). Recientemente se ha demostrado la transmisión venérea del virus de AEC tanto en animales infectados naturalmente como artificialmente. (Travassos et al., 1998 y 1999).

La transmisión natural directa entre especies como el borrego y la cabra no ha sido bien demostrada. Las cabras infectadas con AEC permanecen portadoras del virus de por vida y muchas portadoras asintomáticas pueden estar en los rebaños (Pétursson et al., 1992; Matthews, 1999).

SIGNOLOGÍA CLÍNICA

El virus de la AEC causa una poliartritis degenerativa crónica, mastitis indurativa aséptica y una neumonía difusa progresiva intersticial en cabras adultas; así como una leucoencefalomielitis paralítica en cabras jóvenes. La prevalencia de la infección es arriba del 81% en cabras lecheras de USA y del 70% en Suiza (Zanoni et al., 1992; Reddy et al., 1993; Kwang et al., 1995). Esta enfermedad se caracteriza por un curso lentamente progresivo con solo un poco mas del 40% de cabras que llegan a presentar artritis, mastitis subclínica crónica y neumonía intersticial.

En contraste con los ovinos la artritis es la manifestación clínica predominante de esta enfermedad causada por la infección de lentivirus de cabras. La enfermedad se desarrolla lentamente y usualmente aparece en animales adultos de 2 a 9 años de edad presentando dos signos importantes que son el cursar sin fiebre y no perder el apetito (Pétursson et al., 1992).

En algunos animales la enfermedad progresa rápidamente pero en otros el curso es crónico con episodios de manifestaciones agudas, seguidas por remisiones. La severidad de las cojeras es variable, yendo de escasa rigidez a dolor extremo estando de pie el animal, con pérdida gradual de la condición general y restricción del movimiento (Trigo, 1991; Leyva, 1994).

Los animales con avanzada artritis pueden presentar deformidades de las articulaciones y contracturas al flexionarlas, con pérdida de la función de las extremidades y cambios degenerativos que incluyen mineralización y erosión de la superficie articular (Mc Guire, 1987; Nazara, 1991).

El virus de AEC afecta todas las membranas sinoviales incluyendo la de las articulaciones, tendones y bursa; produciendo una sinovitis crónica progresiva y artritis con exceso de fluido sinovial. La articulación carpal (rodilla) es primeramente afectada observándose aumento del grosor; Cualquier otra articulación puede afectarse, particularmente la de la paleta, rodilla del miembro posterior, corvejón (tibio-tarsianas) y menudillo. La bursa atlantal y supraespinosa con frecuencia aumentan de tamaño después del curso de la enfermedad (Pétursson et al., 1992; Amerighno et al., 1993; Matthews, 1999).

La enfermedad neurológica en las cabras se observa en animales jóvenes de 2 a 6 meses de edad, seguida de un curso rápido con síntomas de paresia y parálisis; Las cabras que son ligeramente afectadas pueden sobrevivir y usualmente desarrollan artritis posteriormente; algunas veces la encefalitis ocurre en animales adultos. La neumonía intersticial crónica puede ser encontrada asociada con infecciones lentivirales en cabras, observándose disnea. La mastitis indurativa crónica se observa en cabras infectadas con VAEC y puede afectar la producción de leche (Ellis et al., 1988a; Ryan et al., 1993).

PATOLOGÍA

Los cambios artríticos en cabras están asociados usualmente con el epitelio sinovial, cavidades, articulaciones, vaina de tendones y bursas. Las articulaciones afectadas aumentan de tamaño por engrosamiento del subcutáneo y la distensión de la cápsula articular, con incremento del fluido sinovial; hay hiperplasia del sinovio con protusión de vellosidades y trazas de fibrina. Esto es acompañado con erosión del cartilago articular y destrucción del hueso subcondral y mineralización. Microscópicamente hay infiltración de células mononucleares en estructuras subsinoviales con proliferación de células sinoviales, hay infiltración perivascular de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas y una tendencia a la formación de folículos linfoides en casos activos, vasculitis y necrosis de algunas vellosidades. En casos avanzados las lesiones son más degenerativas que inflamatorias (Mc Guire, 1987; Nazara, 1991; Pétursson et al., 1992; Perry et al., 1995).

La mastitis lentiviral es caracterizada por inflamación no supurativa con infiltrado difuso de células mononucleares en el parénquima. Los folículos linfoides también se observan en la glándula mamaria adyacentes a los ductos y el septo interlobular (Trigo, 1991; Pétursson et al., 1992).

Los pulmones son mas pesados de lo normal y no se colapsan al removerlos; Microscópicamente se observa engrosamiento del septo interalveolar con infiltración de células mononucleares, hiperplasia de las células del músculo liso y algunas fibrosis; los alvéolos se encuentran obliterados en varios casos. Folículos linfoides perivasculares y peribronquiales con centros germinales activos son una característica común de neumonías lentivirales, una característica importante es el incremento de nodo linfoide mediastínico con cambios hiperplásicos (Zinnk et al., 1987; Pétursson et al., 1992).

En el sistema nerviosos central las lesiones consisten de cambios inflamatorios de células mononucleares multifocales más pronunciados en localizaciones subependimales y perivasculares; nódulos gliales se observan en casos severos de necrosis. Inflamación de meninges en varios grados, el plexo coroideo es a menudo lentamente afectado con formación de folículos linfoides con centro germinales. La desmielinización es comúnmente observada con destrucción de axones (Nazara, 1991; Trigo, 1991).

En el cordón espinal la lesión es principalmente alrededor del canal central, pero algunas veces las áreas de desmielinización se observan en segmentos los cuales se parecen a placas de esclerosis múltiple de humanos (Nazara, 1991; Pétursson et al., 1992).

PATOGENESIS

Como ya se mencionó anteriormente la mayor ruta de transmisión de la AEC es a través de la ingestión de calostro y leche aunque el sitio primario de replicación aun es desconocido, el tejido linfoide de la región oral y gastrointestinal parecen ser los candidatos.

La principal célula hospedera de AEC son células de la línea monocito/macrófago, los monocitos llevan el genoma del virus pero no permiten una infección productiva antes de que migren a los tejidos y maduren en macrófagos. Estos monocitos han sido llamados "Caballos de Troya" por su papel en la transportación del virus sin que se detecte por el sistema inmune. Este tipo de infección restrictiva de monocitos y la falta de infección de linfocitos CD4 puede explicar la baja carga de virus en vía sanguínea; lo cual es considerablemente mas bajo que lo que se observa en VIH en humanos. No se ha reportado que los LVPR que repliquen en altos títulos en nodos linfoides (Jackson et al., 1991; Turelli et al., 1997; Peterhans et al., 1999).

Generalmente la estrategia de los LVPR parece consistir en bajos niveles de replicación, lo cual evita la estimulación de una eficiente respuesta inmune (Coffin, 1991; Peterhans et al., 1999) como en la glándula mamaria, la cual es importante para una eficiente transmisión a la progenie. Además, los virus pueden también replicarse en el pulmón, lo cual es importante para la transmisión horizontal. La capacidad de los VAEC de causar los diferentes cuadros clínicos puede ser por un sin numero de razones como la variación de cepas, factores predisponentes adicionales o por factores de respuesta del hospedador (Ellis et al., 1988). El papel de la replicación en tejidos que son irrelevantes para la transmisión viral es desconocido. En particular, la artritis observada en cabras infectadas con el VAEC puede ser irrelevante para el éxito del virus. Esta aseveración se basa en la observación de que aproximadamente dos terceras partes de cabras infectadas no desarrollan artritis y por lo cual no hay evidencia de que los animales artríticos puedan

transmitir el virus mas eficientemente que su contraparte asintomática (Peterhans et al., 1999).

También se han encontrado muchas células con trascripción viral en áreas inflamadas del sistema nerviosos central, pulmones, articulaciones y glándula mamaria y de las cuales la mayoría fueron identificadas como macrófagos. ARN viral también fue encontrado en células endoteliales, células sinoviales y células epiteliales de criptas intestinales, tubulos renales y folículos de la tiroides (Pétursson et al., 1992).

INMUNOLOGÍA

El VAEC causa una enfermedad inmunomediada no supurativa, considerándola el análogo a la infección de VIH; debido a que no desarrolla uniformemente una enfermedad clínicamente aparente y es una dicotomía la respuesta inmune a la glicoproteína SU y TM. El VAEC no afecta linfocitos por eso es que no se observa inmunosupresión como en otros lentivirus. La SU del VAEC esta ligada a la interacción de células de membrana sinovial, al estado de enfermedad y a la carga viral (Knowles et al., 1991; Peterhans et al., 1999; Cheevers et al., 2000; Beyer et al., 2001).

Las cabras persistentemente infectadas por un período largo de no-progresión tienen relativamente una baja carga viral y perfiles inmunológicos consistente con respuesta tipo I (celular) definida por: 1) títulos de anticuerpos relativamente bajos a SU y TM, 2) inclinación de respuesta a IgG2 a la SU y, 3) una subclase dominante de linfocitos T CD4+ caracterizado por una expresión genética diferencial de IL-2 e interferón gamma (IFN γ) producido principalmente por células asesinas naturales activadas por la IL-12 derivada de células presentadoras de antígeno lo que por consiguiente promueven las funciones inmunomediadas celulares (Perry et al., 1995; Cheevers et al., 2000; Beyer et al., 2001).

Por otra parte la artritis esta asociada con una relativa carga viral alta, una elevada reactividad de anticuerpos IgG1 a VAEC en suero y líquido sinovial y respuesta de linfocitos T th2(respuesta inmune humoral) a proteínas de envoltura y transmembranal de VAEC. La respuesta inmune tipo II, refleja la activación de linfocitos T tipo 2 que producen IL-4 y promueven una proliferación de células B antígeno-especificas e

inmunoglobulinas de la clase IgA, IgE y IgG1 (Perry et al., 1995; Cheevers et al., 2000; Beyer et al., 2001).

La extensiva hiperplasia cortical de nodos linfoides regionales y la formación de folículos secundarios con gran cantidad de células plasmáticas de diversos sinovios afectados, son indicadores adicionales de la activación crónica de células (DeMartini et al., 1983; Perry et al., 1995; Cheevers et al., 2000, Beyer et al., 2001).

La generación *in vivo* de variantes antigénicas del VAEC similares a las variantes de lentivirus humano, han sido identificadas por diferencias en la sensibilidad de neutralización de epítopes de la proteína de superficie; estas variantes causan que en un animal infectado no puedan neutralizarse por anticuerpos pre-existentes (la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ también varía) y que por ende puedan replicarse preferentemente a la cepa del virus que infectó originalmente por lo que no se controla la persistencia viral. Se ha demostrado que la primera aparición de anticuerpos neutralizantes se detectan a menudo de 3 a 5 meses después del periodo de incubación y el desarrollo de la variación se da entre los 9 y los 11 meses después de este mismo periodo de incubación; donde el virus que infectó primeramente y los virus variantes coexisten en la cabra infectada (Ellis et al., 1987; Lichtensteiger et al., 1993; Peterhans et al., 1999; Rimstand et al., 1993; Knowles et al., 1990).

Los anticuerpos a p28, p25 y p16 (Rosati et al., 1995) del VAEC persisten en el suero de muchas cabras infectadas una vez que desaparece la inmunidad pasiva y es la forma de diagnóstico básico; aunque anticuerpos a gp 125, gp 90 y gp 70, también se encuentran en suero y fluido sinovial, la concentración de anticuerpos a gp 125 y gp 90 excede por 100 a 1000 veces más que para p28. Esta alta concentración de anticuerpos en fluido sinovial a gp 125 y gp 90 correlaciona positivamente con la producción de una gran cantidad de anticuerpos IgG1 en el sitio (Mc Guire, 1987). Esta respuesta de anticuerpos a la gp135 (proteína de envoltura) y TM se ha observado que correlaciona con la severidad de la artritis, por lo que la prevacunación de cabras con VAEC inactivado permite altos niveles de anticuerpos contra GP135 empeorando la severidad de la artritis (Mc Guire, 1987; Knowles et al., 1990 y 1991; Vitu et al., 1993; Perry et al., 1995). Dado el precedente de autoinmunidad en las infecciones lentivirales es posible que la artritis inducida por

VAEC pueda ser argumentada por un epítope mimetizado de epítopes sinoviales del hospedador por la proteína de envoltura de VAEC (Davies et al., 1997).

La segregación inmunológica de cabras infectadas con VAEC asociada a la carga del virus y el estado clínico sugiere una estrategia de vacunación para la restricción de la replicación del virus y la prevención de la enfermedad basada en enfocarse en una respuesta tipo 1 a SU de VAEC. Se sugiere que una apropiada citocina exógena en el sitio de inmunización puede potencializar y expandir la subclase de linfocitos Th2 específicos contra el antígeno (SU) pero los experimentos realizados con IL-12 no han podido dirigir esta respuesta inmune (Cheevers et al., 2000).

Las cabras naturalmente infectadas con VAEC tienen una pobre proliferación de linfocitos en respuesta *in vitro*, solo el 42% de cabras naturalmente infectadas con VAEC son capaces de montar una respuesta de células T *in vitro* al virus después de un gran periodo de infección. La baja producción de células mononucleares en sangre periférica (CMSP) en cabras infectadas es un indicador de que estas fueron inmunológicamente comprometidas, por lo que se sugiere que las cabras infectadas desarrollan infecciones oportunistas similares a HIV (Davies et al., 1997).

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LENTIVIRUS

Cualquier cabra seropositiva a las pruebas de AEC esta infectada de por vida ya que los anticuerpos presentes no protegen contra la enfermedad, solamente son indicadores de la infección que persiste aun en presencia de anticuerpos neutralizantes, por la habilidad del virus de insertarse de forma latente como DNA proviral dentro de las células del hospedero (Matthews, 1999).

En contraste una cabra probada seronegativa no puede considerarse libre de la infección, por que las pruebas en la actualidad son poco sensibles para detectar el periodo entre el momento de la infección con el virus y la seroconversion (producción de anticuerpos detectables) el cual puede ser muy prolongado. Los cabritos infectados al nacimiento tienen niveles detectables de anticuerpos calostrales por lo menos 2 o 3 meses,

pero pueden subsecuentemente reaccionar negativos a las pruebas hasta que seroconvierten entre los 6 y 12 meses de edad. Algunas cabras seropositivas pueden periódicamente dar resultados seronegativos o seroconvertir después de un periodo de estrés (por ejemplo el parto). Probarlas antes de la preñez no necesariamente asegura todas las madres que van a seroconvertir después del parto las cuales son una fuente potencial de infección para sus crías (Matthews, 1999).

Los niveles de anticuerpos pueden fallar con el progreso de la enfermedad, aun con un cuadro clínico declarado los animales pueden reaccionar seronegativos.

Las pruebas más sensibles están disponibles en los laboratorios especializados pero no para tamizaje de rutina, como son el aislamiento viral a partir de bazo, nodos linfoides, SNC, articulaciones y pulmón; en un animal vivo el virus puede aislarse de leucocitos en cocultivo con células permisibles. El intentar el aislamiento del virus a partir de leucocitos no siempre es positivo en animales infectados por consiguiente un resultado negativo no siempre es confiable (Pétursson et al., 1992; Matthews, 1999).

Algunos métodos en el diagnóstico son muy poco sensibles y pueden fallar dando reacciones positivas con un contenido relativamente bajo de anticuerpos en el suero o reacciones negativas si no se elige los iniciadores adecuados. En general, la repetición de las pruebas es recomendable debido al tiempo tan variable que requiere la seroconversión y que en algunas cabras la respuesta de anticuerpos es mínima. Muchos animales infectados puede nunca exhibir signos del síndrome de VAEC (Reddy et al., 1993; Clavijo y Thorsen, 1996).

El éxito en el control de la propagación de la infección de VAEC depende en gran parte de la detección temprana y remoción de animales infectados del rebaño para lo cual existen dos posibilidades para diagnosticarlo: La detección de anticuerpos específicos contra el virus por pruebas serológicas y el aislamiento del virus o la detección de la presencia de antígenos virales específicos (Reddy et al., 1993; Clavijo y Thorsen, 1995b).

Lo ideal es que el diagnóstico de la AEC se base en un análisis completo donde se considere por lo menos dos de los siguientes aspectos: Niveles de anticuerpos en suero contra AEC, signos clínicos, lesiones postmortem, cambios histopatológicos, aislamiento del virus de células sinoviales o de cerebro (principalmente en fases tempranas de la

infección y en animales que están infectados pero presentan poco o nada de cambios patológicos) o confirmación del genoma viral y la toma de placas radiográficas que pueden determinar la severidad o progresión de las lesiones artríticas en forma individual y demostrar la presencia de neumonía (Pétursson et al, 1992; Matthews, 1999).

EXAMINACIÓN DEL FLUIDO SINOVIAL.

Fluido sinovial café rojizo con un gran número de células (1000 a 2000 células/ml) principalmente células mononucleares (cabra normal menos de 500 células/ml), así como contener restos de fibrina y presencia de anticuerpos (Matthews, 1999).

EXAMEN HISTOLÓGICO DE ARTICULACIONES.

Infiltración de células mononucleares (macrófagos, linfocitos y células plasmáticas) subsinoviales, hiperplasia o hipertrofia vellosa sinovial, áreas focales de necrosis entre la membrana sinovial o alrededor del tejido conectivo (Pétursson et al., 1992; Matthews, 1999).

HALLAZGOS MACROSCÓPICOS POSTMORTEN EN ARTICULACIONES.

Hiperplasia de membrana sinovial con engrosamiento fibrosis y en casos crónicos calcificación de la cápsula articular, tendones y ligamentos. Reacción periosteal con producción de osteofitos periarticulares. Enfermedad degenerativa de articulaciones con ulceración y erosión de los cartílagos articulares y destrucción del hueso subcondral.

Los órganos blancos principalmente afectados incluyen, pulmones, nodos linfoides mediáticos, sistema nervioso central, glándula mamaria y articulaciones (Pétursson et al., 1992).

PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS EN CULTIVO CELULAR.

El cultivo celular es muy importante para la producción de antígeno que se utiliza en las pruebas rutinarias de serodiagnóstico del VAEC. Se puede utilizar antígeno viral completo de ovino o caprino de una forma cruda o parcialmente purificado, el cual es producto de un cultivo de tejido que por lo general es tedioso, caro, lento y con una

replicación de los lentivirus en bajos títulos (Reddy et al., 1993; Kwang et al., 1995). Produciendo una mínima cantidad de proteínas virus-específicas que son frecuentemente contaminadas con proteínas celulares; esta contaminación es una fuente potencial de reacciones falsas positivas. De acuerdo a la oficina internacional de epizootias la falta de disponibilidad de la cantidad y calidad de antígeno virus-específico ha impedido el desarrollo de una prueba sensible y costo-efectiva para la detección de anticuerpos específicos contra VAEC (Kwang et al., 1995; Simard et al., 2001).

Recientemente proteínas virales recombinantes han encontrado su aplicación para la detección de anticuerpos antivirales de lentivirus, en contraste con el cultivo de tejido convencional y métodos de purificación; las técnicas de DNA recombinante permiten una eficiente producción de grandes cantidades de proteínas vírales altamente purificadas, específicas y económicas. Las proteínas recombinantes lentivirales ovinas se han producido en sistemas de expresión bacterial como es *Escherichia coli*; este es un sistema que provee una abundante y elevada pureza (puede existir contaminación por proteínas del vector) e inmunobiológicamente útil para LVPR (Kwang et al., 1995; Rosati et al., 1995).

PRUEBAS SEROLÓGICAS.

La detección de animales infectados con LVPR en todo el mundo es realizada por pruebas serológicas como la Inmunodifusión en agar gel (IDAG), ELISA y WB. La reactividad antigénica cruzada entre el lentivirus ovino y caprino de los productos del gen gag y env es bien conocida y por tanto la preparación de antígenos de lentivirus ovino son los mas ampliamente usados en las pruebas serológicas para los LVPR (Rosati et al., 1995; Pasick, 1998)

Las pruebas serológicas (principalmente ELISA e IDAG) tienen el problema de validación y estandarización, lo cual se puede hacer con métodos como el radioinmunoensayo o el inmunoblotting (método exitosamente usado en la validación de la ELISA para la detección del lentivirus humano). Se reconoce que el inmunoblotting es más sensible que la prueba de ELISA y por lo cual permite el reconocimiento de reacciones no específicas, minimizando los resultados falsos positivos. Concluyendo que la inmunodifusión y la ELISA indirecta se pueden seguir usando para el diagnóstico

serológico del virus de AEC por su aplicación práctica, siempre y cuando se combine con inmunoblotting (Zanoni et al., 1998; Matthews, 1999).

INMUNODIFUSIÓN.

Esta es la prueba más extensamente usada para detectar anticuerpos contra LVPR y esta disponible comercialmente. Este kit puede usar como antígeno el virus de la neumonía progresiva ovina (VNPO) o VAEC, aunque se ha demostrado que la prueba que usa VNPO es de limitado valor diagnóstico para VAEC, dado la baja sensibilidad que tiene comparada con una prueba de IDAG basada en el uso de VAEC. La baja sensibilidad se atribuye a una divergencia entre las proteínas de gag (25%) y env (40%) de VAEC y VNPO. Otro aspecto relacionado con la baja sensibilidad es que la IDAG requiere la participación de múltiples interacciones epítopes-anticuerpos para obtener un resultado positivo mientras que otras pruebas como la de inmunoprecipitación requiere solamente la unión de un solo epítotope por anticuerpo para obtener un resultado positivo (Reddy et al., 1993; Knowles et al., 1994; Kwang et al., 1995; Pasick, 1998). Se ha desarrollado un sistema de producción de antígeno económico y eficiente, reduciendo el costo de producción en aproximadamente 20 veces, permitiendo que un solo técnico pueda mantener los cultivos en producción con aproximadamente 20 litros de sobrenadante de cultivo/semana (suficiente sobrenadante para 25,000 pruebas de IDAG) (Kirkland y Batty, 1987). La combinación de la proteína interna p24, p28, la gp 130 y la gp135 mejoran mucho los resultados serológicos (Kirkland y Batty, 1987; Knowles et al., 1994).

PRUEBA DE ELISA

Las técnicas inmunoenzimáticas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ELISA) presentan las características de una alta sensibilidad, especificidad, rapidez, economía (los productos utilizados tienen una larga vida de anaquel), posibilidad de hacer estudios de grandes poblaciones en un corto plazo, sencillez, no precisa de instalaciones costosas y existe la posibilidad de automatizarlo. No obstante que las técnicas inmunoenzimáticas se comenzaron a desarrollar desde 1966 por Avrameas y Uriel, en los últimos años se han comenzado aplicar de forma generalizada. El ensayo inmunoenzimático ELISA, se basa en

el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Estando uno de los componentes insolubilizado sobre un soporte, el complejo antígeno-anticuerpo quedará inmovilizado y por tanto podrá fácilmente ser revelado mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro. La cantidad de reacción detectada del producto es proporcional a la cantidad de enzima unida al antígeno retenido en la fase sólida. La cantidad de antígeno viral es determinada por el grado de actividad enzimática de la muestra a probar comparando con la reactividad de unas muestras controles positivos y negativos adecuados (Sánchez-Vizcaino y Cambra, 1987; Ternyinc y Avrameas, 1989).

Los tipos de ELISA se pueden clasificar en función del reactivo marcado y de la finalidad para el que sea utilizado son:

Anticuerpos marcados	{	ELISA Directo ELISA Indirecto ELISA Doble sándwich de anticuerpos ELISA Indirecto doble sándwich de anticuerpos
Antígenos marcados	{	ELISA Competición ELISA Directo
Detección de antígenos y su cuantificación	{	ELISA Indirecto, doble sándwich de anticuerpos, indirecto doble sándwich de anticuerpos y competición.
Detección de anticuerpos y su cuantificación	{	ELISA indirecto e indirecto doble sándwich de anticuerpos.

(Sánchez-Vizcaino y Cambra, 1987; Ternyinc y Avrameas, 1989).

ETAPAS BÁSICAS DE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA.

1.- Tapizado o adsorción de antígenos: Las microplacas son el material más adecuado y de mayor utilidad en la actualidad que pueden ser de 96 pozos o más o en tiras de poliestireno, polivinilo, polipropileno. Los plásticos usados para la preparación de microplacas son generalmente de naturaleza hidrofóbica, así como la reacción de inmovilización de las proteínas en estos plásticos. La fijación se realiza con amortiguador de carbonato a 37° C o a 4° C (siendo los resultados finales más repetitivos cuando se adsorben antígenos). Cuanto mayor es el grado de pureza de los antígenos, mejor son los índices de especificidad y repetibilidad de resultados. La pérdida de epítopes o los cambios de conformación de los anticuerpos de captura durante la inmovilización son importantes factores que pueden afectar la sensibilidad de los inmunoensayos.

2.- Conjugados y substratos: Los conjugados más utilizados son los anti especie, que pueden ser policlonales, monoclonales o fragmentos Fab de anticuerpos, o el uso de proteína A que es un compuesto importante de la pared de *Staphylococcus aureus*, y cuya propiedad biológica característica es su gran afinidad por las inmunoglobulinas G (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1987; Ternynck y Avrameas, 1989). Una molécula de enzima puede romper un millón de moléculas de substrato por minuto, sin pérdida de la actividad enzimática. Las enzimas más utilizadas son: fosfatasa alcalina de la mucosa intestinal de ternera o de *E. coli* y peroxidasa de rábano picante; así como beta-D-galactosidasa (extraída de *E. coli*), glucosa oxidasa (extraída de *Aspergillus niger*), glucoamilasa, lactoperoxidasa, ribonucleasa, tirosinasa, lactato deshidrogenasa, beta-D-glucorinasa y citocromo C (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1987; Ternynck y Avrameas, 1989).

El substrato más utilizado para la fosfatasa alcalina es el p-nitrofenilfosfato, la hidrólisis de este compuesto proporciona un color amarillo intenso, cuantificable a 405 nm de longitud de onda. La reacción puede ser detenida con hidróxido de sodio o no detenerla como en el caso del uso de anticuerpos monoclonales en los que se pueden realizar lecturas incluso tras 16-24 hrs. de incubación con el substrato consiguiendo alta sensibilidad.

El substrato más idóneo para la peroxidasa es la orto-fenildiamina dihidroclorada (OPD). La hidrólisis de dicho substrato, produce una coloración amarillo pálido, que una

vez detenida usando ácido sulfúrico torna al naranja-rojizo intenso. Dicha coloración puede ser cuantificada espectrofotométricamente a 450nm. Otros substratos utilizados para la peroxidasa son: ABTS (ácido 2'-acino-di-3- etil benzotiazolinci- 6- sulfónico), 5-AS (5 amino salicílico), 3,3 DXDH (clorhidrato de 3,3 dimetoxibencidina), 3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB), 3-aminoetil-carbazol (AEC) y 4 cloro-naftol (4-C-1N). Las reacciones enzimáticas pueden detenerse con hidróxido de sodio para el caso de 5-AS, DXDH y ABTS. Aunque para este último se puede utilizar EDTA o FH (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1987; Ternyinc y Avrameas, 1989) (Figura 5).

3.- Repetibilidad y fiabilidad. El porcentaje de repetibilidad adecuado es de cerca del 100 % y la fiabilidad se realiza al comparar la técnica de ELISA con otras técnicas como el cultivo in vitro y aislamiento, ensayos de infectividad, detección de ácidos nucleicos etc., que de muestren la existencia o no del agente patógeno o de sus secuelas inmunológicas.

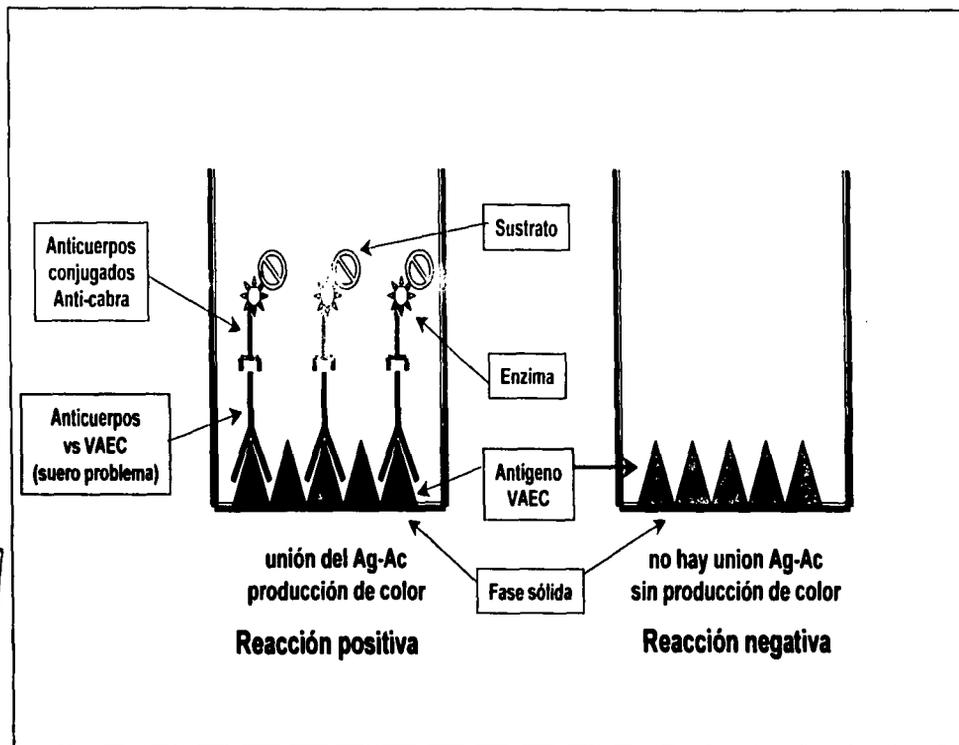
La comparación entre técnicas implica el establecimiento de una sensibilidad y especificidad comparativas, que se pueden evaluar analizando gran número de muestras mediante las dos técnicas de diagnóstico. La sensibilidad del método de ELISA se sitúa entre 0.1ng a 1ng de proteínas (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1987; Ternyinc y Avrameas, 1989).

Existen diversos métodos de evaluación final de resultados, los mas empleados son considerar una muestra como positiva si el valor de su densidad óptica (DO) supera en 2 o 3 veces la media de los valores de DO de los controles negativos. Otros métodos consisten en considerar positiva toda muestra que proporcione una DO mayor que la DO del control negativo adicionada en 2, 3 o 4 la desviación típica de los controles negativos (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1987).

PRUEBA DE ELISA PARA LA AEC.

La divergencia entre las proteínas gag y env de los LVPR, parece no ser un problema en las pruebas de ELISA con proteínas gag y env recombinantes altamente purificadas derivadas del VMV. Así mismo el uso del virus completo se puede usar exitosamente para el diagnóstico de rutina (Pasick, 1998).

Fundamento de la técnica de ELISA indirecta para la detección de animales seropositivos a VAEC



TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Figura 5. Esquematación de los eventos y componentes de la técnica de ELISA indirecta para la detección de animales seropositivos al virus de artritis encefalitis caprina (VAEC).

Los reportes del uso de la prueba de ELISA con 2 proteínas recombinantes (p25 y gp40) demuestran una sensibilidad y especificidad muy similar a la ELISA con virus completo y mejor sensibilidad que la IDAG. Cabe mencionar que la proteína TM está pobremente representada en la preparación de antígenos convencionales siendo una proteína importante en su reconocimiento serológico y que en conjunto con productos del gen gag (p25) puede incrementar la validez de la ELISA para el diagnóstico de la AEC (Rosati et al., 1995).

La técnica de ELISA realizada con un conjugado de proteína G peroxidada-avidina biotina es mejor que el usar un anti-IgG de cabra preoxidada con lo cual se reduce los resultados equivocados. La ELISA doble sándwich (doble anticuerpo) es más específica que la ELISA Indirecta, lo cual depende de la capacidad de los anticuerpos monoclonales (Zanoni, 1989).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

El diagnóstico absoluto de la AEC requiere de la identificación del virus. Los lentivirus han sido buenos candidatos para el diagnóstico por PCR debido a que el DNA lentiviral integrado puede ser detectado por esta técnica, en animales sin seroconversión y seronegativos (cabritos de madres seropositivas), o con serología indeterminada (Clavijo y Thorsen, 1995; Clavijo, 1996). Por lo que en la actualidad, comúnmente se realiza la evaluación de los animales en busca de LVPR con esta técnica. Los iniciadores usados se basan en las publicaciones de las secuencias de los virus de MV y AEC y se han diseñado para amplificar las regiones del genoma del LTR, gag, pol y env (Zanoni, 1998; Pasick, 1998; Guiguen et al., 2000).

La PCR es rápida, sensible y específica para la detección del ácido nucleico viral de VAEC, en muestras obtenidas de CMSP, de fluido sinovial y células de leche (usando secuencias del gen gag) reportando en algunos trabajos una sensibilidad y especificidad del 91% y 97% respectivamente, con respecto a la IDAG. Se calcula que para la prueba de PCR se requiere el DNA de solo 15,000 células de las muestras antes mencionadas (con aproximadamente 15 células infectadas), 188 partículas virales o 100 ng de DNA de células

de MS infectadas (Zanoni,1998; Reddy et al., 1993; Rimstad et al., 1993; Clavijo y Thorsen, 1995b; Clavijo y Thorsen, 1996).

La presencia de bandas adicionales son sugestivas de alineamientos no específicos y extensión de primers a secuencias no relacionadas que ocurren poco frecuentes. Muy probablemente a causa de una acumulación progresiva y depleción de células no infectadas que incrementan el "back ground" del DNA y reduce la sensibilidad de la reacción. Por otro lado las cabras con un muy bajo número de células infectadas no pueden ser detectadas cuando se obtiene DNA directamente de CMSP, por lo tanto la amplificación *in vitro* es necesaria para detectar virus en etapas tempranas de infección (Clavijo y Thorsen, 1995b; Clavijo y Thorsen, 1996).

Se ha demostrado en algunos trabajos que la PCR es más sensible que la ELISA y el WB pero parece improbable que esta prueba pueda reemplazar las pruebas serológicas de diagnóstico de VAEC en poco tiempo (Clavijo y Thorsen, 1996).

Si bien la técnica de PCR ha demostrado ser excepcionalmente sensible, la alta variabilidad genómica de los lentivirus, es muy importante cuando se trata de elegir los primers en genes relativamente conservados como es el Pol, Gag y Ltr, tendiendo a producir una mezcla de resultados como lo demuestra algunos trabajos donde en un primer estudio los primers del LTR fueron capaces de amplificar la correspondiente región genómica de 6 de 6 LVPR, comprendiendo 3 aislados de borregos y 3 de cabras de origen americano, holandés y suizo. En comparación con los primer gag y pol que amplificaron 5 de 6 y 3 de 6 de estos aislados respectivamente. En un segundo estudio usando un total de 9 aislados originarios de Norteamérica (8 ovinos y un caprino) resultado similar para los primers LTR (9 de 9 aislados)y gag P25 (9 de 9); pero se obtuvo un pobre resultado para gag p16(1 de 9)y env gp40 (2 de 9); estos resultados no son sorprendentes, dado que la variación de la secuencia de lentivirus y el factor de la eficiencia de la PCR es íntimamente dependiente de la complementariedad existente entre los iniciadores y el templado. La dinámica de las quasi especies es por lo tanto obviamente importante cuando se diseñan primers para la PCR basados en LVPR como pruebas diagnosticas (Zanoni, 1998; Pasick, 1998).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

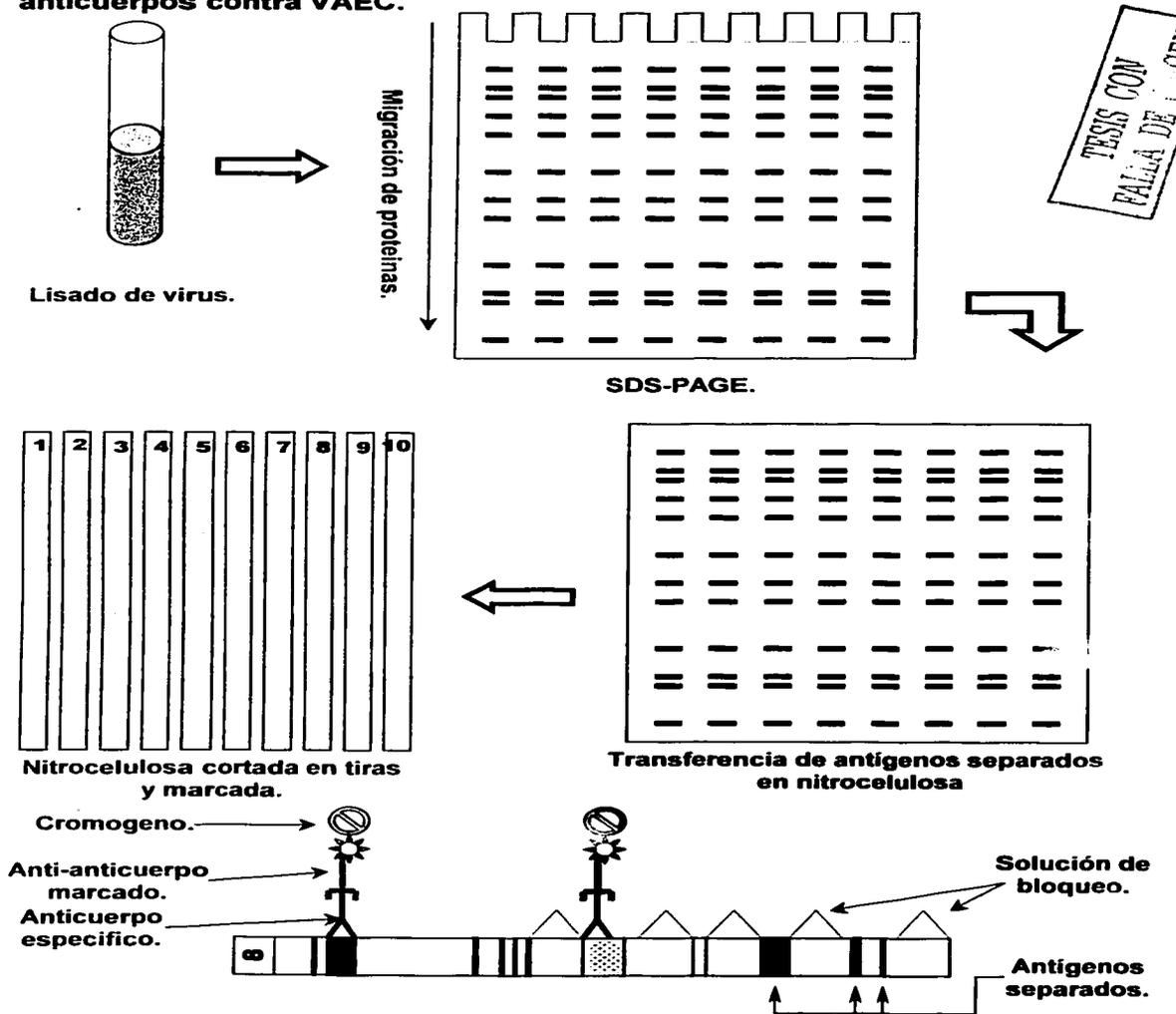
La inmunoelectrotransferencia es una técnica que combina la separación electroforética y los métodos de detección de anticuerpos; siendo esencialmente una prueba enzimática en fase sólida que usa antígeno viral inmovilizado, para detectar anticuerpos contra proteínas específicas. La técnica es usada principalmente como una prueba confirmatoria o suplementaria que ayuda a verificar la especificidad de resultados positivos obtenidos de ensayos usados inicialmente como tamizaje para anticuerpos específicos virales (Lennette y Smith, 1999; Murphy et al., 1999).

La mayor ventaja de la prueba de inmunoelectrotransferencia (WB) es que la interacción específica de anticuerpos y antígeno puede ser directamente visualizada, definiendo el perfil de anticuerpos a productos de genes virales específicos. Esta prueba es altamente sensible y específica, pero demanda manejo técnico, es relativamente cara y puede ser subjetiva a la interpretación (Lennette y Smith, 1999; Murphy et al., 1999).

La técnica consiste en lisar el virus completo para obtener proteínas virales inactivadas y rotas. Las cuales son separadas por electroforesis de acuerdo a su peso molecular o a su relativa movilidad, por lo que migran a través de geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Las bandas de proteínas resultantes son entonces transferidas a hojas de papel de nitrocelulosa, el cual es cortado en tiras que reaccionan con muestras de sueros. Si están presentes en el suero anticuerpos específicos contra el virus, la unión de los anticuerpos a las proteínas virales es revelado con el uso de un conjugado específico marcado con una enzima, que al estar en contacto con el substrato cromogénico se aprecia un color sobre las bandas correspondientes a la presencia de proteínas virales separadas. Las bandas obtenidas son comparadas con bandas de muestras control positivas para caracterizar (Heckert et al., 1992; Lennette y Smith, 1999; Murphy et al., 1999) (**Figura 6**).

El WB es en la actualidad “El estándar de oro” para confirmar las pruebas serológicas de VIH. La interpretación del WB para los antígenos de VAEC es parcialmente subjetiva, usando una variedad de criterios, dividiendo las categorías en positivos y negativos. Se ha considerado en algunas referencias un suero positivo con el reconocimiento de al menos una o dos proteínas virales (Murphy et al., 1999).

FIGURA 6. Técnica de Inmunolectrotransferencia para la detección de anticuerpos contra VAEC.



Una estrategia de prueba que comúnmente se usa para VIH es la de utilizar una prueba de ELISA de tamizaje, seguida por WB para confirmar la presencia de anticuerpos. Este procedimiento tiene una sensibilidad y especificidad del 99 %. Con esta estrategia de prueba es muy raro las pruebas falsas – negativas y falsas – positivas. Los falsos positivos se presumen ser causa de una reactividad cruzada de anticuerpos generada por antígenos desconocidos. Los sueros probados para VIH catalogados como indeterminados generalmente tienen anticuerpos a p25, p55 o p66 o a proteínas celulares de pesos moleculares similares (Lennette y Smith, 1999) .

TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD.

No existe tratamiento en la actualidad para la AEC. Drogas antiinflamatorias no esteroideas como la meglumina de flunixin (Finadyne) puede ser usado para calmar el dolor de la artritis (Narayan et al., 1992; Matthews, 1999).

IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD.

En Suiza la forma clínica más importante desde el punto de vista económico es la artritis que afecta cerca de un tercio de los animales infectados. Cada año del 15-20% de las cabras infectadas son prematuramente seleccionadas por la enfermedad lo cual conduce a una importante pérdida económica anual (Dolf y Ruff, 1994). El efecto económico de AEC no solo es la prematura selección de individuos artríticos; si no también el efecto adverso en la exportación de cabras de lugares con alta seroprevalencia, la muerte de animales adultos y jóvenes infectados, el bajo valor en el mercado por compradores que conocen el daño potencial de la infección en animales destinados para pie de cría provenientes de rebaños infectados y la pérdida en la calidad y cantidad de leche en hatos de cabras lecheras (en Suiza se reporta un 10% de reducción en la producción de leche) (Pétursson et al., 1992; Kwang et al., 1995; Travassos et al., 1998).

PREVENCIÓN Y CONTROL

✘ Se requiere realizar pruebas rutinarias en intervalos de 6 a 12 meses por un mínimo de 5 años y preferentemente a intervalos más cortos si es que se requiere que el hato pueda ser considerado libre de VAEC.

✘ Los cabritos no deben recibir leche o calostro no pasteurizados de cabra, o de cualquier otro animal o de sus madres si es un hato seropositivo.

✘ Nunca se deben alimentar los cabritos con un pool de leche, ya que si una sola madre se determina como portadora en el rebaño, los cabritos pueden resultar infectados.

✘ Todas las cabras deben de probarse antes de entrar al rebaño.

✘ Leche de otros rebaños no se debe utilizar bajo ninguna circunstancia.

✘ La importación de animales y de semen debe ser controlada.

(Pétursson et al., 1992; Matthews, 1999).

El control que se debe implementar en un rebaño infectado es:

✘ Seleccionar o aislar a todos los reactores.

✘ Seleccionar o aislar a la progenie de todos los reactores.

✘ Las cabras infectadas deben ser separadas de las cabras no infectadas por al menos 1.8 metros.

✘ Separar los utensilios que se utilizan para proporcionar agua y alimentación. (Kirkland y Batty, 1987)

✘ Las hembras en producción de leche, se deberán ordeñar primero las seronegativas y después las seropositivas (Rimstand et al., 1993).

✘ Como el virus es lábil al medio ambiente las cabras infectadas pueden pastar la misma pastura que las cabras no infectadas asegurando que los grupos lo realicen por separado. Las cabras no infectadas que pastorean en la mañana y las cabras infectadas por las tardes.

✘ Debido a que la incidencia por infección uterina del virus es muy baja y no existe evidencia real de que exista, la remoción de los cabritos al nacimiento de sus madres

evitará el limpiamiento y amamantamiento y posibilitará obtener un cabrito no infectado en la mayoría de los casos.

✖ Juntar lotes e inducir el parto con prostaglandinas o demorar el parto con el uso de hidroxiclورو de clembuterol.

✖ Aislar los cabritos de cabras infectadas y criarlos con calostro o leche de vacas o con sustituto de leche de becerros o cabritos. Si se va alimentar con calostro o leche de cabra, esta debe ser pasteurizada aun si viene de una supuesta madre seronegativa. La leche puede ser pasteurizada calentándola por una hora a 56° C, esto no asegura el 100 % de la muerte del virus por lo que la leche proveniente de hembras seropositivas nunca se debe utilizar para la alimentación de los cabritos (Kirkland y Batty, 1987; Rimstad et al., 1993).

✖ Si en la muestra de cualquier cabrito separado al poco tiempo de nacido se detecta cualquier transferencia pasiva de anticuerpos es por que la separación no fue hecha correctamente. Por lo que en un determinado tiempo puede ser portador de la infección.

✖ Establecer programas de acreditación y erradicación para eliminar el virus de los rebaños, usualmente cuando la prevalencia de la infección sea baja (Kirkland y Batty, 1987; Pétursson et al., 1992; Matthews, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Se han publicado diversos trabajos sobre el reconocimiento serológico de las proteínas del virus de la artritis encefalitis caprina (AEC) utilizando las técnicas de Inmunoelectrotransferencia o Inmunoprecipitación, reportando una variación importante en sus pesos moleculares; lo que impide tener un criterio internacional de las proteínas codificadas por el virus de AEC como existe para otros lentivirus, como es el caso del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

La diferencia reportada en las proteínas virales pudiera deberse por un lado, a que se traten de diversas cepas del virus de AEC como lo demuestran trabajos realizados en Francia, los cuales reportan por lo menos el reconocimiento de 7 cepas; lo que es muy probable debido a la gran capacidad de los retrovirus de mutar, principalmente en las proteínas codificadas por el gen env.

Por otro lado los trabajos publicados a nivel internacional donde reportan el aislamiento o utilización del virus de AEC en cultivos celulares y el procesamiento del sobrenadante infectado para el posterior análisis de las proteínas virales se basan en la observación del efecto citopático (formación de sincitios) en los cultivos, por que se ha considerado que el pico de producción de proteínas virales esta altamente relacionado con la presencia de este efecto.

Pero es sabido que existen cepas que no causan efecto citopático y la variabilidad reportada en las proteínas en diversos países puede estar dada por las diferencias en el momento optimo de producción de éstas y que no necesariamente este relacionado con la presencia del efecto citopático. Por lo tanto un patrón de proteínas virales completo se puede encontrar demostrando el tiempo optimo de cosecha en los cultivos celulares.

En México no se han hecho estudios al respecto, por lo que se desconoce el tiempo optimo de cosecha de un aislado nacional del virus de AEC, el patrón de proteínas del virus que circula en los rebaños y si existe realmente una cepa diferente a las ya reportadas.

La experiencia adquirida en el diagnóstico de la infección por VIH, puede aplicarse al virus de AEC. En el diagnóstico de VIH se emplean dos tipos de ensayos de detección de anticuerpos, uno de tamizaje: la ELISA de muy alta sensibilidad, lo que permite detectar

casi a cualquier individuo que se haya expuesto al virus y uno de confirmación de mayor especificidad: la inmunoelectrotransferencia, que permite asegurar que los anticuerpos detectados son contra este virus en particular. Aprovechando esta experiencia y debido al desconocimiento en nuestro país de cual sería el comportamiento de las proteínas antigénicas de un virus de AEC aislado de hatos nacionales con técnicas serológicas de uso rutinario (ELISA indirecta) o que pueden ser establecidas (inmunoelectrotransferencia) para la detección de anticuerpos contra la enfermedad. Se pretende comparar el comportamiento de las proteínas en las técnicas anteriormente descritas con estuches comerciales basados en las pruebas de ELISA indirecta e inmunodifusión que son las que actualmente se utilizan para el diagnóstico de la AEC en nuestro país, y tomando en cuenta que estos estuches comerciales utilizan proteínas del virus de Maedi-Visna que está relacionado antigénicamente con el virus de AEC, es importante evaluar si con la implementación de otras técnicas de diagnóstico basadas en el uso de un virus aislado de rebaños nacionales, puedan ser más adecuadas para utilizarlas en el control de la enfermedad en México.

HIPÓTESIS

La introducción a nuestro país de cabras o subproductos caprinos importados de otros países como Estados Unidos y Francia posibilita la presencia de cepas del virus de AEC en los hatos nacionales. Debido a lo anterior es factible que al comparar el patrón de proteínas obtenidas de sobrenadante de células infectadas con un virus aislado de cabras enfermas con la AEC, mostrara diferencias con un virus de referencia. La evaluación de las proteínas del virus aislado reconocidas por sueros de cabras en las técnicas serológicas de ELISA indirecta e inmunoelectrotransferencia, tendrán una sensibilidad y especificidad mayor para la detección de anticuerpos contra la enfermedad, que con las pruebas de inmunodifusión y ELISA indirecta que usan proteínas del virus de maedi-visna, las cuales actualmente se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad en nuestro país.

OBJETIVOS GENERALES

Identificar y evaluar las proteínas que se producen en el sobrenadante de cultivos celulares infectados con un virus de artritis encefalitis caprina aislado en México.

Determinar la respuesta serológica de cabras naturalmente infectadas a las proteínas del virus de AEC, utilizando las técnicas de inmunoelectrotransferencia (western blot (WB) y ELISA indirecta y compararla con dos pruebas comerciales que utilizan antígenos del virus de maedi-visna.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar el virus de AEC a partir de sangre periférica de animales seropositivos y con signos clínicos de la enfermedad, realizando cocultivos en monocapas de células de membrana sinovial de feto caprino.

Evaluar la replicación del virus en cultivo celular mediante una cinética de producción viral utilizando WB.

Identificar y confirmar la presencia del VAEC por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de células de membrana sinovial de feto caprino infectadas.

Determinar el patrón de proteínas obtenidas a partir del sobrenadante de cultivo celular infectados con el VAEC por medio de WB.

Estandarizar y evaluar las técnicas de ELISA indirecta y WB usando proteínas del VAEC y compararlas con las pruebas de inmunodifusión y ELISA comerciales, utilizando sueros de caprinos.

MATERIAL Y METODOS

LUGAR

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM y en la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos (UIRH), UNAM y Subsecretaría de Control y Prevención de Enfermedades, SSA.

COLECCIÓN DE MUESTRAS

Se colectaron un total de 220 muestras de sueros de 2 explotaciones caprinas que como fin zootécnico era la producción de leche, ubicadas en el Estado de México (N= 46) y Querétaro (N= 174). Para la obtención del suero se obtuvo sangre por punción de la vena yugular de hembras mayores de un año de edad de razas Alpina, Nubia y Toggenburg. El suero se separó por los métodos convencionales y fue almacenado a -20° C hasta el momento de realizar las pruebas.

IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA DE CABRAS INFECTADAS

Los sueros obtenidos del sondeo serológico fueron evaluados buscando la presencia de anticuerpos contra el virus de AEC, utilizando kits comerciales de ELISA (Chekit de Laboratorios Bommeli, Suiza). e Inmunodifusión (Veterinary Diagnostic Technology, USA). El desarrollo de las técnicas se realizó conforme a las especificaciones de cada fabricante (Apéndice 1).

CULTIVO CELULAR

Para el aislamiento del virus de Artritis Encefalitis Caprina se utilizaron células de membrana sinovial de feto caprino previamente establecidas y células de membrana sinovial de cabra proporcionadas por el Dr. Álvaro Aguilar Setien, Centro Medico. IMSS.

Los cultivos celulares se mantuvieron con medio de cultivo Eagle Dulbecco Modificado (500ml) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50,000 unidades de penicilina, 50mg estreptomina y 125 μ g anfotericina B. La infección de los monoestratos celulares fue con un 80 % de confluencia (Apéndice 1) (Ramírez, 1998).

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE AEC

Para realizar el aislamiento del virus se escogieron 5 animales con resultados de serología positivos a la AEC y que además presentaron signos clínicos característicos de la enfermedad; estos animales se mantuvieron en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán para la obtención de muestras.

El aislamiento del virus de AEC se realizó a partir de sangre periférica de las cabras infectadas; de las cuales se obtuvo una muestra de 12 ml de sangre cada 7 días empleando heparina (10mg/ml). La sangre fue diluida a razón de 1:4 con solución buffer salina fosfatada (PBS) y colocada en 2 tubos con 15ml de Ficoll Hypaque (densidad=1.077g/ml) como gradiente de densidad; centrifugándose a 400 gravedades por 45 minutos a 20° C, con el objetivo de separar las células mononucleares periféricas (CMP). Las CMP se lavaron 3 veces con PBS a 350g por 10 minutos a 20° C y al finalizar los lavados se colocaron en botellas de cultivo con medio Dulbecco adicionado con 5% de suero fetal bovino, antibióticos y antimicóticos por un espacio de 2 horas a 37° C con 5% de CO₂ para permitir que las células de la línea monocito/macrófagos se adhirieran a la superficie; se utilizaron 5 x 10⁶ monocito-macrófagos/ml para establecer los co-cultivos con células de membrana sinovial de feto caprino (80% de confluencia). Se demostró la presencia del virus en los sobrenadantes de los cultivos que presentaban efecto citopático (sincitios) ya sea por infección de nuevos cultivos de células de membrana sinovial o demostrando la presencia de proteínas del virus de AEC a través de un WB. Se realizaron 2 pases celulares para poder considerar negativo el cultivo, esperando observar los sincitios entre 15 y 30 días post-infección (Ramírez, 1998; Laboratorio UIRH).

CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

La cinética de producción viral se realizó infectando células de membrana sinovial con sobrenadante fresco de cultivos que mostraban la presencia de sincitios y previamente probados por WB. Para ello se utilizaron 13 botellas de cultivo tipo falcón (25cm² de cultivo) con células de membrana sinovial con un 80% de confluencia; 10 de ellas se infectaron con 4.5 ml de sobrenadante y 3 botellas se mantuvieron sin infectar como controles negativos. El sobrenadante de las células infectadas se cosechó a los 3, 5, 7, 10,

12, 14, 17, 19, 21, 24 días y en el caso de las células sin infectar se procesaron por separado el día 24; evaluando la presencia y cantidad de proteínas virales por WB de las 13 botellas (Laboratorio UIRH).

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE AEC POR PCR

a) Extracción del ADN celular:

Para la identificación del genoma del virus (provirus) se realizó la extracción del ADN de las células de membrana sinovial infectadas con presencia de sincitios, las cuales fueron tripsinizadas, centrifugadas y alicuotadas en viales de 1.5 ml con 5×10^6 células. Posteriormente se les agregó 1 ml de buffer de extracción (50mM KCl, 10mM Tris HCl pH 8.3, 2.5mM Cl_2Mg , 0.1 mg/ml de gelatina, 0.45% de Np40 y 0.45% de Tween 20) y 6 μ l de proteinasa k, se incubaron en baño maría a 56°C por una hora. Al finalizar la incubación los viales fueron calentados a 95° C por 5 minutos para detener la reacción y posteriormente se almacenaron a 4° C (Daltabuit et al., 1999).

b) Iniciadores utilizados:

Se utilizaron iniciadores de una región conservada del gen **gag**, publicados por Daltabuit et al., (1999).

Iniciador superior: 5'caa atg ggg atg aga cct g 3'

Iniciador inferior: 3'act ttc cgt caa ccg tat a 5'

c) Reacción de amplificación

Para las reacciones de amplificación se utilizó una mezcla que contenía la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*), el amortiguador 10x, los nucleótidos, los iniciadores superiores e inferiores y agua ultra pura (H_2OUP). Los reactivos se agregaron en el siguiente orden: Mezcla de PCR, ADN y por último aceite mineral para evitar la evaporación. Como controles negativos de ADN se utilizaron células de membrana sinovial de cabra sin infectar y como control negativo de PCR se utilizó la mezcla sin ADN.

El volumen final por muestra de cada una de las amplificaciones fueron las siguientes:

Reactivo:	Cantidad:
H ₂ OUP	12 µl
Buffer PCR (10X)	10 µl
dNTP's (200 µmol c/u)	10 µl
Oligo superior (10 pmol)	1 µl
Oligo inferior(10 pmol)	1 µl
Taq polimerasa (2.5U)	1 µl
ADN	15 µl
Volumen final	50 µl.

Los ciclos ocupados para el PCR fueron:

- | | |
|------------------|-------------|
| 1.- 95°C/5 min. | |
| 2.- 96°C/4 min. | 1 ciclo. |
| 3.- 94°C/31 seg. | } 30 ciclos |
| 55°C/31 seg. | |
| 74°C/31 seg. | |
| 4.- 74°C/10 min. | 1 ciclo. |

El aparato empleado para las ampliificaciones fue un termociclador marca Biorad, Hercules, California EUA (Daltabuit et al., 1999).

Análisis de los productos de reacción:

Por cada tubo de reacción de PCR se utilizó un microtubo de polipropileno estéril para hacer la mezcla de corrimiento. A cada microtubo se les agregaron, 40µl de la reacción de PCR y 10µl de azul de bromofenol (50% de glicerol, 49.5ml de H₂O UP, 0.5 ml de PBS 1M y 0.2 g de azul de bromofenol). Se prepararon geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 10 mg/ml. Se colocó un marcador comercial de 123 pares de bases (Gibco). Para el corrimiento electroforético se utilizó buffer de corrimiento TBE 1x (Apéndice 2) a 100V, hasta que el colorante alcanzó el final del gel. Los geles se revisaron en un transiluminador y se fotografiaron (Daltabuit et al., 1999).

SEMPURIFICACIÓN DEL VIRUS A PARTIR DEL SOBRENADANTE DE CÉLULAS INFECTADAS

El sobrenadante cosechado de los co-cultivos o de las infecciones de células de membrana sinovial se clarificó por centrifugación a 700g durante 20 minutos, enseguida se filtró a través de una membrana de $.45\mu\text{m}$ y posteriormente se colocó sobre un colchón de sacarosa al 20% y se centrifugó a 51,000 g por 2 horas (Laboratorio UIRH).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

La pastilla viral obtenida después del proceso de purificación se resuspendió en 100 μl de buffer de lisis (Apéndice 2) y 100 μl de buffer de muestra (Apéndice 2) con la finalidad de separar las proteínas virales por electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida al 12% a 130 volts constantes (Apéndice 1). Posteriormente los geles fueron lavados tres veces por cinco minutos en buffer de transferencia (Apéndice 2) y enseguida se realizó la transferencia pasiva, preparando un "sándwich" donde se colocó cada componente en el siguiente orden: una hoja de papel aluminio, una película de envoltura auto adherente Kleen pack, un cristal grueso (más grande que el gel), tres hojas de papel blotting (previamente humedecidas en buffer de transferencia), una hoja de nitrocelulosa de 0.22 nm de diámetro (ligeramente más grande que el gel y previamente humedecida en buffer) y el gel de poliacrilamida. Enseguida se completó el sándwich colocando los componentes antes citados en orden inverso (hoja de nitrocelulosa, tres hojas de papel blotting y cristal) envolviendo el paquete con el Kleen pack y el papel aluminio. Se colocó sobre el sándwich un peso de 10 Kg y se transfirió a temperatura ambiente por 3 días.

Después de transferidas las proteínas, las nitrocelulosas se bloquearon en PBS mas albúmina al 3% (Apéndice 2) por 1 hora a 37° C, al finalizar la incubación se lavaron 3 veces en agitación por 5 minutos en buffer de lavado (Apéndice 2); enseguida se colocó el primer anticuerpo (suero) diluido 1:100 en buffer de dilución (Apéndice 2) incubado por 1 hora a 37° C y al finalizar la incubación se realizaron lavados como previamente ya se mencionó; posteriormente se adicionó el conjugado diluido 1:1000 (anti-IgG de cabra peroxidado) en buffer de dilución incubándose por 1 hora a 37° C y al finalizar se realizaron los lavados. Finalmente se reveló con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno

al 0.5% (Apéndice 2). Se utilizó un virus de AEC de referencia de ATCC (American Type Culture Colección) como control positivo (VR 905, 75.G63. Aislado por Crawford (1980) para comparar las proteínas antigénicas reconocidas. Y sobrenadante semipurificado de células de membrana sinovial no infectadas como control negativo.

Se usaron como controles un suero positivo (proveniente de una cabra a la que se le aisló el virus) y suero negativo (cabra en confinamiento en el INDRE) probados previamente por Western Blot (Laboratorio UIRH).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DE ELISA

Se colectó semanalmente sobrenadante de células infectadas y se purificó como previamente se ha descrito; enseguida a la pastilla viral obtenida se le adicionó 50µl de TNE pH 7.5 (Apéndice 2) dejando toda la noche a 4°C, posteriormente se recuperaron las pastillas y se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Apéndice 1). Finalmente se diluyó la pastilla con una solución de PBS-Triton X 100 al 0.5% y se hicieron alícuotas de 100µl que contenían 14, 28 y 56µg de proteína, se conservaron a -70°C hasta su uso. Cada alícuota se diluyó en 11 ml de buffer de carbonatos (Apéndice 2) lo cual era suficiente para una placa completa de 96 pozos. La dilución óptima de antígeno y de los demás componentes (suero y conjugado) se obtuvieron titulando todos en conjunto. Cabe mencionar que utilizando 14µg de antígeno por placa fue la dilución que separó mejor los sueros positivos y negativos, pero se obtuvo poca sensibilidad por lo que se estandarizaron 2 ELISAS mas con mayor cantidad de antígeno por placa para aumentar la sensibilidad (Laboratorio UIRH).

ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA.

En placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano se colocaron 100µl/pozo de antígeno del virus de AEC (se probaron con 14, 28 y 56µg de proteína) diluido en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6. Las placas se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda toda la noche, posteriormente se lavaron 4 veces con solución amortiguadora de lavado (Apéndice 2) en un lavador de placas automático (Ortho

Diagnostic Systems K.K.); para enseguida bloquearse con 200µl/pozo de albúmina al 2% en PBS-Tween al 0.2 %, por 1 hora y 1/2 a 37° C para luego repetir los lavados. Se colocaron 100 µl/pozo de las muestras de sueros problemas diluidos 1:200 en solución amortiguadora de dilución (Apéndice 2) y se incubaron a 37° C por 90 minutos para después repetir los lavados y posteriormente agregar 100µl/pozo de antisuero anti-IgG de cabra peroxidado diluido 1:1000 en solución amortiguadora de dilución e incubar 90 minutos a 37°C.

Finalmente la placa se lavó 4 veces y se adicionó 100µl/pozo del sustrato (OPD (O-fenilendiamina) mas peróxido de hidrógeno al 30% en buffer de citrofosfatos) (Apéndice 2) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para detener la reacción se utilizó 100 µl/pozo de H₂SO₄ 2N. La densidad óptica se midió con un espectrofotómetro a 492 nm. Se usaron como controles un suero positivo (proveniente de una cabra a la que se le aisló el virus) y suero negativo (cabra en confinamiento en el INDRE) probados previamente por WB. El estado serológico de cada suero se calculó dividiendo el valor de su densidad óptica entre la línea de corte, la cual se estableció a partir del promedio de la densidad óptica de un panel de sueros negativos a WB más dos desviaciones estándar. (laboratorio UIRH).

WESTERN BLOT (WB) DEL BANCO DE SUEROS

El banco de sueros de 220 animales previamente probados por Inmunodifusión y ELISA comerciales, así como por la ELISA estandarizada fueron probados por WB realizado como previamente se describió. Se utilizaron tiras de nitrocelulosa con proteínas transferidas del VAEC aislado, de 3mm de ancho para cada suero. De esta manera se calculó la sensibilidad y especificidad para las 3 técnicas usadas, utilizando como estándar de oro la técnica de WB.

COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE WB CON DOS PRUEBAS COMERCIALES (INMUNODIFUSIÓN Y ELISA) Y LA ELISA ESTANDARIZADA.

Las pruebas comerciales de ELISA e Inmunodifusión, así como la ELISA estandarizada con VAEC aislado fueron comparadas cada una con el estándar de oro para

los lentivirus (inmunotransferencia); utilizando una tabla de contingencia de 2x2 como abajo se muestra.

		WESTERN BLOT		
		+	-	Total
INMUNODIFUSIÓN	+	a	b	a + b
	-	c	d	c + d
	Total	a + c	b + d	a+b+c+d (N)

En donde:

a + c = total de sueros con diagnóstico positivo confirmado por WB.

b + d = total de sueros con diagnóstico negativo confirmado por WB.

a + b = total de sueros con prueba (test) positiva a Inmunodifusión.

c + d = total de sueros con prueba negativa a Inmunodifusión.

Entonces se verá la interpretación de cada casilla interna:

a = sujetos con diagnóstico positivo y prueba positiva (verdadero positivo).

b = sujetos con diagnóstico negativo y prueba positiva (falso positivo).

c = sujetos con diagnóstico positivo y prueba negativa (falso negativo).

d = sujetos con diagnóstico negativo y prueba negativa (verdaderos negativos).

De allí que:

SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA:

a = Sueros con diagnóstico y prueba positiva

a + c Total de sueros con diagnóstico positivo confirmado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es la capacidad de la prueba de detectar animales infectados con el virus de AEC como positivos, evitando la presencia de falsos negativos.

ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA:

$$\frac{d}{b+d} = \frac{\text{Sueros con diagnóstico negativo confirmado y prueba negativa}}{\text{Total de sueros con diagnóstico negativo confirmado}}$$

Es la capacidad de la prueba de detectar animales no infectados con el virus de AEC como negativos, evitando la presencia de falsos positivos. (Kahl-Martín, 1990; Constantine et al., 1991; Seric OMS, 1992).

VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA POSITIVA

Es la capacidad de la prueba de dar un resultado positivo a los realmente enfermos, evitando así la inclusión de falsos positivos. Es la estimación de la probabilidad de estar enfermo cuando la prueba es positiva. Se traduce por:

$$\frac{a}{a+b} = \frac{\text{Sueros con diagnóstico positivo y prueba positiva}}{\text{Total de sueros con prueba positiva}}$$

VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA NEGATIVA

Es la capacidad de dar un resultado negativo a los realmente exentos de la enfermedad, evitando así la inclusión de falsos negativos. Es la estimación de la probabilidad de ausencia de enfermedad cuando la prueba es negativa. Se traduce por:

$$\frac{d}{c+d} = \frac{\text{Sueros con diagnóstico negativo y prueba negativa}}{\text{Total de sueros con prueba negativa}}$$

(Kahl-Martín, 1990).

CÁLCULO DEL VALOR KAPPA

El parámetro estadístico que con mayor frecuencia se emplea para medir la correspondencia entre dos observaciones ante una variable dicotómica, es kappa (k), definida como la concordancia más allá de la probabilidad dividida entre la cantidad de concordancia posible más allá de la probabilidad.

$$k = \frac{0 - C}{1 - C}$$

Donde 0 es la concordancia observada y C la concordancia por probabilidad.

C = 1.- concordancia positiva por casualidad = $\frac{a+c}{a+b} \times \frac{a+b}{N}$

2.- concordancia negativa por probabilidad = $b + d \times c + d / N$

3.- proporción para la concordancia por probabilidad o causalidad = resultado del paso 1 + 2/N

$0 = a + d$ por lo tanto: la concordancia más allá de la causalidad es 0 menos la concordancia por causalidad = $(0 - C)$.

El potencial de concordancia más allá de la probabilidad $(1 - C)$ es el resultado de N menos la concordancia por causalidad (Trapp, 1993).

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA DE CABRAS INFECTADAS

INMUNODIFUSIÓN

Con la utilización del estuche comercial de inmunodifusión se encontraron líneas de precipitación para dos proteínas virales la gp135 y la p27 (**Figura 7**). De los 220 sueros evaluados con este estuche solo 76 resultaron positivos y se encontró que exactamente la mitad reaccionó a p27 (38 sueros) y la otra parte a gp135 (38 sueros). Sólo dos sueros reconocieron ambas proteínas. En la prueba de WB se encontró que solo 27 sueros de los 38 que reconocieron a p27 reaccionaron con la proteína p28 y los 76 sueros reconocieron la proteína gp135. Los sueros controles del estuche comercial de la prueba de inmunodifusión se evaluaron por WB, encontrando para el suero denominado reactivo el reconocimiento de las proteínas de 135, 90, 51, 60 y 25 kDa, para el suero positivo débil el reconocimiento de las proteínas 60 y 25 kDa, para el suero positivo se reconocieron las proteínas de 135, 90, 51 45,32, 25, 19, 16, 14 kDa y finalmente en el suero negativo se reconocieron las proteínas de 60, 51 y 25 kDa (**Figura 8**).

ELISA COMERCIAL (CHEKIT)

Este estuche comercial utiliza como antígeno virus lisado de maedi-visna. En la evaluación de 220 sueros se encontró que 131 fueron positivos a la prueba. Además se encontraron 7 sueros indeterminados (sospechosos), los cuales para otras pruebas como la de Inmunodifusión 2 sueros resultaron positivos, para la ELISA Estandarizada (variante 1, 2 y 3) 4 sueros positivos (incluidos los 2 que reaccionaron a ID) y para el WB todos resultaron positivos. De igual forma que en la Inmunodifusión se probó los sueros controles del estuche comercial por WB resultando para el suero positivo el reconocimiento de las proteínas de 135, 90, 60, 51, 25, 19, 16 y 14 kDa y para el suero negativo el reconocimiento de una proteína de 25 kDa (**Figura 8**).

El resumen de los resultados de las pruebas serológicas comerciales se puede apreciar en la **Tabla 3**.

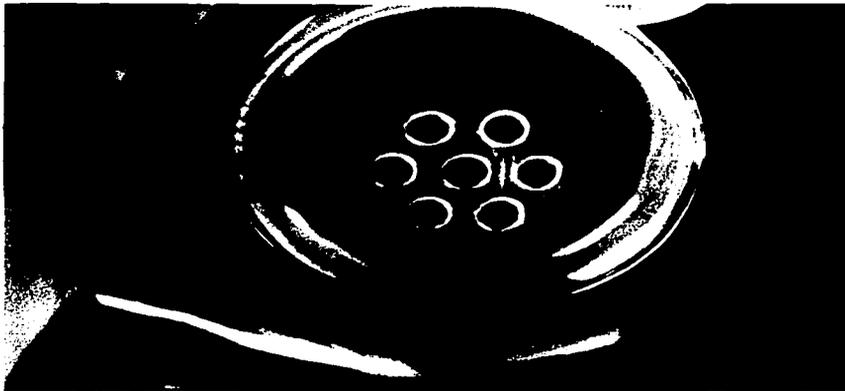


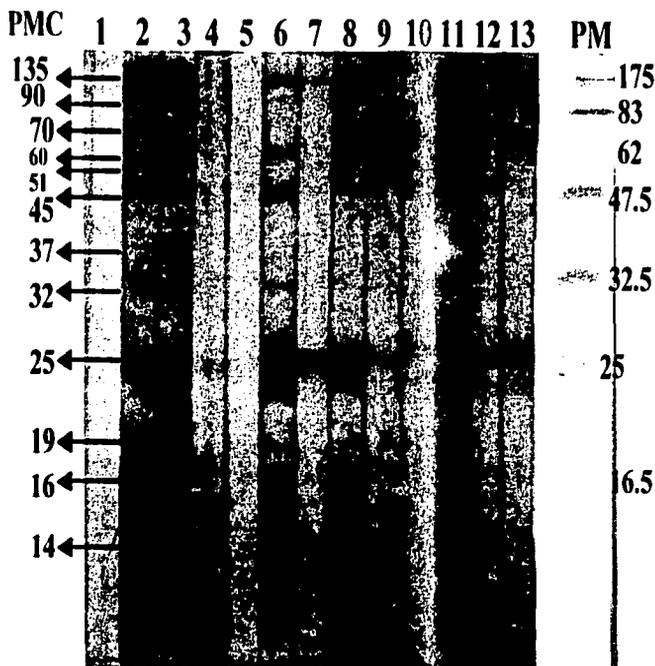
Figura 7. Prueba de inmunodifusión mostrando dos bandas de precipitación. La banda pegada al pozo es por la unión de anticuerpos contra la proteína viral p27 y la banda central es por la unión de anticuerpos contra la glicoproteína viral gp 135.



Figura 9. Cabra infectada con el virus de AEC, presentando signos clínicos de artritis en las articulaciones de las rodillas, con presencia de pelo hirsuto, pérdida de la condición general y rigidez articular.

FEZ 2008
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 8. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE AEC RECONOCIDAS POR SUEROS CONTROLES DE LOS ESTUCHE COMERCIALES DE ELISA E INMUNODIFUSIÓN



- PM: PESO MOLECULAR PMC: PESOS MOLECULARES CALCULADOS
- CARRIL 1: SUERO CONTROL NEGATIVO
 - CARRIL 2 Y 3: SUERO CONTROL POSITIVO
 - CARRIL 4, 5 Y 9: SUERO CONTROL NEGATIVO DEL ESTUCHE COMERCIAL DE ELISA
 - CARRIL 6 Y 11: SUERO CONTROL POSITIVO DEL ESTUCHE COMERCIAL DE INMUNODIFUSIÓN
 - CARRIL 7 Y 8: SUERO CONTROL POSITIVO DEL ESTUCHE COMERCIAL DE ELISA
 - CARRIL 10: SUERO CONTROL NEGATIVO DEL ESTUCHE COMERCIAL DE INMUNODIFUSIÓN
 - CARRIL 12: SUERO CONTROL POSITIVO DÉBIL DEL ESTUCHE COMERCIAL DE INMUNODIFUSIÓN
 - CARRIL 13: SUERO REACTIVO DEL ESTUCHE COMERCIAL DE INMUNODIFUSIÓN

59

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Resultados de 220 sueros caprinos evaluados con las pruebas de ELISA e ID comerciales para detectar anticuerpos contra la AEC, en cabras del estado de México y Querétaro

ESTADO SEROLÓGICO DE LOS SUEROS PROBADOS

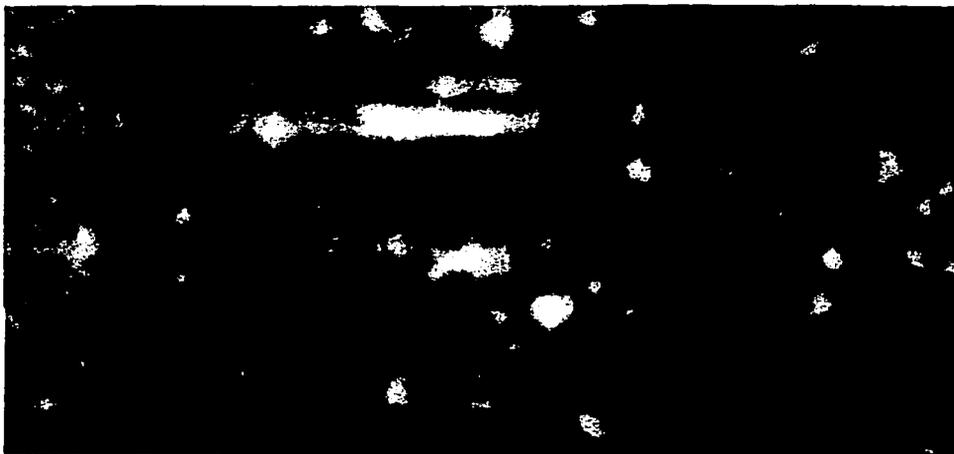
Localidad	Positivo		Negativo		Sospechoso		Total de sueros	
	ELISA	ID.	ELISA	I.D	ELISA	I.D	ELISA	ID
<i>Estado de México</i>	42	22	4	24	0	0	46	46
<i>Querétaro</i>	89	54	78	120	7	0	174	174
TOTAL	131	76	82	144	7	0	220	220

AISLAMIENTO DEL VAEC Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

El aislamiento del VAEC a partir de monocitos/macrófagos de cabras infectadas (**Figura 9**) cocultivadas con CMS (**Figura 10**) se confirmó con la presencia de efecto citopático (sincitios). Se encontraron abundantes células gigantes multinucleadas (mas de 10 núcleos) (**Figura 11**), que se observaron en promedio a los 20 días y esta observación se corroboró con WB, encontrando el reconocimiento de diversas proteínas antigénicas del VAEC, como se observa en la **Figura 12**. En la cinética de producción del VAEC se encontró la presencia de una variación en las proteínas antigénicas según el día de recolección (**Tabla 4**); de las cuales las más constantes fueron las proteínas de 14, 16, 19, 25,37, 51, 60, 90 y 135 kDa y las menos frecuentes fueron las proteínas de 28, 32, 45 y 70 kDa, determinando que el mejor momento para comenzar a coleccionar el sobrenadante de las células infectadas es a partir de los 7 días y al día 14 se observa un mayor patrón de bandas, presentando todas las proteínas virales. Se concluye que el pico de producción de proteínas fue cíclico presentándose cada 7 días (**Figura 13, 14 y 15**) lo cual difirió con la presencia de los sincitios. Las proteínas que se identificaron en total fueron de un peso molecular de 135, 90, 70, 60, 51, 45, 37, 32, 28, 25, 19, 16 y 14 kDa, siendo todas de origen viral exceptuando las proteínas de 60 y 51 kDa que son proteínas de origen celular como se demostró con el sobrenadante de las células no infectadas (**Figura 13 y 14**).



Figura 10. Células de membrana sinovial de feto caprino sin infectar, monocapa con 100% de confluencia. Contraste de fases. Foto superior 10X y foto inferior 40X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

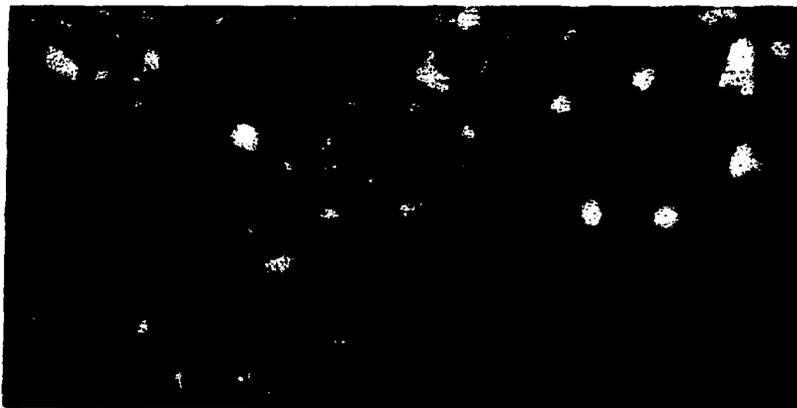


Figura 11. Células de membrana sinovial de feto caprino infectadas con el virus de AEC formando células gigantes multinucleadas (mas de 10 núcleos) y con extensiones citoplasmáticas filiformes (↑). Contraste de fases (40X)

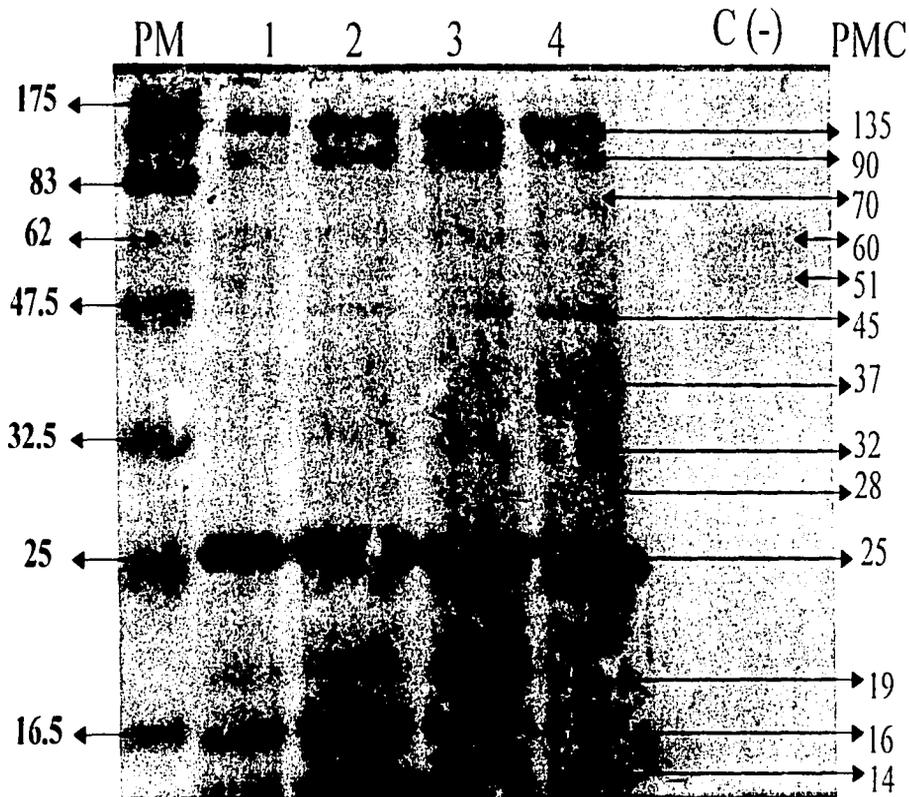


TEBIS CON
FALLA DE CALGEN

62

FIGURA 12

PROTEÍNAS OBTENIDAS DEL SOBRENADANTE DE CÉLULAS INFECTADAS CON EL VIRUS DE AEC AISLADO EN MÉXICO Y PROBADO POR WB



C (-) = Células de membrana sinovial de feto caprino sin infectar.

PM = Marcadores de peso molecular.

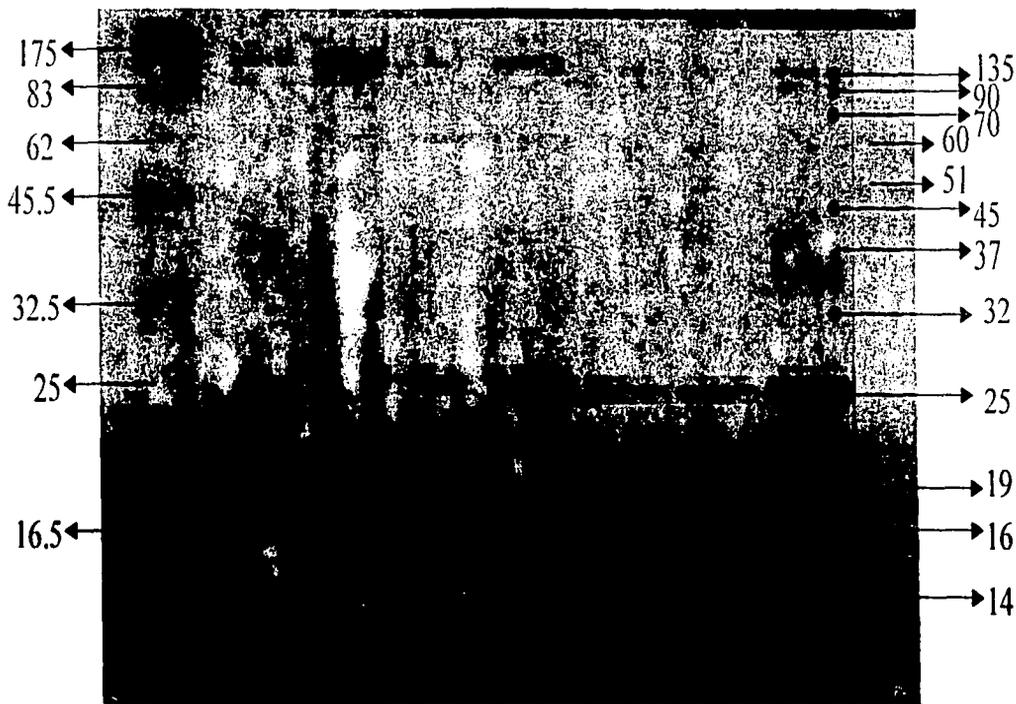
CARRILES 1 - 4= Virus de artritis encefalitis caprina obtenido de sobrenadante de los cocultivos de monocitos/macrófagos en células de membrana sinovial.

PMC = Pesos moleculares calculados.

TESIS CON
FALLA DE CUBRER
RECIBIDA EN FEBRERO

FIGURA 13. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES OBTENIDAS A DIFERENTES DÍAS, DEL SOBRENADANTE DE CÉLULAS INFECTAS CON EL VIRUS DE AEC AISLADO EN MÉXICO. PROBADOS POR WB.

PM C(+) DÍA3 DÍA5 DÍA7 DÍA10 DÍA12 C(+) C(-) PMC



PM = Marcadores de peso molecular.

C (+) = Sobrenadante de células de membrana sinovial infectadas con el virus de AEC de referencia de American Type Colección Culture (VR 905, 75.G63).

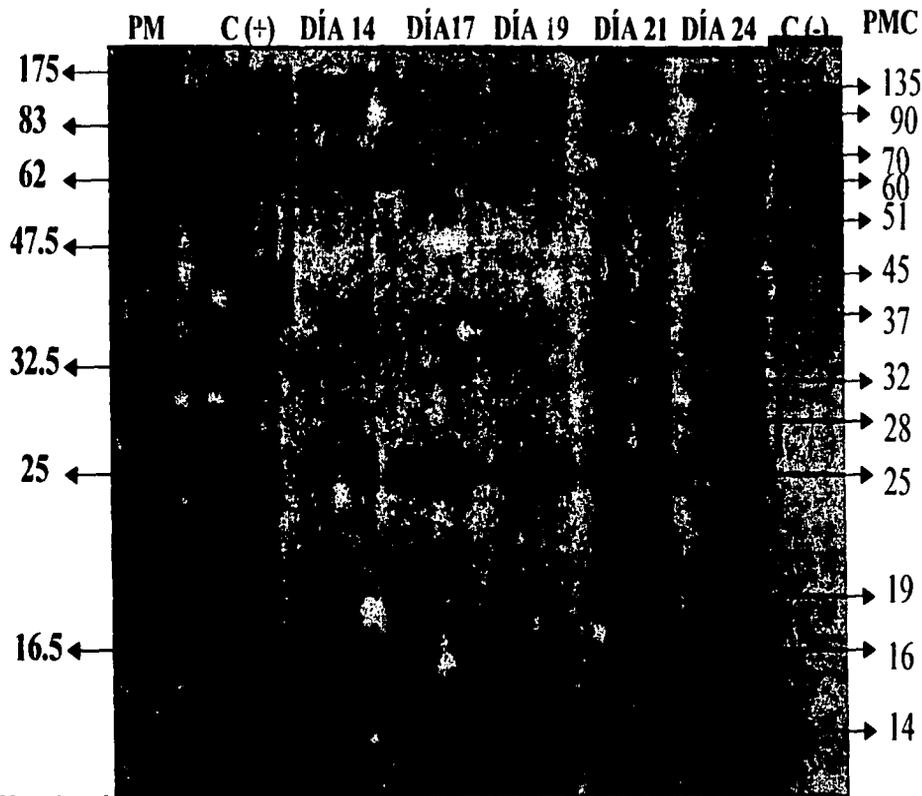
CARRILES 3 - 7 = Días de recolección de sobrenadante de células de membrana sinovial infectadas con el virus de AEC aislado.

C (-) = Células de membrana sinovial de feto porcino sin infectar.

PMC = Pesos moleculares calculados.

TESIS CON
FALLA DE
UNIFORMIDAD

FIGURA 14. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES OBTENIDAS A DIFERENTES DÍAS DEL SOBRENADANTE DE CÉLULAS INFECTAS CON EL VIRUS DE AEC, AISLADO EN MÉXICO. PRUBADAS POR WB.



PM = Marcadores de peso molecular.

C(+) = Sobrenadante de células de membrana sinovial infectadas con el virus de AEC de referencia de American Type Colección Culture (VR 905, 75.G63).

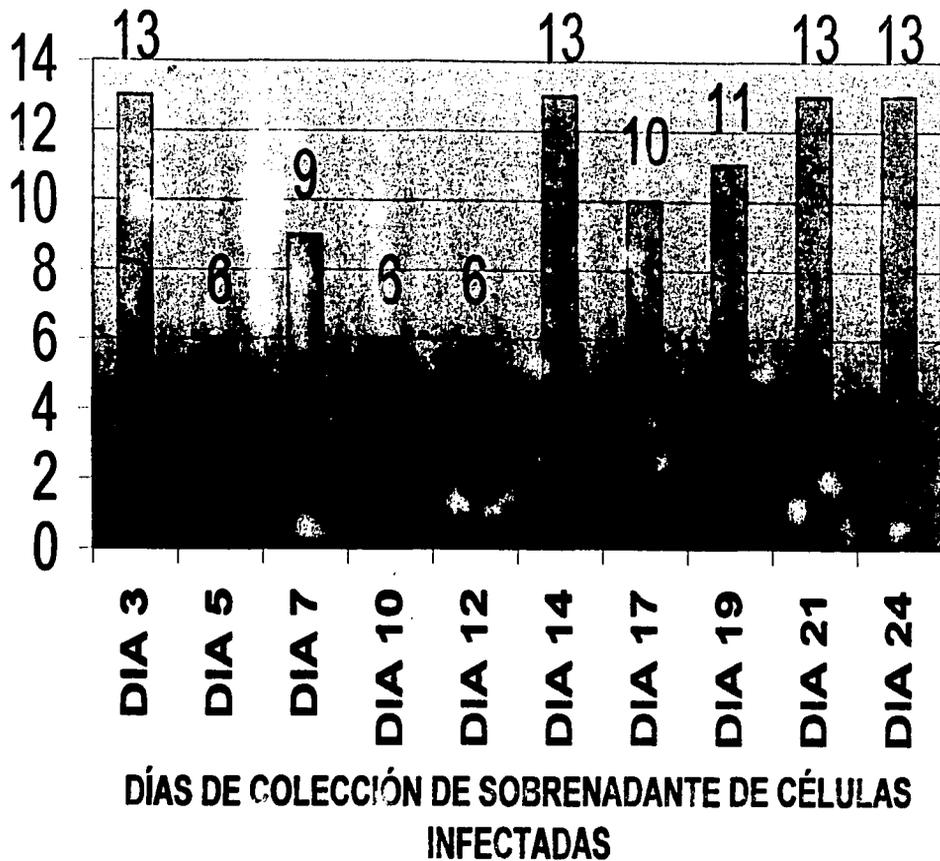
CARRILES 3 - 7 = Días de recolección de sobrenadante de células de membrana sinovial infectadas con el virus de AEC aislado.

C(-) = Sobrenadante de células de membrana sinovial de feto caprino sin infectar.

PMC = Pesos moleculares calculados.

FIGURA 15. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN EN CULTIVO CELULAR DE PROTEÍNAS DEL VIRUS DE AEC AISLADO EN MÉXICO

No. DE PROTEÍNAS RECONOCIDAS



TESIS CON
FALLA DE CEROEN

Tabla 4. Proteínas reconocidas a diferentes días en el sobrenadante de las células de membrana sinovial infectadas con virus de AEC aislado en México.

PROTEÍNA RECONOCIDA (Peso molecular expresado en kDa)	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	DÍA 12	DÍA 14	DÍA 17	DÍA 19	DÍA 21	DÍA 24
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
32	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
37	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
45	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
90	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
135	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

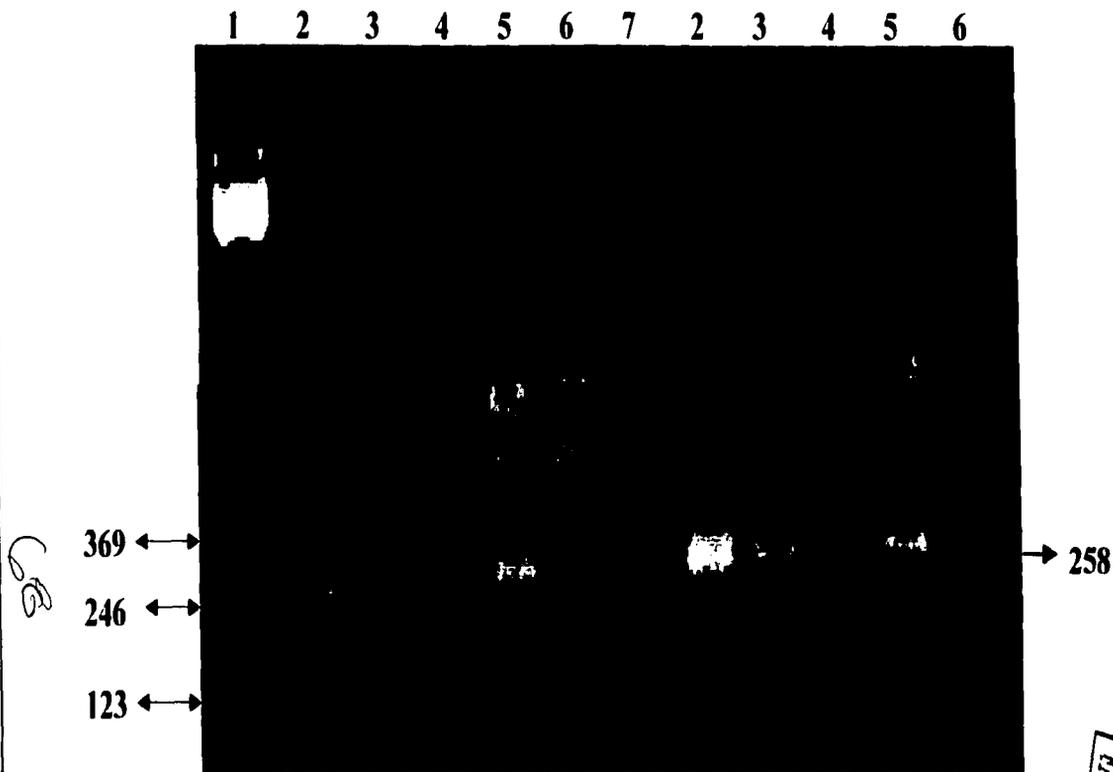
IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE AEC POR PCR

Se corroboró el aislamiento del VAEC por PCR logrando obtener un producto de amplificación de 258 pares de bases, lo que indicó la presencia del genoma del virus de AEC (Figura 16 y 17).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA Y ELISA CON VIRUS AEC AISLADO

Las pruebas estandarizadas con proteínas antigénicas del virus de AEC mostraron la mayor detección de animales seropositivos a la enfermedad, como se muestra en la **Tabla 5**. Se encontró para la técnica de WB 18.65% (41 animales) y 43.6 % (96 animales) más seropositivos comparado con las pruebas de ELISA e Inmunodifusión comerciales respectivamente. La prueba de ELISA estandarizada se corrió con diferentes concentraciones de proteína viral denominando ELISA 1 (14 µg de proteína por placa), ELISA 2 (28 µg de proteína por placa) y ELISA 3 (56 µg de proteína por placa) a cada variante. Se obtuvo para la ELISA 1 un 8.18% (18 animales) y 33.18% (73 animales) más

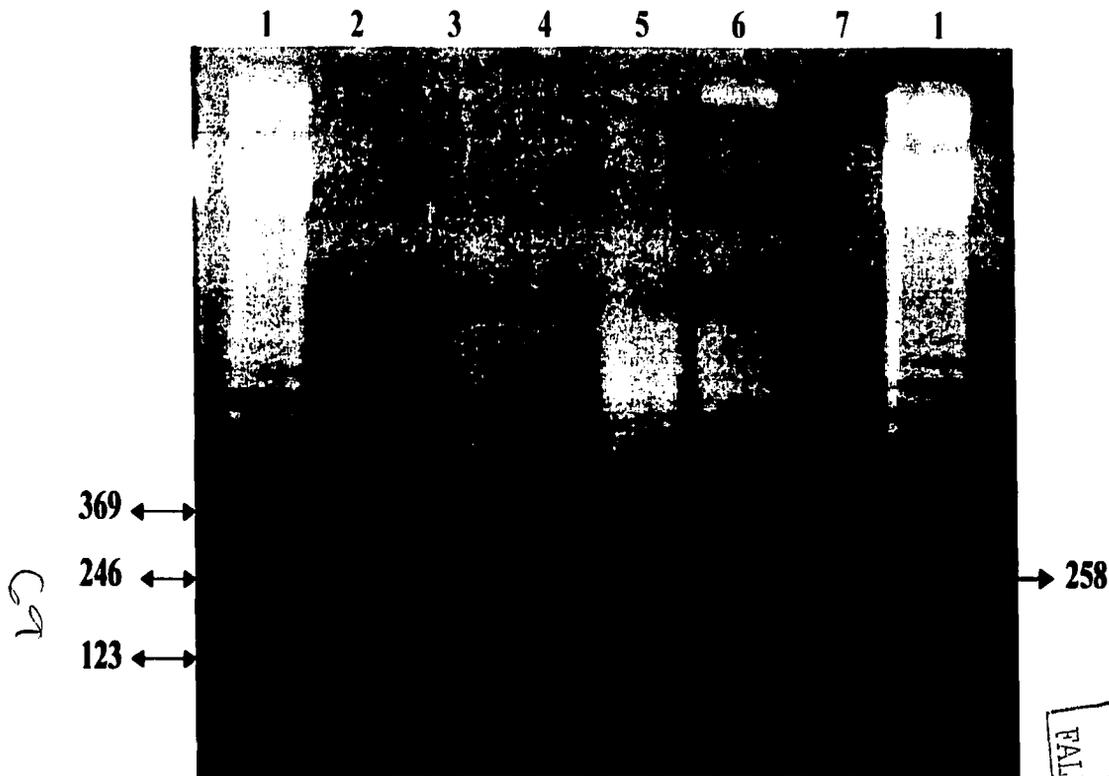
FIGURA 16. Productos de la reacción en cadena de la polimerasa del ADN del virus de artritis encefalitis caprina, con la amplificación de una banda específica de 258 pb



1. Marcadores de 123 pares de bases.
2. ADN 1 3. ADN 2 4.- ADN 3: Muestras extraídas de células de membrana sinovial infectadas con el virus de artritis encefalitis caprina (VAEC) aislado en México
5. ADN extraído de células de membrana sinovial infectadas con el VAEC de referencia de American Type Coleccion Culture (VR 905, 75.G63)
6. Células de membrana sinovial no infectadas 7. C(-) control negativo del PCR (agua)



FIGURA 17. Productos de la reacción en cadena de la polimerasa del ADN del virus de artritis encefalitis caprina, con la amplificación de una banda específica de 258 pb



1. Marcadores de 123 pares de bases.
2. ADN 1
3. ADN 2
- 4.- ADN 3: Muestras extraídas de células de membrana sinovial infectadas con el virus de artritis encefalitis caprina (VAEC) aislado en México
5. ADN extraído de células de membrana sinovial infectadas con el VAEC de referencia de American Type Coleccion Culture (VR 905, 75.G63)
6. Células de membrana sinovial no infectadas
7. C(-) control negativo del PCR (agua)

seropositivos comparado con las pruebas de ELISA e Inmunodifusión comerciales respectivamente. Para la ELISA 2 se obtuvo un 3.18 (7 animales) y 28.18 (62 animales) más seropositivos y para la ELISA 3 se obtuvo un 28.18 (62 animales) y un 53.18 (117 animales) más seropositivos comparado con las pruebas antes mencionadas respectivamente (**Figura 18, 19 y 20**).

Tabla 5. Detección de animales seropositivos a las pruebas de ELISA estandarizada y Western Blot con virus de AEC aislado; comparada con las pruebas de inmunodifusión y ELISA que utilizan virus de Maedi-Visna. En las diferentes pruebas se evaluaron un total de 220 sueros.

PRUEBA	Positivos	% Positivos	Negativos	%Negativo	Sospechoso	%Sospechosos
WB	172	78.19	44	20	4	1.81
ELISA 1	149	67.73	71	32.27	0	0
ELISA 2	138	62.73	82	37.27	0	0
ELISA 3	193	87.73	27	12.27	0	0
CHEKIT	131	59.54	82	37.28	7	3.18
I.D	76	34.09	144	65.91	0	0

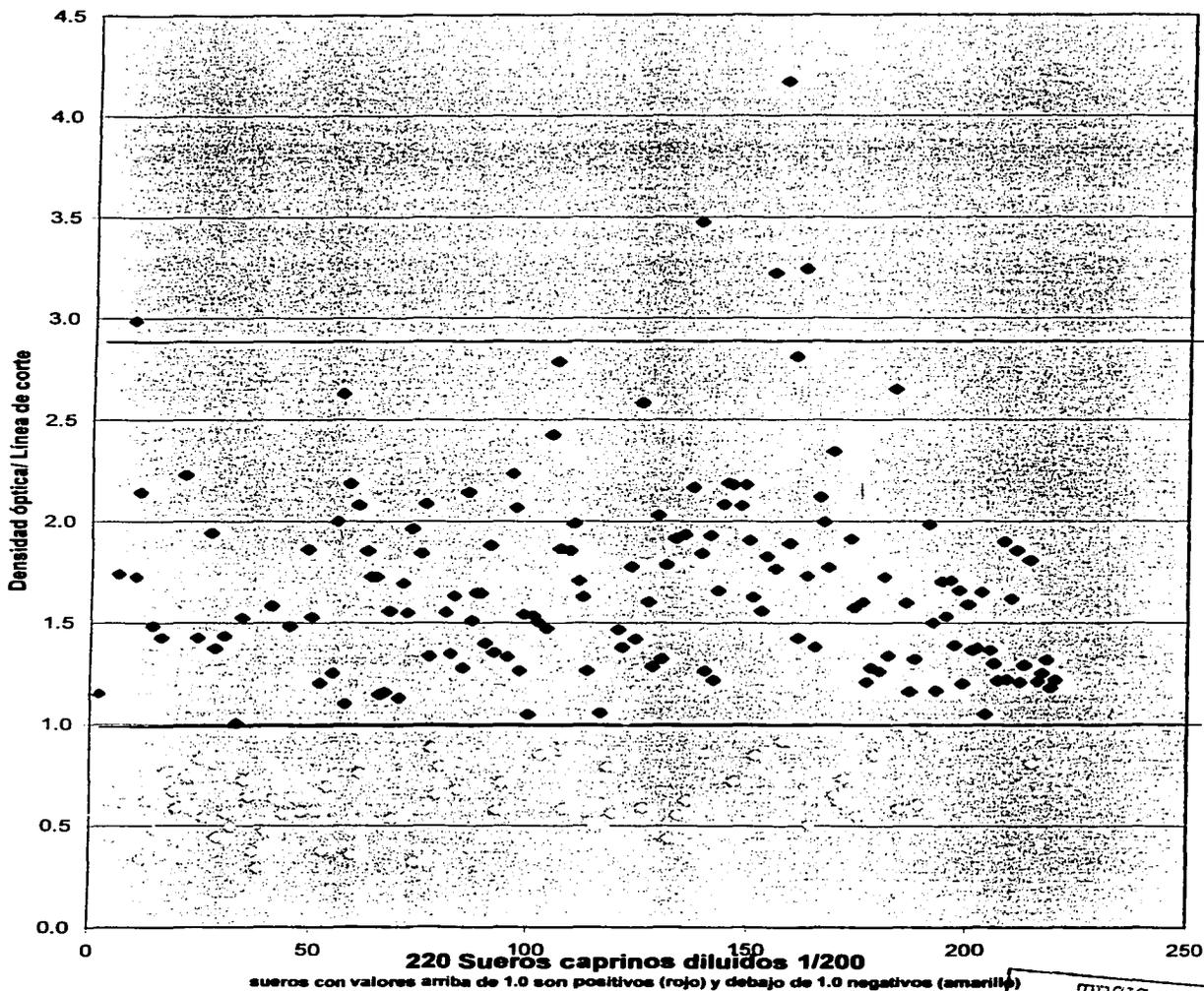
En la **Tabla 6**. Se muestran los sueros positivos, negativos y sospechosos por localidad y por cada una de las tres variantes de ELISA y WB.

Tabla 6. Resultados de 220 sueros evaluados de cabras del Estado de México y Querétaro por las técnicas de ELISA estandarizada y sus tres variantes y por Western blot.

ESTADO SEROLÓGICO DE LOS SUEROS

LOCALIDAD	POSITIVO				NEGATIVO				SOSPECHOSO			
	ELISAS			WB	ELISAS			WB	ELISAS			WB
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
<i>Estado de México</i>	39	41	45	42	7	5	1	4	0	0	0	0
<i>Querétaro</i>	110	97	148	130	64	77	26	40	0	0	0	4
TOTAL	149	138	193	172	71	82	27	44	0	0	0	4

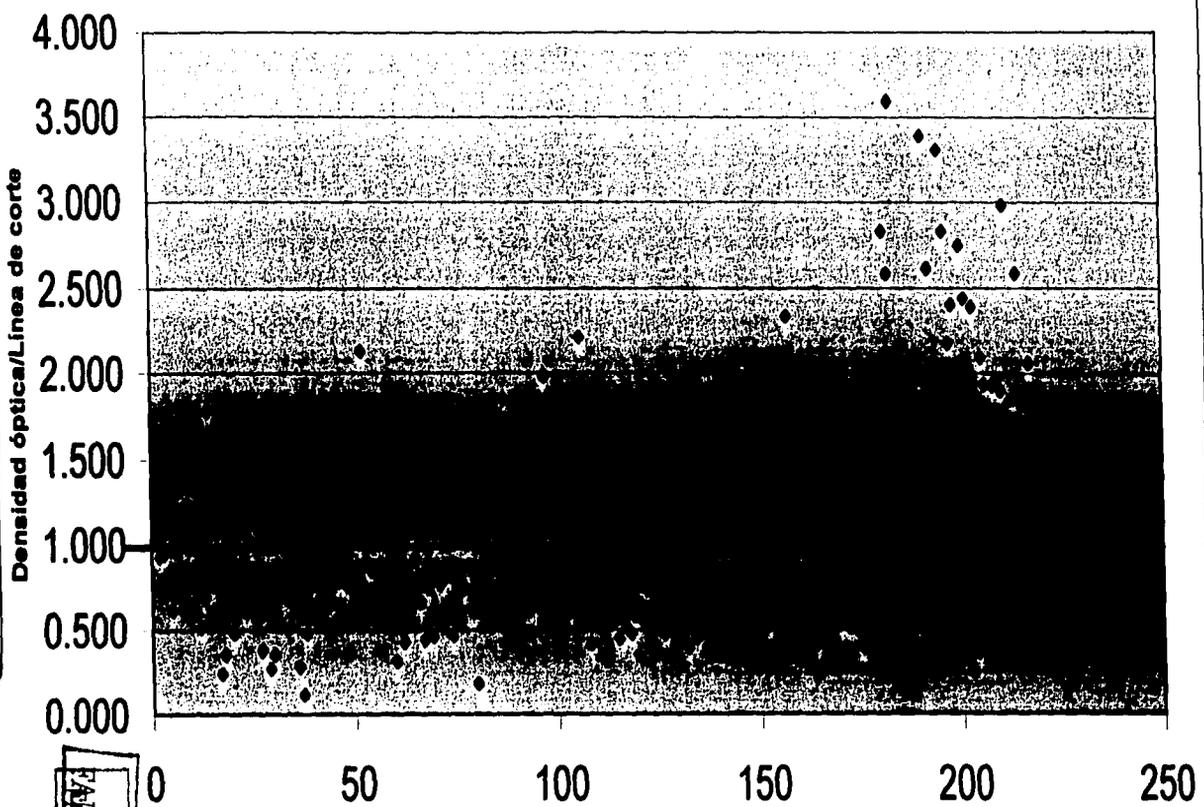
FIGURA 18. Sueros caprinos evaluados por la técnica de ELISA estandarizada (1) con virus de AEC aislado



71

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 19. Sueros caprinos evaluados por la técnica de ELISA estandarizada (2) con virus de AEC aislado

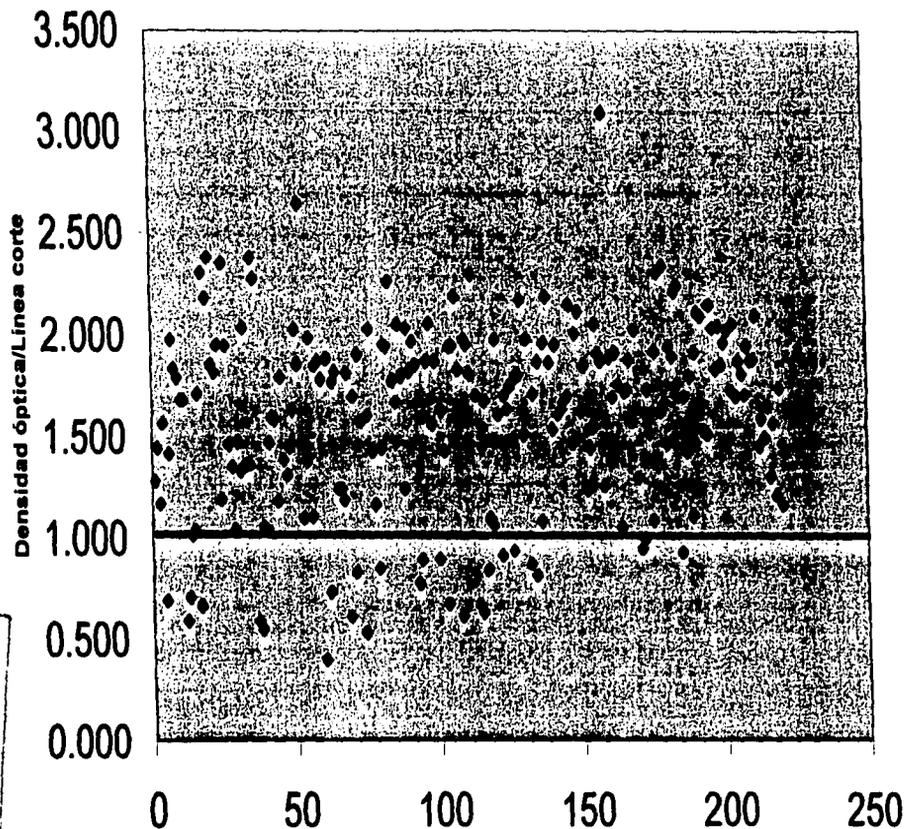


220 Sueros caprinos diluidos 1/200

sueros con valores arriba de 1.000 son positivos y debajo de 1.000 negativos

22
TESIS, CON
FAMILIA DE FORIC

FIGURA 20. Sueros caprinos evaluados por la técnica de ELISA estandarizada (3) con virus de AEC aislado



220 sueros caprinos diluidos 1/200
sueros con valores arriba de 1.000 son positivos y debajo de 1.000 son negativos

TESIS PARA
FALTA DE ORIGEN

3 t

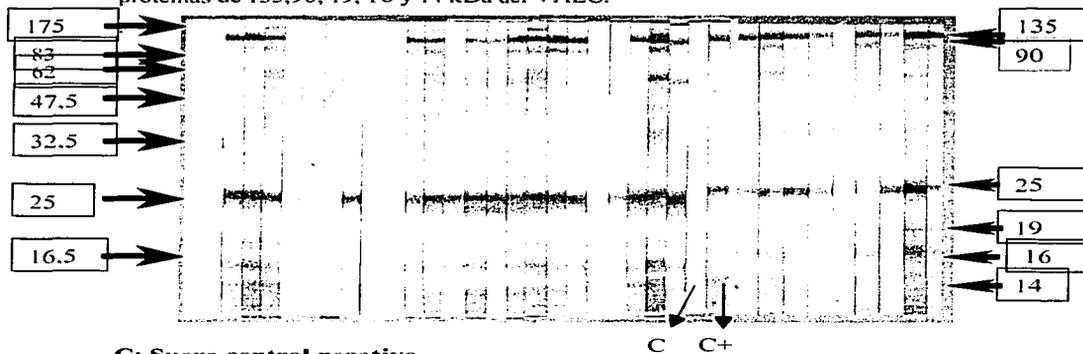
WB DEL BANCO DE SUEROS

En la prueba de WB se observó reacción cruzada de los sueros negativos con la proteína viral de 25 kDa, así como reacción de casi todos los sueros con las proteínas de 51 y 60 kDa. Otro hallazgo interesante fue que al comparar las proteínas del virus aislado con el de referencia de AEC se observaron diferencias en una proteína de 17 kDa presente en la cepa de ATCC y ausente en el virus aislado; así como con una proteína de 16 kDa presente en el virus aislado y ausente en la cepa de referencia.

Se consideró como criterio de positividad la presencia de 5 proteínas de 3 genes diferentes (135, 90 (gen env), 19 (gen rev); 14 y 16 (gen gag) **Figura 21, 22, 23, 24 y 25**. El WB se utilizó como estándar de oro, por lo que al comparar las diferentes pruebas usadas se obtuvo una sensibilidad de 44.1, 75.5, 83.7, 76.8 y 98.8 %, así como una especificidad de 100, 100, 90.9, 90.6-54.5 % para la prueba de Inmunodifusión, ELISA Comercial y ELISA estandarizada 1, ELISA 2 y ELISA 3 respectivamente.

De los 4 sueros que se consideraron sospechosos al WB solamente uno reaccionó positivo (el suero reconoció la proteína de 25, 90 y 135 kDa) a la ELISA comercial y a la ELISA estandarizada y de los 9 sueros positivos que dieron una reacción débil al WB solo 1 dio positivo a ID, 3 positivos a la ELISA comercial y 2 a las ELISAS estandarizadas (incluyendo al de ID)

Figura 21.- Inmunoelectrotransferencia de los sueros evaluados, donde se observa reacción cruzada con la proteína de 25 kDa en los sueros negativos y los sueros positivos presentan reacción a las proteínas de 135,90, 19, 16 y 14 kDa del VAEC.

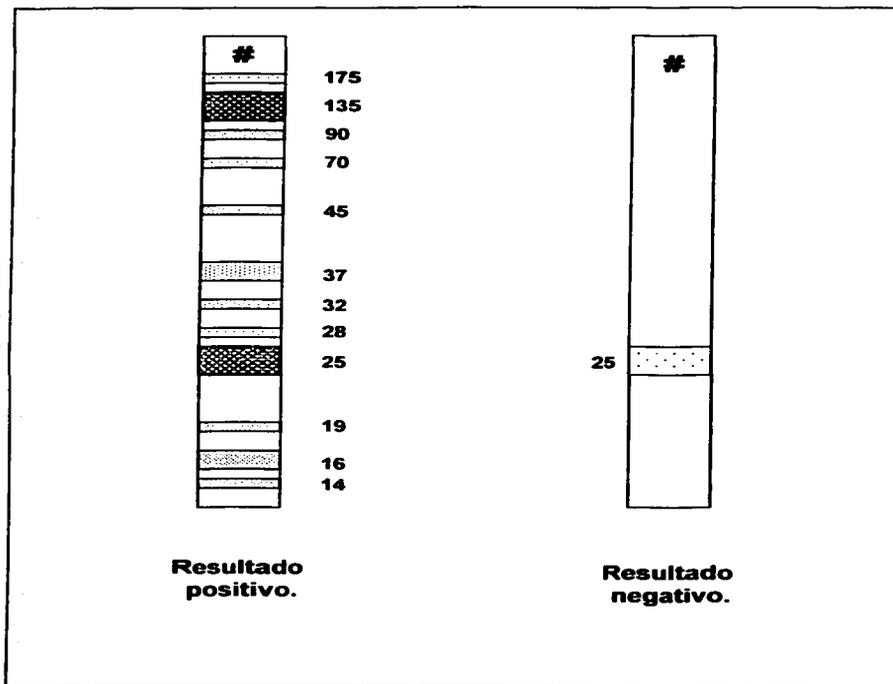


C: Suero control negativo

C+: Suero control positivo

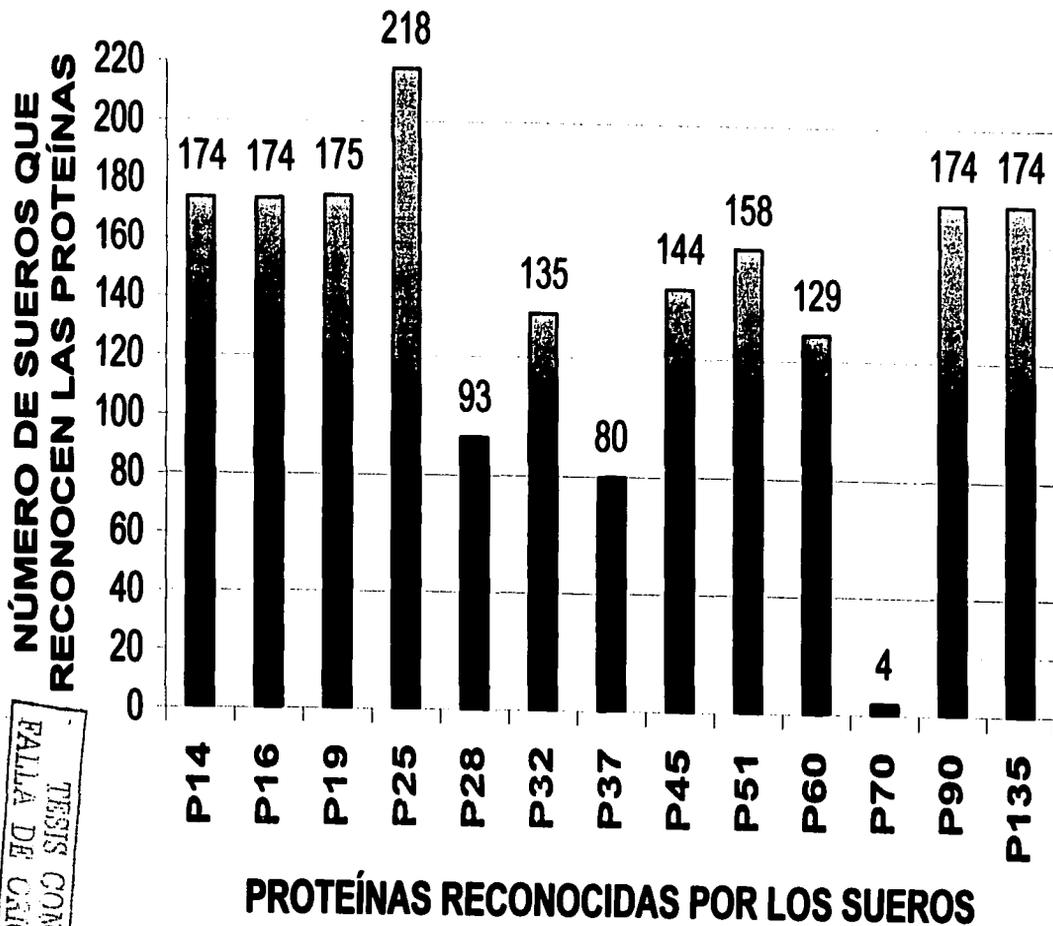
TESIS CON
FALLA DE CARGEN

Figura 22. Esquematzación del reconocimiento de proteínas del VAEC por sueros positivos y negativos en la prueba de inmunoelectrotransferencia o WB.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 23. PROTEÍNAS RECONOCIDAS EN
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA POR 220 SUEROS
CAPRINOS**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

xt

**FIGURA 24. PROTEÍNAS RECONOCIDAS EN
IMUNOELECTROTRANSFERENCIA POR
SUEROS CAPRINOS CONSIDERADOS
POSITIVOS**

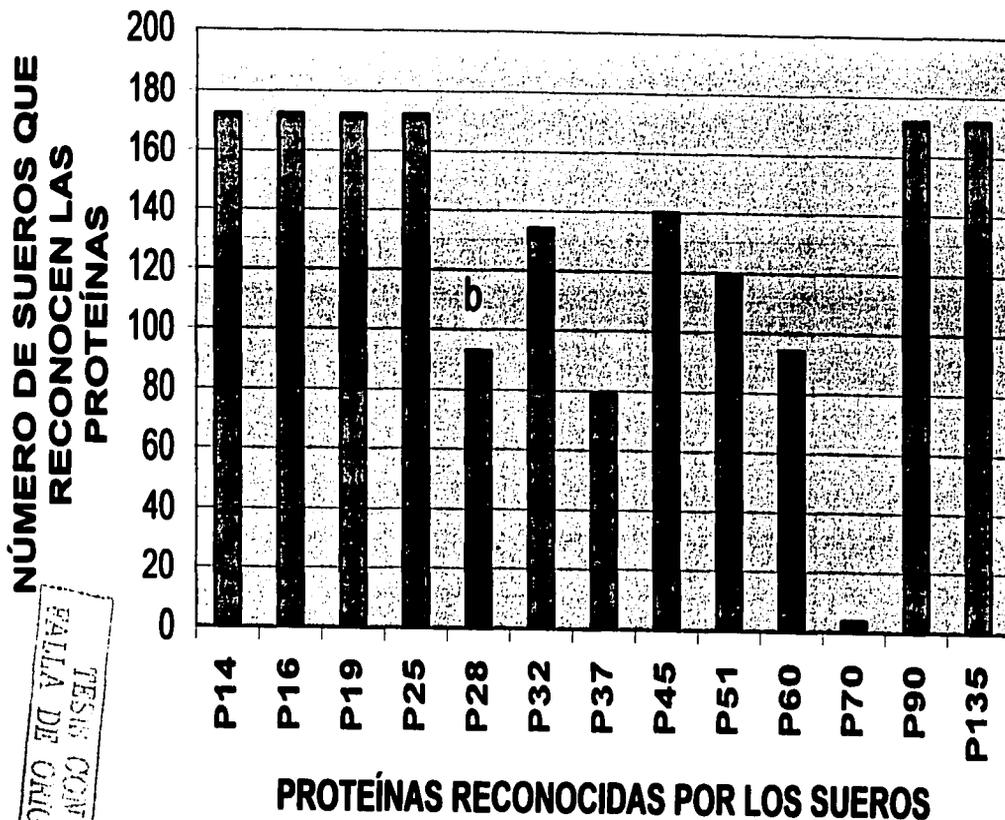
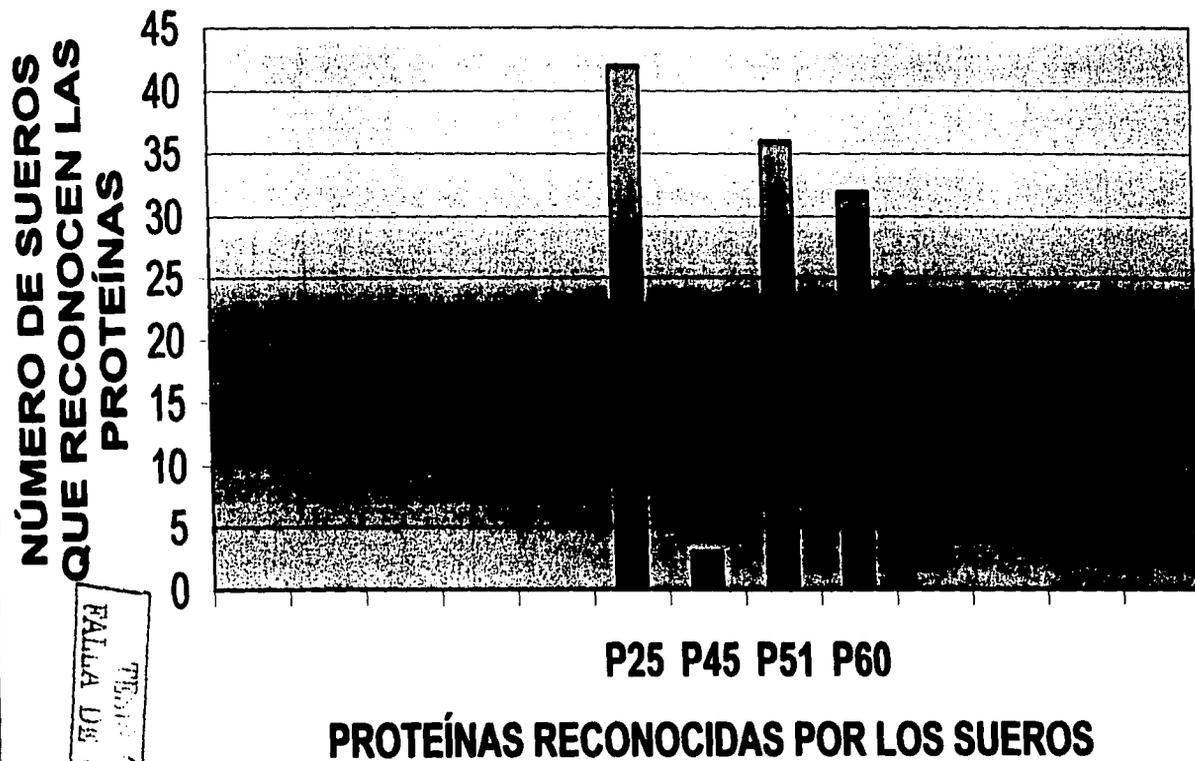


FIGURA 25. PROTEÍNAS RECONOCIDAS EN INMUNOELECTROTRANSFERENCIA POR SUEROS CAPRINOS CONSIDERADOS NEGATIVOS



PROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LOS SUEROS

bt

TEMA DE
FALLA DE UNO

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO DEL TEST POSITIVO, VALOR PREDICTIVO DEL TEST NEGATIVO Y PRUEBA KAPPA, DE LAS PRUEBAS DE WB, ELISA ESTANDARIZADA, INMUNODIFUSIÓN Y ELISA COMERCIAL.

Cálculos de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo del Test Positivo, Valor Predictivo del Test Negativo y Prueba kappa para la prueba de Inmunodifusión comercial.

WESTERN BLOT				
INMUNODIFUSIÓN		+	-	Total
	+	76	0	76
	-	96	44	140
	Total	172	44	216

$$\text{Sensibilidad} = \frac{76}{96+76} \times 100 = 44.1\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{44}{0+44} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Valor Predictivo del Test (+)} = \frac{76}{0+76} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Valor Predictivo del Test (-)} = \frac{44}{96+44} \times 100 = 32.3\%$$

Cálculos de la prueba k

$$K = \frac{0-C}{1-C}$$

$$172 \times 76 / 216 = 60.51$$

$$+ \quad / \quad 100 = 0.89$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$44 \times 140/216 = 28.51$$

$$76\% + 44\% = 120\% = \text{o usando proporciones} = 1.20$$

$$1.2 - 0.89 = 0.31$$

$$2.16 - .89 = 1.27$$

$$0.31 / 1.27 = 0.244$$

Se puede resumir que la prueba comercial de inmunodifusión en gel de agar es poco sensible, muy específica, de un alto valor predictivo del test positivo, de un bajo valor predictivo del test negativo y con muy poca concordancia con WB.

Cálculos de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo del Test Positivo, Valor Predictivo del Test Negativo y Prueba kappa para la prueba de ELISA comercial (Chekit).

WESTERN BLOT			
CHEKIT	+	-	Total
+	130	0	130
-	42	44	86
Total	172	44	216

$$\text{Sensibilidad} = \frac{130}{42+130} \times 100 = 75.5\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{44}{0+44} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Valor Predictivo del Test (+)} = \frac{130}{0+130} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Valor Predictivo del Test (-)} = \frac{44}{42+44} \times 100 = 51\%$$

Cálculos de la prueba k

$$K = \frac{0-C}{1-C}$$

$$1-C$$

$$172 \times 130/216 = 103.5$$

$$+ \quad / \quad 100 = 1.21$$

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

$$44 \times 86/216 = 17.5$$

$$130\% + 44\% = 174\% = \text{o usando proporciones} = 1.74$$

$$1.74 - 1.21 = 0.53$$

$$2.16 - 1.21 = 0.95$$

$$0.53/0.95 = 0.557$$

Se puede resumir que la prueba comercial de ELISA indirecta tiene buena sensibilidad, es muy específica, un alto valor predictivo del test positivo, un bajo valor predictivo del test negativo y una buena concordancia con WB.

Cálculos de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo del Test Positivo, Valor Predictivo del Test Negativo y Prueba kappa para la prueba de ELISA 1 estandarizada con VAEC aislado en México.

WESTERN BLOT			
	+	-	Total
ELISA 1	144	4	148
	28	40	68
Total	172	44	216

$$\text{Sensibilidad} = \frac{144}{28+144} \times 100 = 83.7\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{40}{4+40} \times 100 = 90.9\%$$

$$\text{Valor Predictivo del Test (+)} = \frac{144}{4+144} \times 100 = 97.2\%$$

$$\text{Valor Predictivo del Test (-)} = \frac{40}{28+40} \times 100 = 58.8\%$$

Cálculos de la prueba k

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$K = \frac{0-C}{1-C}$$

$$\frac{172 \times 148 / 216 = 117.8}{+ \quad \quad \quad / \quad 100 = 1.31}$$

$$44 \times 68 / 216 = 13.8$$

$$144\% + 40\% = 184\% = \text{o usando proporciones} = 1.84$$

$$1.84 - 1.31 = 0.53$$

$$2.16 - 1.31 = 0.85$$

$$0.53 / 0.85 = 0.623$$

Se puede resumir que la prueba de ELISA 1 estandarizada con VAEC aislado en México, tiene buena sensibilidad, buena especificidad, un alto valor predictivo del test positivo, un bajo valor predictivo del test negativo y una buena concordancia con WB.

Cálculos de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo del Test Positivo, Valor Predictivo del Test Negativo y Prueba kappa para la prueba de ELISA 2 estandarizada con VAEC aislado en México.

WESTERN BLOT				
	+	-	Total	
ELISA 2	+	133	4	137
	-	40	39	79
	Total	173	43	216

$$\text{Sensibilidad} = \frac{133}{40+133} \times 100 = 76.8\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{39}{4+39} \times 100 = 90.6\%$$

$$\text{Valor Predictivo del Test (+)} = \frac{133}{4+133} \times 100 = 97\%$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\text{Valor Predictivo del Test (-)} = \frac{39}{40+39} \times 100 = 49.3\%$$

Cálculos de la prueba k

$$K = \frac{0-C}{1-C}$$

$$\frac{173 \times 137 / 216 = 109.7}{43 \times 79 / 216 = 15.7} \div 100 = 1.25$$

$$133\% + 39\% = 172\% = \text{o usando proporciones} = 1.72$$

$$1.72 - 1.25 = 0.47$$

$$2.16 - 1.25 = 0.91$$

$$0.47 / 0.91 = 0.516$$

Se puede resumir que la prueba de ELISA 2 estandarizada con VAEC aislado en México, tiene buena sensibilidad, buena especificidad, un alto valor predictivo del test positivo, un bajo valor predictivo del test negativo y una buena concordancia con WB.

Cálculos de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo del Test Positivo, Valor Predictivo del Test Negativo y Prueba kappa para la prueba de ELISA 3 estandarizada con VAEC aislado en México.

WESTERN BLOT				
	+	-	Total	
ELISA 3	+	170	20	190
	-	2	24	26
	Total	172	44	216

$$\text{Sensibilidad} = \frac{170}{2+170} \times 100 = 98.8\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{24}{20+24} \times 100 = 54.5\%$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\text{Valor Predictivo del Test (+)} = \frac{170}{20+170} \times 100 = 89.4\%$$

$$\text{Valor Predictivo del Test (-)} = \frac{24}{2+24} \times 100 = 92.3\%$$

Cálculos de la prueba k

$$K = \frac{0-C}{1-C}$$

$$\frac{172 \times 190 / 216 = 151.29}{+ \quad / \quad 100} = 1.56$$

$$44 \times 26 / 216 = 5.29$$

$$170\% + 24\% = 194\% = \text{o usando proporciones} = 1.94$$

$$1.94 - 1.56 = 0.38$$

$$2.16 - 1.56 = 0.6$$

$$0.38 / 0.6 = 0.633$$

Se puede resumir diciendo que la prueba de ELISA 3 estandarizada con VAEC aislado en México, es muy sensible, muy poco específica, de un buen valor predictivo del test positivo, de un alto valor predictivo del test negativo y con buena concordancia con WB.

Las pruebas que mostraron mayor sensibilidad fueron las estandarizadas con el virus de AEC aislado y las pruebas que mostraron mayor especificidad fueron los estuches comerciales de ELISA e Inmunodifusión, así como el WB con virus aislado, como se muestra en la **Tabla 7**.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Sensibilidad y especificidad de las pruebas de ELISA estandarizada con virus de AEC, ELISA comercial e Inmunodifusión que utilizan virus de maedi-visna; con relación a WB estandarizado con virus de AEC.

Prueba	Verdader Positivo	Verdader Negativo	Falso Positivo	Falso Negativo	Sospe-Chosos	Sensibilidad	Especificidad
WB	172	44	0	0	4	100	100
ELISA 1	144	40	4	28	0	83.7	90.9
ELISA 2	133	39	4	40	0	76.8	90.6
ELISA 3	170	24	20	2	0	98.8	54.5
Chekit	130	44	0	42	0	75.5	100
ID	76	44	0	96	0	44.1	100

WB: Inmunoelectrotransferencia con virus de AEC aislado

ELISAS 1, 2 y 3: ELISAS estandarizadas con virus de AEC aislado a diferentes concentraciones 14, 28 y 56 µg por placa de antígeno respectivamente.

Chekit: Elisa comercial que utiliza virus de maedi - visna

ID: Inmunodifusión comercial que utiliza virus de maedi - visna

Todas las pruebas a excepción de la ELISA 3 mostraron un muy buen valor de predicción positivo y por el contrario la prueba de ELISA 3 es la única que mostró un muy buen valor de predicción negativo. Con respecto a la concordancia de las pruebas en relación con WB todas mostraron buena correlación a excepción de la prueba de Inmunodifusión que mostró una baja concordancia como se aprecia en la **Tabla 8**.

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

Tabla 8. Sensibilidad, especificidad, valor de predicción positivo, valor de predicción negativo y valor k de las pruebas de ELISA estandarizada con virus de AEC aislado, Elisa comercial e Inmunodifusión que utilizan virus de maedi-visna; con relación a WB estandarizado con virus de AEC aislado.

PRUEBA	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predicción Positivo	Valor Predicción Negativo	Valor de k
WB	100	100	100	100	1
ELISA 1	83.7	90.9	97.2	58.8	0.623
ELISA 2	76.8	90.6	97	49.3	0.516
ELISA 3	98.8	54.5	89.4	92.3	0.633
Checkit	75.5	100	100	51	0.557
ID	44.1	100	100	32.3	0.244

WB: Inmunoelectrotransferencia con virus de AEC aislado

ELISAS 1, 2 y 3: ELISAS estandarizadas con virus de AEC aislado a diferentes concentraciones 14, 28 y 56 µg por placa de antígeno respectivamente.

Checkit: Elisa comercial que utiliza virus de maedi - visna

ID: Inmunodifusión comercial que utiliza virus de maedi - visna

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Se han utilizado toda una gama de cultivos celulares primarios principalmente de células de membrana sinovial de feto caprino, esto es debido a la falta de una línea celular que soporte eficientemente el tiempo que requiere el virus para replicarse sin que exista alteración celular y/o muerte, con excepción de la línea de células de ovario o pulmón del Thar del Himalaya en las cuales se ha reportado una excelente replicación viral (Archambault et al., 1988).

De los cultivos celulares utilizados para la propagación del virus de AEC, se han reportado las células fetales de testículo (Dahlberg et al., 1981), explantes de pulmón (Ellis et al., 1987) y músculo de cabra (Hötzel et al., 1993), células de córnea de cordero (Kirkland y Batty, 1987; Simard et al., 2001). Un reporte reciente menciona que en las células epiteliales de leche de cabra se puede establecer una infección productiva de VAEC, aunque en algunos casos sin efecto citopático evidente (Mselli-Lakhal et al., 1999).

El efecto citopático causado por lentivirus es característico (replicación lenta), con formación de sincitios o células gigantes multinucleadas (generalmente de 5 a 30 núcleos por célula) con un cuerpo celular redondeado, retráctil y muchas extensiones citoplasmáticas con forma de estrella, filiformes o parecidas a arañas (Anderson y Cheevers, 1981; Pétursson et al., 1992). Algunas de estas características del efecto citopático se apreciaron en los cocultivos de monocitos-macrófagos con células de membrana sinovial (**Figura 11**). Se observó este efecto en promedio a los 20 días post-inoculación, como lo había reportado Kirkland y Batty (1987) en células de córnea de cordero. En el presente estudio la evaluación de la producción de proteínas virales se realizó utilizando la técnica de Inmunolectrotransferencia después de observar la presencia del efecto citopático en los cultivos celulares, demostrando una excelente producción de proteínas virales como se demuestra en la **Figura 12**.

Además otro aspecto importante es lo relacionado al uso de células de membrana sinovial utilizadas tanto para el aislamiento del virus de AEC como para la obtención del abasto viral. Estas eran células con alto pasaje (36-48 pases) como las células de córnea de cordero utilizadas por Kirkland y Batty (1987), que permitieron una excelente producción

de virus. Estos resultados difirieren de lo reportado por Anderson y Cheevers (1981) quienes indican que las células de membrana sinovial soportan bien la replicación del virus de AEC cuando se usan en bajo pasaje (4-8). En el estudio antes referido el virus que utilizan es el de AEC de referencia cepa CAEV 75- G63, observando la presencia de sincitios alrededor de los días 5 y 6. Este mismo virus de referencia se utilizó en el presente trabajo obteniendo efecto citopático en células de membrana sinovial de alto pasaje entre los días 6 y 7, resultados muy similares a los de Anderson y Cheevers (1981).

Por lo que se puede concluir que en las condiciones en las que se realizó este trabajo las células de alto pasaje y de bajo pasaje de membrana sinovial muestran una eficiencia parecida para soportar la replicación del virus de AEC.

El tiempo de presentación del efecto citopático es muy variable, reportando en explante directo de células de membrana sinovial de cabras infectadas, la observación de este efecto citopático desde un mes (Crawford et al., 1980) hasta dos meses (Pawlish y Maes, 1984), los cuales a su vez mencionan que cuando subcultivaron las células, el tiempo de observación se acortó de 3 a 6 días y de 2-7 días respectivamente. Otros trabajos mencionan que a partir de explante de células de membrana sinovial el efecto se observó entre 10 y 14 días (Ellis et al., 1987) y a partir de células de membrana sinovial de una cabra artrítica se encontró efecto a los 10 días (Dahlberg et al., 1981). Con la utilización de células de cornea de cordero se observó el efecto citopático a las 2 semanas (Simard et al., 2001).

Daltabuit et al. (1999) en su estudio reporta el aislamiento de un virus de AEC de cabras mexicanas, el cual presentó efecto citopático en células de membrana sinovial en un tiempo de 6 meses. Esta variación en la presentación del efecto citopático puede deberse a la adaptación del virus a condiciones de laboratorio, la diversidad de cepas, al título viral y la virulencia del virus. Se puede deducir que al parecer se requiere por lo menos de una a dos semanas promedio (con excepción de lo reportado por Daltabuit et al., 1999) para poder observar el efecto citopático de un primer aislamiento viral y subcultivándolo se disminuye el tiempo de presentación de este efecto citopático, o se acelera como en el presente estudio en el que de un tiempo promedio de casi 3 semanas, se redujo a solamente 2 semanas.

Los métodos de concentración y de purificación viral para AEC varían, utilizando ultrafiltración (con membranas de peso de exclusión de 100,000 y 10,000 daltons) (Kirkland y Batty, 1987) o diálisis (Ellis et al., 1986), pero en ninguno de estos trabajos se describen las proteínas que se obtienen y con que pureza. Evaluaciones hechas de estos métodos indican que se obtiene una gran cantidad de proteínas no virales (resultados no presentados), principalmente albúmina, ya que los medios de cultivo celular son ricos en esta proteína por la adición de suero fetal. Esto dificulta la separación de proteínas adecuadamente por electroforesis y transferencia, lo que impide la visualización de proteínas virales reconocidas por sueros de animales seropositivos a la enfermedad.

Simard et al. (2001) reportaron el aislamiento del virus de AEC de cabras canadienses a partir de cocultivos con células de membrana sinovial de feto caprino y su replicación posterior en células de córnea fetal de cordero con un 80-90% de confluencia muy similar al porcentaje de confluencia de 80 % de las células usadas en el presente trabajo; aunque este no es un factor importante en células de membrana sinovial como lo reporta Anderson y Cheevers (1981), donde indican que la síntesis de ADN celular no se requiere para establecer la infección de VAEC. La metodología de infección de las células de córnea en los trabajos que reportan Belov y Whalley (1988) y Simard et al. (2001), incluyeron el uso de polibrene para mejorar la absorción del virus a estas células que posteriormente se incubaron por dos horas a 37° C y con 5% de CO₂. En el presente trabajo no se utilizó polibrene para infectar las células de membrana sinovial, de tal forma que la infección se realizó directamente con sobrenadante de cajas infectadas con VAEC, previamente probadas por WB y depositando directamente en el medio de cultivo celular (Dulbecco con suero al 10%) sin incubar el sobrenadante previamente con las células. Utilizando esta metodología se obtuvo repetibilidad en los tiempos de presentación de la infección. El poder obviar metodologías descritas para infectar células con el virus de AEC posiblemente se base en que este virus *in vitro* tiene predilección por células de membrana sinovial y aunque otros cultivos puedan soportar la replicación del virus, como en el caso de cerebro, plexo coroideo, pulmón y riñón de cabra, estos tipos de células presentan una reducida eficiencia comparadas con las células de membrana sinovial (Anderson y Cheevers, 1981).

Debido a la variación del virus de AEC en cuanto a virulencia y antigenicidad y a la falta de información del comportamiento de estos virus en sistemas de cultivo *in vitro*, se hace de suma importancia que los laboratorios determinen el tiempo óptimo de cosecha del virus.

Una metodología propuesta para esto es la realizada para la cepa 75-G63 en la cual se monitorea el cultivo con partículas virales marcadas con (H3) determinando el virus asociado a células y el virus extracelular (Anderson y Cheevers, 1981). Otra alternativa más accesible de utilizar, reportada recientemente en células de córnea de cordero y adecuada para determinar la cinética de producción de proteínas virales del virus de AEC es el WB.

Este reporte reciente hecho por Simard et al. (2001) describe el montaje de una cinética de producción de proteínas virales co-cultivando células infectadas (evaluadas por inmunofluorescencia e inmunodifusión) con células no infectadas de córnea ovina, utilizando un total de 25 cajas infectadas, de las cuales una caja por día fue procesada congelando y descongelando 4 veces para posteriormente peletarse con polietilenglicol, dializarse con agua y PBS y finalmente concentrarse con polietilenglicol; enseguida el concentrado viral se separó por electroforesis, se transfirió en nitrocelulosas y se procesó realizando el WB; reportando un tiempo óptimo de cosecha a los 23 días incrementándose la observación de bandas en intensidad y gradualmente desde el día 13, con el reconocimiento de 3 bandas de proteínas virales (10, 25 y 42 kDa de peso molecular). Estos resultados fueron superados en el presente estudio con una metodología de purificación y concentración sencilla utilizando ultracentrifugación con gradientes de sacarosa al 20% lo que fue más rápido y reproducible que la metodología que describen Simard et al. (2001) para concentrar el virus; en un segundo experimento reportaron la presencia de dos proteínas adicionales entre la proteína 25 y 42, y utilizando sobrenadante infectado en lugar de células, se obtiene una débil señal de la proteína 25 y 42; por lo que se puede apreciar la poca reproducibilidad de sus resultados y la posible falta de producción activa de partículas virales o la pérdida de proteínas durante el proceso de purificación y concentración. Esto se sustenta en el trabajo de Guinguen et al. (2000) donde mencionan que la observación de proteínas precursoras y las posteriores proteínas que se obtienen por restricción de la

proteasa viral, indican que las proteínas virales de VAEC son correctamente producidas, procesadas y liberadas por células infectadas.

En la cinética de producción de proteínas para el virus de AEC aislado en cabras mexicanas se utilizaron 10 cajas de células de membrana sinovial infectadas con sobrenadante proveniente de células infectadas y previamente evaluadas por WB (prueba más sensible y específica para esta evaluación que las utilizadas por Simard et al., 2001) **Figura 12**; estas cajas se cosecharon cada tercer día, teniendo información de la infección en los cultivos hasta el día 24 similar a lo reportado por Simard et al. (2001) y posteriormente el sobrenadante se procesó y se evaluó con WB. En el día 3 de colección de sobrenadante, se aprecian 13 proteínas de las cuales 11 son virales; esto se debió al virus excedente que no infectó a las células, por lo que se observó el patrón de proteínas completo en el primer muestreo (**Figura 13**). En el día 5 de esta cinética se observó el reconocimiento de la proteína de 135 kDa codificada por el gen env, que es de gran importancia en el reconocimiento serológico de los animales infectados con VAEC (Perry et al., 1995; Cheevers et al., 2000; Beyer et al., 2001) y las proteínas de 14, 19 y 25, dos codificadas por el gen gag (14 y 25) y una codificada por el gen rev (19) (Saltarelli et al., 1990); estas últimas junto con la gp135 a la postre se verá que son de las más importantes para determinar la infección en cabras por el virus de AEC. Cabe mencionar que durante toda la cinética de producción se encontró el reconocimiento de dos proteínas de un peso de 51 y 60 kDa que como se observa en la **Figura 12**; estas son proteínas celulares obtenidas del sobrenadante de los cultivos.

El primer pico de producción de 7 proteínas virales se observó al día 7 (reconociendo las proteínas de 14, 16, 19, 25, 37, 90 y 135 kDa) como se observa en la **Figura 13**; para posteriormente disminuir (tanto en número de proteínas reconocidas como en intensidad) y enseguida incrementarse al día 14 con 11 proteínas de 14, 16, 19, 25, 28, 32, 37, 45, 70, 90 y 135 kDa, como se muestra en la **Figura 14 y 15**; lo que involucra proteínas de todos los genes del virus como había sido reportado por diferentes autores (**Tabla 2**). Las proteínas descritas en este trabajo concuerdan con lo referido por Guinguen et al. (2000) aseverando que fueron correctamente producidas, procesadas y liberadas por

las células de membrana sinovial de feto caprino. Lo anterior no se encontró en el trabajo de Simard et al. (2001).

El control positivo (cepa de referencia 75-G63) mostró una cinética de producción de proteínas viral encontrando el pico al día 5 como lo reporta Anderson y Cheevers (1981). Las proteínas reconocidas por la cepa de referencia al inicio de la infección fueron las codificadas por los genes gag y env, además las proteínas celulares ya referidas (datos no presentados), esto concuerda con las proteínas encontradas al inicio de la infección por el virus aislado. Comparando las proteínas antigénicas de la cepa de referencia con las del virus aislado se encontró diferencia en el peso molecular de la proteína que correspondería a la matriz, con un peso reportado de 17 kDa, en la cepa de referencia cepa Co (Saltarelli et al., 1990), lo cual también coincidió con el peso de esta proteína para la cepa 75-G63 que se utilizó en el presente estudio. El peso encontrado en la proteína de matriz del virus aislado fue de 16 kDa como se puede apreciar en la **Figura 14** y considerándose una de las proteínas más conservadas del virus nos puede indicar que se trata de una cepa diferente lo que pudiera tener implicaciones en el diagnóstico de la enfermedad, principalmente con técnicas que se basan en la detección del genoma como el PCR. Aunque en el presente trabajo no se presentan los datos que soportan esta aseveración se tienen los resultados por restricción de endonucleasas y secuenciación de las dos proteínas, encontrando diferencias en los aminoácidos.

La cinética de producción viral evaluada por WB demostró que aunque no se observe el efecto citopático en las células de membrana sinovial, el virus se está replicando, lo que refuerza la idea de que la formación de sincitios no está correlacionada con el pico de producción viral. El primer pico de producción de proteínas vírales se observó a los 7 días y posteriormente se observó un patrón de proteínas virales completas a los 14 días y a los 21 días; esta última fecha concordó con la presencia de sincitios evidentes que se apreciaron a los 20 días. Las diferentes proteínas producidas durante el ciclo de infección viral no se pueden evaluar con una metodología como la descrita por Anderson y Cheevers (1981). Montar la cinética de producción viral nos permitió asegurar el tiempo óptimo de cosecha para utilizar los antígenos en las pruebas de ELISA y WB.

La prueba de Inmunodifusión en agar gel (IDAG) utilizada para la AEC, forma dos líneas de precipitación, una contra la proteína gp135 que de los sueros probados como positivos, la mitad reaccionó contra esta proteína y la otra mitad reaccionó contra p27 que es la segunda línea de precipitación. En estos sueros probados en WB no se apreció mayor concentración de anticuerpos contra la gp135 que hiciera la diferencia de la reacción observada en Inmunodifusión; por otra parte de esa mitad de sueros que reconocieron la p27 del VNPO sólo 27 reconocieron la proteína p28 (de 39 sueros) del VAEC en WB y todos los sueros positivos a Inmunodifusión reconocieron la p25 y gp135 en WB.

Por lo que se puede concluir que posiblemente la concentración de anticuerpos contra p27 o gp135 en IDAG si este interviniendo de forma importante en la formación de líneas de precipitación y en el WB esta diferencia de concentración no se aprecia; o que la divergencia de estas proteínas reportada entre el VNPO y VAEC pueda ser causa de la diferencia en el reconocimiento (Knowles et al., 1994; Kwang et al., 1995; Pasick, 1998).

Otro aspecto que hay que considerar es que otras proteínas de alto peso molecular como (p90) o de bajo peso molecular (p19, p16, p14) estén interviniendo en estas reacciones de precipitación, ya que los protocolos para la obtención de antígenos involucran virus completo (Reddy et al., 1993; Kwang et al., 1995). Cabe mencionar que al parecer la p25 es la proteína denominada p27 para NPO, esto se comprobó al correr los sueros controles positivos y negativos del kit de IDAG en WB, y se encontró que los sueros positivos reaccionaron con la p25 y no con la p28, así como a otras proteínas de alto y bajo peso molecular incluyendo proteínas celulares; Mientras que el suero negativo también reconoció la p25 y las proteínas celulares **Figura 8**.

Solo 76 sueros fueron positivos a IDAG de 172 positivos a WB, casi la mitad de los sueros probados para cada región (Estado de México y Querétaro); lo que confirma el limitado valor diagnóstico para VAEC al utilizar como antígeno VNPO. Esta baja sensibilidad se atribuye a una divergencia entre las proteínas de gag (25%) y env (40%) de VAEC y VNPO. Otro aspecto relacionado con la baja sensibilidad es que la IDAG requiere la participación de múltiples interacciones epítopes-anticuerpos para obtener un resultado positivo mientras que otras pruebas como la de inmunoprecipitación requiere solamente la

unión de un solo epítoto por anticuerpo para obtener un resultado positivo (Reddy et al., 1993; Knowles et al., 1994; Kwang et al., 1995; Pasick, 1998).

Los resultados obtenidos con la ELISA indirecta comercial (Chekit®) arrojaron 55 sueros mas positivos (cerca del 100% del total de sueros probados del Estado de México dieron positivo). Demostrando una mayor sensibilidad que la prueba de IDAG como lo corroboran otros trabajos (Rosati et al., 1995).

Los diseños en la estandarización de las pruebas de ELISA para ser utilizadas en el diagnóstico de LVPR, principalmente para AEC son muy variados. En el caso del antígeno se reporta su obtención a partir de un aislado de VAEC de pulmón que se cocultivó en células de córnea fetal de cordero (Heckert et al., 1992); un aislado de VAEC de Nueva Zelanda y propagado en células de membrana sinovial de cabra (Schroeder et al., 1985) y un virus aislado de E.U. propagado en células de pulmón o de ovario del Tahr de Himalayan (Archambault et al., 1988). De todos ellos no se conoce la cinética de producción de proteínas virales, ni la composición de proteínas virales que se usaron para sensibilizar la placa, ni su comportamiento en los cultivos celulares antes mencionados. Lo que es un aspecto muy importante como ya se demostró en la cinética de producción obtenida en el presente trabajo y como lo refiere Simard et al (1998).

Los procesos de purificación para antígenos a utilizar en la prueba de ELISA por lo general se basan en clarificar el sobrenadante y ultracentrifugar varias veces, y en algunos casos adicionar al antígeno SDS y volver a ultracentrifugar (Schroeder et al., 1985; Heckert et al., 1992; Scharlie et al., 1994) lo que podría ocasionar pérdida de proteínas antigénicamente importantes y que son pobremente representadas como se observó en el WB (p28, p32, p37, p45 y p70); esto podría afectar la sensibilidad de la prueba y puede pensarse, por tanto, que obteniendo un antígeno más puro se asegura una excelente especificidad. Los valores de sensibilidad reportados para algunas pruebas de ELISA usando virus de AEC van del orden de 94.4% con respecto a inmunoprecipitación (Scharlie et al., 1994) y 98.3% con respecto a sueros positivos a por lo menos 2 de las 3 pruebas establecidas por los autores (Heckert et al., 1992). Siendo estos resultados similares a los obtenidos en el presente estudio con la ELISA estandarizada denominada 3 (98.8%) comparada con WB. Cabe mencionar que la sensibilidad de la ELISA comercial fue baja

(75.5%) con respecto al WB, siendo aun mejor en sensibilidad la ELISA estandarizada 1 (Tabla 7). Concluyendo que la pruebas de ELISA con VAEC son más sensibles que la ELISA comercial que utiliza VMV.

Los valores de especificidad reportados para algunas pruebas de ELISA con VAEC van de 100% (Scharlie et al., 1994) a 97.9 % (Heckert et al., 1992) comparados como se mencionó previamente. En este parámetro las ELISAS estandarizadas fueron poco específicas teniendo para la ELISA 1 un 90.9% y para la ELISA 3 un 54.5%. Por el contrario la ELISA comercial fue muy específica con 100% (Tabla 7). Esta inespecificidad se debió a las 2 proteínas celulares detectadas en WB (p51 y p60) contra las que reaccionaron en casi todos los sueros; Otra razón que posiblemente sea la más importante, y que se discutirá mas adelante, es que todos los sueros dieron reacción positiva a la proteína p25 del VAEC, por lo que esto incremento la inespecificidad de las pruebas de ELISA.

Archambault et al. (1988) y Shroeder et al. (1985) reportan sus resultados de ELISA con excelentes resultados de positividad (98.8 y 99.4), siendo un parámetro poco adecuado para comparar las técnicas, ya que en el presente estudio la ELISA 3 mostró un 87.7% de positividad mayor aun que el WB (78.19%) pero en este porcentaje se incluyen los falsos positivos (Tabla 5).

La concordancia implica solamente que 2 pruebas son medidas con el mismo o cercano factor de correlación. Por lo que una buena correlación no necesariamente implica exactitud de resultados de la prueba relacionado con la infección. Una buena concordancia indica que una prueba puede remplazar a la otra obteniendo resultados similares. La determinación del estado de infección verdadero de VAEC es difícil, por la patogenia de la enfermedad en la cual se restringe la replicación viral y hace que el aislamiento del virus de animales infectados no sea siempre posible (Heckert et al., 1992).

La concordancia en las pruebas de ELISA estandarizada y la ELISA comercial fue buena con respecto a WB teniendo el valor mas alto para la ELISA 3 de 0.633 considerándose una buena concordancia y muy similar como la reportada por Heckert et al. (1992) de 0.72 (ELISA comparada con WB). Por el contrario Schroeder et al. (1985) reportan una concordancia de 99.4%, comparando la ELISA con la ID siendo esta última una técnica poco sensible.

Los sueros tanto positivos como negativos, reaccionaron a la proteína de cápside p25, en el WB esto es algo que ocurre en el caso de sueros de humanos negativos al VIH y donde un 15 % de los sueros dan reacciones inespecíficas contra la proteína de cápside p24 y no es indicativo de infección (Constantine et al., 1991; Serie OMS, 1992). En el VIH se mencionan que las reacciones no específicas puede deberse a reacciones de los anticuerpos hacia componentes celulares residuales de las células infectadas (Autoanticuerpos que reaccionan a epitopes de los cultivos celulares). La presencia de anticuerpos contra algunos agentes parásito como la malaria y a infecciones con un Retrovirus desconocido, pero relacionado (Constantine et al., 1991; Serie OMS, 1992). Además de lo anterior y por las diferencias de proteínas encontradas por varios autores (Tabla 2) es necesario que se establezca un criterio de positividad como el que se utiliza para otro lentivirus (VIH) (Tabla 9).

Tabla 9. Criterios para la interpretación de un WB positivo a VIH-1

ORGANIZACIÓN	CRITERIO
Asociación de Directores de Laboratorio de Salud Pública Locales y del Estado y el Centro de Control de Enfermedades (ASTPHLD/CDC)	Cualquiera de las dos: p24, gp41 o gp120/gp160
FDA	P24 y p31, gp41 o gp120/160
American Red Cross	Al menos 3 bandas, una de cada producto genético del grupo, gag, pol y env.
Consortio para la estandarización serológica de Retrovirus (CRSS)	Al menos 2 bandas: p24 o p31 y gp41 o gp120/160
Organización Mundial de la Salud (OMS)	Al menos dos bandas de env

Tomado de Constantine et al., 1991 y Serie OMS, 1992.

Basado en los criterios de interpretación para VIH y en los resultados obtenidos al evaluar 220 sueros por WB, se propone lo siguiente: 1-No se puede utilizar como criterio la p25 de gag por que presenta reacciones inespecíficas con sueros negativos. Aunque se mencione que esta proteína del gen gag es de las mas conservadas, pero no fue la más

específica para este trabajo. Los criterios de positividad marcados por ASTKLD/CDC, FDA, CRSS no podrían aplicarse para AEC por la reacción cruzada de p25, Además las proteínas de VIH mencionadas por estas organizaciones de las que su contraparte en AEC serían la p45, p32, gp160 su presentación no fue común en todos los sueros positivos o se presentaron con reacciones débiles. El criterio de la OMS junto con el que propone American Red Cross puede ser utilizado y adaptado para AEC; 2- las proteínas relevantes y que se consideraron como criterio de positividad para AEC son 2 proteínas codificadas por el gen gag (14,16), una proteína codificada por el gen rev (19) y 2 proteínas codificadas por el gen env (90,135) Estas proteínas se encontraron en todos los sueros considerados positivos.

Se concluye que se obtuvo mayor sensibilidad en las pruebas estandarizadas con VAEC aislado que con los Kits comerciales que utilizan VMV. Esta diferencia fue más evidente utilizando WB, con la que se obtuvo una mayor sensibilidad y especificidad detectando casi más de 100 animales, no detectados por ID que es la técnica considerada como de referencia para la enfermedad (Adams et al, 1984). El WB aunque se considera una técnica cara y poco accesible, no tendría ese inconveniente con la AEC por las características de la enfermedad y porque el control de la misma se centra en el sondeo serológico de los hatos. Si se estableciera una campaña contra la AEC utilizando el WB se podría asegurar hatos libres de la enfermedad, así como tener pie de cría no infectados principalmente sementales para venta a rebaños libres o para exportación. La ELISA estandarizada fue un poco más sensible que los estuches comercial y menos específica que estos comparada con WB. Definitivamente se debe descartar el uso de Kits comerciales, que además de ser poco sensibles tienen un alto costo.

Las pruebas de tamizado (Screening test) se utilizan para programas de detección precoz y determinación de incidencia de una enfermedad, trabajos de investigación y programas de acción y vigilancia epidemiológica. Cabe aclarar que las pruebas de tamizado generalmente no son diagnósticas, sólo orientan el diagnóstico; su sensibilidad y especificidad indican la alta probabilidad de que un sujeto con la enfermedad tenga una prueba positiva y que otro sin la enfermedad tenga una prueba negativa. Basado en lo anterior y por las características de la enfermedad de AEC lo recomendable es una prueba

sensible que posteriormente sea sometida a otros procedimientos diagnósticos que confirmen la presencia de la enfermedad y evitar así los falsos positivos (Kahl- Martín, 1990).

Por todo lo anterior se sugiere que se utilice una prueba tamiz como la ELISA denominada como 3 con una alta sensibilidad y posteriormente se confirme por una prueba altamente sensible y específica como el WB.

APENDICE I

DESARROLLO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN (caprine arthritis-encephalitis/ovine progressive pneumonia antibody test kit)

- Preparar una solución de agarosa al 1% en solución buffer salina fosfatada (PBS- Na_2HPO_4 1.17g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.22g y NaCl 8.50g disolviéndolo en un litro de agua destilada) ajustando el pH a 7.4.
- Adicionar 6.0 g de cloruro de sodio por cada 100 ml de PBS, agregando a la vez la agarosa y calentando lo suficiente hasta que el agar este completamente disuelto.
- Servir la solución de agarosa adicionando 6 ml en cajas de Petri de 60 x 15 mm. y esperar a que solidifique.
- Perforar los pozos con un sacabocados obteniendo un pozo central y 6 periféricos.
- Colocar en el pozo central 50 μl de antígeno del VMV que viene en el kit.
- Adicionar en tres pozos periféricos 50 μl de cada uno de los controles del kit (positivo, positivo débil y negativo).
- Poner en los tres pozos restantes 50 μl de cada suero problema a evaluar.
- Identificar adecuadamente las cajas de Petri e incubarlas en cámara húmeda a 4°C por una semana.
- Realizar lectura.

DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA COMERCIAL (CHEKIT®)

- Sacar los reactivos del estuche diagnóstico por lo menos media hora antes, para alcanzar la temperatura ambiente.
- Colocar 180 μl de la solución de dilución del Chekit® a cada pozo de la placa de 96 pozos. Adicionar 20 μl de los sueros testigos negativo y positivo, y sueros problema quedando a una dilución final de 1:10. Colocar los sueros por duplicado

- Cubrir la microplaca e incubar por 90 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Después de la incubación lavar la placa colocando 300 µl de la solución de dilución del Chekit® a cada pozo. Repetir este paso 2 veces, y secar el exceso en papel secante.
- Adicionar 200 µl del monoclonal antiIgG de conjugado con peroxidasa diluido 1:200, e incubar 90 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Lavar la microplaca como previamente se describió.
- Agregar 200 µl del cromógeno Chekit® a cada pozo e incubar en agitación por 5 a 30 minutos.
- Para detener la reacción adicionar 50 µl de solución de paro del Chekit®.
- Realizar la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492nm.
- La interpretación de resultados se realiza de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Valor} = \frac{\text{densidad óptica de la muestra} - \text{densidad óptica del negativo}}{\text{densidad óptica del positivo} - \text{densidad óptica del negativo}} \times 100$$

INTERPRETACIÓN	NEGATIVO	SOSPECHOSO	POSITIVO
VALOR	Menor a 30%	30 – 40 %	Mas de 40%

CULTIVO CELULAR

Aproximadamente cada dos semanas se realizó un pase celular teniendo el 100% de confluencia del monoestrato. Para esto se utilizó una solución de tripsina- verseno al 2% a una temperatura de 10° C y se adicionó directamente a la caja de cultivo sin medio, se dejó actuar un máximo de dos minutos, observándose directamente al microscopio para corroborar el desprendimiento total de las células. Una vez desprendidas las células estas se dividieron en partes iguales y se colocaron en 2 cajas de cultivo celular tipo Falcon, adicionándoles medio de cultivo Eagle Dulbecco con 10% de suero fetal bovino; De esta manera se obtuvo el abasto celular para mantener un stock de células infectadas para la producción de VAEC.

ELECTROFORESIS

- + Armar la cámara de electroforesis (poner una marca 1 cm abajo del peine).
- + Preparar las soluciones para el gel separador con los reactivos a temperatura ambiente.
- + Dejar polimerizar 30 minutos.
- + Colocar el gel concentrador.
- + Dejar polimerizar 45 minutos.
- + Enjuagar el gel con solución tampón de corrida 1x.
- + Colocar las muestras (20 μ l) y el marcador de peso preteñido (10 μ l).
- + Correr a 120 volts constantes y parar diez minutos después de que sale el colorante de las muestras.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD (MICROMÉTODO)

- * Preparar una solución de albúmina que contenga 1 mg/ml.
- * En tubos limpios realizar las siguientes diluciones para la curva estándar.

TUBO	μ l DE AGUA	μ l DE ALBÚMINA	CONCENTRACIÓN EN μ g/ μ l
1	450	50 DEL STOCK	100
2	400	100 DEL TUBO 1	20
3	200	200 DEL TUBO 2	10
4	100	100 DEL TUBO 3	5
5	80	20 DEL TUBO 4	1

* En una placa de 96 pozos de fondo plano pasar 40 μ l de cada concentración y agregar 160 μ l de reactivo de Bradford (diluir 1:5 el reactivo con agua y filtrarlo) a cada pozo. Realizar la curva por duplicado.

* Para los problemas hacer por duplicado; iniciar con una dilución 1:10 poniendo 40 μ l de agua y 4 μ l de proteína problema. Hacer diluciones 1.2 en la placa hasta 1:80 y

posteriormente colocar 160 μ l de reactivo de Bradford diluido y filtrado. Leer a 595 nm, hacer la curva y obtener r por regresión lineal. Interpolar las lecturas de los problemas y obtener la concentración en μ g/ml. de proteína.

APENDICE 2

Sacarosa 20%

20g de sacarosa en 100 ml de agua destilada (D).

Disolver y filtrar con una membrana de 0.45 μ m.

Almacenar a 4° C

Azul tripano

0.4g en 100 ml de PBS (0.4%)

Se filtra y se conserva a temperatura ambiente

PBS cultivo celular

NaCl 8g

KCl 0.2g

Na₂ HPO₄ 1.44g

KH₂ PO₄ 0.24g

Disolver todo en 800 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 7.4 con HCl

Aforar a un litro y esterilizar.

Reactivos de electroforesis

Gel separador (12%)

	1 GEL
Agua Destilada	3.35 ml
Tris -HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml
SDS stock 10%	100 μ l

Acrilamida-Bis (stock 30%)	4 ml
Desgasificar	15 minutos
Persulfato de amonio 10% (100 mg/ml.)	50 μ l
Temed	<u>5 μl</u>
Total	10ml

Gel concentrador (4%)	
Agua Destilada	1.5 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	.625 ml
SDS stock 10%	25 μ l
Acrilamida-Bis (stock 30%)	.325 ml
Desgasificar	15 minutos
Persulfato de amonio 10% (100 mg/ml.)	12.5 μ l
Temed	<u>2.5 μl</u>
Total	2.5 ml

Acrilamida/Bis (30%)

29.2g Acrilamida

0.8 grs Bis-acrilamida

Colocar en 100 ml de agua bidestilada, regular pH 7.0.

Guardar a 4° C en oscuridad por no más de 30 días.

Tris Base 1.5M pH 8.8

18.15g en 100 ml de agua bidestilada, guardar a 4° C.

Tris HCl 0.5 M pH 6.8

7.8g en 100 ml de agua bidestilada, guardar a 4° C.

SDS 10% pH 7.2

10 g en 100 ml de agua bidestilada, conservar a temperatura ambiente.

Buffer de corrida 5x pH 8.3

Tris base 15 g/litro

Glicina 72 g/litro

SDS 5 g/ litro

Agua bidestilada aforar a un litro, conservar a temperatura ambiente.

Usar a 1x

PBS 10X pH 7.0

Solución A $\text{Na}_2\text{H PO}_4$ 14.2 g (0.1 M)

NaCl 87.6 g (0.15 M)

Agua destilada aforar 1000 ml

Solución B $\text{Na H}_2 \text{ PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 13.8 g (0.1 M)

NaCl 87.6 g (0.15 M)

Agua destilada aforar a 1000 ml

100 ml de la solución A 10X se afora a 1000 ml con agua destilada y con la solución B se ajusta el pH a 7.0

Buffer de lavado

500 ml de PBS

1 ml de Tween 20 (0.2%)

Solución amortiguadora de bloqueo

Albúmina sérica bovina 3% en PBS.

Buffer de dilución

Albúmina sérica bovina 1% en PBS.

Revelador

0.015 g. de Diaminobencidina (0.05%)

15 μ l de peroxido de hidrogeno (H_2O_2) (0.05%)
en 30 ml de PBS.

Buffer de transferencia 10x pH 7.0

NaCl 29.22 g

EDTA 6.724g

Tris base 12.11 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada

Preparar 100 ml de buffer de transferencia en 900 ml de agua destilada.

Solución de lisis (100 ml.)

0.05 M Tris HCl pH 7.2 6.05 g

0.15 M NaCl 8.76 g

0.1% SDS

1% Triton X-100

Preparar la solución a 10x sin detergentes, adicionar los detergentes a la solución 1x

1% deoxycholate (DOC).

1mM PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride). Preparar un stock 1M de PMSF disuelto en DMSO (0.871g PMSF en 5 ml DMSO) y adicionar 100 μ l PMSF/10 ml de buffer RIPA.

Solución de muestra 2x

3.2 ml 0.5 M Tris HCl pH 6.8 (0.08 M)

4ml 10% SDS (2%)

2ml glycerol (10%)

0.308 g DTT (Dithiothreitol) (0.1 M)

Azul de bromofenol

Llevar a 10 ml con agua bidestilada

TNE pH 7.5

20 mM Tris-HCl 0.314 g

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1mM EDTA 37.2 mg
100 mM NaCl 384 mg
se afora a 100 ml con agua bidestilada.

Buffer de PCR 10X

(50 mM KCl, 10mM tris HCl (pH 8.3))
MgCl₂ 2.5mM Concentración final

5x TBE pH 8.0 (1x buffer de corrida)

Tris base 27.30 g 54.6 g
Ácido bórico 13.9 g 27.8 g
EDTA 1.86 g 3.7 g
H₂OUP llevar a 500 ml o a 1000 ml y ajustar el pH a 8.

Solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6

Na₂CO₃ 3.18 g
NaHCO₃ 5.86 g
H₂O cbp 1000 ml
Mantener a 4°C.

Solución amortiguadora de citratos

Solución A:

Ácido cítrico 21 g
H₂O 1000 ml

Solución B:

Citrato de sodio 29.11 g
H₂O 1000 ml

Las soluciones se sacan 30 minutos antes de su uso. Mantener a 4° C.

Sustrato para la prueba de ELISA

10 ml de buffer de Citrofosfatos (5 ml. de la solución A + 5 ml. de la solución B)

4 mg de OPD

4 μ l de H₂O₂ al 30 %

Sacar los reactivos del buffer una hora antes.

Solución H₂SO₄, 2N

H₂SO₄ 55.17 ml

H₂O 994.83 ml

BIBLIOGRAFIA

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

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.

Anderson PK, Cheevers WP. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology* 1981; 110: 113-119.

Archambault D, East N, Perk K, Dahlberg JE. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for caprine arthritis-encephalitis virus. *J clin microbiol* 1988; 26 (5): 971-975.

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.

Beyer JC, Chebloune Y, Mselli-Lakhal L, Hötzel I, Kumpula-McWhirter N, Cheevers WP. Immunization with plasmid DNA expressing the caprine arthritis-encephalitis virus envelope gene: quantitative and qualitative aspects of antibody response to viral surface glycoprotein. *Vaccine* 2001; 19: 1643-1651.

Bruett L, Barber SA, Clements JE. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology* 2000; 271: 132-141.

Chebloune Y, Sheffer D, Karr BM, Stephens E, Narayan O. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentivirus in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 1996; 222: 21-30.

Cheevers WP, Hötzel I, Beyer JC, Kumpula-McWhirter N. Immune response to caprine arthritis-encephalitis virus surface protein induced by coimmunization with recombinant vaccinia viruses expressing the caprine arthritis-encephalitis virus envelope gene and caprine interleukin-12. *Vaccine* 2000; 18: 2494-2503.

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.

Coffin JM. Genetic variation in retrovirus. In: Kurstak E, Marusyk RG, Murphy FA, Van RM, editors. Virus variability, epidemiology and control. Ed. *Plenum Medical Book Company* E.U. 1990: 11-33.

Constantine NT, Callahan JD, Watts DM. HIV testing & quality control. AIDSTECH, 1991.

Crawford TB, Adams DS, Cheveers WP, Cork LC. Chronic arthritis in goats caused by retrovirus. *Science* 1980a; 207 (29): 997-999.

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.

Daltabuit TM, Concha-Bermejillo A, Espinosa LEL, Rubio LE, Setién AA. Isolation of caprine arthritis encephalitis from gotas in México. *Can J Vet Res* 1999; 63:212-215.

Davies JM, Robinson WF, Carnegie PR. Antibody reactivity to the transmembrane protein of the caprine arthritis encephalitis virus correlates with severity of arthritis: no evidence for the involvement of epitope mimicry. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 60: 131-147.

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

Dolf G, Ruff G. A DNA fingerprinting band associated with the susceptibility to cae virus-induced arthritis in goats. *Br Vet J* 1994; 150 (4): 349-353.

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. The pathology and aetiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Aust Vet J* 1988a; 65 (3): 69-73.

Ellis TM, 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.

Ellis TM, Wilcox GE, Robinson WF. Antigenic variation of caprine arthritis-encephalitis virus during persistent infection of goats. *J Gen Virol* 1987; 68: 3145-3152.

Gogolewski RP, Adams DS, McGuire TC, Banks KL, Cheevers WP. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J Gen Virol* 1985; 66: 1233-1240.

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.

Guiguen F, Mselli-Lakhali L, Durand J, Du J, Favier C, Fornazero C, Grezel D, Balleydier S, Hausmann E, Chebloune Y. Experimental infection of mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 2000; 61(4): 456-461.

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.

Harmache A, Russo P, Guiguen F, Vitu C, Vignoni M, Bouyac M, Hieblot C, Pepin M, Vigne R, Suzan M. Requirement of caprine arthritis encephalitis virus vif gene for in vivo replication. *Virology* 1996; 224: 246-255.

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 y Cheevers WP. Sequence similarity between the envelope surface unit (SU) glycoproteins of primate and small ruminant lentiviruses. *Virus research* 2000; 69: 47-54

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.

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.

Kahl-Martín C. Fundamentos de epidemiología. Ed. *Díaz de Santos S.A.*, 1990.

Kalinski H, Yaniv A, Mashiah P, Miki T, Tronick SR, Gazit A. rev-like transcripts of caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 1991; 183: 786-782.

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 DPJr, Cheevers WP, Mc Guire TC, Brassfield AL, Harwood WG, Stem TA. Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *J Virol* 1991; 65 (11): 5744-5750.

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.

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.

Lennette EH, Smith TF, Dekker M. Laboratory diagnosis of viral infections. 3er ed. U.S.A: Inc. New York, 1999.

Leroux C, Chastang J, Greenland T, Mornex JF. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 1997; 142: 1125-1137.

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.

Matthews JG. Diseases of the goat. 2nd. Ed. Blackwell Science 1999.

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.

Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, Du J, favier C, Durand J, Grezel D, Balleydier S, Mornex JF, Chebloune Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology* 1999; 259: 67-73.

Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ. Veterinary virology, 3er edition. *Academic Press*, 1999.

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.

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.

Pasick J. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Can J Vet Res* 1998; 62: 241-244.

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

Pépin M, Vitu C, Russo P, Mornex J, Peterhans E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet. Res* 1998; 29: 341-347.

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.

Peterhans E, Zanoni R, Bertoni G. How to succeed as a virus: strategies for dealing with the immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 111-117.

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.

Ramírez AH. Utilización de células de membrana sinovial de feto caprino para la producción de antígeno del virus de Artritis Encefalitis Caprina en México (tesis licenciatura) México (Edo) México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1998.

Reddy PG, Sapp WJ, Heneine W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (11): 3042-3043.

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.

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. Risk factor for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Food Animal Retroviruses* 1997; 13 (1): 35-53.

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.

Saltarelli M, Querat G, Konings DAM, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 1990; 179: 347-364.

Saltarelli MJ, Schoborg R, Pavlakis GN, Clements JE. Identification of the caprine arthritis encephalitis virus Rev protein and its Cis-Acting Rev-Responsive Elements. *Virology* 1994; 199: 47-55.

Sánchez-Vizcaíno JM, Cambra AM. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Office International des Epizooties, Serie Técnica No. 7 1987.

Scharlie JV, Bradway DS, Besser TE, Evermann JF. Evaluation of a kinetic enzyme-linked immunosorbent assay for detection of caprine arthritis-encephalitis virus-specific antibodies. *J vet Diagn Invest.* 1994; 6:30-33.

Schroeder BA, Oliver RE, Cathcart. The development and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in gota sera. *NZ Vet J.* 1985; 33: 213-215.

Serie OMS sobre el sida. Normas de bioseguridad para laboratorios de diagnóstico e investigación que trabajan con el VIH. Ginebra, No 9, 1992.

Simard C, Kibenge MT, Singh P, Dixon P. Simple and rapid method for production of whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8 (2): 352-356.

Ternynch TH, Avrameas S. Técnicas inmunoenzimáticas: Detección de las proteínas de transferencia sobre nitrocelulosa. México: *Grupo Editorial Iberoamérica*, 1989.

Trapp RG, Saunders BD. Bioestadística medica. *Manual moderno*, 1993.

Travassos C, Benoit C, Valas S, da Silva A, Perrin G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum Res* 1999; 32: 101-106.

Travassos C, Benoit C, Valas S, da Silva A, Perrin G. Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. *Vet Res* 1998; 29: 579 – 584.

Trigo JF. La arthriti-encefaliti caprina. *Ciencia Veterinaria* 1991; 5: 49-66.

Turelli P, Guiguen F, Mornex JF, Vigne R, Querat G. dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *J Virol* 1997; 71 (6): 4522-4530.

Vitu C, Russo P, Vignoni M. Arthite – encéphalite caprine: Essai d'une préparation vaccinale adjuvée – II. Etude de la réponse anticorps. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1993; 16 (2): 137-144.

Vitu C, Russo P. L'arthrite-encéphalite enzootique caprine en France: Recherches épidémiologiques et expérimentales. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1988; 11(1): 27-34.

Zanoni R, Krieg A, Peterhans E. Detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis virus by protein g enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (3): 580-582.

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: 341-351.

Zanoni RG. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J Gen Virol* 1998; 79: 1951-1961.

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.