



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN.**

**“EVALUACIÓN SEROLÓGICA A LENTIVIRUS
DE PEQUEÑOS RUMIANTES
EN UNA EXPLOTACIÓN”.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :**

**ASESOR:
DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

**COASESOR:
M en C: MARÍA MARTHA GARCÍA FLORES**



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el amor, dedicación y apoyo en todas mis decisiones y a mi hermana Faby por sus consejos y ejemplo.

A mis tios Julia y Ubaldo por haberme aceptado en su casa durante mis estudios de licenciatura.

A Vic, por su apoyo incondicional cada día de mi vida.

A la FES-C por su apoyo para la realización de este trabajo, en especial al módulo de producción de ovinos y caprinos.

A todas las personas que conforman el equipo de laboratorio y que colaboraron directamente en la realización de mi tesis: Doc Alejandro, Dra Martha, Dra Ayanegui, Itz, Norma, Ana, Yesi, Carmen, Chucho, Chos, Adi, Gerardo Arcila. Espero no haber omitido a nadie y ofrezco una disculpa si alguien me faltó.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1-Agente etiológico	3
1.1.1 Morfología de la partícula viral.....	6
1.1.2. Ciclo de replicación viral.....	8
1.1.3. Implicaciones de la replicación viral en la variabilidad de los lentivirus de pequeños rumiantes.....	9
1.2 Comparación Virus de Artritis Encefalitis Caprina y Virus de Maedi Visna	10
1.3 Respuesta inmune	12
1.3.1. Respuesta inmune humoral.....	12
1.3.2. Respuesta inmune celular.....	13
1.3.2.1 Células blanco del virus.....	13
1.4 Cuadro clínico	14
1.5 Diagnóstico	
1.5.1 Diagnóstico clínico.....	16
1.5.2 Diagnóstico serológico.....	18
1.5.2.1. Inmunodifusión en Agar gel.....	18
1.5.2.1.1 Antecedentes.....	19
1.5.2.1.2 Características de la prueba.....	19
1.5.2.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.....	20
1.5.2.2.1 Antecedentes.....	20
1.5.2.2.2 ELISA de primera generación.....	20
1.5.2.2.3 ELISA de segunda generación.....	20
1.5.2.2.4 ELISA de tercera generación.....	21
1.5.2.2.5 ELISA indirecto.....	21
1.5.2.2.6 ELISA competitiva.....	21
1.5.2.2.7 Consideraciones de la prueba.....	22
1.5.2.3. Western blot	
1.5.2.3.1 Objetivos de la prueba.....	23
1.5.2.3.2 Fundamento.....	23

1.5.2.3.3 Interpretación de resultados.....	25
1.5.3 Validez de una prueba diagnóstica. Sensibilidad y Especificidad.....	26
1.6. Formas de transmisión.....	28
1.6.1. Transmisión aerógena.....	28
1.6.2. Transmisión lactógena.....	28
1.6.3. Transmisión intrauterina.....	29
1.6.4 .Transmisión sexual.....	29
1.7. Medidas de prevención y control.....	30
1.8. Panorama de Lentivirus de Pequeños Rumiantes en México.....	31
2. Justificación.....	33
3. Objetivos.....	34
4. Hipótesis.....	35
5. Materiales y Método.....	36
5.1 Toma de muestras.....	36
5.2 Pruebas serológicas para el diagnóstico de LvPR de ovinos y caprinos.....	37
5.3 Westen blot casero.....	38
5.4. Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas.....	39
6. Resultados.....	40
6.1 Resultados serológicos de ovinos y caprinos.....	40
6.2 WBc.....	41
6.3 Sensibilidad y Especificidad de las pruebas para el diagnóstico a LvPR.....	42
7. Discusión.....	44
8. Conclusiones.....	48
9. Bibliografía.....	49
10. Apéndices.....	63

Índice de cuadros

Cuadro 1: Clasificación taxonómica del virus.....	5
Cuadro 2: Descripción de proteínas reportadas de LvPR por diferentes autores.....	13
Cuadro 3: Aspectos clínicos comparativos de AEC Y MV.....	16
Cuadro 4: Otras pruebas de diagnóstico de laboratorio utilizadas para LvPR.....	17
Cuadro 5: Bandas de reactividad frente a VIH en la técnica de WB.....	24

Cuadro 6: Diversos criterios para que una prueba de WB resulte VIH positiva.....	26
Cuadro 7: Medidas de prevención y control.....	30
Cuadro 8: Especie y raza por tipo de producción	36
Cuadro 9: Resultados de 3 pruebas serológicas comerciales a LvPR.....	40
Cuadro 10: Resultados del diagnóstico a LvPR por especie y tipo de producción.....	41
Cuadro 11: Resultados del análisis de sensibilidad y especificidad	43

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura viral y mapa genómico.....	7
Figura 2: WBc de caprinos seropositivos a las pruebas comerciales.....	41
Figura 3: WBc de sueros caprinos negativos a las pruebas comerciales.....	42

Abreviaturas:

Acn	Anticuerpo neutralizante
Acp	Anticuerpo precipitante
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico.
ARN m	Ácido ribonucleico mensajero
AEC	Artritis encefalitis caprina
CA	Cápside
CDC	Center for Disease Control
CEM	Célula epitelial mamaria.
CRSS	Consortium for Retrovirus Serology and Standardization
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ELISA c	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas competitivo
ELISA i	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto
env	Envoltura
FDA	Food and Drug Administration
gag	Antígeno específico de grupo.
gp	Glicoproteína
IDAG	Inmunodifusión en agar gel
IN	Integrasa
LPR	Lentivirus de pequeños rumiantes.
MA	Matriz
MV	Maedi Visna
NC	Nucleocápside
nm.	Nanometros
NPO	Neumonía progresiva ovina
OIE	Organización mundial de sanidad animal.
p	Péptido

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pol.	Polimerasa
PR	Proteasa
Rev	Regulador de la expresión del Virión
SU	Superficie
TM	Transmembranal
TR	Transcriptasa reversa
TRL	Terminal de repetición larga
VAEC	Virus de la artritis encefalitis caprina
Vif	Factor de infectividad viral
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana
VMV	Virus de Maedi Visna
WB	Western blot

Resumen:

El género *Lentivirus* pertenece a la familia *Retroviridae* y consiste en retrovirus no- oncogénicos que producen enfermedades en diferentes órganos, caracterizadas por largos períodos de incubación e infecciones persistentes.

A los virus Maedi Visna y Artritis Encefalitis Caprina, recientemente se les ha denominado Lentivirus de Pequeños Rumiantes ya que ambos infectan a ovinos y caprinos. Además se ha observado que las pruebas serológicas específicas para el diagnóstico del virus de Maedi Visna diagnostican al virus de la artritis encefalitis caprina y viceversa.

El diagnóstico de la enfermedad por lentivirus de pequeños rumiantes en un 12% a 40% de los animales infectados, se basa en los signos clínicos y es apoyado por pruebas de laboratorio rutinarias como la Inmunodifusión en agar gel o ELISA que hasta la fecha son recomendadas por la Organización Mundial de la Sanidad Animal. Las pruebas confirmatorias de aislamiento de virus en cultivos celulares y la prueba de Western Blot, se les deja a laboratorios certificados por requerir equipo sofisticado y de alto costo.

Con estos antecedentes se decide llevar a cabo una evaluación serológica a LvPR con 268 sueros de ovinos (n= 110) y caprinos(n= 158) albergados en la FES-Cuautitlán agrupados de acuerdo al tipo de producción: 35 caprinos semintensivo, 20 ovinos en estabulado, 90 ovinos pastoreo y 123 caprinos intensivo. Para dicho diagnóstico se utilizaron 3 pruebas serológicas comerciales mediante las que se detectó anticuerpos contra p28 por Inmunodifusión en agar gel y ELISA indirecto y anticuerpos contra gp 135 por ELISA competitiva; obteniéndose que el ELISA indirecto detectó todos los animales con signos clínicos, Resultando que en IDAG fueron 12 diagnósticos positivos y 256 negativos; por ELISAi 91 casos fueron positivos y 177 negativos y por ELISAc 52 positivos y 173 negativos. Se comprobó la presencia de anticuerpos mediante un Western Blot estandarizado en el laboratorio contra p28 y gp135 en 11 de los sueros que resultaron positivos y 13 sueros negativos a las pruebas comerciales.

Debido a estas variaciones en los resultados se sometieron a un análisis de sensibilidad y especificidad en donde la técnica de WB resulto 100 % sensible y específica; y al realizar el análisis de concordancia Kappa, da como resultado, que la evaluación con ambas pruebas de ELISA en forma simultanea es óptimo para reducir el número de falsos negativos si es que no se llegara a contar con la prueba de WB.

Este estudio demuestra que un diagnostico puede variar según la técnica que se emplee, por lo tanto se sugiere realizar una prueba altamente sensible y específica, como lo es el WB.

1.-Introducción

Artritis encefalitis caprina

Es una enfermedad del ganado caprino causada por un virus, caracterizado por la producción de lesiones inflamatorias crónicas divididas en diversos cuadros clínicos (Ávalos *et al*, 1992; Bruguere- Picoux, 1984; Dawson y Wilesmith, 1985; Kennedy *et al* 1985). Se le conoce también como rodilla grande, leucoencefalomielitis, artritis de las cabras, leucoencefalomielitis viral, infección por retrovirus caprino o artritis encefalitis caprina viral. (Rodríguez, 2008). Presenta una distribución mundial. (Trigo, 1991), que afecta principalmente a cabras productoras de leche en los países industrializados como Francia, EUA, Canadá y Australia entre otros, con prevalencias entre un 65% y 81%. (Adams *et al*, 1984; Crawford y Adams, 1981; East *et al*, 1987), otros países como Noruega, tienen un 42%, mientras que países como Kenia y México presentan prevalencias de un 4.5% en animales de producción semiintensiva. (Adams *et al*, 1984; Baba *et al*, 2000; Nord *et al*, 1998).

Fue descrita por primera vez en 1974. (Pawlisch y Maes, 1984), sin embargo, en ese entonces fue denominada como síndrome de meningoencefalitis en cabritos menores de 4 meses y fue hasta 1979 cuando se aisló el virus por primera vez. (Crawford y Adams, 1981).

Maedi visna

Enfermedad viral cuyo agente causal recibe el nombre de maedi-visna (VMV) o neumonía progresiva ovina (NPO), Zwoegerziekte, bouhite, ovine progressive pneumonia (OPP). (Pepín *et al*, 1998). Marsh's Progressive Pneumonia, Montana Progressive Pneumonia, Chronic Progressive Pneumonia, Graff-Reinet Disease. Esta enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial entre los países en los que la enfermedad está presente encontramos a Alemania, Bélgica, Canadá, Chile, Dinamarca, España, EU, Francia y Gran Bretaña. En los países en los cuales la enfermedad no ha

sido detectada son Cuba y Australia y los países libres en los cuales la enfermedad fue erradicada como Islandia, Irlanda, Polonia, Austria y Namibia. (Fort *et al*, 2002).

El virus fue descubierto en Islandia en el año de 1939, aunque algunos signos de la enfermedad fueron descritos previamente en Sudáfrica. (Pepin *et al*, 1998). El síndrome respiratorio era lo que posteriormente se conocería bajo el nombre de maedi (disnea o respiración fatigosa en islandés) y el síndrome nervioso sería conocido como visna (desgaste o enflaquecimiento en islandés). (Sigurdson *et al*, 1952). En 1941 se inicia un plan de erradicación del VMV en la isla, y tras muchos años se logró erradicar la enfermedad mediante un sistema de control y erradicación que se basó en el sacrificio total de los rebaños en los que aparecían animales afectados y en su sustitución por ovinos de zonas no afectadas. El visna fue erradicado en su totalidad hasta 1965. (Gudnadottir, 1974).

En general los pequeños rumiantes pueden ser infectados por un grupo genéricamente denominado lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR), que comprende varios tipos aislados, distribuidos básicamente, en dos grupos filogenéticos, cuyos prototipos son el VMV y el virus la AEC. (Callado *et al*, 2001).

1.1-Agente etiológico

El VAEC y VMV pertenecen a la familia Retroviridae; subfamilia: Orthoretrovirinae, género lentivirus (ICTV, 2006) y subgénero lentivirus de los pequeños rumiantes . (Muphy *et al*, 1999)

Cuadro1. Clasificación taxonómica del virus.

Familia	Género	Subgénero	Especies
Retroviridae	Alpharetrovirus Betaretrovirus Gammaretrovirus Deltaretrovirus Epsilonretrovirus Lentivirus	Lentivirus Bovino	Virus de la inmunodeficiencia Bovina Virus de la enfermedad de Membrana
		Lentivirus Equino	Anemia infecciosa Equina
		Lentivirus Felino	Virus de la Inmunodeficiencia Felina Lentivirus del Puma 14 Lentivirus de Pantera
		LentivirusOvino/Caprino	Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) Lentivurs caprino Brasileño Lentivirus caprino Virus Visna Virus Maedi-Visna (VMV) Virus Maedi-Visna EV-1 Virus Maedi-Visna SA-OMVV Lentivirus Ovino Lentivirus de los Pequeños Rumiantes (LvPR)
		Lentivirus de Primates	Virus de la Inmunodeficiencia Humana Retrovirus del Simio SRV-2 Virus de la Inmunodeficiencia del Simio-Humano

(Daltabuit, 2003).

1.1.1 Morfología de la partícula viral.

Los lentivirus se componen aproximadamente de 60% de proteína, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN. Los viriones son envueltos con un diámetro de 80-100 nm. (ICTV, 2006). El genoma se encuentra en el interior de la nucleocápside (NC) y presenta transcriptasa inversa (TR). La cápside (CA) se encuentra rodeada por una capa de proteína de matriz (MA). Además, el virión presenta una envoltura externa (SU) compuesta por una bicapa de lípidos que contiene la proteína transmembranal (TM). Ver figura 1.

El genoma de doble cadena de ARN contiene tres genes estructurales y cada uno codifica para dos o más proteínas:

1. El gen *gag* (Antígeno Específico de Grupo) codifica 3 proteínas: La CA (p25), la NC (p14) y la MA (p17), entre otras como la p24, p28, p9, p6, p7, p11, p55, p40; que estimula una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección. (ICTV, 2006)(Asociación Monarcas México, 2008).

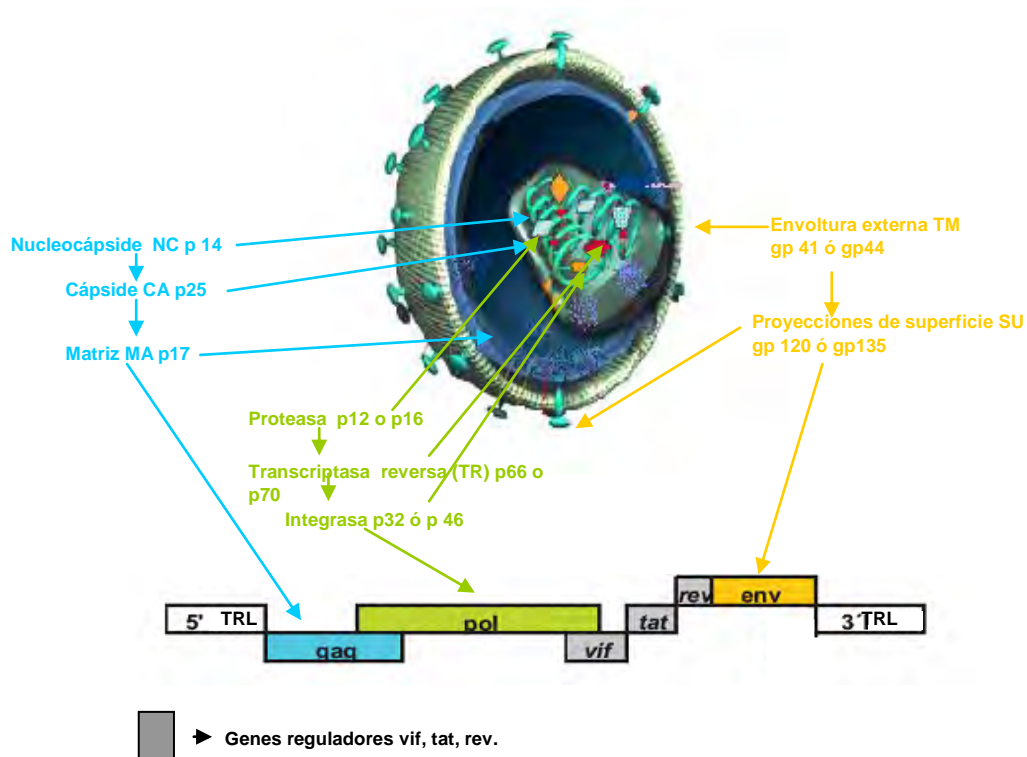
2. El gen *pol* (Polimerasa) codifica la transcriptasa reversa TR (p66-70), la enzima dUTPasa, Integrasa (IN) p32, p46, que facilita la integración del provirus en el genoma de la célula y la proteasa (PR) p12, p16, que es esencial para la infectividad y maduración. (Daltabuit, 2003).

3. El gen *env* (Envoltura) codifica las glicoproteínas, la TM gp 44, la SU gp 135, gp 120, gp 41, p160, y contiene los epítomos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes que sirven para la interacción del virus con el receptor de la célula hospedadora. (ICTV 2006)(Asociación Monarcas México, 2008).

Los LvPR presentan tres genes accesorios:

1. *vif* (factor de infectividad viral): Se requiere para una eficiente replicación y patogenicidad del virus *in vivo*.
2. *tat*: previene la terminación prematura de la transcripción.
3. *rev* (Regulador de la expresión de proteínas del Virión) (Harmache *et al*, 1995). Se considera esencial para una eficiente replicación viral en cultivo celular (Saltarelli *et al*, 1990). Ver Figura 1.

Figura 1: Estructura viral y mapa genómico



Estructura viral y mapa genómico. Modificado de ICTV, 2006 y adaptado de Álvarez, 2006. Se observa la estructura viral y los diversos componentes del genoma.

1.1.2. Ciclo de replicación viral

El virus entra en la célula hospedera (monocitos/macrófagos y células tipo fibroblásticas) por los mecanismos de fusión o endocitosis mediados por los receptores glicoproteicos de la envoltura viral (gp135, SU), que se unen a los receptores específicos presentes en la superficie de la célula hospedera. (Mselli-Lakhal *et al*, 2000).

El momento en que el virus penetra en el citoplasma de la célula, se libera de su envoltura, comienza la retrotranscripción del ARN viral a una doble cadena de ADN que permanece dentro de la nucleocápside. (Saltarelli *et al*, 1990).

Al finalizar la síntesis de la doble cadena de ADN, éste es transportado por las proteínas de la nucleocápside al núcleo de la célula. Este ADN lineal es integrado en el ADN del hospedero con ayuda de la integrasa viral. Una vez integrado en monocitos la replicación del virus no comenzará hasta que los monocitos maduren a macrófagos. (Narayan *et al*, 1993).

En la fase denominada expresión se generan el ARN genómico y el ARNm necesarios para la síntesis del ARN viral y de las proteínas virales. (Cann, 1997).

El precursor de la proteína *env* entra a la cisterna del retículo endoplásmico durante la síntesis y es llevada al complejo de Golgi donde es glicosilada tras lo cual es transportada a la membrana plasmática. El precursor de las proteínas *gag* y *pol* se sintetiza en los polirribosomas libres del citoplasma celular, sigue la misma ruta glicosilandose, alcanzando la membrana plasmática. Junto con el ARN viral, los precursores de *gag*, *pol* y *env* comienzan el ensamblaje de la nucleocápside en la parte interna de la membrana plasmática. Posteriormente se da la gemación con la unión de la nucleocápside a proteínas *env* ya fijadas como peplómeros en la membrana plasmática los precursores proteínicos son lisados post-transcripcionalmente por una proteasa viral obteniendo así proteínas virales maduras (Murphy *et al*, 1999).

1.1.3. Implicaciones de la replicación viral en la variabilidad de los LvPR

La replicación de los retrovirus se acompaña por una alta frecuencia de mutaciones. Se estima que en cada ciclo de replicación ocurren alrededor de 3×10^{-5} mutaciones lo cual sugiere que la enzima TR sufre errores frecuentes, principalmente en el gen ENV. Esta variabilidad no es sólo un instrumento del lentivirus para evadir la respuesta inmune del hospedero y facilitar la persistencia de la infección sino que también podría estar involucrado en la habilidad de estos virus de cruzar la barrera de especie y de mostrar capacidades patogénicas distintas. Este fenómeno tiene obvias implicaciones para el diseño de las pruebas de diagnóstico, desarrollo de vacunas y drogas para el control de la enfermedad. (Murphy *et al*, 1999) (Daltabuit, 2003).

1.2 Comparación entre el virus de Artritis Encefalitis Caprina y el virus de Maedi Visna

El VMV en ovinos y VAEC en caprinos tienen muchas similitudes a nivel antigénico y molecular y por consiguiente están considerados dentro de un mismo grupo denominado (LvPR). (Pasick, 1998). Producen infecciones virales persistentes. Los análisis filogenéticos por comparación de las secuencias nucleotídicas han demostrado que se trata de lentivirus muy relacionados y muestran claras indicaciones de una transmisión cruzada interespecífica entre ovejas y cabras de importancia epidemiológica. (OIE, 2004) Más aún, algunas secuencias de lentivirus de origen ovino están más relacionadas con VAEC que con VMV y viceversa (Narayan *et al*, 1993).

Al comparar las secuencias nucleotídicas de VMV y el VAEC se comprueba que la homología para los genes *gag* y *pol* entre ambos virus es muy alta, de un 75% y 78% respectivamente, y parecen ser menos parecidos en lo que respecta a su gen *env* (60%). (Braun, 1987).

Las investigaciones sobre secuenciación nucleotídica se ha incrementado y permite demostrar que el VMV y el VAEC no se consideran como patógenos específicos de ovejas y cabras (Gjerset *et al*, 2009).

Aparentemente existen evidencias de que el VAEC y el VMV saltan la barrera interespecie entre ovejas y cabras domésticas con relativa frecuencia. Un estudio publicado recientemente menciona una evidencia directa de transmisión natural de LvPR del subtipo A4 y A3 de cabras a ovejas y viceversa llevando a cabo la transmisión con mayor frecuencia en hatos mezclados (Shah *et al*, 2004).

Aunque existen claras diferencias entre ambos virus, sus similitudes son suficientes para que resulte difícil distinguirlos con técnicas de diagnóstico normales, por lo que se tiende a usar un término más amplio denominado LvPR. (Juste y De la concha, 2001).

Ambos virus infectan a las dos especies de pequeños rumiantes y reaccionan en las mismas pruebas serológicas. (Saman *et al*, 1999).

Es importante señalar que aun cuando se realizan análisis filogenéticos más finos, es difícil establecer diferencias claras entre especies, ya que los aislados pueden agruparse de distinta forma según la región del genoma que se examine. Ese hecho es de especial relevancia en relación con los LvPR, ya que además se producen agrupamientos entre aislados ovinos y caprinos. (Davey *et al*, 2000).

La implicación práctica de esta situación es que da pauta para la ejecución de programas de control y erradicación del VMV y de VAEC, y dependiendo del grado entre especies. Actuar contra una de las enfermedades puede resultar inútil si no se actúa simultáneamente contra la otra (Juste y de la Concha, 2001).

1.3 Respuesta inmune

La infección por los LvPR estimula en el hospedero una respuesta inmune mediada por anticuerpos y células que no es capaz de acabar con la infección y que mantiene a los animales persistentemente infectados. La duración de la infección es larga, de varios años en la mayoría de los casos y se distinguen varias fases cronológicas. Tras la infección existe un período largo asintomático (período de ventana) en el que la carga viral es baja, seguido de un período sintomático relativamente corto antes de producirse la muerte (Amorena *et al*, 2001).

1.3.1. Respuesta inmune humoral

Los anticuerpos presentes en la infección por LvPR son de tipo precipitantes (Acp) y neutralizantes (Acn). Los primeros anticuerpos en aparecer ya sea por una infección natural o experimental son los Acp. En estudios experimentales, la detección de estos anticuerpos fue entre las semanas 1 y 8,5 post infección. Los anticuerpos neutralizantes se detectaron más tarde, entre 1 y 5 meses post-infección y son específicos de cepa (De-Boer y Houwers, 1979; Sihvonen, 1981).

La proteína p25 del VMV siempre es constante y preponderante en estudios con inoculaciones experimentales en ovinos (Houwers y Nauta, 1989; Ramírez, 2002). Ver Cuadro 2.

Las razones por las que los Acn son ineficaces para eliminar la enfermedad pueden ser varias. Una de ellas parece ser la capacidad de mutación del virus que implica la aparición de variantes antigénicas que no reconocen los Acn. (Pepin *et al*, 1998).

Cuadro 2.- Descripción de proteínas reportadas de LvPR por diferentes autores

Proteínas	Virus	Técnica	Año	Referencia
P25, p51, gp 135	VMV	WB	2005	Pérez, 2005
P14, p25, 135	VAEC	WB	2002	Ramirez, 2002
P15,p28, p40, p130	VAEC	WB	1989	Zanoni y Peterhans 1989

1.3.2 Respuesta inmune celular

Se presenta entre 1 y 4 semanas post infección y disminuye de 4 a 12 semanas después. (Griffin *et al*, 1978).

En infecciones por el VMV, se invierte la relación de linfocitos CD4+/CD8+ aumentando el porcentaje de linfocitos T CD8+ que facilitan el control de la carga viral eliminando células infectadas, produciendo citoquinas inhibitorias. La producción de factores quimiotácticos estimula la migración de linfocitos y neutrófilos a los órganos diana provocando las lesiones características del VMV. Así, aumenta sobre todo la producción de interleucina 8 (IL-8), que se produce en mayor grado por los macrófagos alveolares de animales infectados, y que es responsable de atraer linfocitos y neutrófilos al tejido infectado, provocando por ejemplo la alveolitis característica del Maedi Visna. Además se ha observado que en infecciones por VAEC se incrementa la expresión de interleucina 16 (IL-16) en células de membrana sinovial, fluido sinovial, suero y sobrenadante de cultivos de células mononucleares de sangre periférica. (Daltaubuit, 2003).

1.3.2.1 Células blanco del virus

El principal tipo de células que infectan los LvPR son monocitos y macrófagos (Zinck *et al*, 1982), aunque también pueden infectar otras células como las dendríticas (Hermann *et al*, 2007), epiteliales (Gorrell *et al*, 1992) y fibroblastos (Lechat *et al*, 2005).

1.4 Cuadro Clínico

En ovinos, el VMV puede provocar lesiones multisistémicas y las cuatro formas clínicas pueden aparecer de forma individual o mixta (Cutlip *et al*, 1998). La forma pulmonar (Maedi) es la más común con presencia de neumonía intersticial crónica; La forma nerviosa (Visna) cursa con meningoencefalomielitis y coroiditis no purulenta (Cutlip *et al*, 1981) (Narayan y Cork, 1985; Sigurdsson, 1951), la forma mamaria se presenta como una mastitis intersticial. La última manifestación clínica y menos frecuente es la forma articular que cursa con artritis de carácter crónico no supurativo (Luján *et al*, 2001).

En caprinos, el VAEC tiene como principal signo la artritis, siendo en orden de frecuencia las articulaciones carpianas, seguidas por las metatarsianas y femorotibiorotulianas. (Trigo 1991); posteriormente la mastitis de tipo indurativo (Castillo y Hernández, 2004); la leucoencefalomielitis se presenta en cabritos entre 2 y 4 meses de edad (Trigo, 1999) y como de menos importancia, ocasionalmente se encuentra la bronconeumonía intersticial.

Forma pulmonar

La forma respiratoria tiene un período de incubación prolongado que puede durar de meses a varios años, siendo los tres a cuatro años de vida la edad en la que más frecuentemente aparece (Cutlip *et al*, 1998; Dawson, 1980). El primer signo que se aprecia, es una pérdida progresiva de peso que puede conducir finalmente a la caquexia sin que se observe anorexia. El signo más característico es la disnea, con aumento en la frecuencia respiratoria, respiración abdominal, extensión del cuello, dilatación de ollares y jadeo. A consecuencia de la insuficiencia respiratoria, se desarrolla intolerancia al ejercicio que provoca el retraso en la marcha (Luján *et al*, 2001). En ocasiones, probablemente a causa de infecciones secundarias, se ha descrito la existencia de tos seca con poca o nula descarga nasal (Dawson, 1980; Luján, 1991; Watt *et al*, 1990). El animal permanece alerta y sólo presenta fiebre si hay infecciones secundarias (Narayan y Cork ,1985). A medida que la enfermedad evoluciona, permanecen cada vez más tiempo postrados hasta morir a causa de insuficiencia respiratoria (Dawson, 1980;

Luján, 1991). Una vez que los los síntomas aparecen, la recuperación es imposible y la muerte inevitable. (Dawson, 1980).

Forma nerviosa

Las ovejas y cabritos presentan retraso en la marcha e incapacidad para seguir al rebaño a causa de incoordinación en el movimiento. Esta inestabilidad provoca caídas múltiples agravándose hasta producir parálisis de las extremidades posteriores y, con el tiempo, incluso las anteriores, culminando con la postración del animal. El animal se encuentra alerta, responde ante estímulos externos, no presenta fiebre ni disminuye su consumo de alimento. (Dawson, 1980; Narayan y Cork 1985).

Forma mamaria

Si el proceso es únicamente mamario el curso clínico es prolongado ya que no suele causar la muerte del animal (Luján *et al*, 2001). Algunos autores señalan que la glándula mamaria es más susceptible al virus que otros órganos (Smith, 1992). El signo clínico más evidente es la presencia de una mastitis indurativa difusa, bilateral, crónica, no dolorosa que se acompaña de un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos retromamarios (Luján, 1991). Las lesiones provocan una disminución en la producción de leche (Van der Molen *et al*, 1985) que puede evolucionar hasta agalaxia (Luján, 1991). Macroscópicamente se observa aumento de tamaño y consistencia en la glándula mamaria. La superficie de corte presenta un aspecto húmedo, liso y con pérdida del aspecto glandular (Van der Molen *et al*, 1985).

Forma articular

La manifestación clínica más evidente es la cojera y marcha envarada (Cutlip *et al*, 1985; Luján *et al*, 2001; Narayan y Cork, 1985; Oliver *et al*, 1981). A nivel macroscópico las articulaciones más afectadas son carpo, tarso y bolsa atlantal. En estas localizaciones puede apreciarse engrosamiento y congestión de las membranas sinoviales y de la cápsula articular. El cartílago articular puede presentar erosiones en los casos avanzados. La cantidad de líquido sinovial está aumentada, en ocasiones con fibrina. Los tejidos periarticulares pueden verse afectados con fibrosis, hemorragias petequiales especialmente en tendones, destrucción del hueso articular y mineralización (Cutlip *et al*, 1985; Georgsson, 1989).

Los pequeños rumiantes pueden estar infectados con LVPR durante toda su vida sin presentar sintomatología y la aparición de síntomas coincide a menudo con infecciones secundarias bacterianas, cambios en la alimentación y situaciones de estrés, incluyendo las fisiológicas como la gestación, el parto y la lactación. (Cutlip *et al*, 1998; Sigurdsson, 1954).

Cuadro 3.- Aspectos clínicos comparativos de AEC y MV

VAEC	VMV
Proceso clínico mas dependiente de la edad	Proceso clínico menos dependiente de la edad
El principal signo clínico en adultos es articular	La forma clínica articular es la menos frecuente
La forma pulmonar es esporádica	Forma pulmonar es la principal
Forma clínica nerviosa (principalmente en cabritos)	Forma nerviosa “esporádica”.(Benavides 2009)
Forma clínica mamaria (mastitis indurativa bilateral)	La forma mamaria es la más frecuente.
Forma clínica respiratoria es esporádica	Forma clínica respiratoria habitual.

(Adaptado Luján 2001)

1.5 Diagnóstico

1.5.1 Diagnóstico clínico

Se basa en los signos clínicos, siendo los más importantes en cada especie:

En caprinos el VAEC causa múltiples manifestaciones sistémicas; el signo clínico más frecuente es el aumento carpal periarticular, el cual aparece en un 12% a 40% de cabras infectadas. El resto de las cabras infectadas nunca muestran signos clínicos; el VAEC muestra una infección persistente, Por lo que las cabras clínicamente normales son una continua fuente de transmisión, por lo tanto, se precisa la detección serológica de la infección en cabras, siendo necesario actualmente un programa de erradicación (Knowles *et al*, 1993) (Zink y Johnson, 1994).

En ovinos, las formas clínicas más frecuentemente encontradas han sido hasta hace pocos años la mamaria, la pulmonar o ambas conjuntamente, que constituyen la afección conocida como Maedi. Más recientemente han aparecido dos brotes con formas diferentes de la enfermedad. Uno de ellos, afectando a un elevado número de ovinos, presenta la forma nerviosa o Visna (Benavides *et al*, 2006), poco frecuente en Europa, y que de forma esporádica se ha detectado en caprinos jóvenes infectados por LvPR. El segundo brote, restringido a un rebaño Raza Aragonesa. (Luján *et al*, 2001) que presenta una afección articular, más frecuente en ganado caprino.

No existe ninguna manifestación clínica característica de la infección y, aunque la presencia de alguna de ellas puedan sugerir en un contexto determinado la presencia de la infección, no es posible establecer un diagnóstico clínico de la enfermedad por lo que éste solo se puede establecer de un modo definitivo por técnicas de laboratorio (Morata y Lòpez, 1996).

Cuadro 4.- Otras pruebas de diagnóstico de laboratorio utilizadas para LvPR

Prueba	Determinación
Microscopía electrónica	Morfología e Identificación viral
Examen de líquido sinovial	Detección de linfocitos y monocitos
Radioinmunoensayo	Detección de antígenos gp 135 y p28 utilizando anticuerpos marcados con yodo
Transcriptasa inversa	Detección de la enzima por la actividad de la transcriptasa inversa
Hibridación in situ	Detección de ARN o ADN viral por medio de una sonda marcada radioactivamente o con un compuesto fluorescente
Inmunoperoxidasa	Detección de antígeno viral en cultivo celular y o tejidos.
Reacción en cadena de la polimerasa	Detección de ácido nucleico del virus
Cultivo celular	Detección del virus por efecto citopático, inmunofluorescencia, microscopía electrónica y transcriptasa inversa.

Ref: Stites y Hugh, 1983 ;Coll, 1993; Storset *et al*, 1996; Pepin *et al* 1998; Sanna *et al*, 1999 y Bruett *et al* 2000)

1.5.2 Diagnóstico serológico

El diagnóstico de la infección de LvPR tiene varios objetivos, algunos de ellos son diagnóstico "per se" de animales que se sospecha que pueden estar infectados, la aplicación en programas de vigilancia serológica (estudios de incidencia y prevalencia, tendencias en razas, función zootécnica etc.) o en programas de investigación clínica, farmacológica, virológica e inmunológica (Ortiz de Lejarazu *et al*, 1998)

El método más comúnmente empleado para el diagnóstico de laboratorio de la infección se basa en técnicas serológicas que detectan anticuerpos contra el virus en el suero de los animales infectados (Ortiz de Lejarazu *et al*, 1998), las cuales detectan principalmente epítopes comunes para todos los lentivirus. La detección de la infección se realiza por métodos como son ELISA indirecta, de bloqueo, IDAG y Western Blot entre otros. (De Andrés *et al*, 2005). Ver cuadro 4

La prueba de IDAG y más recientemente ELISA son las pruebas internacionalmente descritas para el diagnóstico de LvPR (OIE, 2004).

1.5.2.1. IDAG

Es una prueba ampliamente aplicada en todo el mundo (Celer *et al*, 1998). Consiste en detectar anticuerpos precipitantes en un medio de agar empleando antígeno viral soluble. La reacción Ag-Ac genera una línea blanca opaca de precipitado. Esta prueba es poco sensible ya que para tener una reacción se necesita una concentración mínima de 30 ug/ml. (Tizard, 1996).

1.5.2.1.1 Antecedentes

Este método fue aplicado por primera vez para la detección de anticuerpos frente al VMV (Terpstra y De Boer, 1973), y posteriormente se mejoró (Cutlip *et al*, 1977) y (Winward *et al*, 1977).

1.5.2.1.2 Características de la prueba

El medio de gel es 0,7–1% de agarosa en tampón Tris 0,05 M, pH 7,2, con 8% de NaCl. La prueba se realiza en placas de petri. La disposición y el tamaño de los pocillos determinan el número de sueros probados por placa. Se pueden adoptar varias disposiciones pero la hexagonal con un pocillo central es la común: 5 mm de diámetro y separados entre sí 2 mm. En cada prueba debe incluirse también un control positivo débil. Las placas se incuban durante una noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda y se examinan después para observar las líneas de precipitado. Si es necesario, las placas pueden incubarse durante otras 24 horas. (OIE, 2004).

La IDAG utiliza como antígeno el VMV o el VAEC. Los anticuerpos que se detectan van dirigidos a la proteína de superficie gp135, la proteína de cápside p25 en el caso de VMV y la p28 en caso de VAEC. Este antígeno es soluble y no fraccionado. Debido a la similitud antigénica y genómica del VMV y VAEC, es posible la detección de dicha enfermedad en el ganado caprino. (Juste *et al*, 2001).

Se reporta que el antígeno viral de VAEC es más sensible que el antígeno de NPO para la detección de anticuerpos anti VAEC, por lo tanto el antígeno viral de NPO tiene un limitado valor para el uso diagnóstico de VAEC (Knowles *et al*, 1993).

Recientemente se ha propuesto que para la reducción de costos de las pruebas diagnósticas, los sueros de cada animal deben ser probados en grupos conformados hasta por sueros de 8 animales, siendo lo óptimo 5. Posteriormente, los grupos positivos

se pueden corroborar y comprobar uno por uno, con la ayuda de una prueba complementaria (Brinkhof *et al* , 2007).

1.5.2.2. ELISA

1.5.2.2.1 Antecedentes

El desarrollo de los métodos de ELISA han mejorado indudablemente el diagnóstico de las infecciones por LvPR, y ésta ha evolucionado constantemente hacia su optimización, pudiendo distinguir tres generaciones en cuanto a las características de los antígenos y conjugados utilizados. (Juste *et al*, 2001). Suelen ser las más sensibles y específicos (Pero en general todas detectan la mínima cantidad de 0,0005 ug/ml de anticuerpos en el suero. (VIH y SIDA, 1998)

1.5.2.2.2 ELISA de primera generación:

También llamados ELISAS de virus completo, el cual era obtenido a partir de los sobrenadantes de cultivos virales altamente purificados, y en los que los conjugados eran sueros policlonales (Houwens *et al*, 1982). Como consecuencia de la presencia de proteínas celulares copurificadas con las virales. Frecuentemente se producían reacciones inespecíficas. (Juste *et al*, 2001).

1.5.2.2.3 ELISA de segunda generación:

Basada en la utilización de anticuerpos monoclonales y antígenos de gran pureza. Esto era posible por técnicas de recombinación de ADN en cultivos bacterianos de E. coli, mediante la cual es fácil la obtención de grandes cantidades de antígeno viral altamente purificado. Entre dichas proteínas se encuentran la p25, y la gp 135 permitiendo una detección mas fiel de la infección, ya que en un principio la respuesta inmune se dirige frente a la proteína p25, mientras que en los estadios mas avanzados de la enfermedad la respuesta es predominantemente hacia las proteínas transmembranales (Houwens y Nauta 1989).

1.5.2.2.4 ELISA de tercera generación:

Basada en oligopéptidos sintéticos con mayor pureza estructural. Estos oligopéptidos de la envoltura viral forman parte de epítomos inmunodominantes y mejoran considerablemente la especificidad de la prueba pero reducen su sensibilidad, por lo que se asocian a proteínas recombinantes del núcleo viral para mejorar sus resultados. (Saman *et al* ,1999).

Según su diseño para reconocer la presencia de anticuerpos se habla fundamentalmente de cuatro tipos de ELISA diferentes:

1.5.2.2.5 ELISA indirecto:

Consiste en la fijación del antígeno en la placa al cual se unen los anticuerpos presentes en la muestra. Es una prueba altamente sensible, siendo en comparación más sensible que la prueba competitiva.

1.5.2.2.6 ELISA competitivo

Compiten dos anticuerpos por la unión antígeno anticuerpo. Es altamente específica y aumenta esta característica al compararla con el método indirecto. En las ELISAS de competición se enfrentan el antígeno viral, anticuerpos monoclonales o policlonales y el suero problema. Fevereiro *et al* 1999 enfrentan el suero problema con anticuerpos monoclonales a un antígeno del VMV, la sensibilidad de esta ELISA de competición fue del 96% y una especificidad del 78%.

También existen las ELISAS denominadas de tipo sandwich y de captura.

1.5.2.2.7 Consideraciones de la prueba

La estirpe viral usada en la prueba de ELISA puede fallar en la detección de anticuerpos específicos contra algunas cepas de campo. Así una ELISA que contenga antígenos derivados de estirpes locales de interés epidemiológico en cada área de estudio ha sido propuesta (Grego *et al*, 2005).

La técnica de ELISA indirecta utilizando proteínas recombinantes como p55 (*gag*), p25 (*gag*), p16 (*gag*), p14 (*gag*), p44 (TM), gp 135 (*env*) y la gp46 (TM) a diferencia de virus completo, tienen como ventaja, el ser de una mayor pureza.

Kwang *et al*, 1993 presentaron una ELISA indirecta con una glicoproteína recombinante de la región transmembranal (TM) procedente del lentivirus ovino. Los autores demostraron una mayor sensibilidad y especificidad que la IDAG. Posteriormente Kwang *et al* 1995, describe una ELISA-i de 3 péptidos distintos de la región TM, de esta manera aumentan la sensibilidad de la técnica, los autores argumentan que las ELISAs de segunda generación ofrecen mejor capacidad diagnóstica. Clavijo y Thorsen, 1995, presentaron resultados de una ELISA-i de proteína transmembranal (TM), la sensibilidad fue del 98,8% y la especificidad fue del 97,2%, sin embargo, los autores manifestaron que al utilizar en paralelo un ELISA-i (TM) y un ELISA-i de proteína recombinante (p28) aumentaría la sensibilidad, permitiendo detectar un mayor número de falsos negativos. Saman *et al*, 1999 utilizaron como antígeno una proteína recombinante p25 y un péptido derivado de la región inmunodominante de la proteína transmembranal, gp 46. La sensibilidad de la ELISA-i obtenido fue 99,5% y la especificidad 99,3%.

Se ha declarado que se puede obtener una sensibilidad y una especificidad equivalentes cuando se realiza el diagnóstico utilizando dos ELISA que contiene antígenos diferentes y se basan en diferentes principios de ensayos (Hidalgo e Higuera, 1997).

En la actualidad se exige una atención prioritaria a las acciones preventivas y de control de enfermedades. Para ello es necesario contar con instrumentos eficaces para el diagnóstico, de modo que sea posible prevenir la entrada de animales infectados en países, zonas o rebaños libres, o bien poner en marcha planes de control y erradicación. (Corrales *et al*, 2003).

1.5.2.3 Western blot

1.5.2.3.1 Objetivos de la prueba

Esta prueba tiene como objetivo confirmar los resultados obtenidos por otras pruebas diagnósticas; así mismo, esta técnica tiene fundamentos distintos y más específicos. Por lo general, se utiliza para la confirmación de los sueros positivos, pero en casos determinados puede emplearse para descartar a individuos verdaderamente seronegativos, dada su mayor sensibilidad de 1-10 ng (Ortiz de Lejarazu *et al*, 1998). La prueba de WB puede mostrar información importante acerca de patrón contra proteínas específicas. (Reina, 2008) y permite una discriminación puntual de la especificidad a los distintos componentes protéicos del virus (Ortiz de Lejarazu *et al*, 1998). El pronto diagnóstico es esencial en la prevención eficiente y control de la infección por LvPR y no debe estar basada en los signos clínicos, ya que éstos pueden estar ausentes durante toda la vida del animal. La técnica de WB, permite evaluar una cinética de anticuerpos a lentivirus desde el inicio de la enfermedad (Ramírez, 2002).

1.5.2.3.2 Fundamento

Los componentes virales son separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida, y posteriormente transferidos a papel de nitrocelulosa, por métodos físicos y/o eléctricos, dicho papel es cortado en tiras en las que se han transferido todas los componentes proteínas y glicoproteicos del virus. (Ortiz de Lejarazu *et al*, 1998).

La técnica de WB consiste, básicamente, en la incubación de una de esas tiras con el suero problema durante un tiempo que oscila entre 2 a 4 horas hasta 18 horas, tras lo cual se revela la presencia de anticuerpos frente a las diferentes proteínas del virus que son evidenciadas mediante reacciones inmunoenzimáticas de distinta configuración

dependiendo del fabricante. (Figura 2). El resultado es la aparición de bandas coloreadas de mayor o menor intensidad, algo muy utilizado como prueba confirmatoria a nivel mundial para el caso del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Ortiz de Lejarazu *et al*, 1998). Cuadro 5.

Zanoni *et al*, 1989 prueba sueros caprinos que detectan las proteínas (15, 28, 40, 130) del VMV, el cual fue usado como antígeno, y algunos de los sueros eran negativos a la prueba de ELISA. Demostrando Así que la prueba de WB era más sensible que la de ELISA y reducía falsos negativos. Cuadro 2.

Cuadro 5: Bandas de reactividad frente a VIH en la técnica de WB

Naturaleza/Descripción	VIH 1	VIH 2	Aspecto de la banda reactiva
Gp precursora (env)	gp160	gp140	Ancha (3-4 mm). Ligeramente difusa
gp externa (env)	gp120	gp125	Ancha (3-4 mm). Ligeramente difusa
Transcriptasa reversa (pol)	p66	p68	Moderadamente estrecha (1-2 mm). Nítidas. Entre la p66 y las p55 y 51 suelen existir bandas de antígeno de origen celular: Estrechas y nítidas
precursora (gag)	p55	p56	Estrechas y nítidas
Transcritasa reversa (pol)	p51	p53	Estrechas y nítidas
Gp transmembranaL	gp41	gp36	Ancha (5-6 mm). Francamente difusa
Endonucleasa	p32	p34	Ancha (3-4 mm). Generalmente nítida
Proteína del core (gag)	p24	p26	Ancha (4-5 mm). Nítida
Matriz (gag)	p17	p16	Ancha (4-5 mm). Difusa
Matriz (gag)	p9		Ancha (3-4 mm). Francamente difusa

La lectura e interpretación de los resultados por WB debe hacerse siguiendo las siguientes pautas. (Ortiz de Lejarazu *et al*, 1998).

1.5.2.3.3 Interpretación de resultados

Existen distintos criterios de positividad para el WB el más adecuado es el propuesto recientemente por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que justifica la técnica, por ser más sensible cuando se manejan sueros de muy variada procedencia poblacional. Adoptando este criterio un suero es considerado positivo cuando presenta reactividad al menos frente a 2 glicoproteínas de las tres principales proteínas estructurales, que posee el virus (gp160, gp120 y gp41). Ver Cuadro 5. Los sueros negativos no deberán mostrar reactividad frente a ninguna de las proteínas presentes en la tira (Ortiz de Lejarazu *et al*, 1998).

Con el WB pueden darse falsos negativos en casos de exposición reciente al virus. En los sueros indeterminados, el seguimiento debe prolongarse al menos durante 6 meses para verificar si existe un cambio en el patrón de anticuerpos hacia la positividad o por el contrario desaparecen las bandas detectadas inicialmente. En conclusión, la técnica de WB es una prueba de confirmación que en el momento actual es fácilmente adaptable a laboratorios de equipamiento medio, que no tengan un excesivo número de muestras para confirmar y que requiere un cierto entrenamiento para su interpretación y lectura (Ortiz de Lejarazu *et al* 1998). Además de que cada país tiene un criterio de positividad al VIH. (Asociación Monarcas México, 2008). Ver cuadro 6.

Por lo general se considera que el WB es una prueba altamente específica con menos de 1 falso positivo (en relación a la IFI o RIPA) por cada 20.000 diagnósticos, mientras que la tasa de falsos negativos es, en población donante de sangre, de 1 por cada 250.000 o más. (VIH y SIDA, 1998).

Cuadro 6: Diversos criterios para que una prueba de WB resulte VIH positiva.

		África	Australia	Reino Unido	USA CDC1	USA CDC2	USA FDA	USA CRUZ ROJA	CRSS	OMS
Gen ENV	p160 p120 p41	Dos cualquiera	Uno o más	Uno o más	P120/ p160 y p41	p120/ p160 ó p41	Uno o Mas	Uno o mas	Uno o Mas	Dos cualquiera
Gen POL	p68 p53 p32	Opcional	Tres cualquiera	p31			p32	Cualquiera	p32	
Gen GAG	p55 p40 p24	Opcional	Tres cualquiera	p24		p24	p24	Cualquiera	p24	

Se observa que cada país tiene sus propios criterios de positividad. *Asociación monarcas México a.c. Test de western blot, 2008*

1.5.3. Validez de una prueba diagnóstica. Sensibilidad y Especificidad

Es evidente que una buena prueba diagnóstica es evidente que debe ofrecer resultados positivos en enfermos y negativos en sanos. Además debe reunir tres condiciones: **Validez:** (grado en el que mide lo que se supone debe medir); **Reproductividad** (capacidad de ofrecer los mismos resultados cuando se repite en circunstancias similares) y **Seguridad:** (que viene determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo). La sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica son medidas de su validez (Fernández y Díaz, 2003)

Sensibilidad (fracción de verdaderos positivos (FVP))

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad de la prueba diagnóstica para detectar la enfermedad. Cuando los datos obtenidos a partir de una muestra de pacientes se clasifican en una tabla de contingencia de 2X2, es fácil estimar a partir de ella la sensibilidad como la proporción de pacientes enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica. (Molinero, 2002) Es decir:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

VP= Verdaderos Positivos y FN= Falsos Negativos

Especificidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos. A partir de una tabla de contingencia de 2X2, la especificidad se estima como: (Altman y Bland 1994)

$$\textit{Especificidad} = \textit{VN} / (\textit{VN} + \textit{FP}) \quad \text{VN= Verdaderos Negativos y FP= Falsos Positivos}$$

1.6 Formas de transmisión

Los ovinos y caprinos se infectan con LvPR fundamentalmente después del nacimiento por consumo de calostro y leche de ovejas infectadas y por contacto horizontal con animales infectados que excretan virus en sus secreciones pulmonares. (Berriatua *et al*, 2003) a través de fomites y máquinas de ordeño (Crawford y Adams 1981; Lerondelle *et al*, 1999).

1.6.1. Transmisión aerógena

Puesto que los LvPR infectan principalmente monocitos y se replican en macrófagos y éstos abundan en el pulmón, Houwers *et al* 1990 sugieren que este órgano es una fuente de gran cantidad de virus libre e integrado. La transmisión horizontal se relaciona fuertemente con el sistema de producción ovino, el clima y la mala ventilación. (Houwers, 1990).

1.6.2. Transmisión lactógena

De Boer *et al*, 1979 aislaron lentivirus ovinos a partir de leche de hembras seropositivas, dos a tres meses después de la lactancia y detectaron anticuerpos específicos en los corderos que fueron amamantados con leche infectada.

Otros autores han demostrado también la presencia de VMV en calostro y leche (Lerondelle *et al*, 1995). y la posibilidad de infectar corderos y cabritos tras la ingestión de calostro con LvPR. (Schipper *et al*, 1983).

Generalmente la infección se atribuye a macrófagos infectados presentes en calostro y leche (Mselli-Lakhal *et al*, 1999). Sin embargo, en cultivos de células epiteliales mamarias (CEM) de cabras infectadas, se ha detectado la presencia de proteínas *gag* y *env* en los sobrenadantes, lo que sugiere que las células producen partículas virales de forma activa.

1.6.3. Transmisión intrauterina

La opinión generalizada es que la transmisión congénita del VMV es muy poco frecuente; Brodie *et al*, 1994 amplificaron VMV mediante PCR en 10% de fetos de madres de un rebaño infectado y estos autores sugieren que un título viral alto en la madre puede llegar a ser un factor importante en la transmisión uterina.

Lamara *et al* ,2002 describen la replicación *in vitro* del VAEC en células de la granulosa y del oviducto de cabra.

1.6.4. Transmisión sexual

Se ha detectado la presencia de antígenos virales en las células epiteliales del aparato reproductor de machos caprino, mediante la técnica de Inmuhistoquímica (Martínez, 2003).

1.7. Medidas de prevención y control

Hasta la fecha, no hay tratamientos comerciales eficaces contra los retrovirus animales y los programas de control de los LVPR van dirigidos a la erradicación del agente infeccioso (Houwens , 1990) (Luján-Badiola 2001).

Los Islandeses demostraron que es posible erradicar el virus en un país, mediante sacrificio de rebaños completos afectados por la enfermedad seguido de un periodo de vaciado sanitario y reemplazo con animales de otros rebaños libres de infección (Houwens, 1990) (Luján-Badiola 2001) (Palsson 1978).

Además se han descrito varios metodos, eficaces para eliminar los LvPR de rebaños infectados, y la elección de estos métodos, depende de la prevalencia de la infección, del valor genético de los animales del rebaño y de los costos que sea posible asumir. (Houwens, 1990) (Peterhans *et al*, 2004)

Cuadro 7.- Medidas de prevención y control

1.- Realizar un diagnóstico a tiempo y hacer el seguimiento serológico cada 6 meses.
2.- Separar al hato en dos grupos (seropositivos-seronegativos). Aislamiento de la reposición seronegativa.
3.- Reemplazo total o eliminación gradual de animales reemplazando a los seropositivos, con animales libres de LvPR o sacrificio de los seropositivos.
4.- Aislamiento de los recién nacidos.
5.-Encalostamiento seguro (calostro artificial, calostro de bovino, calostro congelado calostro procedente de cabras seronegativas o el tratamiento térmico a 56°C durante 60 min. disminuye la presencia de VAEC hasta niveles inferiores a la titulación del virus (Adams <i>et al</i> , 1983).
6.- Utilización de machos seronegativos para realizar las montas.
7.-Ordeñar primero a las cabras seronegativas y posteriormente a las seropositivas.
8.-Pedir semen negativo a LvPR.

Estas medidas son altamente recomendables, para tratar de controlar y o radicar la enfermedad.(Reina 2008, Contreras y Corrales 2003).

1.8. Panorama de LvPR en México

La importancia de los LvPR solo puede entenderse de manera global, dado que las pérdidas económicas (tanto directas como indirectas), empiezan a extenderse en diversos países, en las restricciones de movimientos, venta y comercialización de animales vivos procedentes de rebaños infectados. (Luján y Badiola, 2001).

La frecuencia de animales infectados por VAEC es mayor en explotaciones altamente tecnificadas, donde las cabras son producidas y mantenidas en establos con ordeña mecanizada y programas de mejora genética.

Aunque en México predominan las explotaciones caprinas no tecnificadas, el país no está exento de VAEC, ya que la fuente de semen y animales de reemplazo en los programas de mejora genética de nuestros hatos provienen de los países más tecnificados. (Salazar *et al*, 2003).

La primera publicación científica sobre la presencia de VAEC en México apareció en 1984 con una seroprevalencia registrada de 27.1% (Trigo, 1991). Identificándose al virus en hatos caprinos de diferentes estados. En el año 2003 se realizó un estudio serológico de cabras en el estado de Yucatán con la técnica de IDAG y esta detectó anticuerpos contra las proteínas gp 135 y p28 mostrando una seropositividad de 3.6%. (Torres, 2003). Otro estudio realizado a 1211 caprinos residentes en el altiplano central con la prueba de ELISAc reveló una seroprevalencia de 39.35%. (Vázquez *et al*, 2008).

En un estudio macroscópico en vísceras decomisadas en el rastro de la ciudad de México se reportan observaciones macro y micro de lesiones muy sugestivas de VMV (Eguiluz y Aluja, 1981). En el año de 1986 se decide realizar un estudio serológico en México para la detección de anticuerpos contra NPO el cual tuvo como resultado un 8.2% de animales positivos (Molina *et al*, 1986).

Otro estudio donde se identificaron anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos ovinos por la técnica de Inmunotransferencia y ELISA indirecta, se evaluaron 70 sueros provenientes de 5 estados de la república, un suero resulto positivo a ELISA y 20 resultaron positivos por la técnica de Western blot identificando varias bandas entre ellas la gp 135.(Pérez 2005); así mismo en los ovinos importados de los Estados Unidos de Norte América, se han encontrado altos porcentajes de seroprevalencia del VMV 26% en el año 2006 (De la concha, 2006).

Cabe mencionar la situación ocurrida en el año 2007 , donde se realizó una exportación a Colombia de 265 ovinos, donde resultaron 7 animales positivos a Maedi Visna , por lo que tuvieron que sacrificarse 284 animales. (Urcastegi, 2007) teniendo un costo económico aproximado de 3 millones de pesos.

Aún no hay datos sobre la situación de la enfermedad a escala nacional. Esta carencia de información y la importancia de los pequeños rumiantes se precisa llevar acabo un proyecto para determinar la prevalencia de LvPR en los hatos caprinos en México y procurar la condición de país libre es una medida urgente. (Tórtora, 2008; Salazar *et al*, 2003).

2. Justificación

La mayoría de las pruebas comerciales de diagnóstico serológico utilizadas para detectar las infecciones causadas por LvPR; se basan en la detección de anticuerpos; teniendo ventajas y desventajas como podría ser el usar como antígeno: el virus completo, lo cual causa una elevada cantidad de falsos positivos; péptidos sintéticos o solo una o dos proteínas de las más comunes, conservadas y antigénicas del virus, lo que no permite detectar sueros que presenten anticuerpos contra otras proteínas no incluidas en dichas pruebas. Por lo que es muy común dar un diagnóstico falso para esta enfermedad en particular, y esto trae como consecuencia la convivencia de animales seropositivos con animales sanos y si el objetivo de un productor es erradicar la enfermedad o exportar animales nunca podrá lograrlo.

Otro de los problemas presentes para establecer un diagnóstico es que todos los kits comerciales son de importación, por lo que su costo es sumamente elevado y además de que contienen proteínas del virus, proveniente de cepas virales de otros países.

Debido a esto para hacer un análisis serológico con especificidad cercana al 100% es necesario llevar a cabo la prueba de WB como se hace en el caso del diagnóstico de VIH. Se han publicado diversos trabajos en donde se menciona que en cada país se manejan diferentes criterios de evaluación para dar a conocer un diagnóstico, por lo que es preciso hacer una estandarización de la prueba de WB con las cepas virales del país para una mejor evaluación diagnóstica en los hatos de pequeños rumiantes.

En México no se han hecho estudios actuales al respecto, por lo que se desconoce la situación serológica actual frente a LvPR en los hatos y por consiguiente las proteínas virales que circulan en los rebaños del país.

Las investigaciones científicas y avances en el diagnóstico de VIH, nos dan pauta para tomarlas como referencia para hacer un diagnóstico certero y permitirnos detectar casi a cualquier individuo seropositivo bajo la técnica de WB.

3. Objetivo general.

Evaluar el diagnóstico serológico a LvPR obtenido mediante 3 pruebas comerciales en ovinos y caprinos de la FES Cuautitlán.

Objetivos particulares

1. Obtener sueros de ovinos y caprinos albergados en la FES-Cuautitlán.
2. Realizar el diagnóstico serológico a LvPR utilizando el Kit serodiagnostic CAEV-IDG P28 CAPRINE ARTHRITIS- ENCEPHALITIS VIRUS. INSTITUT POURQUIER- FRANCE (IDAG).
3. Realizar el diagnóstico serológico a LvPR usando el Kit MAEDI- VISNA / C.A.E.V SERODIAGNOSTIC ELISA TEST SERUM. INSTITUT POURQUIER FRANCE (ELISAi).
4. Realizar el diagnóstico serológico a LvPR mediante el Kit CAPRINE ARTHRITIS- ENCEPHALITIS VIRUS ANTIBODY TEST KIT, CELISA. VMRD Inc . USA (ELISAc).
5. Confirmar el diagnóstico serológico a LvPR por Western Blot Casero (WBc)
6. Determinar sensibilidad y especificidad de las pruebas, así como la concordancia entre ellas, utilizadas para el diagnóstico serológico a LvPR en ovinos y caprinos.

Hipótesis

Algunas pruebas serológicas para el diagnóstico de laboratorio a LvPR se basan en la detección de anticuerpos generados contra una o dos proteínas principales del virus, como es la proteína de 28 kDa de (p28) o la glicoproteína de 135 kDa (gp 135). Dependiendo de la técnica que se use para detectar anticuerpos contra estos antígenos virales, existirá diferencia en las pruebas a la sensibilidad y especificidad.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Agropecuaria, Módulo de Reproducción y Genética y en el laboratorio L-504 de Virología, Genética y Biología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en colaboración con el Laboratorio de Inmuno-Virología de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. (Preparación de reactivos)

5. Materiales y Métodos

5.1. Toma de muestras

Se tomaron 3 ml de sangre por punción de la vena yugular usando el sistema de vacutainer a 213 animales del Centro de Enseñanza Agropecuaria y 55 del Módulo de Reproducción y Genética de la FES-Cuautitlán.

Cuadro 8: Especie y raza por tipo de producción

Ovinos Pastoreo	Ovinos estabulado	Caprinos semi-intensivo	Caprinos intensivo	Total de animales
90 Columbia	19 Columbia 1 Romanov	32 Criollos 3 Toggenburg	123 Criollos	268

Se muestra la distribución de pequeños rumiantes muestreados, por especie, raza y área de producción tal de animales a evaluar.

La muestra de sangre se dejó reposar durante una hora, posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, se separó el suero y fue almacenado en un vial de plástico de 1.5 ml a -20°C hasta el momento de realizar las pruebas de diagnóstico.

A los animales muestreados adicionalmente se les identificó por sexo, la edad y sí al momento de la toma de muestra presentaban signos clínicos de la enfermedad. Ver apéndice 3.

5.2 Pruebas serológicas para el diagnóstico de LvPR de ovinos y caprinos.

Para la realización de cada una de las pruebas de diagnóstico, se descongelaron los sueros para su utilización (a temperatura ambiente durante 30 min).

El diagnóstico serológico a LvPR de ovinos y caprinos se realizó mediante el uso de las siguientes pruebas comerciales, usando las técnicas especificadas por cada fabricante (Apéndice 1):

(a) IDAG. Kit serodiagnostic caev-IDG Caprine Arthritis- Encephalitis Virus. Institut Pourquier- Montpellier- France, que se basa en la detección de anticuerpos contra la p28, usando la técnica de Inmunodifusión.

La presencia de una línea de color blanco observada a través del gel entre el pozo central y el periférico. Se considera como resultado positivo a AEC y su ausencia se considera como resultado negativo a AEC.

(b) ELISAI. (Maedi- Visna / C.A.E.V Serodiagnostic Elisa Test Serum. (Institut Pourquier France), basada en la detección de anticuerpos contra p25 y un péptido transmembranal de MVV mediante la técnica de Elisa indirecto. Para la interpretación del resultado de cada muestra se tiene que calcular el porcentaje del cociente:

$$\% \text{ cociente} = (\text{densidad óptica de la muestra} / \text{densidad óptica del control negativo}) \times 100$$

Resultando como:

Muestras con % cociente $\leq 110\%$ se considera que los animales no han tenido contacto con antígenos virales AEC o MAEDI VISNA.

Muestras con $110 < \%$ cociente < 120 considera a los animales sospechosos de haber tenido contacto con antígenos virales AEC o MAEDI VISNA

Muestras con % cociente $\geq 120\%$ considera que los animales han tenido contacto con antígenos virales AEC o MAEDI VISNA.

(c) ELISAc. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Antibody Test Kit, Celisa VMRD Inc. USA. Basada en la detección de anticuerpos contra la glicoproteína 135 de LvPR. Para obtener los resultados se tiene que calcular el porcentaje de inhibición (%I) de cada problema mediante la siguiente fórmula:

$$\%I = (\text{Densidad Óptica del problema}) \times (100) / (\text{Media de la Densidad Óptica del Control Negativo})$$

Si una muestra produce un $\%I > 35$, se considera positiva a AEC.

Si una muestra produce un $\%I \leq 35$ se considera negativo a AEC

(d) Western Blot (Casero)

Primeramente se realizó la separación electroforética de 250 μ l por carril de las proteínas estructurales de un retrovirus caprino a partir de un lisado del VAEC aislado en México y obtenido mediante una cinética en cultivo celular (Ramírez, 2002) en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12%. La electroforesis se efectuó a un voltaje constante de 100 volts. La electrotransferencia fue de acuerdo al método de Towbin *et al*, 1964, con 200 mA constantes durante 2 horas.

Posteriormente la membrana de nitrocelulosa se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente en solución de bloqueo (ver apéndice 2)

La inmunoreacción se realizó sobre una tira de nitrocelulosa por cada uno de los sueros colocando 500 ul de cada suero problema diluido (1:100) en solución de bloqueo, incubado durante 1 hora a 37°C, se realizaron 3 lavados (ver apéndice) durante 5 min cada uno; posteriormente se adicionaron 500ul del conjugado diluido (1:1000) en solución de PBS con Tween 20 al 0.2% de (Anti IgG de cabra peroxidado) incubándose durante 1 hora a 37°C, luego se realizaron 3 lavados. Finalmente se reveló con diaminobencidina en PBS y peróxido de hidrógeno. (Apéndice 2).

5.4 Sensibilidad y Especificidad de las pruebas diagnósticas.

Se realizaron tablas de contingencia de 2X2 para la prueba diagnóstica IDAG, ELISAI, ELISAc y Wbc contra el número de animales que tenían o no signos clínicos de la enfermedad. A partir de las comparaciones se determinó el número de verdaderos positivos (*VP*) y de falsos negativos (*FN*) con el fin de calcular la sensibilidad. Además se determinó el número de verdaderos negativos (*VN*) y de falsos positivos (*FP*) para determinar la especificidad de acuerdo con la metodología de Fernández y Díaz, 2003; Molinero 2002; Altman y Bland 1994. (Mc Nemar (χ^2) ($p < 0.05$). IC 9% y 3° de libertad).

Para analizar la concordancia entre las pruebas se utilizó (estadística paramétrica) el índice Kappa. (WinEpiscope 2.0) (<http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope/>).

6. Resultados

Se obtuvieron un total de 268 sueros de los ovinos y caprinos del Centro de Enseñanza Agropecuaria y del Módulo de Reproducción y Genética de la FES-Cuautitlán

6.1 Resultados serológicos de ovinos y caprinos.

- a) Mediante IDAG resultaron un total de 12 positivos y 256 negativos a LvPR. (Cuadro 10).
- b) Por ELISAi resultaron 91 positivos y 177 negativos a LvPR. (Ver cuadro 10).
- c) Utilizando ELISAc se obtuvieron 52 positivos y 173 negativos.

Cabe mencionar que esta última técnica solo permitió realizar la evaluación de 225 sueros, quedando sin evaluar por este kit 43 sueros.

Cuadro 9.- Resultados de 3 pruebas serológicas comerciales a LvPR.

Prueba de diagnóstico a LvPR	Número de casos diagnosticados positivos	Número de casos diagnosticados negativos.
IDAG	12 (4.47 %)	256 (95.52 %)
ELISA i	91 (33.95 %)	177 (66.04 %)
ELISA c	52 (23.11 %)	173 (76.88 %)

La prueba de IDAG diagnosticó 4.47% (n=12) de 268 animales entre ovinos y caprinos. La prueba de ELISAi diagnosticó 33.95 % (n=91) de 268 animales entre ovinos y caprinos. La prueba ELISAc diagnosticó 23.11% (n=52) de 225 animales entre ovinos y caprinos

Cuadro 10.-Resultados del diagnóstico a LvPR por especie y tipo de producción.

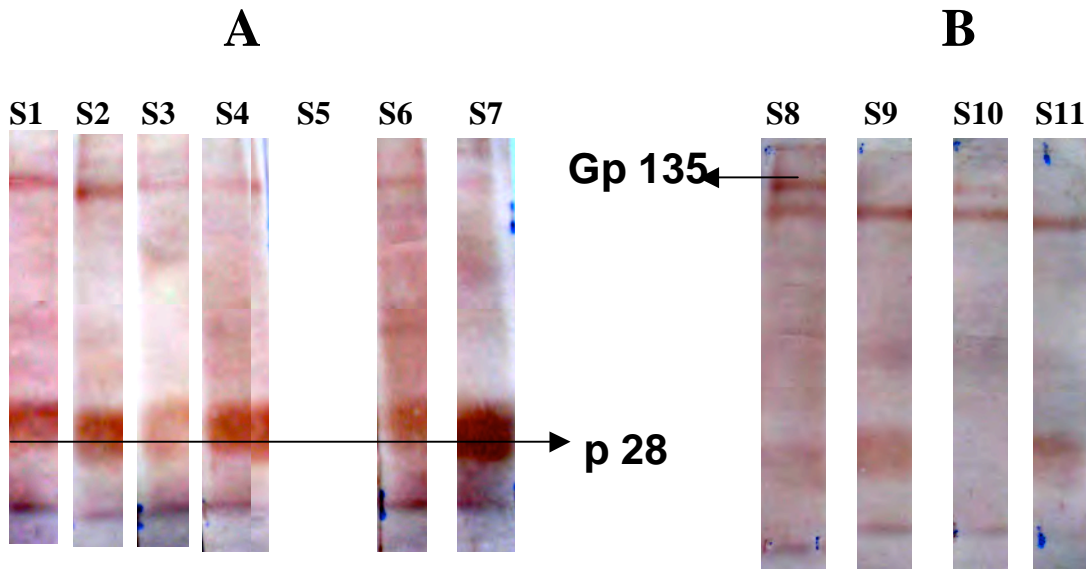
Especie por tipo de producción.	Ovinos Pastoreo	Ovinos estabulado	Caprinos semiintensivo	Caprinos intensivo	Total de animales
Pruebas	+/-	+/-	+/-	+/-	
IDAG	0/90	0/20	0/35	12 / 123	268
ELISA i	0/90	0/20	0/35	91 / 177	268
ELISA c	0/90	0/20	0/35	52 / 173	225

Es importante mencionar que del presente cuadro los caprinos en producción intensiva fueron lo únicos donde se detectaron animales seropositivos.

6.2. Western blot casero.

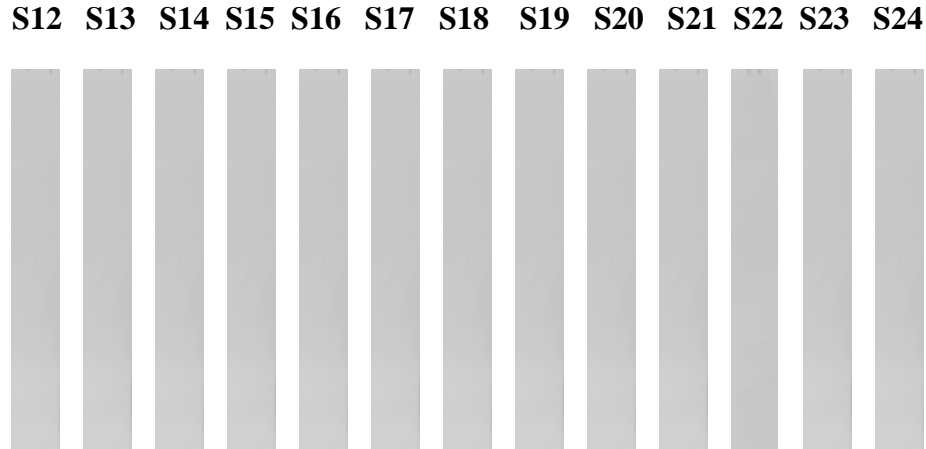
Los 11 sueros de caprinos que resultaron previamente positivos a las 3 pruebas comerciales (IDAG, ELISAI, ELISAc), se evaluaron por la técnica de WbC y se logró evidenciar 2 bandas inmunoreactivas, una la p28 kDa y la gp135 kDa (ver figuras A y B).

Figura 2. WbC de caprinos seropositivos a las pruebas comerciales.



No. de Caprinos seropositivos: S1 (No. 248), S2 (No. 251), S3 (No. 255), S4 (No. 256), S5 (No. 266), S6 (No. 270), S7 (No. 290) S8 (No. 291), S9 (No. 292), S10 (No. 300), S11 (No. 326). Ver Apéndice 3.

Figura 3. WBc de sueros caprinos negativos a las pruebas comerciales.



No. de Caprinos seronegativos S12 (No. 244), S13 (No. 249), S14 (No. 252), S15 (No. 263), S16 (No 284), S17 (No 293), S18 (No 296) S19 (No 299), S20 (No 304), S21 (No 305), S22 (No 306) S23 (No 309) S24 (No 310). Los 13 animales que resultaron negativos a las 3 pruebas (IDAG, ELISAi, ELISAc, en la cual no se observan bandas inmunoreactivas, confirmando la ausencia de anticuerpos contra las proteínas virales de AEC.

6.3 Sensibilidad y Especificidad de las pruebas para el diagnóstico a LvPR

Para determinar la sensibilidad y especificidad se construyeron las siguientes tablas de contingencia de IDAG (A), ELISAc (C) y WBc (D) contra ELISAi para realizar los cálculos con las fórmulas descritas en materiales y métodos. Así mismo para unificar grupo y realizar el análisis estadístico, se redujeron a 225 muestras.

Cuadro 11: Resultados del análisis de sensibilidad y especificidad

	ELISAi +	ELISAi -	Total	
IDAG +	12	0	12	Sensibilidad: 19 % Especificidad: 100 % (p < 0.0001)
IDAG -	51	202	213	
Total	91	162	225	

	ELISA i+	ELISA i-	Total	
ELISA c +	50	2	52	Sensibilidad: 79.4 % Especificidad: 98.8 % (p<0.0098)
ELISA c -	13	160	173	
Total	13	212	225	

	ELISA i +	ELISA i -	Total	
WB+	11	0	11	Sensibilidad: 100 % Especificidad: 100 % (p =0.0009)
WB -	0	13	13	
Total	2	22	24	

Se observa la sensibilidad y especificidad de cada prueba IDAG, ELISAc y WB.

La sensibilidad de las pruebas WbC, ELISAc e IDAG, cuando se analizaron contra ELISAi (prueba de oro) fueron 100 % (p=0.0009), 79.4% (p<0.0098) y 19% (p<0.0001) respectivamente. Referente a la especificidad de las pruebas WbC, ELISAc e IDAG, fueron 100 % (p=0.0009), 98.8 % (p<0.0098) y 100% (p<0.0001) respectivamente.

A los datos anteriores se les determinó el coeficiente Kappa o la concordancia entre variables cualitativas. (Anexo 4): Encontrándose lo siguiente: Al comparar IDAG contra ELISAi (0.264) y ELISAc (0.253), se observó una concordancia mínima y una concordancia de 0.828, denominada casi perfecta entre ELISAi y ELISAc.

Discusión

El diagnóstico de las infecciones causadas por LvPR puede hacerse clínicamente aunque solo de un 12 a un 40% de los animales desarrollan signos clínicos (aumento carpal periarticular principalmente) (Knowles et al; 1993) por lo que el método más rápido y de apoyo para realizar el diagnóstico a la infección de LvPR es a través de la serología. Las pruebas serológicas constituyen una herramienta fundamental para la detección de la infección en un rebaño y se cuenta con una gran variedad de métodos que incluyen IDAG, ELISA, y WB (D Andrés *et al*, 2005) de las cuales, la IDAG y ELISA, son recomendadas como pruebas de referencia por la OIE (OIE 2004). Dichas técnicas también han sido utilizadas en los pocos estudios de prevalencia de LvPR realizados en México los cuales han mostrado una amplia diferencia entre ellos en la seropositividad (Trigo 1991; Torres 2003; Vázquez et al, 2008). Con estos antecedentes y debido a las características de reacción cruzada entre los LvPR, se procedió a evaluar los sueros por diferentes técnicas para el diagnóstico serológico de lentivirus (IDAG, ELISAI, ELISAc y WB), como lo han hecho Zanoni y Peterhans, 1989; Pérez 2005 y Ramírez 2002.

La efectividad de un método de diagnóstico es medida por los datos de sensibilidad y especificidad que ofrece cada casa comercial. En el caso de las pruebas que hemos usado ninguna contiene estos datos, solo estudios publicados de diversos autores tienen sus datos al respecto (D. Andrés *et al*, 2005) pero no existe una homología entre las diferentes pruebas y además no utilizan el mismo antígeno, por lo tanto no se ha podido determinar un método de referencia universal. Además la OIE sugiere un mínimo de 300 muestras seropositivas y 1000 seronegativas que se deben usar para hacer una estimación preliminar no evaluado en todos los kits de diagnóstico (D Andrés *et al*, 2005).

La prueba serológica tamiz (IDAG) que se usa de rutina para el diagnóstico a LvPR (Daltabuit, 2003; Brinkhof y Maanen, 2006) requiere una concentración mínima de 30 ug/ml. de anticuerpos (Tizard, 1996) y solo serán positivos los sueros que contengan esta concentración mínima o más. De ahí que los 12 (4.47%) de 268 sueros que resultaron positivos a LvPR en este estudio, presentaron esta concentración o mayor. Por otro lado la prueba de ELISA presenta mayor sensibilidad (Tizard, 1996; D Andrés *et al*. 2005) y en el presente estudio se utilizaron 3 diferentes estuches

comerciales, los cuales identifican antígenos del virus de MV o AEC, sin especificar el tipo de cepa o variante.

Así mismo diversos autores han mostrado que la prueba de IDAG es poco sensible (Schroeder 1985; Kwang et al 1993) y altamente específica (Brinkhof y Maanen, 2007; D andrés *et al*, 2005) y en el presente estudio se confirmó , ya que se determinó una sensibilidad del 19% ($p < 0.0001$) al tomar como prueba de oro a ELISAI y una especificidad de 100% ($p < 0.0001$). Rosati *et al*, 1994 encontró una sensibilidad semejante a este estudio en donde evaluó el suero de 41 ovinos italianos, obteniendo 14.7% (IDAG relacionada con ELISA). Brinkhof y Maanen, 2007 publican un estudio en donde se evaluó la sensibilidad, obteniendo 86.9% de sensibilidad para ovinos y 67% para caprinos , este resultado fue de un total de 62 ovinos y 18 caprinos usando como antígeno la gp135. Además al ser comparar IDAG con ELISAI y ELISAc, el resultado fue que existe una concordancia mínima para realizar un diagnóstico.

Con base a lo anterior se puede establecer que una prueba diagnostica no reconocerá a todos los animales seropositivos en un hato, dejando sin identificar animales infectados y esto no permitirá un confiable control de la enfermedad, por lo tanto para establecer un diagnóstico más completo se deberán complementar con otras pruebas.

Las pruebas inmunoenzimáticas como es la de ELISA suelen ser las más sensibles y específicos (Pero en general todas detectan la mínima cantidad de 0,0005 ug/ml de anticuerpos en el suero). (Morata y López, 1996) y en este estudio la prueba de ELISA i detectó anticuerpos contra la proteína p28 (33.95%) de 91 animales que resultaron positivos de un total de 268. Esta prueba fue la que mas animales positivos detectó comparada con ELISAc e IDAG, esto puede deberse a que esta prueba detecta simultáneamente anticuerpos dirigidos frente a p25 y un péptido transmembranal (De Andrés *et al*, 2005; Rosati *et al*, 2004). Aunque los anticuerpos frente a p25 se elevan relativamente con facilidad después de la infección los niveles de este anticuerpo muestran un declive una vez que los signos clínicos aparecen (Boshoff *et al* 1997; Houwers y Nauta, 1989). Cabe resaltar que en este estudio esta prueba detectó a todos los animales con el signo clínico de artritis. La prueba de ELISAc, detectó anticuerpos

contra gp 135 en 52 sueros (23.11%) de un total de 225, obteniendo por lo tanto una sensibilidad (comparada con ELISA i) de 79.4 ($p < 0.0098$) y una especificidad de 98.8% ($p < 0.0098$). Además de un valor de Kappa muy alto (0.828), el cual es considerado como cuerdo entre pruebas casi perfecto, esto se interpreta que sus diagnósticos son muy similares. Aunque la respuesta anti-p28 se presenta por lo general a títulos inferiores que la respuesta anti-gp135 (OIE, 2004)

Es importante comentar, que existen cabras infectadas con CAEV que produce una respuesta anti-gp135 en ausencia de una respuesta anti-p28 y viceversa (Rimstad, 1994) (Dawson, 1985), complicando el diagnóstico si no se conoce lo que detecta la prueba comercial. Se sabe que existen anticuerpos frente a la envoltura (gp 46 y gp 135), los cuales aumentan después de la infección y persisten en la fase clínica (Boshoff *et al* 1997; Houwers y Nauta, 1989). Esto ha propiciado estudios hechos con pruebas de ELISAS, utilizando diferentes péptidos, con el fin de detectar un mayor número de animales infectados y evitar por consiguiente resultados falsos negativos (Kwang *et al*, 1994; Clavijo *et al*, 1995; Saman *et al*, 1999). Así la combinación de ambos epítomos (cápside y transmembranal) pueden constituir buenos antígenos para el diagnóstico serológico (Boschoff *et al*, 1997).

Cabe mencionar que la técnica de WB realizada a los animales positivos en las 3 pruebas y los negativos en las 3 pruebas, resultaron ser concordantes, ya que se puede observar la presencia de bandas de inmunoreacción frente a p28 y gp 135 (Ramirez 2002, Pérez 2005, Zanoni 1989) Así Torfason *et al*, 1992, sugieren la utilización de WB como prueba estándar, sin embargo no es usada rutinariamente, ya que no se puede automatizar, pero si puede ser usada como una prueba de oro para el diagnóstico de LvPR. La aparición de bandas visuales, con un correcto peso molecular, dan al observador mayor confianza, mas que una presencia de color como lo es en el caso de ELISA (De Andres *et al*, 2005). En este estudio se observó una sensibilidad y especificidad del 100% ($p = 0.0009$), Vale la pena comentar que este resultado se obtuvo debido al escaso número de muestras a las que se les realizó el WBc, lo que presupone este porcentaje, así varios estudios demuestran que es una prueba mas sensible que la ELISA (Zanoni *et al* 1989; Brodie *et al* 1992; Houwers y Nauta 1989). Las pruebas de ELISA, para el diagnóstico de retrovirus, al igual que en el virus de

inmunodeficiencia humana, sirven de prueba tamiz, para posteriormente confirmar por una prueba de WB como en el presente estudio.

Este estudio aporta información que se debe considerar, ya que permite explicar en parte el limitado éxito de algunos programas de erradicación basados en la identificación de animales positivos solo IDAG (Juste *et al*, 2001). Ya que si es que se hubiera tomado en cuenta solamente el diagnóstico de IDAG, hubieran pasado 65 sueros como falsos negativos. Y se solo se hubiera tomado en cuenta el diagnóstico de IDAG y ELISAi entonces habrían pasado como falsos negativos 2 sueros.

Las pruebas además de apoyar en sistemas de control y erradicación, permiten realizar controles periódicos y comprobar el estado de los animales que se quieran incorporar al rebaño o que se pretendan exportar ya que debido a las características de patogenicidad del virus, periodo de ventana, mutación antigénica, raza, tipo de producción, neutralización de anticuerpos y respuesta inmune se dificulta la detección de animales infectados, por lo que es recomendable hacer la prueba cada 6 meses para asegurar que el animal esta libre de la enfermedad (Reina 2008, Contreras y Corrales 2003).

De la misma forma las pruebas diagnósticas deberían ser de aplicación obligatoria para controlar a los animales que concurren en ferias y mercados, en la que la presencia de individuos infectantes supone un grave riesgo de difusión para la infección (Juste *et al*, 2003).

Conclusiones

Las pruebas de ELISA son en general más sensibles que la técnica de IDAG para la detección de LvPR.

La sensibilidad y especificidad depende del antígeno contenido las pruebas comerciales.

La prueba de ELISAI fue la que detectó a más animales positivos 73.98 %, pero también demostró resultados falsos negativos comparada con la prueba de ELISAc, y obtuvieron una concordancia casi perfecta.

Se realizó la técnica de WB y se comprobó la presencia de anticuerpos específicos contra proteína 28 y glicoproteína 135 en los sueros que ya habían sido sometidos a evaluación por IDAG, ELISA i y ELISA C; apareciendo otras bandas de los componentes virales específicas en las tiras de nitrocelulosa.

El resultado sugiere que la combinación de pruebas es óptimo para la detección de anticuerpos contra LvPR.

Bibliografía

Adams D.S.P; Klevjer-Anderson J.L; Carlson T.C; McGuire J.R. Gorham. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. Am. J. Vet. Res. 1983. 1670- 1675.

Adams D.S.P; Oliver R.E; Ameghino E; De Martini J.C; Verwoerd D; Whouwers D.J; Waghela S; Gorman J.R; Hyllset B; Dawson; Trigo F.C; Mc Guire TC: Serological evidence of caprine arthritis encephalitis infection in eleven of fourteen countries tested. Vet. Rec. 1984; 115: 493-495.

Altman D.G y Bland M.J. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity 1994; 308: 1552.

Álvarez M. V. Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de raza latxa del País Vasco; Tesis Doctoral. Gobierno Vasco, 2006.

Amorena, B; González, B; Andres, S; De Andrés, D., Vargas, A., A.Luján, A.: Mecanismos patológicos y respuesta inmune, Revista OVIS. Madrid. 2001, 27-40.

Asociación Monarcas México A.C. Test de Western blot. 2008.
http://www.monarcasmexico.org/western_blot.htm

Avalos R; Ramírez R; García J; Zapata P; Cervantes R; y Lehmkuhl H. Seroprevalencia del virus de artritis encefalitis caprina en el estado de Nuevo León. IX Congreso Nacional Caprino. Monterrey, N.L; México. Facultad de Agronomía U.A.N.L 1992: 11-14.

Baba S.S; Fontabe A.L; Baba MM; Rimstard E:Preliminary survey for antibodies againts caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) using recombinant gag proteins:studies among small ruminant population in north- eastern Nigeria. Small Rumin Res. 200. 37: 137-140.

Benavides J; García-Pariente C; Fuertes M ; Ferreras M. C; García-Maryn J. F Juste; R. A; Pérez V . Maedi-Visna: the Meningoencephalitis in Naturally Occurring Cases. *J. Comp. Path.* 2009, Vol. 140, 1-11.

Berriatua, E., Álvarez, V., Extramiana, B., González, L., Daltabuit, M., Juste, R. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in basque dairy-sheep flocks; *Prev Vet Med.* 60. 2003. 265-279.

Boschoff CH, Dungu B, Williams J, Vorster JD, Conradie JD, Verwoerd DW y York DF. Detection of Meedi Visna virus antibodies using a single fusion transmembrane-core p 25 recombinant protein ELISA and a modified receiver-operating characteristic analysis to determine cut-off values. *J Virol Methods* 1997. 63: 47.56.

Braun M J. The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the env gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *J. Virol.* 1987. 61: 4046-4054.

Brinkhof J.M.A; Houwers D.J; Maanen C.V. Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA. *Small Ruminant Research* 70. 2007a. 194–199

Brinkhof J.M.A; Maanen C.V. Evaluation of Five Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and and Agar Gel Immunodiffusion Test for Detection of Antibodies to Small Ruminant Lentiviruses. *Clinical and Vaccine Immunology*, American Society for Microbiology Vol. 14, No. 9. Sept. 2007b, p. 1210–1214

Brodie S.J; De la Concha B.A; Koeing G; Snowden G.D; De Martini J.C. Maternal factors associated with prenatal transmission of Ovine Lentivirus», *J Inf Dis.* 169. 1994. 653-657.

Bruet L; Barber S.A; Clements J. Characterizacion of a membrane associated protein implicated in Visna virus binding and infection. *Virol* 271. 2000:132-141

Bruguere-Picoux J. Le complex Arthrite- Encephalite- Caprine (C.A. E C.). Recueil de Medicine Veterinaire. 160(1984): 319-327.

Cann, A. Molecular Virology; 2ed Academic Press San, Diego. 1997. 5 . 128-260.

Callado A.K.C; Castro R.S; Teixeira M.F.S., Lentivirus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas, *Pesq. Vet. Bras.* 21 (2001), pp. 87–97.

Celer, V.Jr., Celer, V., Nemcova, H., Zaroni, R.G., Peterhans, E.: «Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test», *Zentralbl Veterinarmed.* 45 (1998) 183-188.

Cerda L.J; Villaroel L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr* 2008; 79 (1): 54-58

Castillo V.Y.C Y Hernández F.S. Prevalencia serológica del virus de artritis encefalitis caprina en los municipios del Rosal y Subachoque (Cundinamarca) mediante la técnica de Inmunodifusión en agar gel. 2004. Tesis, Universidad Lasalle, Facultad de medicina Veterinaria . Colombia

Clavijo A; Thorsen J. Serologic diagnosis of caprine arthritis-encephalitis by ELISA with two recombinant proteins in a parallel testing format, *J Immunoassay* 16. 1995. 419-436.

Crawford T.B; Adams P.S. Caprine Arthritis encephalitis: Clinical feadures and Presence of antibody in selected goat populations. *Journal of America Veterinary Medical Association*, 1981; 178: 713-719.

Coll M.J; Técnicas de Diagnóstico en Virología. Madrid: Díaz de Santos, 1993

Corrales J.C; Sánchez A; Contreras A. Diagnostico de la artritis encefalitis caprina. Monografía Artritis encefalitis caprina II. *Rev. Ovis.* 2003. 88, Madrid. 30-46

Cunha C.A.K; Soares C.R ; Silva TMF. Lentivirus entivirus de pequenos ruminantes (C CAEV AEV e Maedi-visna):revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 2001. 21(3):87-97

Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Schmerr, M.J.F., Brogden, K.A.: «Ovine progressive pneumonia (Maedi/Visna) in sheep», *Vet Microbiol.* 17 (1988) 237-250.

Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Wood, R.L., Brogden, K.A.: «Arthritis associated with ovine progressive pneumonia», *Am J Vet Res.* 46 (1985) 65-68.

Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Jackson, T.A.: «Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus», *Am J Vet Res.* 42 (1981) 1795-1797.

Cutlip R.C, Jackson T.A y Laird G.A.Immunodifusión Test for ovine Progressive Peneumonia. *Am J. Vet Res*,1977. 38: 1081-1084

Daltabuit T. M. E. Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el estudio de la transmisión calostrual y horizontal del virus Maedi-Visna (VMV) en ovino. Tesis doctoral – 1a ed. – Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. 2006

Davey R.T. J; Murphy R.L; Graciano F.M; Boswell S.L; Pavia A.T, Cancio M; Nadler J.P, Chaitt D.G, Dejar R. L; Sahner D.K; Duliege A. M; Capra W. B, Leong W.P, Giedling M.A; Lane H. C; Kahn J. O. Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial. 2000. *J Amer Med Assn* 284:183-189.

Dawson M. The detection of precipitating antibodies to lentivirus antigens in goat sera using two immunodiffusion assays. *En: Slow Viruses in Sheep, Goats and Cattle*, Sharp J.M. & Hoff-Jørgensen R.,eds. Commission of the European Communities, EUR(1985). 8076, 233–238.

Dawson, M.: «Maedi/Visna, a review», *Vet Rec.* 106 (1980) 212-216.

Dawson M y Wilesmith W. Serological survey of lentivirus (Maedi Visna-/ Caprine Arthritis Encephalitis) Infection in British goat herds. *Veterinary Record*, 117(1985):86-89.

De Andrés D; Klein D; Watt N. J; Berriatua E; Torsteinsdottir S.B.A; Blacklaws, Harkiss G. D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol* 2005. 107:49–62

De-Boer G.F. Antibody formation in Zwoegerziekte, a slow infection in sheep. *J Immunol.* 104. 1970. 414-422.

De-Boer G.F; Houwers D.J. Epizootiology of Maedi/Visna in sheep. D.A.J. Tyrrell. *Aspects of slow and persistent virus infections*, D.A.J Tyrrel, Brussels-Luxembourg 1979. 198-220.

East E.N; Rowe J.D; Madewel BR; Floyd K: Serologic prevalence of caprine arthritis encephalitis virus in California goat dairies. *J. Am. Vet Assoc.* 1987; 190: 182-186

Eguiluz C; De Aluja A.S. Neumonía Intersticial progresiva (Medi) y adenomatosis pulmonar en vísceras de ovidos decomisadas. *Nota Informativa. Veterinaria Mex* 1981.12.

Episodios tempranos en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. La prueba. <http://www.fundacionfit.org/info/prueba.htm>

Fernández P. S; Díaz P. S. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Cad Aten Primaria* 2003; 10: 120-124.

Feverheiro M; Barros S; Fagulha T. Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against maedi-visna virus. *J Virol Methods.* 81 .1999. 101-108.

Fort M.C; Bedotti D.O; Buseti M.R; Suárez V.H; Giménez H. D. Maedi –visna: rastreo seroepidemiológico de la enfermedad en una majada de ovinos pampinta. 2002.

Gjerset B; Rimstad E; Teige J; Soetaert K; Monceyron J.C. Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections *Veterinary Microbiology* 135 . 2009. 231–238

Gorrell M.D; Brandon M.R; Sheffer D; Adams R.J; Narayan O. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes», *J Virol.* 66. 1992. 2679-2688.

Grego E; Bertolotti L; Carrozza M.L; Prot. M; Mazzei M; Tolari F; Rosati S. Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 106, 2005. 179–185.

Griffin D.E; Narayan O; Adams R.J. Early immune responses in Visna, a slow viral disease of sheep. *J Infect Dis.* 138. 1978. 340-350.

Gudnadottir M. Visna . Maedi in sheep. *Progr. Med Virol.* 18: 1974. 336-349.

Georgsson, G.: «Maedi-Visna. Pathology and pathogenesis», in: *Development in Veterinary Virology Series.* Yachiel Becker (Ed) Klower Academic Publ. Boston. (1989) 19-53.

Harmache A; Vitu C; Russo P; Bouyac M; Hieblot C; Peveri P; Suzan M. The caprine arthritis encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo, *J Virol.* 69. 1995. 5445-5454

Hermann-Hoesing LM.G; Palmer H.G; Knowles P.D. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of aa ovine lentivirus. *Virology* 2007.

Hidalgo H; Higuera F. Comparación de eficacia y seguridad de una prueba rápida para la detección del VIH tipo 1 y 2 por detección de Ac IgG en saliva vs Western Blot. VI Congreso Nacional Sobre SIDA. 1997

Houwens D.J. Economic importance, epidemiology and control in: Maedi Visna and related diseases, Academic Press, Massachusetts, 6. 1990. 83-117.

Houwens D.J; Nauta I.M. Immunoblot Analysis of the Antibody Response to Ovine Lentivirus Infections. *Vet. Microbiol.*, 19: 1989. 127-139.

Houwens D.J; König C.D; Bakker J; De Boer M.J; Pekelder J.J; Sol J; Vellema P; De Vries G. Maedi-Visna control in sheep III: results and evaluation of a voluntary control program in the Netherlands over a period of four years. *Vet Q*, 9, 1987. 29s-36s.

Houwens D.J, Gielkens ALJ y Schaake J. An indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Maedi Visna virus. *Vet Microbiol* 1982. 7: 209-219.

ICTVdB Virus Description - 00_061_1_06_007_ Caprine arthritis encephalitis virus.mht.2006

Juste R.A; De La Concha A; Monografía Maedi Visna Etiología del maedi visna., Editorial Luzan. Rev.Ovis 72. Madrid 2001. 9-23.

Juste R; Wang J; De la Concha B.A. Dynamics of cell-associated viremia and antibody response during the early phase of lentivirus infection in sheep. *Am J Vet Res*, 59, 1998. 563-568.

Kennedy S; Narayan O y Strandberg J: The Mammary Gland as a Target Organ For Infection with Caprine Arthritis encephalitis virus. *Journal of comparative pathology*, 95 (1985): 609-617.

Knowles D.P; Evermann J. F; Shropshire C; Vanderschalie J; Bradway D; Gezon H.M; Cheevers W.P. Evaluation of Agar Gel Immunodiffusion Serology Using Caprine and Ovine Lentiviral Antigens for Detection of Antibody to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 32, No. 1. 1993. p. 243-245.

Kwang J; Keen J; Cutlip R.C; Kim H.S, De la concha B.A. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Rumin. Res* 1995. 16. 161-167.

Kwang J; Keen J; Cutlip R.C; Littledike E.T. Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein», *J Vet Diagn Invest.* 5. 1993. 189-193.

Lamara A; Fieni F; Mselli-Lakhal L; Tainturier D; Chebloune Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells», *Virus Res.* 79. 2001. 165-172.

Lechat E; Milhau N; Brun P; Bellatob C; Greenland T; Mornex J.F Le Jan C. Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis encephalitis virus infected leucocytes. *Veterinary Immunol and Immunopathology* 104. 2005. 257-263.

Leginagoikoa I; Minguijón E; Berriatua E; Juste R.A. Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *Journal of Virological Methods* 156. 2009. 145–149.

Lerondelle C; Godet M.T; Mornex J.F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet Res* 1999. 30,467-474.

Lerondelle C; Greenland T; Jane M; Mornex J.F. Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus», *J Dairy Sci.* 78. 1995. 850-855.

Luján L.L; Badiola J. Monografía Maedi Visna. Editorial., Editorial Luzan. *Rev.Ovis* 72. Madrid 2001. 7-8.

Luján L; Gómez N; Bolea R; García M.J.F; Varea R; Vargas A; Badiola J.J. Cuadro Clínico y lesional. Editorial., Editorial Luzan. Rev.Ovis 72. Madrid 2001. pp 41-57.

Luján, L.: «Estudio de la prevalencia y formas de presentación del maedi visna ovino en la cuenca media del Ebro», Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza (1991).

Martínez R.H.A. Diseminación del VAEC a partir de machos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor. Tesis doctoral. FESC UNAM 2003.

Molina M.R; Trigo T.J.F; Cutlip R.C. Estudio serológico de la neumonía progresiva ovina en México. Vet Mex 17. 1986.

Molinero L.M. Valoración de una prueba diagnòstica.2002. <http://www.seh-lelha.org/pdiagnos.htm>.

Morata C; López A.J. Diagnóstico: Test De Detección. <http://www.ctv.es/USERS/fpardo/vih4.htm>.1996

Mselli-Lakhal L; Favier C; Leung K; Guiguen F; Grezel D; Miossec P; Mornex J.F; Narayan O; Querat G; Chebloune Y.Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *J Virol.* 74. 2000. 8343-8348.

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

Murphy F.A; Gibbs E.P.J; Horzinek M.C; Studdert M.J.Veterinary virology, 3ed, Academic Press, San Diego. 1999. 363-389.

Narayan O; Zink M; Gorrell M.C; Crane S; Huso D; Jolly P; Saltarielli M; Adams R.J,Clements J.E., The lentiviruses of sheep and goats. *The Retroviridae* 2. 1993: 229-255.

Narayan, O., Cork, L.C.: «Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis», *Rev Infect Dis.* 7 (1985) 89-98.

Nord K; Rimstad E; Storset K; Loken; Prevalence of antibodies against caprine arthritis encephalitis virus in goats herds in Norway. *Small Rum. Resp* 1998;28:115-121.

OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004.

Oliver, R.E., Gorham, J.R., Perryman, L.E., Spencer, G.R.: Ovine progressive pneumonia: experimental intrathoracic, intracerebral, and intra-articular infections», *Am J Vet Res.* 42 (1981) 1560-1564.

Ortiz de Lejarazu L.R; Cisterna C.R; González L.A; M. Maroto M.C; Pumarola S.T; Viñas R.J. Diagnóstico Microbiológico de la Infección por VIH. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.1998.

Palsson, P.A.: «Maedi/Visna, a slow virus disease», *Bull Off Int Epiz.* 89 (1978) 465-475.

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

Pawlisch R.A , Maes R.K. Caprine arthritis-encephalitis virus isolated from Michigan goats. *Am J Vet Res* 1984; 45 (9): 108-1810

Peluso R; Hasse A.T; Stowring L; Edwards M; Ventura P. A Trojan Horse mechanism for the spread of Visna virus in monocytes”. *Virol*, 147. 1985. pp. 231-236.

Pepin M; Vitu C; Russo P; Mornex J.F; Peterhans E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review», *Vet Res.* 29 .1998. 341-367.

Pérez S.A. Identificación de anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos ovinos por las técnicas de inmunoelectrotransferencia (Western Blot) y Elisa indirecta. Tesis Licenciatura . Edo de mex 2005.

Peterhans E, Greenland T, Badiola J.J, Harkiss G, Bertoni G, Amorena B, Eliazewicz M, Juste R, KraBing, R., Lefont, J.P., Lenihan, P., Peturson, G., Thorely, J., Vitu, C., Mornex, J.F., Pepin, M.: «Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes», *Vet Res.* 35 (2004) 1-38.

Ramírez A.H; Evaluación in Vitro de proteínas antigénicas de un virus de artritis encefalitis caprina (AEC) aislado en México, usando las técnicas de ELISA y WESTERN BLOTT. Tesis Maestria. México 2002

Reina R; Berriatua E; Luján L; Juste R; Sanchez A; De Andrés D; Amorena B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *The Veterinary Journal.* 2008.

Rimstad E, East N, Derock E, Higgins J. y Pedersen N.C. Detection of antibodies to caprine arthritis/encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, 1994. 134, 345–356.

Rodríguez V.R. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) sobre células epiteliales del prepucio caprino in Vitro. Tesis Maestria. Mexico. 2008.

Ruff G; Regli J.G; Lazary S. Occurrence of caprine leucocyte class I and II antigens in Saanen goats affected by caprine arthritis (CAE)”. *eur j immunogenet*, 20. 1993. 285-288.

Salazar O.L; Rangel C; Flores N; López R.R. La Artritis- Encefalitis Caprina: Amenaza de la Caprinocultura Potosina. Colaboración del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

http://www.ipicyt.edu.mx/eipicyt/eventosynoticias/pulso_diciembre_03.pdf

Saltarelli M; Querat G; Konings D.A.M; Vigne R; Clements J.E. Identification of the caprine arthritis encephalitis virus rev protein and its Cis-Acting Rev responsive elements 1994; 199: 47-55.

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

Saman E; Geertrui V.E; Lujan L; Extramiana B; Harkiss G; Tolari F; González L; Amorena B; Watt N; Badiola J. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus Infections in small ruminants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1999.

Sanna E, Sanna M.P, Vitali G.P, Renzoni G, Sanna L, Spano S; Rossi G, Leoni A. proviral DNA in the brain of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *J Comp Path* 121. 1999. 271-273 .

Schipper I.A; Misek A; Ludeman L; Light M.R; Limesand W. Ovine progressive pneumonia infection via the oral route», *Agripractice* (1983) 415-417.

Shah C; Huder J.B; Boni J; Schonmam M; Muhler J; Lutz H; Schupbach J. Direct evidence for natural transmission of small ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and viceversa. *J. Virol. Meth.* 118: 2004. 123-130.

Sigurdsson, B.: «Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootological and a pathological study», *Br Vet J.* 110 (1954) 255-270.

Sigurdson B; Grimsson H; Palsson P.A. Maedi, a chronic progressive infection of sheep's lungs. *L infect. Dis.* 90: 1951. 233-241.

Sihvonon, L.: «Early immune responses in experimental Maedi», *Res Vet Sci.* 30 (1981) 217-222.

Smith, C.: «Ovine lentivirus: a real or imagined threat?», *J Am Vet Med Assoc.* 200 (1992) 139-143.

Stites D.P, Hug Hf. Inmunología básica y clínica. 4a edición. El manual moderno. Mexico 1983.

Storset A.K. Teig A, Rimstad E. Detección of caprine arthritis- encephalitis virus RNA in macrophages by in situ hybridization using fluorescein labelled single- stranded RNA probes. *vet microbiol* 52 (1-2): 25-35 (1996).

Terpstra C; De Boer G.F. Precipitating antibodies against maedi-visna virus experimentally infected sheep. *Arch Ges Virusforsch.* 1973. 43: 53-62.

Tizard R. Ian. Inmunología Veterinaria. Quinta edición. Mc Graw Hill.1996.USA.

Torres A.J et al. Serological survey of caprine arthritis encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatán Mexico. *Small ruminant research* Volume 49. Edición 2. Agosto 2003. Pages 207-211.

Tórtora P.J.L. Acontecer ovino caprino; Maedi Visna ; la situación de México. Vol VIII No 37. Noviembre 2007-Enero 2008.

Trigo T. F. La artritis encefalitis caprina. *Ciencia Veterinaria* 5. 1991.

Urcastegi R.H.A. Ovinos mexicanos sacrificados en Colombia. Acontecer ovinos caprino. Vol VIII 2007. No. 35.

Van der Molen, E.J., Vecht, U., Houwers, D.J.: «A chronic indurative mastitis in sheep, associated with Maedi-Visna Virus infection», *Vet Quart.* 7 (1985) 112-119.

Vazquez F N C, Soberón M A, Trujillo G A, Segundo Z C, Ducoing WAE. Caprine arthritis encephalitis seroprevalence in dairy goat intensive systems of the Mexican high plateau. *Memorias de la 9a conferencia Internacional sobre caprinos.* Queretaro Mexico 2008. 262.

Watt, N.J., Roy, D.J., Mc-Connell, I., King, T.J.: «A case of visna in the United Kingdom», *Vet Rec.* 126 (1990) 600-601.

Winward L, Leendertsen L y Shen D.T. Microimmunodiffusion Test for diagnosis of ovine Progressive Pneumonia. *Am J Vet Res*, 40: 1979. 564-566.

Zanoni R.K; Rieg A; Peterhans E. Detectión of Antibodies to caprine Arthritis-Encephalitis Virus By protein GEnzyme- Linked Immunosorbent Assay and Immunoblotting. *Journal of clinical Microbiology* 1989. p 580-582.

Zink M.C; Johnson L.K.. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Res*. 32. 1994. 139–154.

Zink M.C; Narayan O; Kennedy P.G.E; Clements J.E. Pathogenesis of Visna/Maedi and Caprine arthritis encephalitis new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol. Immunopathol.* 1982.15:167-180.

Apéndice 1:

Desarrollo de la prueba de Inmunodifusión en agar gel

Kit serodiagnostic CAEV-IDG p28 (120 reacciones) caprine arthritis- encephalitis virus. Institut pourquier- montpelier- France

- 1.-Sumerja la botella con agar gel en un recipiente con agua hasta que el agar llegue a ser perfectamente líquido y claro.
- 2.-Deje enfriar un poco el agar hasta que llegue aproximadamente a 60°C, para evitar la evaporación cuando el agar sea vertido.
- 3.-Usando una pipeta de 10 ml tomar 7 ml de agar y colocarlo en la caja de petri (4 cm de diámetro) y esperando a que solidifique.
- 4.-Perforar los pozos con un sacabocados obteniendo un pozo central y 6 periféricos. Colocar en el pozo central 50ul de antígeno (p28), que viene en el kit.
- 5.-Identificar adecuadamente los pozos de las cajas con los números de sueros de los animales y los controles positivo y negativo.
- 6.-Adicionar en dos pozos periféricos 50 ul de cada uno de los controles del kit (positivo y negativo)
- 7.-En los pozos restantes colocar 50ul de los sueros a evaluar.
Los sueros de ovinos se agruparon por edades; con un máximo por grupo de 5 sueros
Para realizar cada grupo se colocaron 10 ul de suero de cada ovino. Siendo un total de 25 grupos.
- 8.-Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente por una semana.
- 9.-Realizar la lectura.

Preparación del gel de agarosa

1.- Preparar la solución Bufferada

Solución 1% de agarosa en una solución bufferada de fosfato

*1.17 % Na_2HPO_4

*0.22 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$

*8.5 g NaCl

2.-Disolver y aforar a 1 lt de agua destilada o desionizada. Ajustar pH a 7.4.

3.-Agregar azida de Sodio (0.01) de concentración final)

4.-Agregar 6 g NaCl por cada 100 ml de buffer en el momento que se añada la agarosa.

5.-Calentar la solución a baño maría hasta que el agar se disuelva completamente.

6.-Enfriar la solución de agarosa a 45-50°C y colocar 6 ml en la caja de petri de 4 cm de diámetro.

7.-Seguir los pasos del 6 al 9 de la metodología anterior.

Desarrollo de la prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

MAEDI- VISNA / C.A.E.V SERODIAGNOSTIC ELISA TEST SERUM (Versión P00302) (INSTITUT POURQUIER FRANCE)

Detección de Anticuerpos IgG contra p25 y péptido TM..

Sacar del refrigerador todos los reactivos del kit media hora antes, para alcanzar la temperatura ambiente.

- 1.-Colocar 190 ul de buffer de dilución por cada pozo
- 2.-Colocar 10 ul de suero control negativo en A1 y A2
- 3.- Colocar 10 ul de suero control positivo en B1 y B2
- 4.-Colocar 10ul del suero problema en la columna par e impar (duplicado)
- 5.- Homogenizar el contenido con un ligero movimiento de la placa
- 6.- Cubrir la placa con aluminio e incubar una hora a 37°C.
- 7.-Vertir el contenido de los pozos en la tarja y llenar cada pozo con 300 ul de solución de lavado, hacer movimientos ondulatorios y secar el exceso con papel absorbente. (repetir este paso 4 veces)
- 8.- Adicionar 100ul de conjugado diluido 1:100; cubrir la placa e incubar a 37°C por 30 min.
- 9.- Repetir el paso 7.
- 10.-Colocar 100 ul de solución de revelado por pozo y cubrir la placa.
- 11.- Incubar la placa a temperatura ambiente por 20 min.
- 12.-Colocar 100 ul de solución de paro por pozo y mover la placa suavemente para que se homegenize el color
- 13.- Realizar la lectura a 450 nm.

El control positivo debe de tener un valor minimo no corregido de 0.350

El cociente entre el valor corregido de el control positivo y el valor corregido del control negativo debe ser mayor o igual a 3.5

Calculo del cociente para cada muestra.

Valor: densidad optica de la muestra/ densidad optica del control negativo x 100.
CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS ANTIBODY TEST KIT,
CELISA

VMRD Inc . USA

Detección de anticuerpos para gp 135 de VAEC.

- 1.- Colocar 50 ul de muestras de sueros y controles (+)(-).
- 2.- Incubar una hora a temperatura ambiente.
- 3.- Verter el contenido de los pozos en la tarja y llenar cada pozo con 200 ul de solución de lavado, haciendo movimientos ondulatorios, verter el contenido y secar el exceso con papel absorbente. (Repetir este paso 4 veces)
- 4.-Agregar 50 ul del conjugado (anticuerpo peroxidado) a cada pozo, dar pequeños golpecitos para el conjugado quede en el fondo.
- 5.- Incubar 30 min. a temperatura ambiente.
- 6.-Repetir paso 3.
- 7.-Agregar 50 ul de solución sustrato. Incubar 20 min a temperatura ambiente.
- 8.- Agregar solución de paro y homogenizar.
- 9.- Hacer la lectura a una densidad óptica de 650 nm.

La media de los controles negativos debe producir una densidad óptica mayor a 0.300

La media de los controles positivos debe producir mayor a 35% de inhibición.

Calculo del porcentaje de inhibición (%I):

$$\%I=100-(\text{Simple O.D} \times 100) / (\text{media de la densidad óptica del control negativo})$$

Apéndice 2

Electroforesis en gel de acrilamida según el sistema de Laemmli. (Page-SDS)

- 1.- Ensamblar la cámara y verificar que no haya filtraciones.
2. Poner el peine y con un marcador poner una marca en la placa de vidrio 1 cm debajo de los dientes y retire el peine
3. Preparar 21 ml del monómero al 12% por combinación de los reactivos en un tubo de plástico de 50 ml siguiendo la secuencia de Tabla I. Mezclar con la pipeta seca sin provocar burbujas y vaciar la solución hasta la marca que previamente se haya puesto. Dejar en reposo.
4. Preparar 10 ml del monómero al 5 % por combinación de los reactivos en un tubo de plástico de 50 ml siguiendo la secuencia de Tabla. Mezclar con la pipeta seca sin provocar burbujas y vaciar la solución
5. Colocar la muestra problemas en los carriles del gel. Colocar en el primero y último carril poner 20 ul de buffer de muestra, en el segundo carril agregar 10 ul de marcadores de peso molecular y del tercer carril en adelante poner las muestras problema 40 ul.
6. Poner el buffer de corrida 1x en el tanque luego sumergir el dispositivo que lleva las placas con gel y muestras cargadas. Llenar con buffer de corrida 1x el centro del dispositivo que lleva las placas con gel y muestras.
- 7.-Encender la fuente de poder y mantenerla a 50 volts

Preparación de reactivos para gel en placa

1.- Acrilamida/bis-Acrilamida (30%T, 2.67% C)

14.6g acrylamide

00.4g NN-bis-methylene-acrylamide

Disolver en aproximadamente 25 ml de agua destilada. Completar a 50 ml con agua destilada. Filtrar y almacenar a 4°C.

2.-1.5 M. Tris-HCL, Ph 8.8

18.165g Tris Base/100 ml

Disolver en aprox 50 ml (30 ml) de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con 1N HCL. Completar a 100 ml (con agua destilada y almacenar a 4°C.

3.- 0.5 M Tris-HCL, ph 6.8

6.055 g Tris Base (3.633 g/60 ml)

Disolver en aproximadamente 50 ml (30 ml aprox de Ph de 10.74) de agua destilada. Ajustar el Ph a 6.8 con 1N HCL. Completar a 100 ml (60 ml) con agua destilada y almacenar a 4°C

4.- 10% SDS

Disolver 0.5 g de SDS (Lauryl Sulfate) en aprox. 5 ml de agua destilada con agitación lenta por rotación cuidando que no se haga espuma. Hacer alícuotas de 250 ul para almacenar a temperatura ambiente.

5.- 10% APS.

Disolver 0.5 g de Ammonium Persulfate en aprox 5 ml de agua destilada con agitación por rotación. Hacer alícuotas de 150 ul. Si se almacenan guardar a -20°C.

6.- Buffer de muestra 3x

1.0 M Tris-HCL Ph 6.8 1ml

10% SDS 4 ml

Glicerol 2ml

Azul de bromofenol adicionar gránulos

Se hacen alícuotas de 350 µl, se mantienen a temperatura ambiente. En el momento de su uso se adicionan 50 µl de 2B mercapto etanol

7.- Buffer De Corrida Ph 8.3

Suficiente para 10 corridas

Tris base 9 g

Glicina 43.2 g

SDS 3 g.

Completar para 600 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C

Calentar a 37°C antes de usar si es que existe precipitación

Diluir 60 ml del stock 5x con 240 ml de agua destilada para una corrida electroforética

Preparación del gel separador

	12%
Agua destilada	7.0 ml
1.5 Tris HCL Ph 8.8	5.0 ml
10% SDS	200 ul
Acrilamide/ bis (30%) stock	8.0 ml
10% APS	100 ul
TEMED	22 ul

Preparación del gel Concentrador

	5 %
Agua destilada	6.8 ml
0.5 Tris HCL Ph 6.8	1.25 ml
10% SDS	100 ul
Acrilamide/ bis (30%) stock	1.7 ml
10% APS	100 ul
TEMED	15 ul

8.- Buffer de transferencia

3.03 g Trisma base

14.4 g Glicina

200 ml de metanol

Agregar agua destilada o desionizada cbp 1 lt. Rango de Ph 8.1-8.4.

9.- Solución de Bloqueo 5%

150 ml de PBS-T 0.2 %

7.5 g de leche descremada en polvo

10.- Solución de lavado 2%

700 ml de PBS-t 0.2%

14 g de leche descremada

11.- PBS-T (0.02)

500 ml de PBS

1 ml de Tween 20

12.- Revelador

10 mg DAB

20 ml PBS

10 ul de H₂O₂

Apéndice 3

Base de datos

OVINOS					1	2	3	4	5
TUBO	ARETE	RAZA	SEXO	EDAD					
1	123	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
2	121	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
3	113	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
4	112	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
5	118	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
6	144	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
7	116	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
8	85	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
9	129	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
10	480	Columbia	Hembra	5 años	-	-	-	-	N
12	838	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
13	728	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
14	84	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
15	252	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
16	395	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
17	391	Columbia	Hembra	4 años	-	-	-	-	N
18	356	Columbia	Hembra	5 años	-	-	-	-	N
19	894	Columbia	Hembra	5 años	-	-	-	-	N
20	890	Columbia	Hembra	5 años	-	-	-	-	N
21	943	Romanov	Macho	menos de un año	-	-	-	-	N
22	184	Columbia	Macho	menos de un año	-	-	-	-	N
23	7	Columbia	Macho	menos de un año	-	-	-	-	N
24	700	Columbia	Macho	menos de un año	-	-	-	-	N
25	189	Columbia	Macho	menos de un año	-	-	-	-	N
26	1269/817	Columbia	Macho	menos de un año	-	-	-	-	N
27	Macho sin num	Columbia	Macho	menos de un año	-	-	-	-	N
28	8	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
29	34	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
30	35	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
31	126	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
32	1810	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
33	712/255	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
34	1812	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
35	844	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
36	282	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
37	1815	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
38	1811	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
39	4	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
40	800	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
41	22	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
42	184	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
44	899	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
46	1820	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
TUBO	ARETE	RAZA	SEXO	EDAD	1	2	3	4	5
47	42	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
48	770	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N

49	806	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
50	152	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
51	257	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
52	12	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
53	314	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
54	814	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
55	167	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
56	240	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
57	171	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
58	1818	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
59	726	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
60	386	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
61	1819	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
62	132	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
63	212	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
64	780	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
65	124	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
66	28	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
67	216	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
68	836	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
69	830	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
70	394	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
71	46	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
72	654	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
73	1821	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
74	224	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
75	444	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
76	360	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
77	173	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
78	220	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
79	790	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
80	296	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
81	722-25	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
82	144	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
83	718-13	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
84	702	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
85	18-13	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
86	130	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
87	166	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
88	834	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
89	36	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
90	420	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
TUBO	ARETE	Columbia	SEXO	EDAD	1	2	3	4	5
91	1817/887	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
92	1822-38	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
93	234	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
94	256	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
95	897	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
96	768	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N

97	52	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
98	708	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
99	38	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
100	16	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
101	163	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
102	840	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
103	892	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
104	168	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
105	1814	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
106	160	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
107	1816	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
108	82	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
109	224	Columbia	Hembra	menos de un año	-	-	-	-	N
111	1806	Columbia	macho	menos de un año	-	-	-	-	N
112	9	Columbia	macho	menos de un año	-	-	-	-	N
113		Columbia	macho	menos de un año	-	-	-	-	N
115		Columbia	macho	menos de un año	-	-	-	-	N

Caprinos

TUBO	ARETE	RAZA	EDAD	SEXO	CORRAL	1	2	3	4	5
200	Toggenburg s/n	Toggenburg	3 años	hembra	1	-	-	-	-	N
201	3	Criolla (Nubia)	4 años	hembra	1	-	-	-	-	N
202	36066	Criolla (Nubia)	3 años	hembra	1	-	-	-	-	N
203	90	Criolla (Nubia)	4 años	hembra	1	-	-	-	-	N
204	7	Criolla (Nubia)	4 años	hembra	1	-	-	-	-	N
205	11	Criolla (Nubia)	5 años	hembra	1	-	-	-	-	N
206	89	Criolla (Nubia)	5 años	hembra	1	-	-	-	-	N
207	34	Criolla (Nubia)	5 años	hembra	1	-	-	-	-	N
208	P6156	Toggenburg	2 años	hembra	1	-	-	-	-	N
209	20	Criolla (Nubia)	5 años	hembra	1	-	-	-	-	N
210	26	Criolla (Nubia)	3 años	hembra	1	-	-	-	-	N
211	35	Criolla (Nubia)	2 años	hembra	2	-	-	-	-	N
212	39	Criolla (Nubia)	1	hembra	2	-	-	-	-	N
213	28	Criolla (Nubia)	2	hembra	2	-	-	-	-	N
214	37	Criolla (Nubia)	2	hembra	2	-	-	-	-	N
215	31	Criolla (Nubia)	2	hembra	2	-	-	-	-	N
216	27	Criolla (Nubia)	2	hembra	2	-	-	-	-	N
217	43	Criolla (Nubia)	1	hembra	2	-	-	-	-	N
218	29	Criolla (Nubia)	2	hembra	2	-	-	-	-	N
TUBO	ARETE	RAZA	EDAD	SEXO	CORRAL	1	2	3	4	5
219	63	Criolla (Nubia)	1 mes	hembra	2	-	-	-	-	N
220	87	Criolla (Nubia)	4	hembra	3	-	-	-	-	N
221	79	Criolla (Nubia)	4	hembra	3	-	-	-	-	N
222	87	Criolla (Nubia)	5	hembra	3	-	-	-	-	N
223	30	Criolla (Nubia)	3	hembra	3	-	-	-	-	N
224	25	Criolla (Nubia)	4	hembra	3	-	-	-	-	N
225	12	Criolla (Nubia)	3	hembra	3	-	-	-	-	N
226	32	Criolla (Nubia)	4	hembra	3	-	-	-	-	N
227	MACHO	Criolla (Nubia)	4	Macho	macho	-	-	-	-	N
228	P6136	Toggenburg	2	Macho	macho	-	-	-	-	N

229	248399	Criolla (Nubia)	1	Macho	macho	-	-	-	-	N
230	P6100	Toggenburg	2	Macho	macho	-	-	-	-	N
231	127	Criolla (Nubia)	- de 1 a	Macho	5	-	-	-	-	N
232	51	Criolla (Nubia)	- de 1 a	Macho	5	-	-	-	-	N
233	42	Criolla (Nubia)	- de 1 a	Macho	5	-	-	-	-	N
234	33	Criolla (Nubia)	2 años	hembra	2	-	-	-	-	N
236	349/079	Criolla (Alpina)	4 años	hembra	1	-	+	+	-	N
237	870/5	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
238	330/4	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	+	N
239	172/36	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
240	477	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
241	321/056	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
242	72	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
243	100	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	+	-	+	-	N
244	s/a cara negra	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	-	-	-	-
245	393/57	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
246	448	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
247	473	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
248	375	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	+	+	+	-	+
249	cara café	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	-	-	-	-
250	342	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	-	+	-	N
251	395/077	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	+	+	+	-	+
252	824/044	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	-	-	-	-
253	76/043	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
254	347/062	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	+	N
255	879/49	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	+	+	+	-	+
256	78	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	+	+	+	-	+
257	7	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
258	68 /900	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	-	N
259	849/88	Criolla (Alpina)	4	hembra	1	-	+	+	+	N
260	71	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	+	+	-	N
261	650/33	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	+	+	-	N
262	65	Criolla (Alpina)	5	hembra	2	-	-	+	+	N
263	68/025	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	-	-	-	-
264	629/103	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	+	-	-	N
265	80	Criolla (Alpina)	3	hembra	2	-	-	+	-	N
266	98/67	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	+	+	+	-	N
267	38	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	+	+	+	+
TUBO	ARETE	RAZA	EDAD	SEXO	CORRAL	1	2	3	4	5
268	73/70	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	+	+	-	N
269	2	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	+	+	-	N
270	479/61	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	+	+	+	-	+
271	32	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	+	+	-	N
272	26/53	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	-	+	+	N
273	82	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	-	+	+	N
274	97/89	Criolla (Alpina)	4	hembra	2	-	-	+	-	N
275	99	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N
276	41	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N
278	26	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N
280	863/98	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	-	+	-	N
281	28/25	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	-	+	-	N
282	347/102	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N

283	91/396	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	+	N
284	382/055	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	-	-	-	-
285	857/029	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N
286	44/01	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N
287	862/63	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N
288	64/994	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	-	+	-	N
289	985/039	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	-	+	+	N
290	987/081	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	+	+	+	-	+
291	47/989	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	+	+	+	+	+
292	966/094	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	+	+	+	+	+
293	96	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	-	-	-	-
294	037/450	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N
295	95	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	+	+	-	N
296	48	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	-	-	-	-
297	58	Criolla (Alpina)	4	hembra	3	-	-	+	+	N
298	03 tatuaje	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	+	+	+	N
299	12 tatuaje	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	-	-	-	-
300	canela gestante	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	+	+	+	-	+
301	18 tatuaje	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	+	+	-	N
302	S/N / RM	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	+	+	-	N
303	S/N / G	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	+	+	-	N
304	1 amarillo	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	-	-	-	-
305	040 amarillo	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	-	-	-	-
306	36 tatuaje	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	-	-	-	-
307	6 tatuaje	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	+	+	-	N
308	62 tatuaje	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	+	+	-	N
309	9 amarillo	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	-	-	-	-
310	43 amarillo	Criolla (Alpina)	2	hembra	4	-	-	-	-	-
311	1 tatuaje	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	+	-	-	N
312	blanca gestante	Criolla (Alpina)	4	hembra	4	-	-	-	-	-
313	041 amarillo	Criolla (Alpina)	1.5 años	hembra	4	-	+	+	-	N
314	044 amarillo	Criolla (Alpina)	2	hembra	4	-	-	-	-	N
315	938	Criolla (Alpina)	- de 1 a	Macho	5	-	+	+	-	N
316	69	Criolla (Alpina)	- de 1 a	Macho	5	-	SR	+	-	N
TUBO	ARETE	RAZA	EDAD	SEXO	CORRAL	1	2	3	4	5
317	52	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	-	-	N
318	72	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N
319	930	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N
320	70	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N
321	47	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N
322	904	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	-	-	N
323	928	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	-	-	N
324	931	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	-	-	N
325	914	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	-	-	N
326	919	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	+	+	+	-	+
327	925	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	-	-	N
328	929	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N
329	924	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N
330	71	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	-	-	N
331	918	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N
332	915	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N
334	937	Criolla (Alpina)	- de 1 año	Macho	5	-	SR	+	-	N

335	CLEMEN	Criollo alpino	5 años	Macho	sementales	-	SR	+	-	N
336	PHILIP	Criollo alpino	5 años	Macho	sementales	-	SR	-	-	N
337	GRINGO	Criollo alpino	5 años	Macho	sementales	-	SR	-	-	N
338	935	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
339	S/N	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
340	909	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	+	N
341	55	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
342	911	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
343	912	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
344	45	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
345	49	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	-	-	N
346	40	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	-	+	-	N
347	53	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
348	67	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
349	50	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
350	66	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	-	-	N
351	61	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
352	68	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	-	-	N
353	Toggen Negra	Criolla (Toggenburg)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	-	-	N
354	910	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
355	s/n CREMA	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	-	-	N
356	CARA NEGRA	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
357	933	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	-	-	N
358	46	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	+	N
360	54	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N
361	Cuerno db.	Criolla (Alpina)	- 1 año	Macho	reemplazo	-	SR	+	-	N
362	65	Criolla (Alpina)	- 1 año	hembras	reemplazo	-	SR	+	-	N

Abreviaturas: Negativo (-), Positivo (+), Sin Reactivo (SR), No se realizó (N).

1.- IDAG 2.- ELISAc 3.- ELISA i 4.- Signos clínicos 5.- Wbc

Apéndice 4
 Tablas de Contingencia
 Kappa

Cuadro 8.- Tabla de contingencia de los resultados del diagnóstico a LvPR por los métodos de IDAG y Elisa i que detectan anticuerpos contra la proteína p28 viral

	ELISA i+	ELISA i-	TOTAL
IDAG +	12	0	12
IDAG -	51	162	213
TOTAL	63	162	225

Valor de Kappa: 0.264

Tabla 9.- Tabla de contingencia de los resultados del diagnóstico a LvPR por los métodos de IDAG y Elisa c que detectan anticuerpos contra la proteína p28 y la glicoproteína 135 viral, respectivamente

	ELISA c +	ELISA c -	TOTAL
IDAG +	10	2	12
IDAG -	41	172	213
TOTAL	51	174	225

Valor de Kappa: 0.253

Tabla 10.- Tabla de contingencia de los resultados del diagnóstico a LvPR por los métodos de ELISA i y ELISA c que detectan anticuerpos contra la proteína p28 y la glicoproteína 135 viral, respectivamente.

	ELISA c +	ELISA c -	TOTAL
ELISA i +	50	2	52
ELISA i -	13	160	173
TOTAL	63	162	225

Valor de Kappa: 0.828.

“Prueba de Mc Nemar para observaciones pareadas”

Tabla 11.- Tabla de contingencia de los resultados del diagnóstico a LvPR por los métodos de IDAG y Elisa i.

	ELISA i+	ELISA i-	TOTAL
IDAG +	12	0	12
IDAG -	51	202	213
TOTAL	63	202	225

Valor de $P < 0.0001$. 95% Intervalo de Confianza. Un grado de Libertad

Tabla 12.- Tabla de contingencia de los resultados del diagnóstico a LvPR por los métodos de IDAG y Elisa i.

	ELISA i +	ELISA i -	TOTAL
ELISA c +	50	2	52
ELISA c -	13	160	173
TOTAL	63	162	225

Valor de $P = 0.0098$ 95% Intervalo de Confianza. Un grado de Libertad

Tabla 13.- Tabla de contingencia de los resultados del diagnóstico a LvPR por los métodos de WBC y Elisa i.

	ELISA i+	ELISA i-	TOTAL
WB +	11	0	11
WB -	0	13	13
TOTAL	11	13	24

Valor de $P < 0.0009$ 95% Intervalo de Confianza.

Un grado de Libertad