



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS CONTRA PROTEINAS  
DE LENTIVIRUS EN MACHOS OVINOS POR LAS TECNICAS  
DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)  
Y ELISA INDIRECTA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICA VETERINARIA ZOOCTENISTA**

P R E S E N T A :

ADELA PEREZ SANTIAGO

ASESORES: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ  
M.C. HUGO RAMIREZ ALVAREZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES - CUAUTITLAN



**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE  
 EXAMENES PROFESIONALES  
 ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Identificación de anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos ovinos por las técnicas de inmunoelectrotransferencia (western blot) y ELISA indirecta.

que presenta la pasante: Adela Pérez Santiago  
 con número de cuenta: 9406237-5 para obtener el título de:  
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Junio de 2005.

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| PRESIDENTE       | <u>M.Z. Susana Elvira García Vázquez</u>  |  |
| VOCAL            | <u>M.C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordáz</u>   |  |
| SECRETARIO       | <u>Dr. Humberto A. Martínez Rodríguez</u> |  |
| PRIMER SUPLENTE  | <u>M.Z. Joaquín Rivera Quiroz</u>         |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>M.C. Oscar Chávez Rivera</u>           |  |

*A LA MEMORIA DE MI PADRE YA MI MADRE:*

*Por haberme dado la vida y guiarme  
a través  
de ella con amor y paciencia.*

## AGRADECIMIENTOS

- *A Papi (Tomás †): porque me enseñó a luchar para alcanzar mis metas y a no rendirme ante las adversidades.*
- *A Mami (Natividad): por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.*
- *A mis Hermanas (Lidia, Ale y Vicky): por su amistad, cariño, ayuda y por ser las mejores hermanas.*
- *A mis Amigos: por haberme brindado su amistad, por todos los momentos compartidos, porque son una parte importante de mí.*
- *A mis Asesores: por su amistad, ayuda y estímulos para que lograra realizar este trabajo.*
- *A todos los seres que de alguna manera participaron conmigo para que lograra alcanzar este objetivo.*

G R A C I A S

## AFERRATE!

*Aférrate a la fe, porque es la fuente  
de la creencia de que todo es posible.  
Es la fibra y es la fortaleza de un alma  
confiada*

*Aférrate a la familia y a los amigos,  
porque son las personas más importantes  
en tu vida y porque hacen del mundo un  
lugar mejor. Ellos son la vida que ha  
crecido con el tiempo para ayudarte a  
seguir tu camino y permanecer siempre  
cerca de ti.*

*Aférrate a todo lo que eres y a todo lo  
que has aprendido, porque esto es lo que  
te convierte en un ser singular.  
No menosprecies lo que sientes y lo que  
crees que es bueno e importante,  
tu corazón te habla con más fuerza  
que tu mente*

*Aférrate a tus sueños, alcánzalos  
de manera diligente y honrada.  
No tomes nunca el camino fácil  
ni te rindas ante el engaño.*

## ÍNDICE DE TESIS

|  |    |
|--|----|
| 1. RESUMEN   | 1  |
| 2. INTRODUCCIÓN                                      | 2  |
| 2.1 ANTECEDENTES DE LAS ENFERMEDADES                 | 2  |
| 2.2 ETIOLOGÍA  | 2  |
| 2.3 PATOGENIA  | 5  |
| 2.4 CUADRO CLÍNICO                                   | 5  |
| 2.5 PATOLOGÍA  | 7  |
| 2.6 VÍAS DE TRANSMISIÓN                              | 8  |
| 2.7 INMUNIDAD  | 9  |
| 2.8 DIAGNÓSTICO                                      | 9  |
| 2.9 TRATAMIENTO                                      | 14 |
| 2.10 CONTROL Y PROFILAXIS                            | 15 |
| 3. JUSTIFICACIÓN                                     | 16 |
| 4. OBJETIVOS   | 17 |
| 5. HIPÓTESIS   | 17 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS                                | 18 |
| 6.1 MUESTREO SEROLÓGICO                              | 18 |
| 6.2 ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA) | 19 |
| 6.3 ORIGEN DEL VIRUS DE AEC UTILIZADO                | 20 |
| 6.4 REPLICACION DEL VIRUS EN CULTIVO CELULAR         | 20 |
| 6.5 ELECTROFORESIS                                   | 21 |
| 6.6 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)        | 21 |
| 7. RESULTADOS  | 22 |
| 8. DISCUSIÓN   | 27 |
| 9. CONCLUSIONES                                      | 30 |
| 10. APÉNDICE   | 31 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA                                     | 33 |

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## INDICE DE CUADROS

- CUADRO No. 1 Descripción de las proteínas reportadas del virus de artritis encefalitis caprina por diferentes autores. ....4
- CUADRO No. 2 Pruebas de diagnóstico utilizadas para LVPR. ....10
- CUADRO No. 3 Criterios para la interpretación de un wb positivo a VIH1.....13
- CUADRO No. 4 Diagnóstico diferencial de los LVPR .....14
- CUADRO No. 5 Raza de los animales muestreados .....18
- CUADRO No. 6 Sueros colectados de rebaños ovinos en .....18  
diferentes zonas del país.
- CUADRO No. 7 Proteínas identificadas del virus de AEC por inmunoelectrotransferencia. ....26



## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1 Sueros de borregos que reconocieron proteínas del virus de aec por wb .....   | 22 |
| Fig. 2 Sueros de borregos que reconocieron proteínas del virus de aec por wb.....  | 23 |
| Fig. 3 Sueros de borregos que reconocieron proteínas del virus de aec por wb.....  | 23 |
| Fig. 4 Sueros de borregos que reconocieron proteínas del virus de aec por wb.....  | 24 |
| Fig. 5 Sueros de borregos que reconocieron proteínas del virus de aec por wb.....  | 24 |
| Fig. 6 Reconocimiento de proteínas antigénicas de sueros de carneros considerados positivos a LVPR probados por Western Blot. ....   | 25 |
| Fig. 7 Reconocimiento de proteínas antigénicas de sueros de carneros considerados negativos a LVPR probados por Western Blot. ....   | 25 |
| Fig. 8 Reconocimiento de proteínas antigénicas de sueros de carneros considerados sospechosos a LVPR probados por Western Blot. .... | 26 |

## 1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue detectar anticuerpos contra *Lentivirus* de pequeños rumiantes (Maedi Visna (MV) y Artritis Encefalitis Caprina (AEC)) en machos adultos destinados a pie de cría de las razas hampshire, suffolk, rambouillet, columbia, tipo criollo, kathadi y pelibuey; mayores de un año de edad. Los 70 sueros utilizados en este trabajo fueron colectados en rebaños ubicados en diferentes estados de la república mexicana (Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Estado México y Zacatecas) cabe mencionar que ninguno de los animales muestreados presentaba signos clínicos sugestivos de enfermedad en el momento de tomar la muestra. El estado serológico de las muestras se determinó utilizando un kit comercial (CHEKIT Bommeli Switzerland) basado en la técnica de ELISA indirecta que utiliza virus completo de MV y detecta anticuerpos contra los virus de MV y AEC; posteriormente los sueros fueron evaluados por la prueba de inmunoelectrotransferencia o Western Blot (WB) utilizando un antígeno viral obtenido a partir de células de membrana sinovial de feto caprino infectadas con el virus de AEC. De los 70 sueros probados por ELISA indirecta se obtuvo un animal positivo y 1 sospechoso de la raza Hampshire originarios del estado de Hidalgo. En la prueba de Western Blot el resultado fue de 11 animales positivos originarios de los estados de Puebla, Hidalgo y el Estado de México, así como 11 sospechosos de los estados de Hidalgo y Puebla; en su mayoría son de raza Hampshire. Se recomienda utilizar la prueba de ELISA como prueba tamiz y corroborar el diagnóstico con la prueba de WB.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 ANTECEDENTES DE LAS ENFERMEDADES LENTIVIRALES DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES

El virus de Maedi-Visna (VMV) fue descubierto en Islandia a principios de los años 50's, aunque algunos signos de la enfermedad fueron descritos previamente en Sudáfrica (Pepin *et al.*, 1996). Este agente fue aislado por primera vez del sistema nervioso central de ovejas en 1960 (Feveriereiro *et al.*, 1999). En México país se realizó el primer estudio de seroprevalencia del VMV en 1983 a partir de muestras procedentes del Estado de México y el Distrito Federal, las cuales fueron probadas por inmunodifusión en el cual se encontraron lesiones en pulmón muy características de la infección por MV (Ramírez y Trigo, 1983).

Por otro lado, estudios de seroprevalencia realizados en ovinos de Norteamérica demuestran que el VMV se encuentra distribuido en toda la población ovina de este lugar; reportando seroprevalencias de hasta el 26% de 17,000 muestras de ovejas de 29 estados de la unión americana. El porcentaje de animales afectados aumenta con la edad desde 4% en animales menores de un año hasta 34% en individuos de 4 años ( Brodie *et al.*, 1998).

Otro lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) es el virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) el cual está distribuido mundialmente. Uno de los estudios más amplios realizado en Estados Unidos incluye muestras de suero de 3790 cabras de 28 estados, revelando una seroprevalencia del 31% al VAEC. Mientras que un estudio realizado en 1990 en 4701 cabras de Canadá estima una seroprevalencia de hasta el 50% (Pasick 1998 a). En México se presentaron evidencias preliminares del aislamiento e identificación del virus en cabras en 1986 (Álvarez, 1984; Gay *et al.*, 1986).

### 2.2 ETIOLOGÍA

Las enfermedades de AEC y MV son causadas por virus de la familia *Retroviridae* y del género *Lentivirus*. Este grupo incluye virus tales como los de la inmunodeficiencia humana, del simio, felina y bovina, así como el virus de la anemia infecciosa equina. Los *lentivirus* establecen infecciones persistentes, crónicas, de progresión lentas y fatales (Potterfield, 1989).

Estos virus muestran una morfología típica de Retrovirus. El virión completamente formado tiene un diámetro de 100 nanómetros (nm) y contiene un núcleo electro denso que mide de 30-40 nm aproximadamente (Thibier y Guerin, 2000).

Los lentivirus están compuestos por aproximadamente 60% de proteína, 35% lípidos, 3% carbohidratos y 1% de RNA (Petturson *et al.*, 1992). Los viriones

son envueltos con un diámetro aproximado de 80-130 nm. y tienen una única estructura tridimensional. El genoma se une en el interior y la nucleocápside, la cual incluye cerca de 30 moléculas de transcriptasa reversa con simetría helicoidal (Petturson *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1999; Clavijo y Thorsen, 1996).

El genoma de los retrovirus es único en varios aspectos:

- 1) Es el único diploide.
- 2) Es el único que presenta un ADN viral que es sintetizado por la maquinaria que procesa el ARN mensajero de la célula hospedadora.
- 3) Es el único con el ARN de transferencia específica que funciona como iniciador de la replicación.
- 4) Presenta un ARN de una sola cadena de sentido positivo que no funciona como ARN mensajero poco después de la infección.
- 5) Es el único virus ARN que codifica una transcriptasa reversa la cual por sí misma es única (Murphy, *et al.* 1999). Entre sus variadas funciones la transcriptasa reversa 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 (Petturson *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1999).

La parte central de los virus está conformada por el complejo núcleo-genoma-proteico, el cual está asociado a la transcriptasa reversa. Ésta estructura se encuentra encerrada en una cápside icosaédrica envuelta por una capa de la membrana plasmática de la célula huésped. El genoma es un dímero de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva; la transcriptasa reversa se encuentra dentro del DNA proviral y en algunas ocasiones puede estar asociada al DNA cromosomal. Contienen tres genes estructurales que codifican las proteínas del virus, éstos son *gag*, *pol* y *env*; así como tres genes auxiliares (*tat*, *vif* y *rev*) (Pepin *et al.*, 1996).

El genoma del VAEC es de aproximadamente 9.2 kilobases, igual que el del VMV por lo que basándose en la secuencia nucleotídica se han construido árboles filogenéticos en los que se ilustra la relación genética entre numerosos aislamientos de LVPR. En un estudio realizado en los LVPR se dividieron en cuatro grupos genéticos basados en su secuencia nucleotídica. Las cepas del VMV K1514 (aislada en Islandia) y SA-OMVV (aislada en Sudáfrica) , fueron colocadas en el grupo IV, ya que al compararse con la cepa VAEC Co se encontró un 74.8%, 77.5% y 60.0% de homología en las secuencias de aminoácidos de sus respectivas proteínas de *gag*, *pol* y *env* (Chebloune *et al.*, 1996; Pasick, 1998 a). La considerable homología que presentan los genes estructurales de los virus de ovinos y cabras explica la reactividad cruzada entre los dos virus, principalmente entre las proteínas p25 y gp135 en las pruebas de inmunodifusión y ELISA con virus completos (Petturson *et al.*, 1992). El VAEC presenta varias proteínas que van desde la p 14 hasta la p175, lo anterior ha sido descrito por diferentes autores que han realizado estudios con diversas técnicas de diagnóstico (Cuadro 1).

Tabla 1. 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<br>CAEV-Co     | Inmunoprecipitación     | 1985 | J.Gen.Virol. Gogolewski et al                     |
| 125, 90, 45, 28, 15                                      | -----<br>-            | 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            | 1988 | Comp.Immun. Microbiol. Infect. Dis. Vitu y Russo. |
| 135, 90, 46, 38, 28                                      | 75-G63                | Inmunoprecipitación     | 1993 | Virology. Hullinger et al                         |
| 170, 135, 55, 25   | 75-G63<br>CAEV-Co     | Inmunoprecipitación     | 1996 | Virology. Chebloune et al                         |

## 2.3 PATOGENIA

Los virus de AEC y MV son absorbidos por el intestino del recién nacido en las células de la línea monocito/macrófago. Los monocitos llevan el genoma viral pero no permiten una infección productiva antes de que migren a los tejidos y maduren a macrófagos. En los LVPR no se ha reportado replicación con altos títulos en nodos linfoides (Zink *et al.*, 1987; Zink y Narayan, 1989; Peterhans *et al.*, 1999).

Generalmente la estrategia de los LVPR parece consistir en bajos niveles de replicación, lo cual evita la estimulación del sistema inmune (Peterhans *et al.*, 1999). La capacidad de estos virus de causar diferentes cuadros clínicos puede ser por un sin número de razones como la variación de cepa, factores predisponentes adicionales o factores de respuesta del huésped (Ellis *et al.*, 1988)

Se han encontrado muchas células con transcripción viral en áreas inflamadas del sistema nervioso central, pulmones, articulaciones y glándula mamaria, de las cuales la mayoría fueron identificadas como macrófagos (Petturson *et al.*, 1992).

## 2.4 CUADRO CLÍNICO

Las infecciones que se presentan en pequeños rumiantes por el VMV y el VAEC se caracterizan por causar una infección persistente y progresiva de curso muy lento, que comienza en una forma subclínica y acaba con la degeneración de múltiples órganos, caquexia y muerte. El VMV y el VAEC se encuentran dentro de monocitos/macrófagos sistémicos, lo que puede propiciar su presencia en el semen de animales donadores; éstos pueden representar una amenaza para las hembras inseminadas (Thibier y Guerin, 2000). Estas enfermedades se encuentran a nivel mundial y son responsables de importantes pérdidas económicas en los rebaños afectados debido a los cuadros clínicos y a la disminución en la producción de leche asociada a la mastitis (Travassos *et al.*, 1999).

El periodo de incubación de ambas enfermedades es muy variable ya que puede ir desde algunos días hasta meses e incluso años. En el caso de la enfermedad de AEC se caracteriza principalmente por un cuadro artrítico y el MV por signos respiratorios (Petursson *et al.*, 1992).

Los signos clínicos en estas enfermedades inicialmente corresponden a inquietud y adelgazamiento crónico hasta emaciación, sin que los individuos presenten anorexia (Brodie *et al.*, 1998). En el caso particular de la AEC la

artritis se presenta fundamentalmente en cabras adultas como una sinovitis hiperplásica crónica, que habitualmente sólo se nota en las articulaciones del carpo y tarso. El comienzo puede ser insidioso o repentino, de forma unilateral o bilateral; algunos animales afectados pierden peso gradualmente y terminan por permanecer postrados la mayor parte del tiempo desarrollando úlceras en las articulaciones. En algunos casos se produce dilatación de las bolsas del atlas y supraespinosa (Petursson *et al.*, 1992).

En cabritos de 1 a 5 meses de edad infectados con el VAEC se observa principalmente leucoencefalomielitis, ésta se caracteriza por paresia o ataxia unilateral o bilateral posterior. En las fases iniciales la marcha es en pasos cortos, seguida de debilidad y postración. La afección encefálica se manifiesta por inclinación de la cabeza, torticolis y movimientos en círculos; puede haber ceguera y no se presenta fiebre. En los cabritos con paresia unilateral posterior ésta evoluciona a paresia bilateral en 5 a 10 días y puede llegar a propagarse a los miembros anteriores y producir tetraparesia; los cabritos que sobreviven a esta fase, muestran deficiencias neurológicas. Algunos cabritos pueden llegar a desarrollar neumonía por lo cual se presenta taquipnea y a la percusión se perciben sonidos mate en la cavidad torácica. Se puede presentar atrofia muscular en los miembros afectados, pudiendo llegar a desarrollar problemas artríticos similares a los que se presentan en adultos (Dinter y Morein 1990; Trigo, 1991; Petursson *et al.*, 1992).

En ambas enfermedades se puede observar la destrucción de la articulación y se han reportado cambios en la composición del líquido sinovial de los animales afectados con artritis subclínica. Las enfermedades en fase aguda por lo general son cortas y fatales cuando los signos son severos; pero se puede llegar a prolongar hasta por un mes (Trigo 1991; Angus *et al.*, 1994).

El VMV se caracteriza por causar cuadros respiratorios más que artríticos en los animales afectados; en las fases iniciales de la enfermedad no se hacen evidentes pero los animales muestran intolerancia al ejercicio y cuando el rebaño se traslada se quedan rezagados. Posteriormente se produce disnea y aumento de la frecuencia respiratoria, movimiento de los ollares así como respiración por la boca. No se encuentra exceso de líquido en pulmones, la frecuencia respiratoria en reposo aumenta hasta 80-120/minuto, puede observarse tos y cierta secreción nasal aunque en la mayoría de los casos ésta se produce en ovejas con neumonía bacteriana secundaria. El proceso clínico dura entre 3-10 meses y el curso de la enfermedad siempre es mortal (Pepin *et al.*, 1996).

La mastitis se presenta de manera insidiosa en ambas enfermedades y la ubre se observa aumentada de tamaño, simétrica y dura. Como resultado de todo esto hay una marcada disminución en la producción de leche (Brodie *et al.*, 1998).

## 2.5 PATOLOGIA

Los cambios artríticos causados por estas enfermedades se caracterizan por afectar principalmente las articulaciones del carpo y tarso, éstas se observan aumentadas de tamaño por engrosamiento del tejido subcutáneo, la cápsula articular se encuentra distendida y se observa un incremento en el flujo sinovial. Las articulaciones afectadas frecuentemente se observan edematizadas con necrosis y mineralización de la membrana sinovial. Hay una severa erosión del cartilago articular y del hueso subcondral, también se puede observar fibrosis del mismo y del tejido periarticular. En cortes histológicos se puede encontrar comúnmente hiperplasia con edema sinovial, hiperemia e infiltración linfocítica de células plasmáticas (Brodie *et al.*, 1998; Petursson *et al.*, 1992).

La forma pulmonar de estas enfermedades comúnmente se caracteriza por causar una neumonía intersticial, la cual está asociada generalmente a infecciones oportunistas y en la mayoría de los casos los animales no presentan fiebre ni anorexia (Brodie *et al.*, 1998). A la necropsia los pulmones son más pesados de lo normal y no se colapsan al removerlos; microscópicamente se observa engrosamiento del septo interalveolar con infiltración de mononucleares, hiperplasia de células del músculo liso y algunas fibrosis, los alvéolos se encuentran obliterados en algunos casos. En este tipo de neumonías los folículos peribronquiales y perivasculares con centros germinativos activos son una característica común (Petursson *et al.*, 1992).

La mastitis lentiviral se caracteriza por una 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 (Petursson *et al.*, 1992).

En el sistema nervioso central las lesiones consisten en cambios inflamatorios de células mononucleares más pronunciadas en espacios subependimales y perivasculares; en casos severos de necrosis se pueden observar nódulos gliales. Se presenta inflamación de diferentes grados en meninges, el plexo coroideo es lentamente afectado con formación de folículos linfoides con centros germinales. Hay destrucción de axones y desmielinización. En la médula espinal la lesión se encuentra alrededor del canal central, pero algunas veces las áreas de desmielinización se observan en segmentos (Petursson *et al.*, 1992).



## 2.6 VIAS DE TRANSMISIÓN

La transmisión del VMV y VAEC puede ocurrir de diferentes maneras: horizontal, vertical, transplacentaria y venérea (Rowe y East, 1997; Travassos et al, 1999).

**TRANSMISIÓN HORIZONTAL:** Puede llevarse a cabo por inhalación de secreciones respiratorias, las infecciones asociadas con otros virus o bacterias pueden contribuir a la aparición de MV en pulmón manifestándose en forma de exudado pulmonar. Este tipo de transmisión está estrechamente relacionado al confinamiento de los animales durante el invierno en países europeos; la duración de la presencia del virus en el rebaño y la adquisición de reemplazos (Pepin *et al.*, 1990). En la infección de AEC es posible la transmisión por contacto directo con adultos infectados, exposición a secreciones como saliva, heces secreciones urogenitales o del aparato respiratorio que contaminen el alimento o agua; aerosoles, equipos, agujas contaminadas con sangre, lesiones cutáneas y tatuajes; siendo esto más probable en poblaciones con alta densidad, estrés e inmunosupresión (Rowe et al, 1992; Smith y Sherman, 1994).

a) **Transmisión venerea:** El virus está presente en todos los fluidos corporales, por lo tanto pueden darse casos de transmisión venérea, esto ha sido documentado en donde la presencia de *Brucella ovis* (epididimitis) y leucocitospermia puede aumentar el riesgo de diseminación e implica reconsiderar al macho en la epidemiología y control de la enfermedad (De la Concha *et al.*, 1996)

Las conductas en el apareamiento son una fuente importante de infección como el lamido del ojo, olfateo y consumo de orina del macho, así como del mordisqueo y succionamiento de los pezones (Petturson *et al.*, 1992).

Otra posible vía de infección es el contacto con loquios postparto de hembras infectadas debido a que se han detectado células infectadas con el virus de AEC utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(Rowe y East, 1997).

**TRANSMISIÓN VERTICAL:** En los rebaños infectados de manera endémica, las células infectadas y no infectadas pasan de la madre a su descendencia vía calostro y leche; la mayor permeabilidad del intestino del recién nacido favorece este tipo de transmisión; además de la mastitis que facilita el reclutamiento de células mononucleares infectadas en la glándula mamaria (Dinter y Morein, 1990; Pepin *et al.*, 1996).

a) **Transmisión trasplacentaria:** En el caso de la AEC no existen datos que indiquen esta vía como probable ruta de infección; sin embargo, en MV es posible este tipo de transmisión aunque en muy raras ocasiones y no ha sido confirmado mediante una evidencia epidemiológica (Pepin *et al.*, 1996).

## 2.7 INMUNIDAD

Los lentivirus de pequeños rumiantes establecen una infección persistente en sus hospedadores. La estrategia que ellos utilizan para permanecer en sus huéspedes parece diferir significativamente de las que utilizan los lentivirus de primates. Quizás el fracaso de los LVPR para infectar linfocitos T CD4 puede ser la razón por la cual no se observa inmunosupresión en AEC y MV. Las principales células huésped de éstos virus son las células de la línea monocito-macrófago. Los monocitos pueden llevar el genoma viral, pero no permiten la infección productiva antes de que estos maduren a macrófagos y migren a los tejidos. Por esta razón los monocitos han sido llamados “caballos de Troya” ya que juegan el papel de transportar a los virus y no permitir que éstos sean detectados por el sistema inmune del hospedero. Este tipo de infección restrictiva de monocitos y la necesidad de infectar células T CD4 puede explicar la baja cantidad de virus en la sangre periférica, en contraste con el VIH en el cual la carga es mucho mayor. No se han reportado para los LVPR altos títulos de replicación en linfonodos a diferencia de lo que ocurre en VIH. En particular para el virus de AEC, dos terceras partes de los animales infectados desarrollan artritis sin que esto signifique que éstos son capaces de transmitir de manera más eficaz la enfermedad que los animales infectados de forma asintomática (Peterhans *et al.*, 1999).

## 2.8 DIAGNÓSTICO

- **DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

El diagnóstico para ambas enfermedades mediante los signos clínicos no es lo suficientemente específico, se debe intentar su confirmación mediante técnicas de laboratorio como pueden ser inmunodifusión en agar gel (IDAG), sueroneutralización, ELISA , Western Blot y PCR (Martin, 1998). (Cuadro No. 2)

Cuadro No. 2 Pruebas de diagnóstico utilizadas para LVPR

| PRUEBA                                    | DETERMINACIÓN   |
|---|---|
| Microscopía electrónica                   | Morfología e identificación viral   |
| Inmunodifusión                            | Detección de anticuerpos contra la GP 135 y la P 28   |
| Exámen del líquido sinovial               | Detección de monocitosis y linfocitosis   |
| ELISA                                     | Detección de anticuerpos  |
| Radioinmunoensayo                         | Detección de antígenos GP 135 y p28 utilizando anticuerpos marcados con yodo.                                   |
| Inmunoelctrotransferencia WB              | Detección de anticuerpos contra la todas las proteínas del virus.   |
| Transcriptasa inversa                     | Detección de antígeno a través de la actividad de la transcriptasa inversa del virus                            |
| Hibridación In Situ                       | Detección de ADN o ARN viral por medio de una sonda marcada radiactivamente o con un compuesto fluorescente.    |
| Inmunoperoxidasa                          | Detección de antígeno viral en cultivo celular y/o tejidos  |
| Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | Detección del ácido nucléico del virus.   |
| Cultivo celular                           | Detección del virus por efecto citopático, inmunofluorescencia, microscopía electrónica, transcriptasa inversa. |

Ref: Stites y Hugh, 1983 ; Coll, 1993; Storset et al, 1996 ; Pépin et al, 1996; Sanna et al, 1999 y Bruett et al, 2000.

#### PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN EN AGAR GEL (IDAG)

Es la técnica más utilizada, en particular en los exámenes médicos de grupo o hato. Se basa en una difusión pasiva a través del agar permitiendo la unión del antígeno y del anticuerpo en una zona de equivalencia observándose una línea de precipitación (Stites y Hugh, 1983).

Esta prueba detecta primariamente anticuerpos anti GP 135 y P 28. La similitud antigénica del virus de la AEC y del VMV posibilita el uso de antígeno de éste último en los kits de diagnóstico para ambas enfermedades; no obstante la sensibilidad de la prueba utilizando antígeno de AEC es 35% mayor que con el uso de antígeno de MV. Esta prueba es poco costosa, fácil de realizar y es menos sensible que la técnica de ELISA (Stites y Hugh, 1983; Heckerts *et al.*, 1992; Knowles *et al.*, 1994).

## PRUEBA DE ELISA

Las pruebas inmunoenzimáticas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)) presentan las características de una alta sensibilidad, especificidad, rapidez, automatizable y económica; con las cuales se pueden hacer estudios de grandes poblaciones en un corto plazo, además de ser sencilla y no precisa de instalaciones costosas. 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 (Coll, 1993).

Uno de los componentes se encuentra insolubilizado sobre un soporte debido a lo cual el complejo antígeno-anticuerpo queda inmovilizado y por lo tanto es revelado fácilmente mediante la adición de un sustrato específico que reacciona con la enzima y produce un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro (Coll, 1993).

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta prueba ha sido evaluada a partir de células mononucleares extraídas de leche y sangre, detectando en estas últimas la presencia de provirus de AEC; para lo cual requiere de la presencia de por lo menos el ADN de 15,000 células; con una sensibilidad y especificidad de 97% (Rimstad *et al.*, 1993). Los lentivirus han sido buenos candidatos a ser diagnosticados por esta técnica, principalmente en animales sin seroconversión y seronegativos o con serología indeterminada (Clavijo y Thorsen, 1996).

Es una prueba que provee un método sensible y específico para la detección de ácidos nucleicos virales (Clavijo y Thorsen, 1996).

## HIBRIDIZACIÓN *in situ*

La hibridización *in situ* es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN o estudiar la expresión de una proteína en una célula. Consiste en marcar una sonda que va a detectar la molécula de interés con una sustancia trazadora ya sea radiactiva o fluorescente. La sonda es incubada con la célula para luego ser detectada y visualizada al microscopio. De esta manera se puede observar el sitio en particular de la célula donde se localiza esta secuencia o se expresa esa proteína de interés. Esta es una técnica realmente útil para mapear genes en los cromosomas y para estudiar la expresión de los mismos (Storset *et al.*, 1996 ; Sanna *et al.*, 1999).

### PRUEBA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WB):

La electroforesis es el estudio de la migración de los iones las partículas coloidales cargadas cuando están bajo la acción de un campo eléctrico a una mezcla de proteínas en solución ocasiona la migración de las diferentes proteínas hacia uno de los electrodos a velocidades variables dependiendo de sus propias características; por lo que se separan gradualmente en bandas o zonas que contienen moléculas con idéntica velocidad de migración, estas bandas se distribuyen con el tiempo a lo largo de un canal o tubo. Es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y un tamizado molecular a través de un gel de corrida, varían los diámetros de los poros y el tamaño dependerá de las concentraciones relativas de ambos reactivos durante la polimerización(Ramírez, 2002).

La electroforesis en gel de poliacrilamida puede efectuarse en tubo individual para cada muestra o en placa para correrse en forma simultánea en una sola de ellas, varias muestras. Este procedimiento resulta útil para separar proteínas de una mezcla; si bien las cantidades recuperadas son pequeñas muchas veces son suficientes para el análisis de algunas de sus propiedades o para usarlas como inmunógenos. En esta técnica se puede utilizar solución buffer que contiene sustancias disociantes, en especial detergentes iónicos. Uno de los más usados es el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) que permite por comparación de sustancias de peso molecular conocido que han sido corridos simultáneamente, determinar el peso molecular relativo de los productos de análisis, se utiliza en forma rutinaria con tal finalidad y para ello sólo son necesarios pequeñas cantidades de muestra(Ramírez, 2002).

La técnica de Western Blot ha sido utilizada para analizar la cantidad de anticuerpos que responden a cada una de las principales proteínas de los virus de pequeños rumiantes (Pepin *et al.*, 1996). Este es un método cualitativo para la detección de anticuerpos contra LVPR en muestras de suero o plasma de individuos potencialmente infectados. La presencia de anticuerpos frente a las proteínas de los virus demuestra que existió una exposición previa a dicho virus y sugiere la posible infección en el individuo examinado. Un resultado negativo de la prueba no excluye la posibilidad de la exposición o de la infección con el virus (Coll, 1993).

Los criterios de interpretación del WB para el diagnóstico de lentivirus humanos se observan en la Cuadro No. 3.

**Cuadro 3.** Criterios para la interpretación de un WB positivo al 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  |

Ref: Constantine *et al.*, 1991 y Serie OMS, 1992

El WB es un método que consiste en transferir las proteínas separadas de los virus por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS a una hoja de nitrocelulosa; seguido de la detección de las proteínas por métodos inmunoenzimáticos (Coll, 1993). Los resultados obtenidos dependen de la composición del antígeno utilizado y de la naturaleza imprevisible de la respuesta por anticuerpos humorales en cada animal (Bruett *et al.*, 2000).

- **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Las enfermedades causadas por los LVPR deben diferenciarse de una gran variedad de enfermedades debido a los diferentes cuadros clínicos que presentan. Cuadro 4.

Cuadro No.4 Diagnóstico diferencial de los LVPR

| SIGNO                  | MAEDI VISNA   | ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA  |
|------------------------|---|---|
| Adelgazamiento crónico |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad de Johne</li> <li>• Linfadenitis caseosa</li> </ul>   |
| Sistema nervioso       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Scrapie</li> <li>• Listeriosis</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Traumatismos en columna vertebral</li> <li>• Abscesos en vértebras</li> <li>• Listeriosis</li> <li>• Toxoplasmosis</li> <li>• Enterotoxemia</li> <li>• Poliencfalomalacia</li> <li>• Deficiencia de Cobre</li> </ul>           |
| Aparato locomotor      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Artritis nutricionales</li> <li>• Artritis traumáticas</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Artritis bacteriana por <i>Corynebacterium</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Erisipelothrix</i>, <i>Brucella</i>, <i>Mycoplasma</i>, <i>Clamidas</i>.</li> <li>• Artritis nutricionales</li> <li>• Artritis traumáticas</li> </ul> |
| Aparato respiratorio   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenomatosis pulmonar ovina</li> <li>• Neumonía verminosa</li> <li>• Neumonía crónica purulenta</li> <li>• Linfadenitis caseosa</li> <li>• Neumonía por inmersión</li> <li>• Neumonía enzoótica</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neumonía por otros virus, bacterias, parásitos y micoplasmas.</li> </ul>   |

Ref: Rowe *et al.*, 1992; Smith y Sherman, 1994; Pépin *et al.*, 1996 ; Brodie *et al.*, 1998; Martin, 1998.

## 2.9 TRATAMIENTO

En la actualidad no existe tratamiento para ninguna de estas enfermedades de lentivirus. Se pueden utilizar antibióticos para evitar la proliferación de bacterias oportunistas y analgésicos antiinflamatorios no esteroideos como la meglumina de flunixin y el carprofen para contrarrestar el dolor causado por la artritis(Matthews, 2002).

## 2.10 CONTROL Y PROFILAXIS

Hasta el momento no existe una vacuna que proteja contra la infección por estos virus (Petturson *et al.*, 1992; Vitu *et al.*, 1988). En los rebaños donde existe morbilidad la mejor recomendación es eliminar a los animales infectados paulatinamente e iniciar un rebaño libre de AEC y MV. Esto puede lograrse de la siguiente manera:

- Realizar pruebas rutinariamente en intervalos de 6-12 meses durante por lo menos 5 años; eliminando a los animales positivos.
- Separar a los recién nacidos de la madre, teniendo cuidado de no permitir el contacto con leche o calostro de ésta si se encuentra infectada.
- Proporcionar a los recién nacidos calostro previamente calentado a 56°C por una hora o de hembras de las cuales se tiene la certeza de que son negativas.
- Proporcionar sustitutos de leche o leche de hembras libres del virus o en su defecto leche pasteurizada de la misma especie o de vaca.
- La leche de otros rebaños no debe ser utilizada en ninguna circunstancia.
- Todos los animales deben probarse antes de entrar al rebaño.
- Evitar prácticas de manejo que permitan la transferencia de fluidos y sangre en los animales.

Para los animales adultos se recomienda lo siguiente:

- En el caso de las cabras organizar la ordeña para pasar primero a los animales negativos antes que los positivos.
- Seleccionar o aislar a todos los reactores.
- Los animales infectados deberán ser separados de los no infectados por lo menos 1.8 m.
- Aislar a la prole de hembras infectadas.
- La importación de animales y de semen debe ser controlada mediante la evaluación serológica de éstos.
- Utilizar la inseminación artificial con semen de machos serológicamente negativos.

Ref: Alvarez, 1984; Russo 1984; Pétturson *et al.*, 1992; Rowe y East, 1997.



### 3. JUSTIFICACIÓN

El manejo reproductivo en los rebaños ovinos es de suma importancia para que se considere una actividad rentable y la participación que tiene el macho es de gran relevancia para lograr esta meta. El número de ovejas que un macho sirve durante una temporada depende de su edad, vigor y método de manejo. De tal forma que la proporción macho: hembra pudiera ser en un rango de 1:40-50 (Marai y Owen, 1994). Esta proporción permite hacer notar la importancia del macho en los rebaños, no solo desde el punto de vista reproductivo, si no como posible transmisor de enfermedades de importancia económica. En el caso de los LVPR la forma de transmisión venérea se ha comprobado en borregos (De la Concha et al; 1996) y cabras (Travassos *et al.*, 1999). Por lo que se considera que evaluar el estado serológico de los sementales permitirá identificar la posible presencia de los LVPR en los rebaños nacionales y de esta forma sugerir medidas de control adecuadas para la compra y venta de animales destinados para pie de cría o realizar monitoreos serológicos en rebaños que pudieran estar infectados por el uso de un semental seropositivo a los LVPR.

#### 4. OBJETIVOS

##### OBJETIVO GENERAL:

- Detectar anticuerpos contra LVPR en machos ovinos por medio de las técnicas de ELISA e inmunoelectrotransferencia

##### OBJETIVO PARTICULAR:

- Identificar animales seropositivos a LVPR utilizando la técnica de ELISA indirecta.
- Identificar animales seropositivos a LVPR utilizando la técnica de inmunoelectrotransferencia ( WB)

#### 5. HIPÓTESIS

- Los machos ovinos destinados a pie de cría de diferentes explotaciones de ovinos pueden ser seropositivos a LVPR.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 MUESTREO SEROLÓGICO

Se visitaron explotaciones de ovinos ubicadas en diferentes estados del país, con la finalidad obtener muestras sanguíneas de carneros mayores de un año de edad destinados a pie de cría de diversas razas (Cuadro No. 5); de los cuales se extrajo sangre de la vena yugular con tubos vacutainer; la muestra obtenida fue centrifugada a 3000 rpm. y posteriormente se separó el suero y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente ser evaluado por prueba de Western blot y de ELISA indirecta. Los estados de procedencia de los sueros se muestran en el Cuadro 6.

**Cuadro No.5 Razas de los animales muestreados**

| Raza         | No. De Animales |
|--------------|-----------------|
| Hampshire    | 24              |
| Sufolk       | 2               |
| Rambouillet  | 7               |
| Columbia     | 8               |
| Tipo Criollo | 15              |
| Kathadi      | 10              |
| Pelibuey     | 4               |
| TOTAL        | 70              |

**Tabla No. 6 Sueros colectados de rebaños ovinos en diferentes zonas del país**

| ESTADO           | No. DE SUEROS |
|------------------|---------------|
| Puebla           | 5             |
| Tlaxcala         | 13            |
| Hidalgo          | 14            |
| Estado de México | 30            |
| Zacatecas        | 8             |
| TOTAL            | 70            |

## 6.2 TÉCNICA DE ELISA

Para llevar a cabo la evaluación inmunoenzimática (ELISA) se utilizó un kit comercial (Chekit hoesch rousset vet.) que detecta anticuerpos al virus de maedi visna y de artritis encefalitis caprina en suero. La técnica se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, las cuales se describen a continuación:

### *OPERACIONES PRELIMINARES:*

- El número de microplacas a utilizar se pusieron a temperatura ambiente.
- Se prepararon las soluciones de dilución y de lavado llevándolas a concentración de 1x con ayuda de agua destilada (9 volúmenes de agua por 1 volumen del reactivo).

### *DILUCIÓN E INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS Y LOS CONTROLES:*

#### Distribución de las muestras de suero:

- Se distribuyeron 180  $\mu$ l de la solución de dilución en cada pocillo, agregándoles 20  $\mu$ l de suero problema a cada uno y 20  $\mu$ l de cada control en los destinados para este efecto, para obtener una dilución final de 1:10.
- Se agitaron las placas para homogeneizar las muestras.
- Se cubrieron las microplacas dejándolas incubar durante 90 min., en cámara húmeda a temperatura ambiente (18-30°C).

#### *DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS EN LA MICROPLACA:*

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|   | - | + | - | + | - | + | - | + | - | +  | -  | +  |
| A | N | N | N | N | 7 | 7 | 7 | 7 |   |    |    |    |
| B | P | P | P | P | 8 | 8 | 8 | 8 |   |    |    |    |
| C | 1 | 1 | 1 | 1 | 9 | 9 | 9 | 9 |   |    |    |    |
| D | 2 | 2 | 2 | 2 | E | T | C |   |   |    |    |    |
| E | 3 | 3 | 3 | 3 | E | T | C |   |   |    |    |    |
| F | 4 | 4 | 4 | 4 | E | T | C |   |   |    |    |    |
| G | 5 | 5 | 5 | 5 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H | 6 | 6 | 6 | 6 |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

N= negativo

P= positivo

1,2,3,...= suero problema

#### *LAVADO DE LA MICROPLACA:*

- Después de la incubación fueron decantadas las microplacas y se adicionó a cada pocillo 300  $\mu\text{l}$  con solución de lavado, esta operación se llevó a cabo tres veces.

#### *DILUCIÓN, DISTRIBUCIÓN E INCUBACIÓN DEL CONJUGADO MARCADO CON PEROXIDASA.*

- Se diluyó 1:200 el conjugado anti IgG de rumiantes monoclonal con la solución de dilución.
- Se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  en cada pocillo.
- La microplaca fue cubierta e incubada en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 min.

#### *LAVADO DE LA MICROPLACA:*

- La microplaca fue lavada como se mencionó anteriormente.

#### *DISTRIBUCIÓN DEL CROMÓGENO:*

- Se distribuyeron 100  $\mu\text{l}$  en cada pocillo de la solución cromógena llevada a una temperatura entre 20-25° C durante una hora. La solución cromógena se calentó en un baño maría a 25° C durante 20 min.
- La microplaca fue cubierta e incubada a temperatura ambiente.

#### *Lectura de resultados:*

- Antes de medir la microplaca se agitó para homogenizar la coloración, midiéndose en espectrofotómetro a 492 nm de longitud, cuando la diferencia entre los dos controles fue  $\geq 0.3$  se detuvo la acción agregando 50  $\mu\text{l}$  de solución de paro a cada pocillo a temperatura ambiente y se hizo en el mismo orden en que se agregó el cromógeno.

### **6.3 ORIGEN DEL VIRUS DE AEC UTILIZADO**

El virus utilizado para la realización de la inmunoelectrotransferencia fue aislado a partir de sangre periférica de cabras infectadas diagnosticadas clínica y serológicamente (Ramírez, 2002).

### **6.4 REPLICACIÓN DEL VIRUS EN CULTIVO CELULAR**

El virus de AEC fue inoculado en células de membrana sinovial y después de siete días el sobrenadante fue cosechado y clarificado por centrifugación a 3000 rpm/20 min.; en seguida se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y posteriormente se colocó sobre un colchón de sacarosa al 20%, centrifugándose a 51 000 g/2 h (Ramírez, 2002).

## 6.5 ELECTROFORESIS

La pastilla viral obtenida después del proceso de purificación se resuspendió en 100  $\mu$ l de solución de lisis (apéndice). Para separar las proteínas virales se utilizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y se corrió a 130 volts constantes siguiendo la metodología convencional (Constantine *et al.*, 1991).

## 6.6 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

Los geles fueron lavados en buffer de transferencia (apéndice) y enseguida se realizó la transferencia pasiva, preparándose un “sándwich” donde se colocó cada componente en el siguiente orden: Una hoja de papel aluminio, una película autoadherente (envoltura 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 citados en orden inverso (hoja de nitrocelulosa, tres hojas de papel blotting y cristal) envolviendo el paquete en kleen pack y en papel aluminio. Se colocó sobre el sándwich un peso de 10 kg y se transfirió a temperatura ambiente durante tres días (Ramírez, 2002).

Los sueros de carnero fueron evaluados de la siguiente manera:

Después de transferidas las proteínas a nitrocelulosas éstas se bloquearon en PBS más albúmina al 3% (apéndice) por 1 hora a 37°C, al finalizar la incubación se lavaron tres veces en agitación durante 5 minutos en buffer de lavado (apéndice); enseguida se colocó el primer anticuerpo (suero de carnero) diluido 1:100 en buffer de dilución (apéndice) incubado por 1 hora a 37 °C y al finalizar la incubación se realizaron lavados como anteriormente se mencionó. Posteriormente se adicionó el conjugado diluido 1:1000 (anti IgG de rumiante peroxidado) en buffer de dilución incubándose por 1 hora a 37 °C y al final se realizaron los lavados. Finalmente se reveló con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno al 0.5% (apéndice). Se utilizaron como controles un suero de cabra seropositiva y uno de cabra seronegativa, previamente evaluados por western blot (Ramírez, 2002).

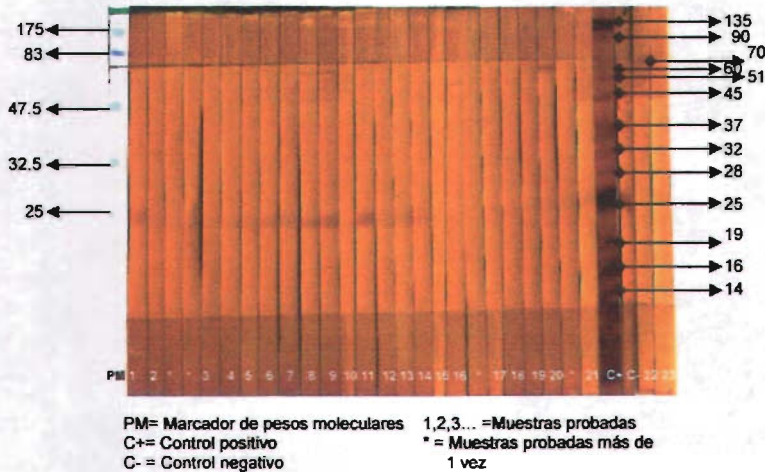
## 7. RESULTADOS

El muestreo para la obtención de sueros de machos ovinos se realizó de forma aleatoria, en los cuales se incluyeron animales de diversos ranchos ubicados en diferentes localidades de 5 estados de la República Mexicana y que a su vez incluyeron 7 razas distintas (Cuadro 4 y 5).

De los 70 sueros evaluados por la técnica de ELISA, se obtuvo un animal positivo y otro sospechoso; ambos sueros provenían del estado de Hidalgo y los animales fueron de raza Hampshire.

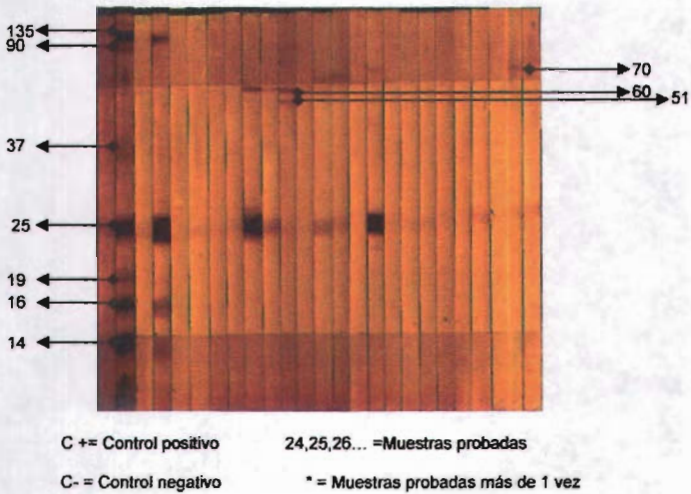
En el caso de la técnica de WB se consideraron positivos los sueros que por lo menos presentaron dos bandas de diferente origen genético. Todos los sueros considerados positivos reconocieron la proteína 135 y algunos las proteínas 45 y 90 las cuales son codificadas por el gen env, además reconocieron las proteínas 14, 16 y 70 codificadas por el gen gag ó 19 codificada por el gen rev (Figura 1-6).

**Fig. 1 SUEROS DE MACHOS OVINOS QUE RECONOCIERON PROTEÍNAS DEL VIRUS DE AEC POR WB**



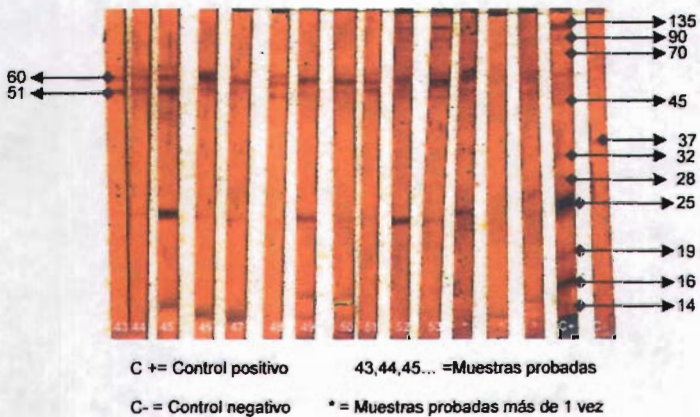
En esta figura se observa la presencia de la proteína p25 en la mayor parte de las tiras, la presencia de otras proteínas es mínima. El control positivo usado fue un suero tomado de una cabra positiva a el virus de AEC por serología, cuadro clínico y aislamiento.

**Fig. 2 SUEROS DE MACHOS OVINOS QUE RECONOCIERON  
PROTEÍNAS DEL VIRUS DE AEC POR WB**



En la presente figura existe una fuerte reacción por parte de los sueros 27 y 33 a la proteína p25. En la tira 28 se observa la presencia de las proteínas 60 y 51 que son de origen celular sin importancia diagnóstica.

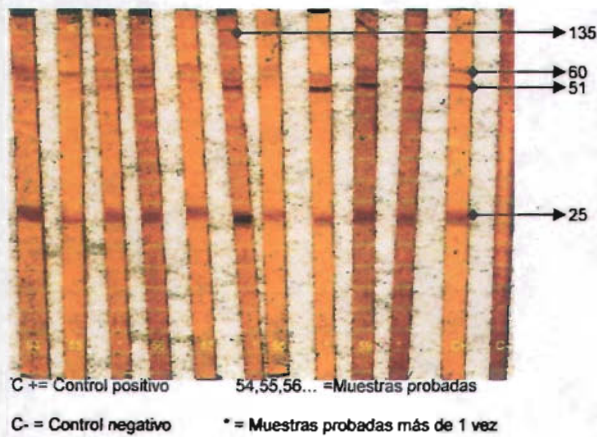
**Fig. 3 SUEROS DE MACHOS OVINOS QUE RECONOCIERON  
PROTEÍNAS DEL VIRUS DE AEC POR WB**



En estas tiras son visibles una mayor cantidad de proteínas utilizadas para el criterio de interpretación del WB como lo son p14, p70, p90 y p135.

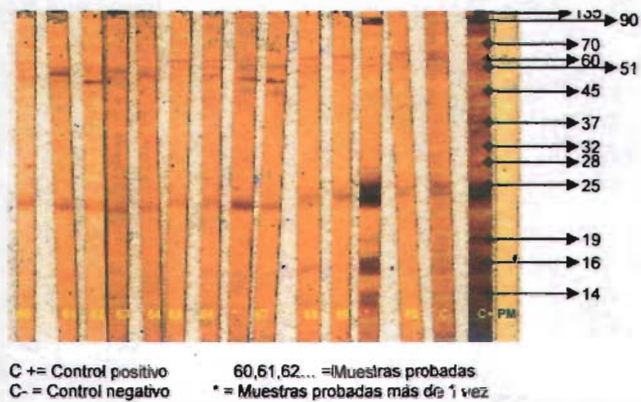


**Fig. 4 SUEROS DE MACHOS OVINOS QUE RECONOCIERON PROTEÍNAS DEL VIRUS DE AEC POR WB**



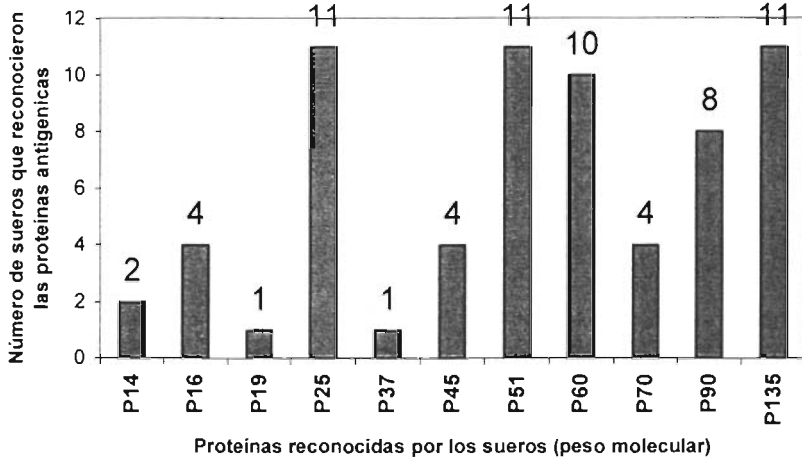
Esta figura se muestra principalmente el reconocimiento a las proteínas de origen celular p51 y p60 así como la reacción a p25.

**Fig. 5 SUEROS DE MACHOS OVINOS QUE RECONOCIERON PROTEÍNAS DEL VIRUS DE AEC POR WB**

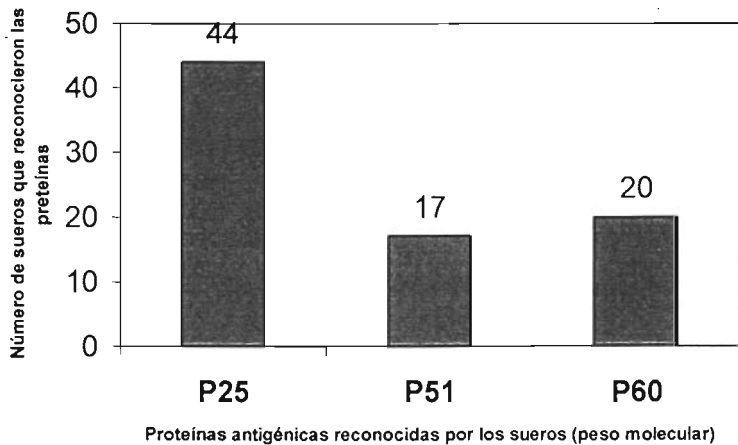


Se muestra en estas tiras la presencia de una mayor cantidad de proteínas, además de la p25 que fue reconocida por la mayoría de los sueros.

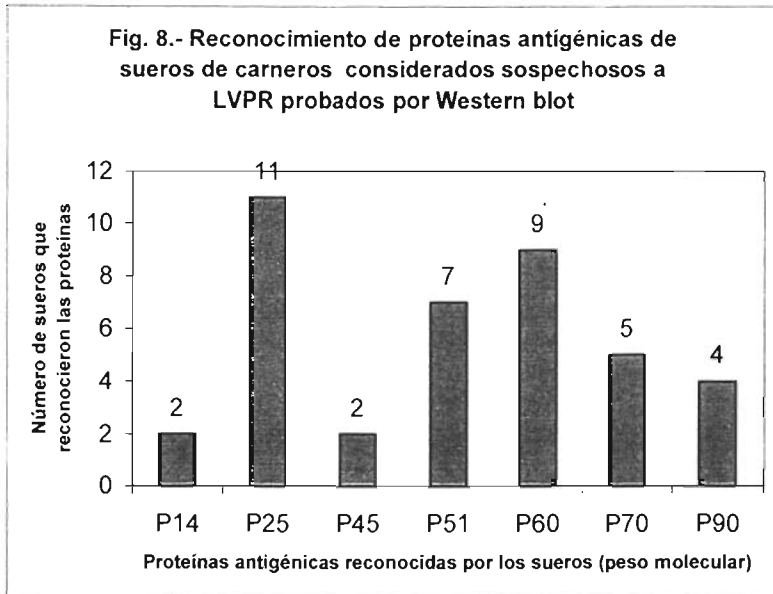
**Fig 6.- Reconocimiento de proteínas antigénicas de sueros de carneros considerados positivos a LVPR probados por Western blot**



**Fig. 7.-Reconocimiento de proteínas antigénicas de sueros de carneros considerados negativos a LVPR probados por Western blot**



Los sueros que resultaron negativos presentaron en su mayoría las proteínas de origen celular, además de la p25 la cual se observa en la mayor parte de las tiras.



Los sueros considerados sospechosos solo reconocieron una proteína codificada por alguno de los genes, así como la p25 y las proteínas de origen celular.

**Cuadro No. 7** Proteínas del virus de AEC reconocidas por 70 sueros probados por Western Blot

| PROTEÍNA | CANTIDAD DE SUEROS QUE LA RECONOCEN |
|----------|-------------------------------------|
| 135      | 11                                  |
| 90       | 12                                  |
| 70       | 9                                   |
| 60       | 39                                  |
| 51       | 35                                  |
| 45       | 6                                   |
| 37       | 1                                   |
| 25       | 66                                  |
| 19       | 1                                   |
| 16       | 4                                   |
| 14       | 4                                   |

Los animales que resultaron positivos fueron del Estado de Tlaxcala (8 animales), Hidalgo (2 animales) y un animal de Toluca. De los cuales 1 fue de raza Rambouillet, 9 Hampshire y uno criollo.

Cabe mencionar que de los animales muestreados ninguno presentaba signos clínicos al momento de tomar la muestra.

## 8. DISCUSIÓN

MV y AEC han sido denominadas infecciones lentas debido a su largo periodo de incubación y persistencia del virus en el animal; en ambas enfermedades se presentan signos nerviosos, respiratorios, artríticos y mastitis, aunque cada cuadro clínico afecta en diferentes edades (Ravazzolo *et al.*, 2001). En este trabajo se utilizó únicamente suero de machos reproductores, mayores de un año de edad; principalmente por el papel que juegan dentro de las explotaciones, lo cual es de suma importancia, particularmente en los aspectos reproductivos donde cada macho puede cubrir de 25-35 hembras (Ensminger, 1973); lo anterior puede ser causa de que los machos puedan ser importantes transmisores de enfermedades en los rebaños.

Existen reportes en los cuales se menciona que los virus causantes de MV en borregos y AEC en cabras al parecer tienen un origen común, lo que pudiera facilitar la transmisión de los virus entre estas especies (Valas *et al.*, 1997; Guiguen *et al.*, 2000). Esta característica se ha utilizado para agrupar ambas enfermedades como lentivirus de pequeños rumiantes (Chebloune *et al.*, 1996; Leroux, 1997; Pasick, 1998). Actualmente la AEC se encuentra enlistada en el grupo 3 y el MV en el grupo 1 de las Enfermedades, Plagas Exóticas y Enzoóticas de Notificación Obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos (Sagar, 1999). Aunque en México no existe de forma oficial la presencia de la enfermedad de MV en machos ovinos existe un reporte de un estudio serológico reconociendo anticuerpos contra el virus (Ramírez y Trigo, 1983) por lo tanto existe la posibilidad de que los machos ovinos se infecten con el virus de AEC, ya que generalmente en México estas especies son criadas en forma mixta. El presente estudio corrobora la presencia serológica de LVPR en borregos de México como fue reportado por Ramírez y Trigo, 1983, lo cual no descarta que pudiera ser AEC o MV, por lo que sería importante realizar la identificación genética y el aislamiento del virus presente en machos ovinos nacionales.

Además se ha demostrado que entre el VMV y VAEC pueden presentar reacción cruzada relacionada principalmente con las proteínas codificadas por los genes gag y env (Rosati *et al.*, 1999). Esta reacción se ha demostrado principalmente entre las proteínas p27 y gp135 (Cutlip *et al.*, 1977); la primera relacionada con la proteína de cápside y la segunda con la envoltura viral, ambas consideradas antígenos inmunodominantes en la infección por lentivirus (Pasik 1998 b).

Hasta hace poco la prueba de diagnóstico más utilizada para LVPR había sido la de inmunodifusión en gel de agar debido a que alcanza niveles de casi el 100% de especificidad (Knowles 1997); en el presente estudio se utilizaron las pruebas de ELISA y WB las cuales se han reconocido como pruebas más sensibles. La prueba de ELISA utilizada contiene proteínas de virus completo del VMV, por lo que no es posible que contenga todas las variaciones antigénicas que puedan

presentar los VAEC (Pasick, 1998), ya que es sabido del alto índice de mutaciones en el genoma de los lentivirus (Petursson *et al.*, 1992) lo que implica que los anticuerpos presentes en el suero no reaccionen con la misma intensidad contra todas las variantes, tal vez esa sea la razón por la cual en este estudio únicamente hubo un positivo y un suero sospechoso en la prueba de ELISA mientras que el WB se presentaron 11 individuos seropositivos. La prueba de WB se ha reconocido como la prueba de oro para el diagnóstico de los retrovirus (Murphy *et al.*, 1999), ya que es una prueba mucho más sensible y específica que la de ELISA, lo que permite reconocer de forma cualitativa las proteínas virales detectadas por los anticuerpos séricos.

En el presente estudio, los resultados obtenidos con la prueba de Western Blot mostraron que todos los sueros probados presentaron reacción a la p25 (Figura 1-5), esto se podría interpretar como lo sugiere Clavijo, 1995; que todos los animales deberían ser considerados como positivos a la enfermedad; pero como se demostró por Ramírez 2002 es necesario considerar por lo menos una proteína del virus codificada por dos genes diferentes para dar un resultado positivo utilizando el criterio del Consorcio para la estandarización serológica de Retrovirus (CRSS) (Tabla 3) el cual es propuesto para la interpretación del VIH que es un retrovirus importante en humanos (Constantine *et al.*, 1991; Serie OMS 1992).

En este trabajo se obtuvo que de los estados muestreados los que presentaron animales seropositivos a LVPR fueron los ubicados en el centro de país de los cuales indicaron que algunos de los individuos muestreados fueron importados de Estados Unidos lo que conlleva a determinar que es muy importante que los productores soliciten un certificado de animales libres de LVPR. Por otro lado las razas que resultaron con mayor seropositividad fueron hampshire, rambouillet y tipo criolla, lo que es semejante a lo reportado en AEC donde se ha comprobado una mayor susceptibilidad de los animales tipo criollo (Martínez, 2003).

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 pueden deberse autoanticuerpos que reaccionan a epítopes de los cultivos celulares. La presencia de anticuerpos contra algunos agentes parasitarios como la malaria y a infecciones con retrovirus endógenos (Constantine *et al.*, 1991; Serie OMS, 1992). Lo anterior puede aplicar para la infección por LVPR y por lo cual el establecer un criterio de positividad permite descartar estas reacciones inespecíficas.

Es importante señalar que cuando se realizan análisis filogenéticos de los LVPR más finos, se hace difícil establecer diferencias claras entre especies, ya que los aislados pueden agruparse de distintas maneras según la región del genoma que se examine. Este hecho es de especial relevancia en relación con los

LVPR ya que, además, se producen agrupamientos entre aislados ovinos y caprinos que revelan una gran facilidad de infección entre especies (Zanoni *et al.*, 1992; Kwang *et al.*, 1995; Leroux *et al.*, 1997; Pasick, 1998; Guiguen *et al.*, 2000), por lo cual en el presente trabajo se utilizó antígeno de AEC para sugerir la posible existencia de AEC en borregos o la convivencia con la infección del VMV en rebaños ovinos nacionales.

## 9. CONCLUSIONES

Aunque se considera exótica en México, la enfermedad de MV puede estar presente en los rebaños ovinos.

En el caso de la infección por el VAEC pudiera estar presente en borregos debido a que el antígeno utilizado en este trabajo para la prueba de WB fue un virus de AEC.

Para corroborar lo anterior es necesario hacer pruebas de PCR y aislamiento viral a los animales seropositivos.

Uno de los animales detectados como seropositivo a la prueba de WB fue importado de Estados Unidos, por lo cual es importante que los animales que son introducidos al país se encuentren libres de ambas enfermedades.

Se recomienda utilizar la prueba de ELISA como prueba tamiz y corroborar el diagnóstico con la prueba de WB y aislamiento viral.

## 11. APÉNDICE

### \* *PBS 10x pH 7.0*

#### Solución A

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 14.2 g (0.1 M)  |
| NaCl                             | 87.6 g (0.15 M) |
| H <sub>2</sub> O                 | Aforar 1000 ml  |

#### Solución B

|  |                 |
|--|-----------------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O | 13.8 g (0.1 M)  |
| NaCl   | 87.6 g (0.15 M) |
| H <sub>2</sub> O                                   | Aforar 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

#### \* *Solución de Lisis (100 ml):*

|                        |        |                            |
|------------------------|--------|----------------------------|
| 0.05 M TRIS HCL PH 7.2 | 6.05 g | } Buffer de lavado<br>RIPA |
| 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).

1 mM PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride). Preparar un stock 1M de PMSF disuelto en DMSO (0.871 g PMSF en 5 ml DMSO) Y ADICIONAL 100 µl PMSF/10 ml de buffer RIPA.

#### \* *Buffer de Dilución:*

Albúmina Serica Bovina 1% en PBS

#### \* *Buffer de lavado*

|              |        |
|--------------|--------|
| PBS          | 500 ml |
| Tween 20(2%) | 1 ml   |

#### \* *Buffer de Transferencia:*

|           |         |
|-----------|---------|
| NaCl      | 29.22 g |
| EDTA      | 6.724 g |
| 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.

\* *Revelado*

|                       |                    |
|-----------------------|--------------------|
| Diaminobencidina      | 0.015 g (0.05%)    |
| Peróxido de Hidrógeno | 15 $\mu$ l (0.05%) |
| PBS                   | 30 ml              |

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez VJL, seroprevalencia de la artritis encefalitis caprina en algunos estados de la república (tesis de licenciatura) Cuautitlán Izcalli, Edo. de México:UNAM, 1984.
2. Angus AA, Gordon DH, Neil JW. Quantitative analysis of immunohistological changes in the synovial membrane of sheep infected with maedi-visna virus. *Clin immun immunopath* 1994;72(1):21-29
3. Belov L, Whalley M. Virus-specific polypeptides of caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to virion proteins p24 and p14. *J Gen Virol* 1988; 69: 1097-1103.
4. Brodie SJ, De la Concha-Bermejillo A, Snowden GD, Demartini JC. Current concepts in the epizootiology, diagnosis and economic importance of ovine progressive pneumonia en North America: a review. *Small Rum Res* 27:1-17 (1998).
5. Bruett L, Barber SA, Clements J. Characterization of a mambrane-associated protein implicated in Visna virus binding and infection. *Virology* 271:132-141(2000).
6. Clavijo A, Thorsen J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Rum Res* 1996;22:69-77.
7. Coll MJ. Técnicas de diagnóstico en virología. Madrid: Díaz de Santos,1993.
8. Constantine NT, Callahan JD, Watts DM. HIV testing & quality control. AIDSTECH, 1991.
9. Chebloune Y, Sheffer D, Karr BM, Stephens E, Narayan O. Restrictive type of replication of ovine/ceprine lentivirus in ovine fibroblast cel, cultures. *Virology* 1996; 222: 21-30
10. Dahlberg JE, Gaskin JM, Perk K. Morphological and immunological comparision of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J Virol* 1981; 39(3): 914-919.

11. De la Concha B.A., Corral, S.M., Brodie, S.J., De Martín J.C. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am. J. Vet. Res.* 1996; 57:284-688.
12. Sagar. Acuerdo mediante el cual se enclistan las enfermedades y plagas exóticas y enzooticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Diario oficial de la Federación, México; 5 de Marzo 1999:18-28.
13. Dinter Z, Morein B. Virus infections of ruminants. Netherlands: *Elsevier Science Publishers B.V.* 1990.
14. 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.
15. Ellis, TM, Robinson WF, Wilcox GE. Comparison of caprine arthritis-encephalitis viruses from goats with arthritis and goats with chronic interstitial pneumonia. *Aust Vet J* 1988; 65(8): 254-257.
16. Fevereiro M, Barros S, Fagulha T. Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *J Virol meth* 1999; 81(1-2):101-108.
17. Gay G, Valdivieso N, Tron F, Enríquez O. Informe preliminar del aislamiento del virus productor de la Artritis Encefalitis Caprina en México. Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México-SARH. México DF. 1986: 215
18. Guiguen F, Mselli-Lakhal L, Durand J, Du J, Favier C, Fornazero C, Grezel D, Balleydier S, Haussman E, Chebloune Y. Experimental infection of mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis viru. *AJRV* 2000; 61(4): 456-461.
19. Gogolewsky 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.* 66: 1233-1240(1985).
20. Heckert RA, McNab WB, Richsrdsn SM, Briscoe MR. Evaluation of an Enzime-Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Can J Vet Res* 56:237-241;(1992).
21. 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.

22. Kirkland PD, Batty EM. Caprine arthritis-encephalitis virus: an efficient method for the large scale production of serological antigens. *J Virol Meth* 1987; 16: 323-326.
23. Knowles DP, Evermann JF, Shropshire c, VanderSchalie J, Bradway D, Genzon HM, Cheevers WP. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology usin caprine and ovine of antibody to caprine arthritis encephalitis virus. *J of Clin Microbiol* 32: 243-245 (1994).
24. Knowles DP. Laboratory dianostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary clinics of North America: Food animal practice*; 13(1): 1-11(1997).
25. Knowles DPJr, Cheevers WP, McGuire TC, Brassfielf AL, Harwood WG, Stem TA. Structure and genetic variability of envelopr glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis encephalitis lentivirus. *J Virol* ; 65(11):5744-5750(1991).
26. Kwang J, Keen J, Cutlip RC, Kim HS, Bermejillo A de la C. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *S Rum Res* 1995; 16: 271-177.
27. 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.
28. Martin WB. Enfermedades de la oveja. Zaragoza España: Acribia, 1998.
29. Martínez RHA. Diseminación del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) a partir de machos caprinos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor (tesis de doctorado). Cuautitlan Izcalli, Edo. de México: UNAM, 2003.
30. Matthews J. Enfermedades de la cabra. España: Acribia, 2002.
31. McGuire TC. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet Immunol and Immunopath* 1987; 17: 465-470.
32. Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary virology*. Academic Press, USA; 1999.
33. Pasick J. Using of a recombinant Maedi Visna virus protein ELISA the serologic diagnosis of lentivirus infections in small ruminants. *Can J Vet Res* 62: 307-310 (1998 a).

34. Pasick J. Maedi-visna virus an caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Can J Vet Res* ; 62:241-244 (1998 b).
35. Pepin M, Vitu Ch, Russo P, Mornex JF, Peterhans E. Maedi-Visna virus infections in sheep: a review. *Vet Res* 29:341-367 (1996).
36. Peterhans E, Zanoni R, Bertoni G. How to succeed as a virus: strategies for dealing with the immune system. *Vet Immunol and Immunopath* 72: 111-117 (1999).
37. Pettursson G, Andresdóttir V, Andresson OS, Georgsson G, Pálsson PA, Rafnar B, Torsteinsdóttir S. Lentivirus diseases of sheep and goats - research: Maedi Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis. Progress in sheep and goat research. Oxford: *Speedy A.W.* 1992:107-129.
38. Potterfield JS. Andrewes viruses of vertebrates. London England: Baillere-Tindall, 1989.
39. Ramírez AH. Evaluación "in vitro" de proteínas antigénicas de un virus de Artritis Encefalitis Caprina (AEC) aislado en México, usando las técnicas de ELISA e inmunoelectrotransferencia (Western Blot) (tesis de maestría). Cuautitlan Izcalli, Edo. de México: UNAM, 2002.
40. Ramírez C, Trigo FJ. Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la neumonía progresiva ovina en México. Reunión de investigación pecuaria en México; 1983.
41. Ravazzollo AP, Reischak D, Peterhans E, Zanoni R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Res* 79-1-2:117-123 (2001).
42. 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.
43. Rosati S, Mannelli A, Merlo T, Ponti N. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis- encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res* 61-2:177-183 (1999).
44. Rowe JD, East NE, Thrumond MC, Franti CE, Pedersen NC. Cohor study of natural transmission and two methods for control for caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am J Vet Res* 53 (12): 2386-2395 (1992).

45. Rowe JD, East NE. Risk factor for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis infection virus. *Food Animal Retroviruses* 13(1): 35-53 (1997).
46. Russo P. Virus de l'arthrite encéphalite caprine (CAEV). Breve revue caprine arthritis encéphalitis virus (CAEV). *Short Review Ann Rech Vét* 15 : (11) :3-6 ;(1984).
47. Sanna E, Sanna MP, Vitali GP, Renzoni G, Sanna L, Spano, S, Rossi G, Leoni A. Proviral DNA en the brains of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *J Comp Path* 121: 271-273 (1999).
48. Serie OMS No. 9 sobre el SIDA. Normas de bioseguridad para laboratorios de diagnóstico e investigación que trabajan con el VIH. Ginebra, 1992.
49. Smith MC, Sherman DM. Goat medicine. *Usa: lea & Febiger*, 1994.
50. Stites DP, Hugh HF. Inmunología básica y clínica. 4ª ed, *El manual moderno México* 1983.
51. Storset AK, Teig A, Rimstad E. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus RNA in macrophages by in situ hybridization usin fluorescein - labelled single -stranded RNA probes. *Vet Microbiol* 52(1-2): 25-35 (1996).
52. Thibier M, Guerin B. higienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reprod Sc* 62: 233-251(2000).
53. Travassos Ce, Benoit C, Valas S, Da Silva AG, Perrin G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum Res* 32:100-106 (1999).
54. Trigo JF. La artritis encefalitis caprina.; *Ciencia Veterinaria* (1991) 5:49-66 México, UNAM.
55. Valas S, Benoit C, Guionaud C, Perrin G, Mamoun RZ. North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virol* (1997); 237 (2):307-318.
56. Vitu Ç, Russo P. L'arthrite-encefalite enzootique caprine en France: Recheches epidemiologiques et experimentales. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1988 ; 11(1) 27-34.
57. Zanoni RG, Nauta IM, Kuhnert P, Pauli U, Pohl B, Peterhans E. Genomic heterogeneity of small ruminant disease lentiviruses detected by PCR. *Vet Microbiol* 1992: 27(3): 580-582.

58. Zink MC, Narayan O, Kennedy PG, Clements JE. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: new insights on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunopath* 15:167-180 (1987).
59. Zink MC, Narayan O. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol* 63(6): 2578-2584 (1989).