



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“Detección de anticuerpos a Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) en líquido seminal, utilizando una prueba de ELISA competitiva.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

OSCAR RUBEN ORTIZ SANJUAN

Asesor: Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez

Coasesor: Dr. Hugo Ramírez Álvarez



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos LA TESIS:

Detección de anticuerpos a Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) en líquido seminal.
 utilizan una prueba de ELISA competitiva.

Que presenta el pasante: Oscar Rubén Ortiz Sanjuan
 Con número de cuenta: 40603199-6 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

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

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
 Cuautitlán Izcallí, Méx. a 8 de Septiembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto A. Martínez Rodríguez	
VOCAL	MC. Raúl Arturo Mar Cruz	
SECRETARIO	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
1er SUPLENTE	MC. Oscar Chávez Rivera	
2do SUPLENTE	MVZ. Edna Maribel Legaspi Nuevo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

DEDICATORIAS.

A mi madre Luz María:

Por haberme dado la vida, por ser el pilar de la familia, por darme todo ese cariño, por tus consejos, por tu apoyo económico. Este gran paso en mi formación académica es dedicado a ti. Por todo esto y más te amo mamá. Gracias Luchita.

A mis hermanos:

Sergio y Gabriela, por haberme cuidado y soportarme todo el tiempo, los amo. Gracias.

A mi tío Francisco:

Por haber sido como un padre, por haberme cuidado y por los consejos dados. Gracias.

Al amor de vida Cynthia:

Por ser una parte fundamental en mi vida, por tu ayuda incondicional, por estar conmigo y hacerme tan feliz. Gracias Hoomiga. Te amo

A mis Asesores:

Dr. Alejandro y Dr. Hugo. Gracias por su apoyo para que este proyecto tuviera un buen final, por despertar esa inquietud mía hacia la investigación, por transmitir sus conocimientos, por ser unos excelentes investigadores y sobre todo por su amistad. Gracias.

AGRADECIMIENTOS.

A mi madre Luz María:

Te agradezco todo lo que has hecho por mi mamá, por haberme dado la vida y por ser mí amiga, mi todo. Muchas gracias.

A mi familia:

Por darme tantos consejos, por haber cuidado de mí en todo este tiempo, por darme su cariño y llevarme por el buen camino.

Al amor de mi vida:

Cosa hermosa agradezco haberte conocido, el haber compartido parte de la carrera a tu lado, agradezco tu amor, tu paciencia. Gracias por apoyarme tanto y por ser lo que eres, nunca cambies Cynthia. Te amo y gracias nuevamente.

A mis amigos:

Carlitos, Antonio, Dulce, Selene por haber estado conmigo en toda la carrera, por haberse portado tan bien conmigo, por ser como mis hermanos. Ustedes saben cuanto los estimo y les agradezco todo lo que han hecho por mí. Gracias.

Diego, Gabriel, Miguel, Vicente. Ustedes han sido un gran apoyo en todo el tiempo de conocerlos, les agradezco su amistad de siempre.

A mis compañeros del laboratorio de Virología:

Por haber hecho la estancia tan agradable, por ayudarme cuando los necesite, por enseñarme las cosas de un modo tan comprensible. Gracias Lulú, Alma, Ana, Norma, Yesi, Itz, Víctor, Chucho y Flor.

Al Dr. Alejandro:

Doc. Gracias por haberme apoyado en este proyecto, por los consejos. Hace una gran labor en apoyarnos a los alumnos y transmitir sus conocimientos de una forma desinteresada. Le agradezco su amistad.

Al Dr. Hugo:

Muchas gracias también por su amistad, por su simpatía, por apoyarme en el proyecto, por toda la información que me ayudo demasiado para este trabajo. Gracias.

A la M en C. Martha:

Por su apoyo, por ser tan buena persona y amiga, le agradezco todo lo que hizo por mí, por los pastelitos que nos llevaba al laboratorio.

A la UNAM FESC-4:

Por haberme abierto las puertas de esta gran Institución, por formar a personas para que este país siga creciendo. Por haber sido mí segunda casa. Gracias por todo.

A todas las personas que hicieron posible que este trabajo llegara a su fin, les agradezco las muestras donadas, ya que sin su ayuda no habría terminado. Mil gracias a todos ustedes.

ÍNDICE

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción.....	2
2.1	Antecedentes de la enfermedad por Lentivirus de Pequeños Rumiantes.....	2
2.2	Etiología.....	2
2.3	Morfología.....	4
2.4	Genes estructurales.....	5
2.5	Genes reguladores.....	5
2.6	Región LTR.....	6
2.7	Patogenia.....	7
2.8	Cuadro clínico.....	8
2.8.1	Forma pulmonar.....	8
2.8.2	Forma articular.....	9
2.8.3	Forma nerviosa.....	10
2.8.4	Forma mamaria.....	10
2.9	Respuesta inmune.....	11
2.9.1	Respuesta humoral.....	12
2.9.2	Respuesta celular.....	13
2.10	Transmisión.....	13
2.10.1	Transmisión vertical.....	14
2.10.2	Transmisión horizontal.....	14
2.11	Diagnóstico.....	15
2.11.1	Microscopía electrónica.....	16
2.11.2	Cultivo celular.....	16
2.11.3	Inmunodifusión en Gel Agar (IDAG).....	16
2.11.4	Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).....	17
2.11.5	Inmunoelctrotransferencia o Western blot (WB).....	18
2.11.6	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
2.11.7	Hibridación <i>in situ</i>	19
2.12	Diagnóstico diferencial.....	19
2.13	Prevención y control.....	21
2.14	Importancia económica.....	22
3.	Justificación.....	24
4.	Hipótesis.....	24
5.	Objetivos.....	25
5.1	Objetivo general.....	25
5.2	Objetivos particulares.....	25
6.	Materiales y métodos.....	26
6.1	Recolección de muestras.....	26
6.2	Procedimiento de la prueba de ELISA competitiva.....	30
6.3	Procedimiento de la tinción de Papanicolaou.....	31

6.4	Procedimiento para la prueba de Inmunocitoquímica.....	32
6.5	Procedimiento para el Western blot.....	33
7.	Resultados.....	34
7.1	Resultados a la prueba de ELISA Competitiva.....	34
7.2	Resultados a la tinción de Papanicolaou.....	37
7.3	Resultados a la prueba de Inmunocitoquímica.....	40
7.4	Resultados a la prueba de Western blot.....	43
8.	Discusión.....	45
9.	Conclusiones.....	49
10.	Bibliografía.....	50
11.	Apéndice I.....	59
	Apéndice II.....	61
	Apéndice III.....	62

Índice de tablas y figuras

1. Tabla 1. Célula huésped de los Lentivirus.....	3
2. Tabla 2. Formas clínicas de la infección por LVPR en cabras y borregos.....	11
3. Tabla 3. Pruebas utilizadas para el diagnóstico de LVPR.....	20
4. Tabla 4. Total de muestras de semen obtenidas de ovinos y caprinos.....	28
5. Tabla 5. Razas de machos ovinos muestreadas para la obtención de semen.....	29
6. Tabla 6. Razas de machos caprinos muestreadas para la obtención de semen.....	29
7. Tabla 7. Agentes patógenos ocasionalmente presentes en semen.....	62
8. Tabla 8. Resultados comparativos de las muestras obtenidas.....	63
1. Figura 1. Estructura de los LVPR	4
2. Figura 2. Genes estructurales y reguladores de los LVPR	6
3. Figura 3. Patogenia de los LVPR	8
4. Figura 4. Diseño experimental.....	27
5. Figura 5. Gráfica que muestra los resultados obtenidos del líquido seminal de ovinos y caprinos en la prueba de ELISA competitiva destinados por estado.....	34
6. Figura 6. Gráfica que muestra la distribución de los valores de densidad óptica (a 620 nm) obtenidas de 75 muestras de líquido seminal de ovinos y caprinos a la prueba de ELISA competitiva.....	35
7. Figura 7. Resultados obtenidos en el líquido seminal en total de muestras evaluados por ELISA competitiva de ovinos y caprinos	36
8. Figura 8 Porcentaje de animales positivos, negativos y sospechosos en la prueba de ELISA competitiva.....	37
9. Figura 9. Células epiteliales teñidas con Papanicolaou a partir de frotis realizados con el paquete celular de muestras de semen de ovinos y caprinos.....	38
10. Figura 10. Células de defensa teñidas con Papanicolaou a partir de frotis realizados con el paquete celular de muestras de semen de ovinos y caprinos.....	39
11. Figura 11. Resultados negativos obtenidos, en la prueba de Inmunocitoquímica en muestras de células seminales de ovinos y caprinos.....	40
12. Figura 12. Unión Antígeno-Anticuerpo en la prueba de Inmunocitoquímica.....	42
13. Figura 13. Resultados obtenidos de la evaluación de líquido seminal de ovinos y caprinos en Western blot.....	43

1. Resumen.

El virus de Maedi-Visna (VMV) y el virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC), designados actualmente como Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR), pertenecen a la familia *Retroviridae*, son retrovirus exógenos que causan lesiones inflamatorias y degenerativas crónicas en el cerebro, pulmón, articulaciones, y glándula mamaria de ovejas y cabras.

En la actualidad se ha demostrado que ninguna de estas enfermedades son específicas de especie y que tanto los caprinos como los ovinos se infectan con ambos virus.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar en líquido seminal una prueba de ELISA competitiva, que detecta anticuerpos específicos contra la infección de Lentivirus de Pequeños Rumiantes. Se utilizaron 75 pajillas de semen de ovinos y caprinos de distintas razas, las cuales procedieron de diferentes distribuidoras y explotaciones (Hidalgo, Edo. de México, Guanajuato y Querétaro) y trasladadas al laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. A partir de aquí, las pajillas se centrifugaron a 2,500 RPM por 10 minutos y se separó el líquido seminal del paquete celular. Para el análisis del líquido seminal se utilizó una prueba de ELISA competitiva, para detectar anticuerpos a la Gp135 del virus de Artritis Encefalitis Caprina, además se utilizó la prueba de Western blot con fines comparativos. Al paquete celular, se le realizó un frotis y se tiñó con Papanicolaou, además un grupo de frotis fueron procesados para la prueba de Inmunocitoquímica, con el fin de hacer conteo celular y detección del antígeno respectivamente.

De las 75 muestras de líquido seminal, dos resultaron positivas a la prueba de ELISA competitiva, y dos fueron sospechosas. A la prueba de Western blot se obtuvieron 20 muestras positivas. En la tinción de Papanicolaou se observaron células epiteliales en la mayoría de las laminillas y se pudieron observar leucocitos en un animal positivo a ELISA. Con la prueba de inmunocitoquímica se logró detectar dos animales positivos, con macrófagos, polimorfonucleares, linfocitos y la unión Ag-Ac alrededor de células epiteliales en dos muestras con resultado positivo y otra negativo a la prueba de ELISA.

2. Introducción.

2.1 Antecedentes de la enfermedad por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR)

El virus de Maedi-Visna (VMV) fue descubierto en Islandia por Sigurdson *et al.*, 1957. Sin embargo los signos y síntomas de la enfermedad habían sido descubiertos con anterioridad en Sudáfrica en 1915, de lo que se describió como un problema respiratorio crónico en ovejas (de la Concha-Bermejillo, 1997; Pepin *et al.*, 1998; Vega, 2006). En México el primer estudio de seroprevalencia del VMV fue en el año de 1983 a partir de muestras con lesiones en pulmón recolectadas de rastros del Estado de México y el Distrito Federal y que fueron analizadas por inmunodifusión (Ramírez y Trigo, 1983).

El virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) fue aislado por primera vez en el año de 1980 en Estados Unidos, a partir de membrana sinovial de una cabra con artritis (Crawford y Adams, 1981). En México se presentaron evidencias del aislamiento e identificación del virus en el año de 1986 (Gay *et al.*, 1986; Trigo, 1991).

2.2 Etiología

El virus de Maedi-Visna y el de la Artritis Encefalitis Caprina, designados actualmente como Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR), pertenecen a la familia *Retroviridae*, que se subdivide en 7 géneros: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gamaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Lentivirus y Spumavirus. En el género Lentivirus se encuentran 9 especies que son: Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipos 1 y 2 (VIH), Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS), Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF), Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE), Virus de la Inmunodeficiencia Bovina (VIB), Lentivirus del Puma, VMV y VAEC (Murphy *et al.*, 1999; Nieves, 2004; Leroux y Mornex, 2008).

El género Lentivirus presenta diferencias en el tropismo celular y en el desarrollo de la enfermedad, por lo que se pueden dividir en dos grupos: (el primero puede incluir al VIH, VIS, VIF) los cuales se replican en linfocitos y macrófagos causando un síndrome de inmunodeficiencia adquirida y una enfermedad órgano específica de los pulmones, sistema

nervioso central (SNC) y tracto gastroentérico; el segundo grupo; (puede incluir al VAIE, VAEC y VMV) en contraste con el primer grupo, éstos se replican predominantemente en macrófagos, no afectan linfocitos (es por ello que no hay inmunosupresión) y causan una enfermedad órgano específica del SNC, pulmón y articulaciones (Bruett *et al.*, 2000).

Tabla 1. Célula huésped de los Lentivirus

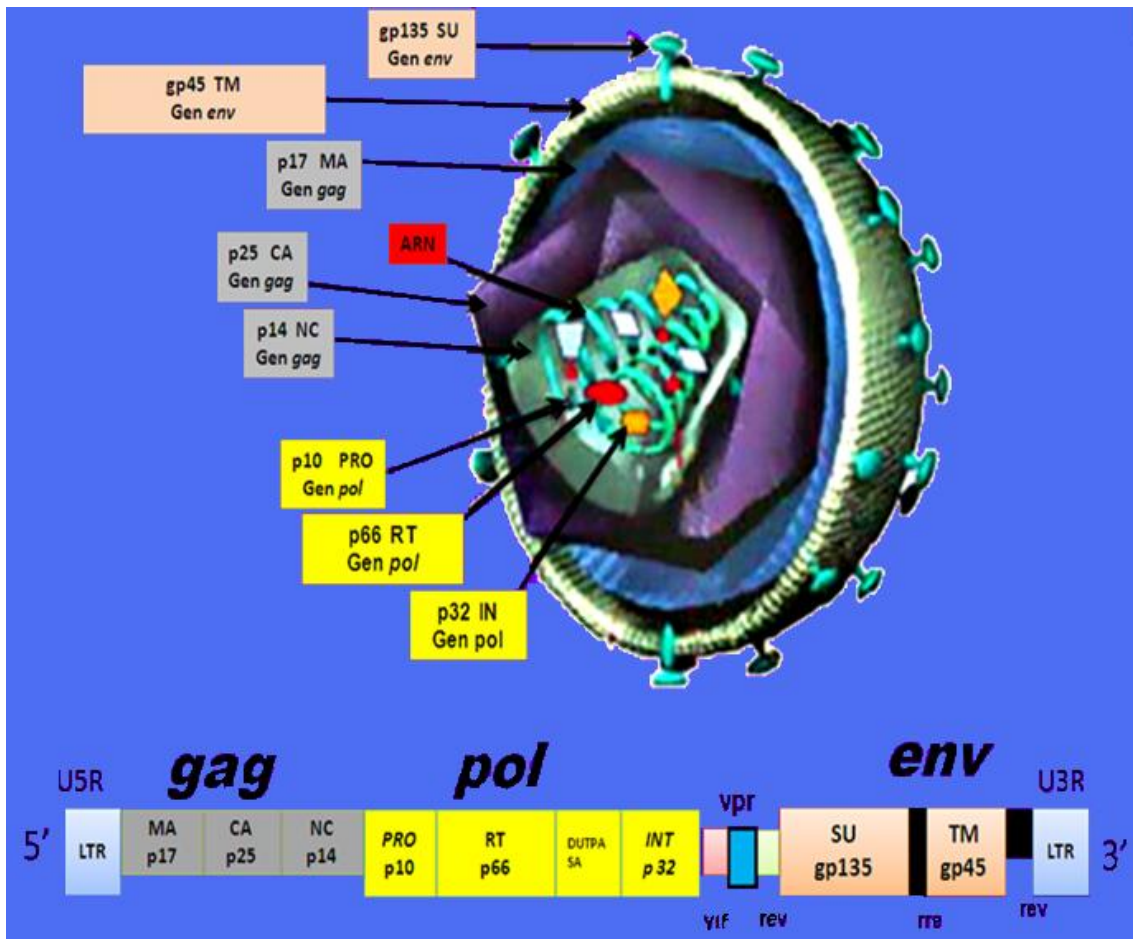
Virus	Hospedador	Célula huésped	Manifestación clínica
LVPR	Ovinos y Caprinos	Monocito/macrófago	Neumonía, artritis, mastitis, encefalitis
VAIE	Equinos	Monocito/macrófago	Anemia hemolítica, fiebre, algunas veces encefalopatías
VIH	Humanos	Linfocitos T y Monocito/macrófago	Inmunodeficiencia
VIS	Primates	Linfocitos T y Monocito/macrófago	Inmunodeficiencia
VIF	Felinos	Linfocitos T y B y Monocito/macrófago	Inmunodeficiencia
VIB	Bovinos	Macrófago	Linfadenopatía e Inmunodeficiencia

Fuente: Pepin *et al.*, 1998; Nieves, 2004; Leroux y Mornex, 2008

2.3 Morfología

Los lentivirus están compuestos de aproximadamente 60% proteína, 25% lípidos, 3% carbohidratos y 1% de ARN (Peturson *et al.*, 1992; ICTV, 2009). Tiene la morfología típica de los Retrovirus, el virión tiene un diámetro de entre 80-100 nm, con proyecciones de 8 a 10 nm de longitud en la superficie, las cuales están constituidas por glicoproteínas. En el interior de la nucleocápside se encuentra el genoma, la transcriptasa reversa, la proteasa y la integrasa. Rodeando a la nucleocápside se encuentra la cápside que tiene morfología icosaédrica con cerca de 60 nm de diámetro (Peturson *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1999) (Figura 1).

Figura 1. Estructura de los LVPR



NC= Nucleocápside CA= Cápside SU= Protuberancias de glicoproteínas TM= Proteína de transmembrana

PRO= Proteasa RT= Transcriptasa reversa IN= Integrasa MA= Proteína de Matriz Fuente: Ramírez, 2010

2.4 Genes estructurales

Los LVPR se caracterizan por tener 3 genes principales organizados de la siguiente forma: 5´gag- pol- env 3´. El gen *gag* (antígeno específico de grupo) que tiene un tamaño de 1229 a 1479 bases, el gen *pol* (polimerasa) de 2934 a 3333 bases y el gen *env* (de la envoltura) de 2549 a 2999 bases.

El gen *gag* codifica 3 proteínas: CA (p 25), NC (p 14) y MA (p 17) que estimula una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección (Saltarelli *et al.*,1990; Peturson *et al.*, 1992). El gen *pol* codifica la RT, la enzima dUTPasa, necesaria para la infección en los macrófagos, la IN que facilita la integración del provirus en el genoma de la célula y la PRO, esencial para la infectividad y maduración del virus (Pepin *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1999). El gen *env* codifica las proteínas de envoltura, la TM (gp45) y la SU (gp135) que contiene los epítomos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes y ésta además interviene en la interacción del virus con el receptor de la célula hospedadora (Peturson *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1999). (Figura 1y 2).

2.5 Genes reguladores

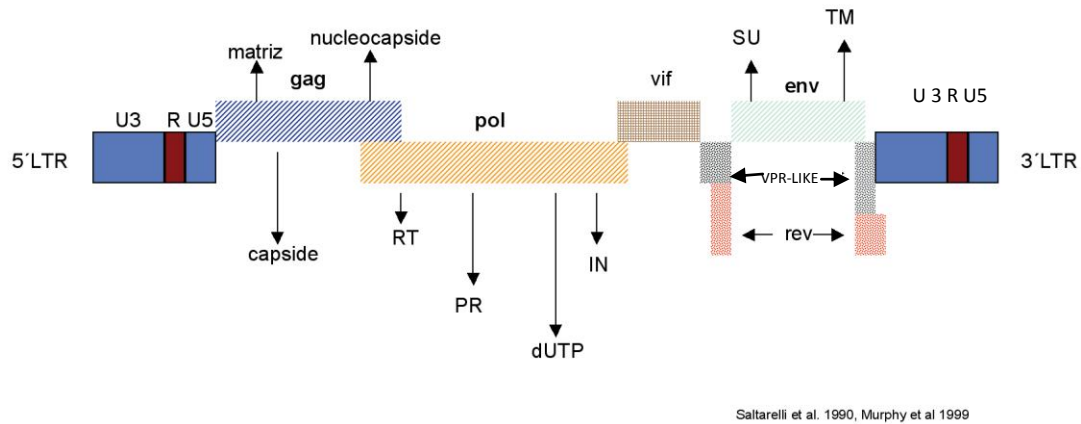
Los LVPR tienen tres genes accesorios o reguladores:

1. *Vif* (factor de infectividad viral), es el único gen accesorio conservado en el genoma de los LVPR que induce una respuesta débil inmune *in vivo*. Este gen se requiere para una eficiente replicación y patogenicidad del virus *in vivo* (Ramírez, 2010).

2. *Vpr-like* (antes llamada *tat*) previene la terminación prematura de la transcripción incrementando la expresión génica viral *in vivo* (Ramírez, 2010).

3. *Rev* (regulador de la expresión de proteínas del virión) codifica una proteína que está involucrada en los empalmes de los transcritos de RNA viral. Este gen se localiza en una pequeña región de la extremidad 5´del gen *env* y una región más grande en la región 3´del mismo gen (Saltarelli *et al.*, 1990; Peturson *et al.*, 1992; Coffin, 1996; Murphy *et al.*, 1999; Daltabuit, 2006 ; Ramírez, 2010) (Figura 2).

Figura 2. Genes estructurales y reguladores de los LVPR



Fuente: Daltabuit, 2006.

2.6 Región LTR

La región LTR (Long terminal repeats) no codifica ninguna proteína, su tamaño oscila entre 358 y 447 bases y se divide en tres zonas: U3, R y U5 (Figura 2). La función de la LTR es la de proporcionar sitios de unión a factores de transcripción celulares, con el fin de activar la transcripción y regular las fases latentes y productivas (Saltarelli *et al.*, 1990; Ramírez, 2010).

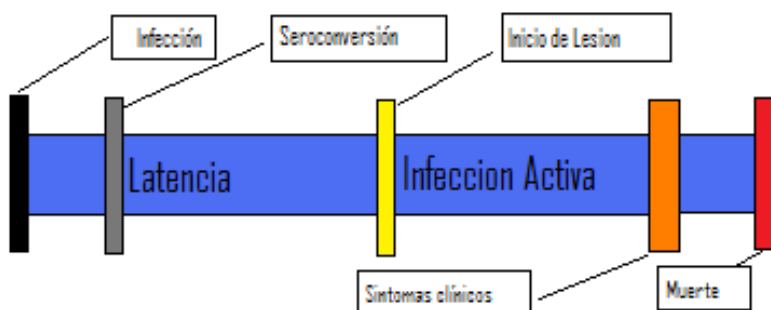
2.7 Patogenia

Las principales vías de infección en los animales son la ingestión de calostro y/o leche que contienen virus libre o asociado a células y la vía respiratoria en el caso de VMV.

Los LVPR son absorbidos en el intestino del recién nacido en la célula blanco infectada, (monocito/macrófago). La maduración de monocito a macrófago, está relacionada con el aumento de la replicación viral; sin embargo, los monocitos (célula infectada de forma latente) son capaces de diseminar el virus a otros órganos y así eluden la respuesta inmune del huésped, este mecanismo es conocido como “caballo de Troya.” (Peluso *et al.*, 1988; Narayan y Clements, 1989). Cuando el animal se infecta se observa una breve viremia, que es cuando el antígeno viral se expone al sistema inmunológico, y da lugar a la síntesis de anticuerpos en el hospedador y se produce la seroconversión. Después de la viremia inicial la infección entra en una etapa de latencia que puede durar desde semanas, e incluso años (Cheevers y McGuire, 1988; Blacklaws *et al.*, 1995). En la etapa de latencia el virus se está replicando continuamente en una cantidad baja, sobre todo en los ganglios linfáticos y es captado por células presentadoras de antígeno y van a ser rodeadas de linfocitos. Esto va a dar origen a los focos de inflamación que se observan en los tejidos blanco y que conducen a la aparición de los signos (Figura 3).

El virus se va a replicar en monocitos y macrófagos de la sangre, pulmón, bazo y médula ósea de animales infectados (Gendelman *et al.*, 1985; Peluso *et al.*, 1988). También se han identificado otras células que soportan la replicación viral e incluyen células dendríticas, células del sistema nervioso, células epiteliales y fibroblastos del plexo coroideo (Brodie *et al.*, 1993).

Figura 3. Patogenia de los LVPR



Fuente: Daltabuit, 2006, Ramírez 2010

2.8 Cuadro clínico

Las infecciones que causan los LVPR se caracterizan por ser infecciones lentas, persistentes y progresivas, que comienzan de forma subclínica y terminan con la degeneración de diferentes órganos llevándolos a la muerte. El periodo de incubación puede variar de días, meses hasta años, aunque el porcentaje de animales infectados puede ser alto en algunos rebaños, el número de animales que manifiestan una o múltiples formas clínicas de LVPR, varía de rebaño a rebaño (de la Concha-Bermejillo, 1999). Algunos animales pueden estar infectados y no presentar signo clínico alguno. En ovinos y caprinos las manifestaciones clínicas varían según la especie (Tabla 2).

2.8.1 Forma pulmonar

En ovinos es la manifestación predominante; el primer signo que se puede apreciar es la pérdida de peso que puede llegar a caquexia. La manifestación clínica más importante es la neumonía crónica con signos de falla respiratoria progresiva, sin fiebre, que generalmente afecta a ovinos de entre 2-4 años de edad. Sin embargo, es factible que más de una manifestación clínica se observe en un mismo animal. Inicialmente los animales afectados se retrasan cuando se trasladan de una pradera a otra y desarrollan intolerancia al ejercicio (Petursson *et al.*, 1990; Lujan y Bandiola, 2001). Conforme la enfermedad

progresa, la respiración se vuelve gradualmente más difícil. Posteriormente presenta esfuerzos respiratorios abdominales con extensión del cuello que son evidentes, acompañada de jadeo, distensión de los ollares, y respiración por el hocico. A la auscultación los ruidos respiratorios se acentúan y los estertores se vuelven aparentes. Borregas afectadas frecuentemente paren a corderos pequeños y débiles. Infecciones bacterianas secundarias son comunes durante las fases terminales de la infección y los animales afectados generalmente presentan fiebre, descarga nasal purulenta, tos y depresión. Una vez que la enfermedad se vuelve obvia clínicamente, los animales afectados mueren dentro de los siguientes 8-12 meses (Watt *et al.*, 1995).

Las lesiones macroscópicas consisten en un aumento de peso y de volumen de los pulmones que no colapsan al realizar la necropsia y pueden contener múltiples focos de 1 a 1.5 mm de diámetro de color gris y bien demarcados. (Ramírez, 2010) Microscópicamente hay engrosamiento del septo interalveolar con infiltración de mononucleares, hiperplasia en células del músculo liso y fibrosis (Petursson *et al.*, 1992; Brodie *et al.*, 1998).

2.8.2 Forma articular

La artritis es la manifestación clínica más importante en las cabras adultas. Los animales con una artritis avanzada presentan deformidades en las articulaciones y contracturas cuando se flexionan (Narayan y Clements, 1989). La artritis puede ser de forma unilateral o bilateral, algunos animales afectados pierden peso gradualmente y terminan postrados la mayor parte del tiempo, por lo que desarrollan úlceras en las articulaciones. La articulación más afectada es la del carpo y también las del tarso. La cantidad de líquido sinovial está aumentada, en ocasiones con fibrina, posee un color rojizo o pardusco y un conteo celular que va de 100 hasta 20 mil células/mm³ (valor normal menos de 100 células/mm³), de aquí el 90% son células mononucleares, principalmente linfocitos y macrófagos (Narayan y Cork, 1990; Trigo, 1991; Petursson *et al.*, 1992).

Microscópicamente, la lesión consiste en una sinovitis proliferativa crónica. Se puede apreciar una hiperplasia de la membrana sinovial con infiltración perivascular de

macrófagos, linfocitos, células plasmáticas. En casos avanzados se observa lesión degenerativa más que inflamatoria (Cheevers y McGuire, 1988; Trigo, 1991).

2.8.3 Forma nerviosa

En cabritos de 2 a 6 meses de edad se observa principalmente leucoencefalomielitis, se caracteriza por ataxia unilateral o bilateral posterior, también se pueden observar cojeras (Díaz *et al.*, 2005). En las fases iniciales la marcha es en pasos cortos, seguida de debilidad y postración. La afección nerviosa se manifiesta por inclinación de la cabeza, tortícolis y movimientos en círculos, no se presenta fiebre. El cerebro y la médula espinal muestran lesiones inflamatorias con infiltración de células mononucleares, de forma multifocal con gliosis astrocítica y desmielinización con permanencia de axones, así como reblandecimiento del tejido, que se van a manifestar con áreas de color pardo claro. Las meninges y el plexo coroideo a veces se ven afectadas con formación de folículos linfoides (Trigo, 1991; Petursson *et al.*, 1992). En años recientes la forma clínica nerviosa ha sido diagnosticada en numerosos rebaños de ovejas en el noroeste de España y han causado la pérdida de animales adultos y jóvenes (Benavides *et al.*, 2007; Ramírez, 2010) Los síntomas nerviosos en ovinos ocurren en animales mayores de un año, generalmente.

2.8.4 Forma mamaria

La mastitis se presenta de manera insidiosa tanto en ovinos como en caprinos y la ubre se ve aumentada de tamaño, simétrica y dura. Algunos autores señalan que la glándula mamaria es más susceptible al virus que otros órganos, y que puede depender de la raza para que sea el órgano más afectado. (Brodie *et al.*, 1998; Peterhans. *et al.*, 2004). La mastitis es indurativa difusa, bilateral crónica, no es dolorosa, los ganglios linfáticos supramamarios se hipertrofian.

El signo que más se observa en los rebaños es una disminución en la producción de leche y esto lleva a pérdidas importantes en la explotación. En la glándula mamaria, en las etapas iniciales se observa una infiltración moderada de células mononucleares e histiocitos

en el estroma periductal así como aumento del tejido conectivo (Trigo, 1991). La mastitis por LVPR se caracteriza por una inflamación no supurativa con infiltrado difuso de células mononucleares (Petursson *et al.*, 1992).

Tabla 2. Formas clínicas de la infección por LVPR en cabras y borregos

CAPRINOS		OVINOS	
Artritis crónica	++++	Problemas respiratorios crónicos	++++
Problemas respiratorios	+++	Mastitis	+++
Mastitis indurativa aséptica	++	Forma nerviosa	++
(Nerviosa)	Leucoencefalomielitis	en	Problemas articulares
cabritos de 2-6 meses edad	+		+

Fuente: de la Concha-Bermejillo, 1999 + menos frecuente, ++ y +++ frecuente, ++++ signo principal

2.9 Respuesta inmune

Dentro de los problemas que presenta el sistema inmune para tratar la infección por LVPR, destaca que los anticuerpos contenidos en calostro y leche de animales seropositivos, no tiene un efecto protector para la descendencia, y no evita la infección de los recién nacidos (Peretz *et al.*, 1993; Martínez, 2003). La infección de los LVPR va a estimular en el hospedador una respuesta inmune mediada por anticuerpos y células que no son capaces de acabar con la infección y que mantienen a los animales infectados de por vida. Tras la infección existe un periodo largo asintomático en el que la carga viral es baja, seguido de un periodo corto sintomático que lo puede llevar a la muerte (Pepin *et al* 1998; Amorena *et al.*, 2001).

Las células blanco principales de los LVPR son las de la línea monocito/macrófago, además de las células dendríticas (Ryan *et al.*, 2000). Estas células son las encargadas de captar antígenos y presentarlos a los linfocitos para desencadenar una respuesta inmune específica (Ryan *et al.*, 2000).

Los monocitos pueden llevar el genoma viral, pero no permiten la infección productiva hasta que maduran a macrófagos y migran hacia los tejidos; como se mencionó previamente, los monocitos son llamados “caballo de Troya” ya que tiene el papel de transportar el virus y no permitir que sea detectado por el sistema inmune (Peluso *et al.*, 1988).

Una vez que la célula se transforma a macrófago, se dispara la expresión del virus. El incremento en la replicación viral conduce a la secreción de una importante producción de interferon- γ (IFN- γ) por los linfocitos T y células asesinas naturales (NK); este incremento, induce la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II, (CMH) con antígenos de la superficie viral, en macrófagos tisulares infectados y finalmente, la producción de citocinas y otros mediadores inflamatorios por el sistema inmune (Petursson *et al.*, 1992).

2.9.1 Respuesta humoral

Los anticuerpos (Ac) presentes en la infección por los LVPR son de tipo precipitantes y neutralizantes, los primeros anticuerpos en aparecer son los anticuerpos precipitantes. Las razones por las que los anticuerpos neutralizantes son ineficaces para eliminar la enfermedad, puede ser por la capacidad de mutación del virus que implica la aparición de variantes antigénicas que estos no van a reconocer (Pepin *et al.*, 1998). El tropismo de los LVPR hacía los macrófagos es un importante factor de infección ya que algunos epítopes pueden pasar desapercibidos al sistema inmune del hospedador. (Kennedy-Stoskopf y Narayan, 1986; Begara *et al.*, 1996)

La respuesta inmune se desarrolla contra varias proteínas del virus, en particular a las glicoproteínas de envoltura *env* y a las codificadas por el gen *gag* (p14, p15, p17) (Rosati *et al.*, 1995; Daltabuit, 2006; Ramírez, 2010)

2.9.2 Respuesta celular

Se presenta entre la primera y cuarta semana post infección y disminuye de la cuarta a la doceava semana.

La respuesta de las células T desempeña un papel crucial en controlar infecciones virales agudas y persistentes y se puede considerar beneficiosa para el huésped. Sin embargo su participación en la protección de los ovinos y caprinos contra LVPR es polémica y aún confusa. (Welsh *et al.*, 2004; Klenerman y Hill, 2005; IVIS, 2007).

Las células T citotóxicas (CD8) que se encuentran en caprinos y ovinos infectadas con LVPR, se consideran un importante control de la carga viral de los animales que tienen una infección persistente (Blacklaws *et al.*, 1995). En infecciones por LVPR 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 y produciendo citoquinas inhibitorias. La producción de quimiotácticos estimula la migración de linfocitos a los órganos blanco provocando las lesiones características de los LVPR, que es una inflamación con infiltración linfocitaria. 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 en casos de alveolitis por VMV. Además se ha observado que en infecciones por VAEC se incrementa interleucina 16 (IL-16) en células de membrana sinovial y suero (Begara *et al.*, 1996; Amorena, 2001; Daltaubuit, 2006).

2.10 Transmisión

Los LVPR pueden ser transmitidos naturalmente atravesando la barrera entre especies en ambas direcciones. (ovino-caprino) (Shah *et al.*, 2004; Denner, 2007). Principalmente la transmisión ocurre de la madre a su descendencia a través del calostro y la leche, (Houwens *et al.*, 1983; Peterhans *et al.*, 2004; Blacklaws. *et al.*, 2004), sin embargo, existen otras rutas de diseminación como son: vía aerógena (que actualmente se considera la mas importante para VMV), intrauterina, por loquios postparto de hembras infectadas, secreciones salivales, secreciones vaginales durante el nacimiento, contacto

directo, iatrogénica y venérea (Rowe y East. 1997; Travassos *et al.*, 1998 y 1999; Radostits *et al.*, 2000; Berriatua. *et al.*, 2003; Blacklaws. *et al.*, 2004;).

La transmisión de la enfermedad es posible por dos vías: horizontal y vertical.

2.10.1 Transmisión vertical

Línea germinal: no existe evidencia de que el genoma de LVPR este presente en la “línea germinal” (Blacklaws. *et al.*, 2004).

Infección intrauterina/transplacentaria: se ha tratado en varios estudios y es la ruta más polémica. Algunos autores proporcionan evidencia a favor de esta ruta, mientras que otros divulgan resultados negativos. Lamara *et al.*, (2001, 2002) demostraron que las células epiteliales del oviducto de la cabra se pueden infectar *in vitro* con el virus de la AEC, aunque no hay informes de que tales células sean infectadas *in vivo* (Blacklaws. *et al.*, 2004).

Vía calostrada y leche: como se mencionó anteriormente, ésta es la principal vía de infección. La infección se ve favorecida por el reclutamiento de células mononucleares infectadas hacia la glándula mamaria, de este modo, la cría puede ser infectada con su primera toma de calostro, ya que el intestino presenta una alta permeabilidad las primeras horas de vida (Peterhans *et al* 2004).

2.10.2 Transmisión horizontal

Vía aerógena: la fuente de infección es el fluido pulmonar expulsado al toser, pues va acompañado de monocitos y macrófagos alveolares infectados con el virus. Experimentalmente es posible la infección intranasal e intratraqueal. (Torsteinsdottir *et al.*, 2003). La transmisión aerógena es la más asociada al confinamiento en corrales, sobre todo en invierno y puede aumentar la incidencia tanto con la edad como con el tiempo de exposición.

Vía venérea: se ha descrito la presencia de LVPR en células, plasma y tejidos del tracto genital en sementales ovinos y caprinos (de la Concha-Bermejillo *et al.*, 1996; Travassos *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2008). Por lo tanto, existe la posibilidad de

transmisión venérea de forma natural o por inseminación artificial. La presencia de *Brucella ovis* puede aumentar la probabilidad de que se encuentre el virus en semen. Teóricamente, el virus, al encontrarse en todo fluido corporal, también podría transmitirse por esta vía, por ello hay que tener en cuenta esta posibilidad al utilizar semen para la inseminación artificial (Blacklaws *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2009). En los machos aunque se han realizado diversos estudios a la infección por LVPR, no se les ha dado su verdadera importancia en la diseminación de la enfermedad vía semen (Martínez *et al.*, 2005)

Otra posible ruta de transmisión de los LVPR en forma horizontal, pero de forma indirecta, es a través de la transferencia de embriones. Si se tiene en cuenta que en la “transferencia de embriones” estos proceden de rebaños seronegativos, esta vía no parece que pueda crear ningún problema. Aun así, no se debe de olvidar que se puede hallar ADN proviral en células del oviducto, por lo que no deja de constituir un riesgo (Nieves, 2004).

Se sabe que las maquinas ordeñadoras o las manos y toallas que contaminen la leche, pueden ser potenciales diseminadoras del virus.

En cuanto a la forma iatrogénica podría transmitirse la infección por agujas o instrumentos contaminados (Narayan *et al.*, 1983).

2.11 Diagnóstico

El diagnóstico clínico es complejo por las características de la infección los LVPR, ya que tienen un largo periodo de incubación, además de que no todos los animales van a manifestar algún signo clínico o producir anticuerpos, o aún si generan anticuerpos van a estar aparentemente sanos (Trigo, 1991).

Para el diagnóstico de los LVPR se han descrito métodos que identifican al agente como la microscopía electrónica y el aislamiento viral utilizando cultivo celular. Utilizando pruebas serológicas como la inmunodifusión en gel de agar, (IDAG) inmunoensayo ligado a enzimas, (ELISA) radioinmunoprecipitación (RIPA) y Western blot. (WB). Otros métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos se pueden utilizar para el diagnóstico como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), southern blotting (SB), e hibridación *in*

situ (Cunha *et al.*, 2001; OIE, 2004; de la Concha-Bermejillo, 2005; de Andres *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2005; Daltauit, 2006; Vega, 2006; Brinkhof *et al.*, 2010). Otras pruebas de laboratorio que pueden utilizarse son la detección de la transcriptasa inversa y la activación policlonal de células B (Pérez, 2005).

2.11.1 Microscopía electrónica

En la identificación de la estructura viral, la microscopía de transmisión de electrones es la técnica de elección, al realizar estudios en cultivos celulares infectados así como, en tejidos de animales infectados con LVPR, se observa en el microscopio electrónico la presencia de la estructura viral, la cual mide entre 90 y 100 nm de diámetro (Can, 1997).

2.11.2 Cultivo celular

El cultivo celular de LVPR se lleva a cabo en cultivos primarios en los que se añaden células (co-cultivos) de la línea monocito/macrófago obtenidos de la sangre periférica de animales sospechosos, o también de lavados bronquiales o macerados de tejidos; y si hay infección, las células muestran efecto citopático tras 2 a 3 semanas de incubación. El efecto citopático consiste en la formación de células gigantes (sincitios), aunque en algunos casos puede no observarse si la cepa viral no induce este efecto, o bien por que el virus permanece latente (Sihvonen *et al.*, 1980; Ellis, 1990). Las líneas celulares más utilizadas son la membrana sinovial de cabras y fibroblastos de plexo coroideo de corderos o fetos ovinos. Otro tipo de líneas celulares que se han utilizado son las de córnea de cordero (Trigo, 1991; Juste *et al.*, 1998). Aunque el aislamiento del virus permite dar diagnóstico definitivo, este procedimiento es caro y necesita de un periodo largo para su realización (Sihvonen *et al.*, 1980).

2.11.3 Inmunodifusión en gel de agar (IDAG)

La calidad de los métodos serológicos se define por su sensibilidad y especificidad. La IDAG se considera muy específica y poco sensible. Es la técnica más utilizada, en particular en los exámenes de hato. Su principio se basa en la difusión pasiva del antígeno y los anticuerpos a través del agar hasta que el antígeno y el anticuerpo se encuentran en

una zona de equivalencia y precipitan formando una línea de precipitación (Morilla y Bautista, 1986).

Hay dos antígenos virales que son importantes en serología, la glicoproteína de la envoltura (gp 135) y la proteína interna (p 28). Ambas se conservan en una preparación antigénica constituida por medio colectado de cultivos celulares infectados que se concentra aproximadamente 50 veces por diálisis con polietilén-glicol (Adams y Gorham, 1986; OIE, 2004). Es importante reconocer que la sensibilidad de la IDAG para detectar anticuerpos anti-AEC depende del antígeno empleado. Se ha demostrado que una prueba de IDAG con gp135 de AEC aporta más sensibilidad que una prueba IDAG con p28 de AEC (Gorham, 1986).

2.11.4 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

La técnica de ELISA es fácil de realizar en laboratorios con un equipamiento mínimo (espectrofotómetro) y es conveniente para realizar análisis a gran escala, sobre todo para el diagnóstico veterinario, ya que es fiable para demostrar anticuerpos a LVPR en ovejas y cabras (OIE, 2004). La prueba presenta una alta sensibilidad, especificidad, rapidez, es automatizable y económica. Actualmente hay ELISAs disponibles de forma comercial en los que se utilizan formatos y diseños diversos; como la ELISA Indirecta (ELISAI) y la ELISA competitiva (ELISAc) (de Andrés *et al.*, 2005).

La preparación antigénica para esta prueba debe contener al menos uno de los antígenos principales de los LVPR, es decir, la glicoproteína de la superficie (gp135), la proteína transmembrana (gp44), y la proteína de cápside (p25) (Zanoni *et al.*, 1994). La técnica de ELISA puede aplicarse también en la detección de anticuerpo en la leche, pero como los títulos de anticuerpos contra los LVPR en la leche son más bajos que en suero, es de esperar una menor sensibilidad (OIE, 2004; Knowles *et al.*, 1994). Ramírez *et al.*, 2009, realizaron estudios con algunos kits de ELISA comerciales y los resultados que obtuvieron indican que pueden aplicarse para la detección de anticuerpos específicos contra LVPR al líquido seminal, lo cual podría ser una buena elección para el control de la infección en los centros de inseminación artificial.

El principio básico de el ELISA es el uso de anticuerpos conjugados con una enzima que al reaccionar con el sustrato adecuado producen una reacción de color que se puede cuantificar en un espectrofotómetro a una longitud de onda apropiada.

2.11.5 Inmunoelctrotransferencia o Western blot (WB)

El Western blot consiste en someter el antígeno a una interacción específica con anticuerpos marcados directa o indirectamente. Tras separar las proteínas del antígeno mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas se transfieren a una hoja de nitrocelulosa, los lugares de unión no específicos se bloquean, las tiras se incuban con anticuerpo primario y se añaden anticuerpos anti-anticuerpo con peroxidasa (conjugado) (Amorena *et al.*, 1997). Una muestra se considera positiva si se detectan al menos dos proteínas virales diferentes. (Brodie *et al.*, 1992; Murphy, 1999; Daltabuit, 2006). Diversos autores han considerado al WB como la “prueba de oro o referencia” para los ensayos de anticuerpos a LVPR (de Andrés *et al.*, 2005).

La identificación de LVPR requiere de pruebas más sofisticadas que no son utilizadas rutinariamente por la mayoría de laboratorios como métodos de diagnóstico. El Western blot, debido a su complejidad y costo solo se utiliza como prueba confirmatoria (Ramírez, 2010).

2.11.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR consiste en la amplificación de una región de ADN mediante la aplicación de series de tres ciclos de desnaturalización del ADN blanco, con oligonucleótidos específicos (cebadores) que se van a unir a los extremos 5' y 3' del fragmento blanco. Tras completar la reacción, se separa y visualiza el producto amplificado del resto del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Vega, 2006). La PCR al inicio, se consideró que sería exitosa para el diagnóstico de LVPR, gracias a su capacidad para detectar directamente el ADN proviral, en la célula infectada o como ARN de las partículas virales (Leroux *et al.*, 1997). Sin embargo, la eficiencia va a depender de la especificidad de los cebadores diseñados y por consecuencia de una adecuada elección de la región viral a amplificar, además del nivel de detección de

moléculas de ADN viral que es lo que determina la sensibilidad de la prueba (Ramírez, 2010).

2.11.7 Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* es una técnica utilizada para la detección de ADN o ARN viral en células infectadas, o para estudiar la expresión de una proteína en una célula, utilizando secuencias complementarias (sondas) de ADN para detectar la molécula de interés con una sustancia radioactiva (Amorena *et al.*, 1997). La sonda es incubada con la célula para luego ser detectada y visualizada al microscopio. La hibridación *in situ*, tiene buena sensibilidad y especificidad En las últimas décadas se ha utilizado esta técnica en el diagnóstico de los LVPR (Sanna *et al.*, 1999; Pérez, 2005).

2.12 Diagnóstico diferencial

Hay una gran variedad de enfermedades de las cuales se deben de diferenciar los LVPR.

Forma pulmonar: por diversas neumonías bacterianas, parasitarias y enfermedades virales.

Forma artrítica: por artritis nutricional, artritis bacterianas y por traumatismos.

Forma nerviosa: por distintas enfermedades bacterianas, parasitarias, virales y deficiencias nutricionales.

Forma mamaria: por las diversas mastitis bacterianas que existen (Radostits *et al.*, 200; Pérez, 2005; Daltabuit, 2006; Vega, 2006).

Tabla 3. Pruebas utilizadas para el diagnóstico de LVPR

Nombre de la prueba	Principio de la prueba
Cultivo celular	Detección de virus por efecto citopático, inmunofluorescencia, microscopía electrónica
Microscopía electrónica	Morfología e identificación viral
Inmunodifusión en gel de agar	Detección de anticuerpos contra la gp135 de envoltura y la p28 de la cápside
ELISA	Detección de anticuerpos
Radioinmunoensayo	Detección de antígenos gp135 y p28 utilizando anticuerpos con marcadores radioactivos
Western blot	Detección de anticuerpos contra todas las proteínas del virus
PCR	Detección del ácido nucléico del virus
Hibridación <i>in situ</i>	Detección de ADN o ARN viral por medio de una sonda marcada radioactivamente o con un compuesto fluorescente
Inmunoperoxidasa	Detección de antígeno viral en cultivo celular o tejidos
Transcriptasa inversa	Detección de la actividad de la transcriptasa inversa del virus

Fuente: Pérez, 2005

2.13 Prevención y control

Con el fin de evitar la alta prevalencia de la enfermedad en los corrales tanto de ovinos, como de caprinos, se necesita realizar una serie de medidas en los recién nacidos, hembras y en machos (semen). Según Martínez, 2003, los sementales serían una fuente importante de transmisión de la enfermedad. También en el manejo del calostro, en la eliminación de animales positivos, en el manejo de las secreciones y manejo de las ordeñadoras (Rowe y East, 1997). A la fecha el único método efectivo para el control de las infecciones por LVPR es a través de la eliminación de animales infectados (de la Concha-Bermejillo, 1999).

Desde el desarrollo de las pruebas serológicas para la detección de LVPR, estas infecciones se pueden controlar por medio de la identificación y eliminación de animales infectados. Debido a que en el mayor de los casos transcurre un tiempo entre la infección y la seroconversión, por lo que es necesario hacer las pruebas cada seis meses, o anuales (de la Concha-Bermejillo, 1999).

En la actualidad no existe una vacuna eficaz para los LVPR por varias razones: a) los mecanismos de inmunidad frente al virus no están bien definidos. b) la selección e identificación de los antígenos protectores se encuentran en vías de estudio. c) la ruta y el vehículo de vacunación óptimos, y el adyuvante idóneo no se han establecido. d) la variación genética y antigénica del virus es elevada (Shah *et al.*, 2004; Amorena *et al.*, 2008).

El control de la infección por LVPR es necesario para alcanzar el estatus de “libre de infección.” Los rebaños libres de infección obtienen beneficios como el de un valor añadido en las ventas para, se evita propagar la infección y evitan pérdidas económicas asociadas con la infección (Reina *et al.*, 2009; Ramírez, 2010).

En los rebaños donde existe la infección, la mejor recomendación es eliminar a los animales infectados gradualmente e iniciar un rebaño libre a LVPR. Esto se logra de la siguiente manera:

- Realizar pruebas serológicas cada 6-12 meses por lo menos 5 años; eliminando a los positivos.
- Separar inmediatamente a los recién nacidos, teniendo cuidado de no permitir el contacto con secreciones de la madre.
- Proporcionar calostro, previamente calentado a 56°C por una hora o que provenga de hembras negativas.
- Al momento de la ordeña, pasar primero a los animales negativos y después los positivos.
- La importación de animales y de semen debe de ser controlada mediante pruebas serológicas.
- Al utilizar inseminación artificial, el semen de los machos debe de provenir de animales serológicamente negativos (Rowe y East, 1997; Martínez, 2003).

2.14 Importancia económica

El impacto económico por la infección de LVPR es difícil de determinar (Petursson *et al.*, 1990). Las pérdidas económicas atribuibles a los LVPR pueden relacionarse con las producidas por efectos directos con la muerte y eliminación precoz de los ovinos y caprinos infectados, el aumento de la tasa de reposición anual y la disminución del crecimiento de ovejas y cabritos afectadas, y por efectos indirectos como la propensión a sufrir infecciones secundarias, la disminución del valor en el mercado de los animales de rebaños infectados y la imposibilidad de poder comercializar a estos animales (Houwens, 1990).

Quizá en este punto es donde se pueda convencer al productor de que tenga en cuenta lo mencionado anteriormente, dándole a detalle la pérdida en ganancias si tiene animales infectados con LVPR.

- Los animales tienen un bajo costo a la venta.
- Hay una prematura reposición por efectos directos con la muerte.
- Se aumentan los costos en reposición.

- Hay pérdida en la calidad y cantidad de la leche (10%, 25-30%).
- Hay aumento de células somáticas en leche.
- Habrá efectos adversos en la explotación (no se puede exportar) por la posible diseminación de la infección de LVPR.

(Martínez, 2007)

3. Justificación.

Existen estudios que detectan anticuerpos en líquido seminal de animales infectados a LVPR, utilizando para ello kits de ELISA comerciales de procedencia Europea, basados en un formato de ELISA indirecta (Instituto Pouquier Maedi-Visna/ CAEV Serodiagnostic ELISA Test Serum, Chekit CAEV-MVV IDEXX, Elitest MVV/CAEV) (Ramírez *et al.*, 2009). El kit de ELISA comercial VMRD Inc. De fabricación estadounidense, es una prueba de ELISA competitiva que no ha sido evaluado para este tipo de fluidos y podría ser útil para el control de la infección en centros de inseminación artificial. México importa semen de ovinos y caprinos sin validarlos a la infección de LVPR con lo cual se podría evitar la posible introducción o reintroducción de la enfermedad si se establece como norma la evaluación de muestras biológicas utilizadas en la mejora genética.

4. Hipótesis.

Se pueden demostrar anticuerpos anti LVPR en el líquido seminal de machos ovinos y caprinos, utilizando una prueba de ELISA competitiva.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo general

1. Detectar anticuerpos específicos contra la infección de LVPR en líquido seminal utilizando una prueba de ELISA competitiva.

5.2 Objetivos particulares

1. Obtener muestras de semen de carneros y machos caprinos por diferentes métodos como: vagina artificial, electroeyaculación y pajillas de centros de inseminación artificial.
2. Separar por centrifugación el líquido seminal del paquete celular.
3. Realizar tinción de Papanicolaou y la prueba de Inmunocitoquímica al paquete celular.
4. Determinar la presencia de anticuerpos y proteínas en el líquido seminal con la prueba de ELISA competitiva y Western blot. Ésta última técnica se utilizará con fines comparativos.

6. Material y métodos.

6.1 Recolección de las muestras.

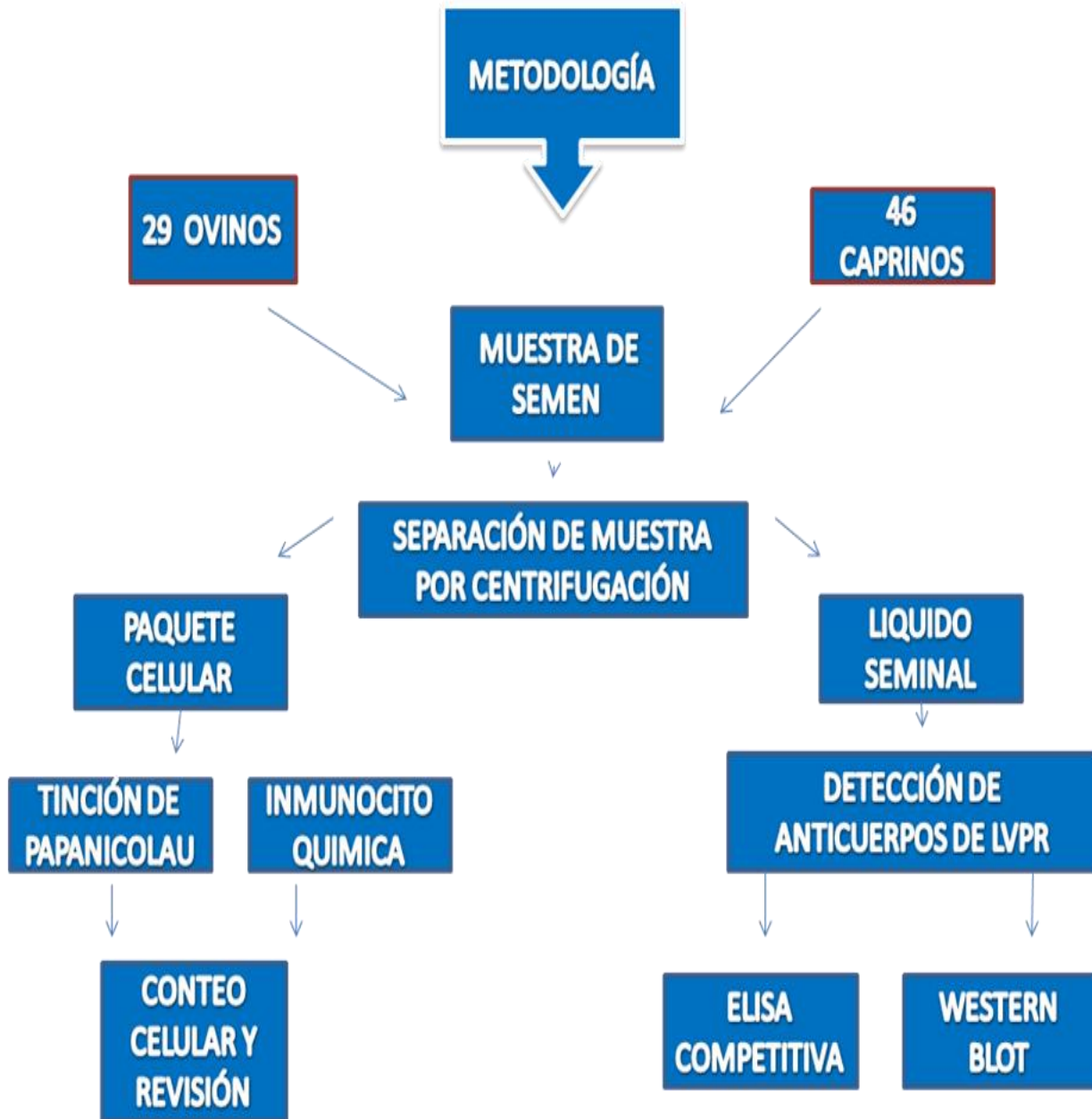
Para la realización del presente trabajo, la obtención de semen se realizó con vagina artificial, electroeyaculación y de pajillas de centros de inseminación artificial, por lo cual, se procedió a visitar distintas explotaciones de ovinos y caprinos de distintas razas en el Estado de México, Hidalgo, Guanajuato y Querétaro, con el fin de obtener muestras de semen de los sementales (Tabla 4). También se logró contactar con gente de un centro de inseminación artificial para la obtención de pajillas.

La selección de sementales, se realizó considerando que tuvieran un rango de edades de entre 1 a 3 años. Ninguno de los sementales presentaba signos clínicos de la infección por LVPR, la obtención de las muestras fue de la siguiente forma.

1. Obtención directa (vagina artificial y electroeyaculación) de animales en explotaciones de ovinos y caprinos
2. Obtención de muestras de semen a partir de pajillas de caprinos.

Las muestras en fresco, se mantuvieron en refrigeración a 4°C y se llevaron inmediatamente al laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán para llevar a cabo el procesado de las mismas. El procesamiento consistió en centrifugar la muestra a 2,500 RPM por 10 minutos separando el líquido seminal del paquete celular. Para las pajillas obtenidas de centros de inseminación artificial, éstas estuvieron en nitrógeno líquido hasta la llegada al laboratorio de la FES- Cuautitlán y el procesamiento fue como previamente se ha descrito.

Figura 4. Diseño experimental



El número total de muestras fue de 75, de las cuales 46 muestras fueron de machos caprinos, mientras que 29 fueron de machos ovinos (Tabla 8).

Tabla 4. Total de muestras de semen obtenidas de ovinos y caprinos

Caprinos 46		Ovinos 29	Total 75 animales
Estado de México	Querétaro	Hidalgo	Guanajuato
Cuautitlán n= 6	Apaseo n= 7	Santiago, Tezontlale n= 14	Centro Ovi-Caprino n= 38
Melchor Ocampo n= 1			
Teoloyucan n= 6			
Capulhuac n= 3			

La cantidad de muestras por estado fueron: Estado de México n= 16 de los municipios de Cuautitlán, Melchor Ocampo, Teoloyucan y Capulhuac. Querétaro n= 7, del municipio de Apaseo, Hidalgo n= 14, del municipio de Santiago Tezontlale y Guanajuato n=38 del centro ovi-caprino (Tabla 4).

Tabla 5. Razas de machos ovinos muestreadas para la obtención de semen

Especie	Raza	Edad	Total
Ovino	Columbia	3 años	2
Ovino	Suffolk	1-2 años	11
Ovino	Criollo	1-3 años	11
Ovino	Dorper	1 año	1
Ovino	Dorset	2 años	1
Ovino	Hampshire	1-3 años	3

La cantidad de razas de ovinos y caprinos utilizadas fue diversa, ya que dependía del estado del cual se tomaba la muestra. (Tablas 10 y 11).

Tabla 6 Razas de machos caprinos muestreadas para la obtención de semen

Especie	Raza	Edad	Total
Caprino	Desconocida	1-3 años	38
Caprino	Saanen	1 año	4
Caprino	Toggenburg	1 año	2
Caprino	Murciana-granadina	2 años	1
Caprino	Criollo	2 años	1

6.2 Procedimiento de la prueba de ELISA competitiva

El kit comercial utilizado para el análisis de las muestras de líquido seminal: CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS TEST KIT cELISA y es elaborado por laboratorios VMRD. Inc. U.S.A. El fundamento de la prueba se basa en la detección de anticuerpos que reconocen a la glicoproteína Gp135 de LVPR. Los anticuerpos de la muestra, inhiben la unión del anticuerpo peroxidado específico (conjugado) al antígeno de VAEC cubriendo los pozos de la placa. El desarrollo débil o ausencia de color nos indica que la muestra es positiva, debido a que el sustrato no encontró a la enzima, por que el conjugado fue desplazado por los anticuerpos presentes en la muestra. El procedimiento realizado para la prueba fue, según las especificaciones del fabricante: (VMRD, 2011)

- a) Las muestras se dejaron a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.
- b) Se agregaron 50µl de las muestras en los pozos de la placa sin diluir por duplicado, al igual que para los controles positivo y negativo. Y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
- c) Se lavaron tres veces los pozos de la placa con 250µl de solución de lavado.
- d) Se agregaron 50µl de conjugado en cada pozo, y se dejó incubar la placa por 30 minutos a temperatura ambiente.
- e) Se realizaron tres lavados a los pozos con 250µl de la solución de lavado.
- f) Se agregaron 50µl de la solución sustrato en cada pozo de la placa y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- g) Se agregaron 50µl de la solución de paro a cada pozo de la placa.
- h) Se realizó la lectura de la placa en espectrofotómetro, a una longitud de onda de 620-650nm. Finalmente se interpretaron los resultados con la siguiente formula.

$\% \text{ Inhibición} = 100 - (\text{Densidad óptica (D.O) de la muestra} \times 100) / (\text{D.O de control negativo})$

Las muestras que con una inhibición mayor o igual a 35%, se consideran positivas y las menores a 35%, se consideran negativas.

6.3 Procedimiento de la tinción de Papanicolaou

Al centrifugar el semen, se obtuvo el paquete celular, del cual se agregó una gota en un portaobjetos común y se realizó un frotis, para posteriormente llevar el siguiente procedimiento:

- a) Las laminillas se fijaron con alcohol metílico por 10 minutos y se secaron al aire.
- b) Se rehidrataron con agua destilada por 1 minuto.
- c) Se tiñó con hematoxilina por 1 minuto y posteriormente se eliminó el exceso con agua corriente.
- d) Se realizaron dos lavados con alcohol etílico al 96% por 2 minutos cada uno.
- e) Se sumergieron en una solución de OG6 (Orange Gal 1% en OH al 96%) por dos minutos.
- f) Se realizaron dos lavados con alcohol etílico al 96% por 5 minutos.
- g) Se sumergieron en una solución de EA (eosina al 0.5%, pardo Bismark al 0.5% y verde brillante al 0.5%) por tres minutos.
- h) Se realizaron dos lavados con alcohol etílico al 96% por cinco minutos
- i) Se realizó un lavado con alcohol absoluto por dos minutos
- j) Se sumergieron en una solución de alcohol absoluto con xilol en una proporción de 50/50 por dos minutos.
- k) Se sumergieron después en xilol, dos veces por dos minutos.
- l) Finalmente se montaron en resina y se dejaron secar para su posterior observación.

(Aguilar, 2009)

6.4 Procedimiento de la prueba de inmunocitoquímica

Se agregó una gota del paquete celular en un portaobjetos y se realizó un frotis, para después fijarlo con acetona durante 10 minutos y dejarlo secar al aire.

- a) Previamente las muestras fueron tratadas para eliminar la peroxidasa endógena, cubriendo el corte con peróxido de hidrógeno al 3% por una hora en cámara húmeda, después se lavó con PBS con un pH de 7.4.
- b) Se bloqueó con albúmina sérica bovina al 2% e incubó nuevamente por una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente y se lavó con PBS (apéndice 1).
- c) A cada portaobjetos se le agregaron 200µl de suero policlonal a LVPR de origen caprino en una dilución 1/50 (Previamente evaluado con la prueba de ELISA) y se incubó nuevamente en cámara húmeda por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS dos veces.
- d) A continuación se agregó 200µl de un anticuerpo monoclonal anti-IgG de cabra peroxidado y se incubó 90 minutos en cámara húmeda.
- e) La reacción se reveló con 5mg de diaminobencidina (Dab Sigma Chemical) en 10ml de solución reguladora Tris HCL 0.05 M con pH 7.6 y añadiendo 0.1ml de peróxido de hidrógeno al 3%. Esta solución se depositó sobre los portaobjetos e incubó 10 minutos, para luego lavar con agua destilada tres veces.
- f) En cuanto se observó una precipitación de color café, se lavaron inmediatamente los frotis con agua destilada por cinco minutos y se contratiñeron con hematoxilina de Harris por 60 segundos.
- g) Finalmente se lavaron los frotis con agua destilada durante cinco minutos para luego deshidratar la laminilla con alcohol etílico al 90%, 96% y 100%. Se aclararon con xilol y se montó la laminilla con resina.

(Rodríguez, 1998; Martínez, 2003)

6.5 Procedimiento del Western blot

A partir de membranas de nitrocelulosa a las que previamente le fueron transferidas proteínas de LVPR de un virus aislado de un caprino de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Se generaron tiras con cortes de 3mm de las membranas de nitrocelulosa y posteriormente se fueron bloqueando con solución de bloqueo al 5% (apéndice II) por una hora a 37°C y se lavó tres veces en un agitador por 10 minutos.
- b) Enseguida se colocó el primer anticuerpo (líquido seminal) sin diluir y se incubó por 24 horas a una temperatura de 4°C.
- c) Al finalizar la incubación se realizaron tres lavados en agitación por 10 minutos con solución de lavado al 2% (apéndice II).
- d) A continuación se adicionó el conjugado diluido 1:1000 (anti-IgG de cabra peroxidado) en buffer de dilución (apéndice II) y se incubó a una temperatura de 37°C por 2 horas.
- e) Al terminar la incubación se realizaron tres lavados en agitación por 10 minutos con solución de lavado al 2%.
- f) Finalmente se reveló con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno al 0.5% (apéndice II).
- g) Se utilizó como control positivo suero de cabra, previamente evaluado a Inmunodifusión y a ELISA. Mientras que como control negativo se utilizó suero de murciélago.

(Pérez, 2005)

7. Resultados.

7.1 Resultados a la prueba de ELISA competitiva

De las 75 muestras de líquido seminal de machos ovinos y caprinos que se evaluaron por medio de la prueba de ELISA competitiva, se obtuvieron dos muestras positivas, dos muestras sospechosas y 71 muestras negativas.

Las muestras positivas provenían: una del Estado de México de un caprino criollo y la otra, de un ovino de la raza Suffolk del estado de Hidalgo. Las muestras sospechosas ambas fueron de caprinos de la raza Saanen del estado de Querétaro (Figura 5).

Figura 5. Gráfica que muestra los resultados obtenidos en la evaluación de fluido seminal de ovinos y caprinos en la prueba de ELISA competitiva destinados por estado

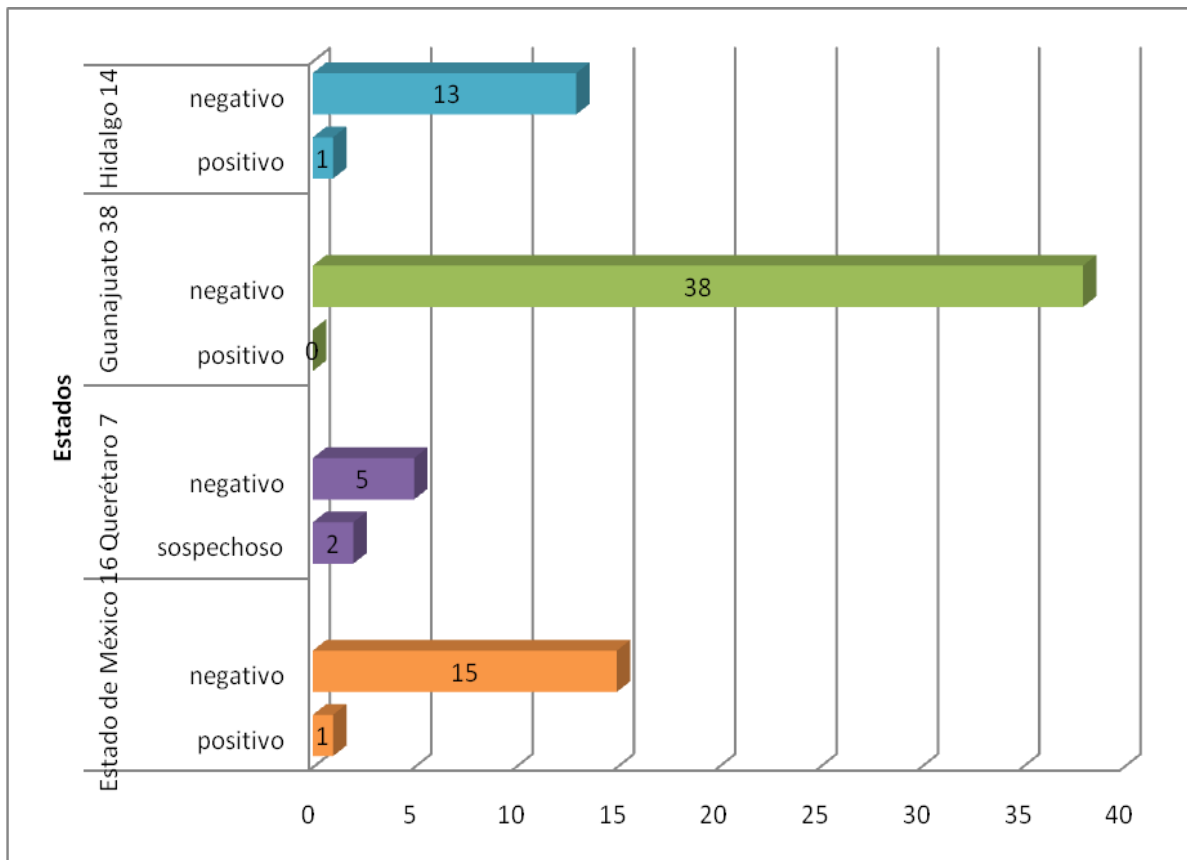
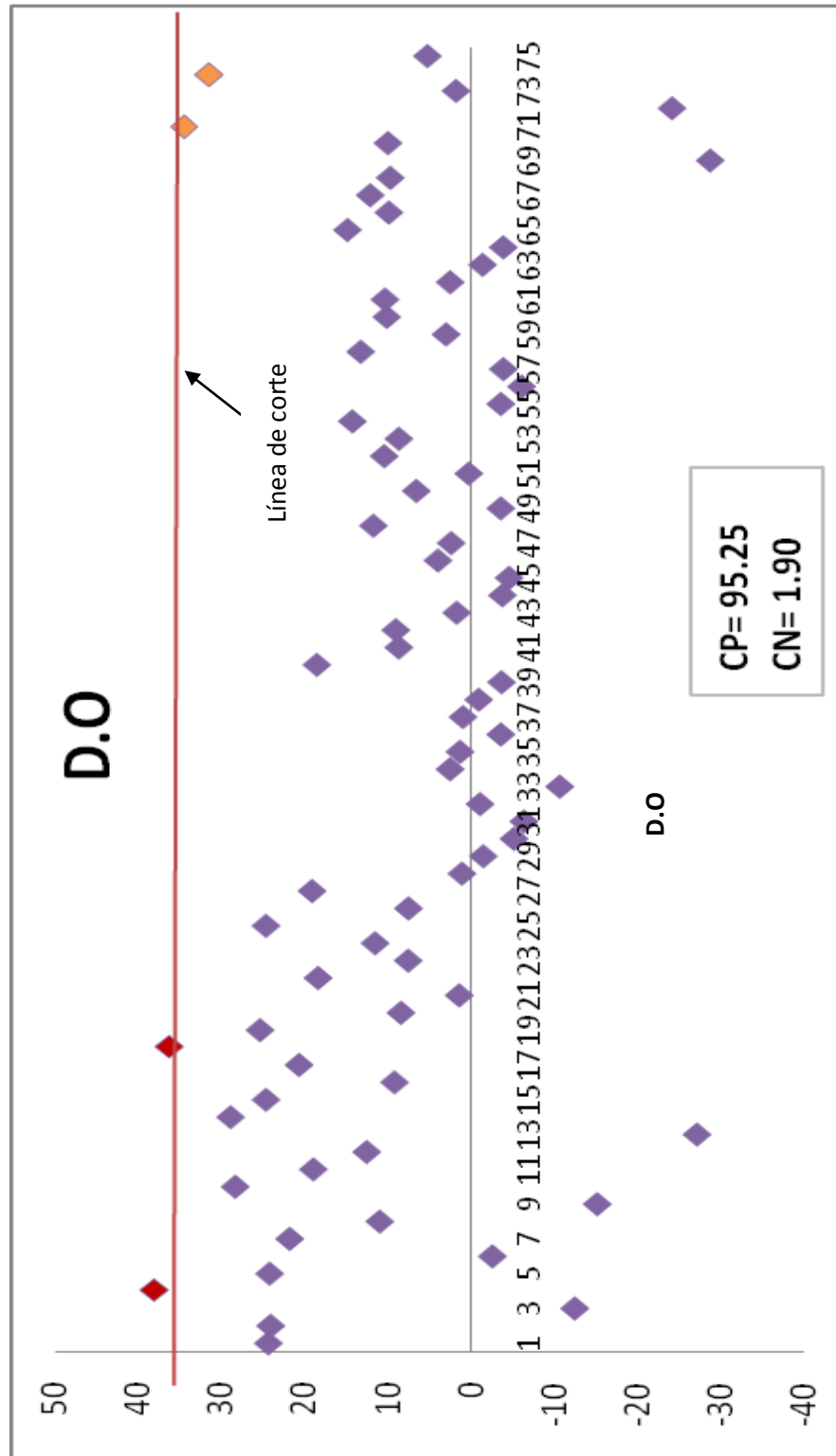


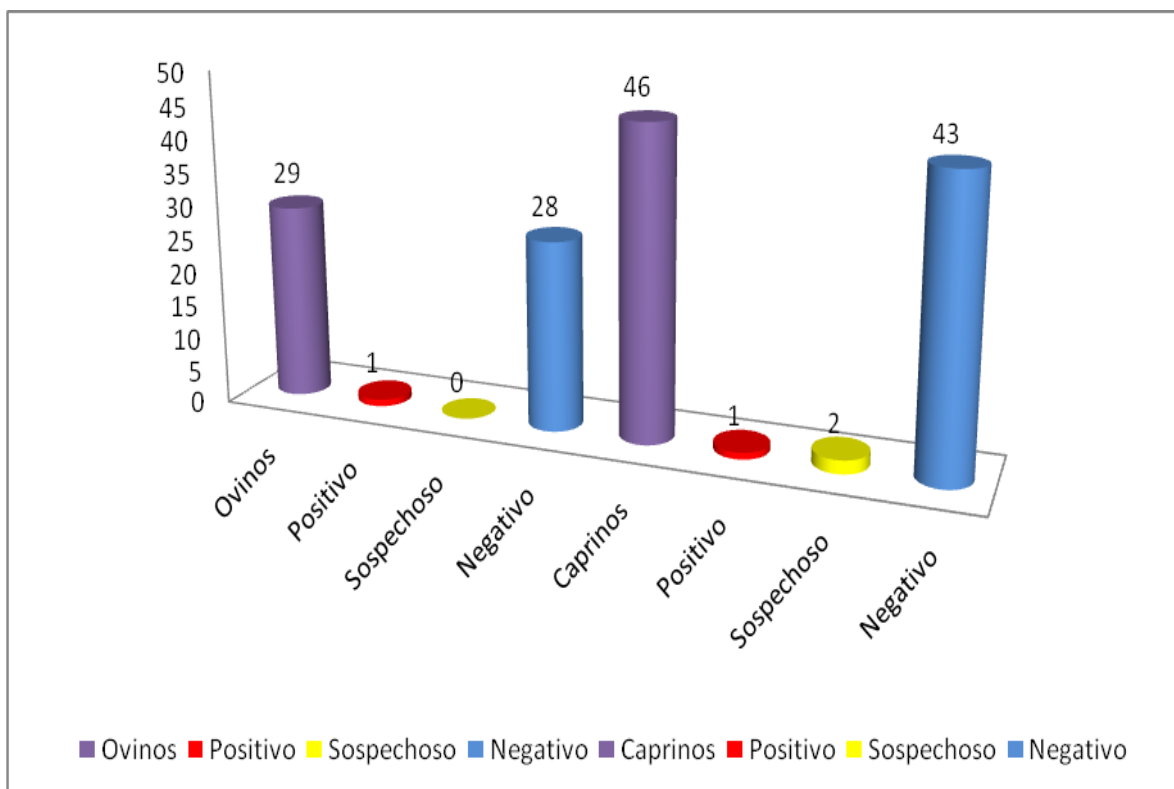
Figura 6. Gráfica que muestra la distribución de los valores de densidad óptica (a 620nm) obtenidas por 75 muestras de líquido seminal de ovinos y caprinos en la prueba de ELISA



CP= Control positivo

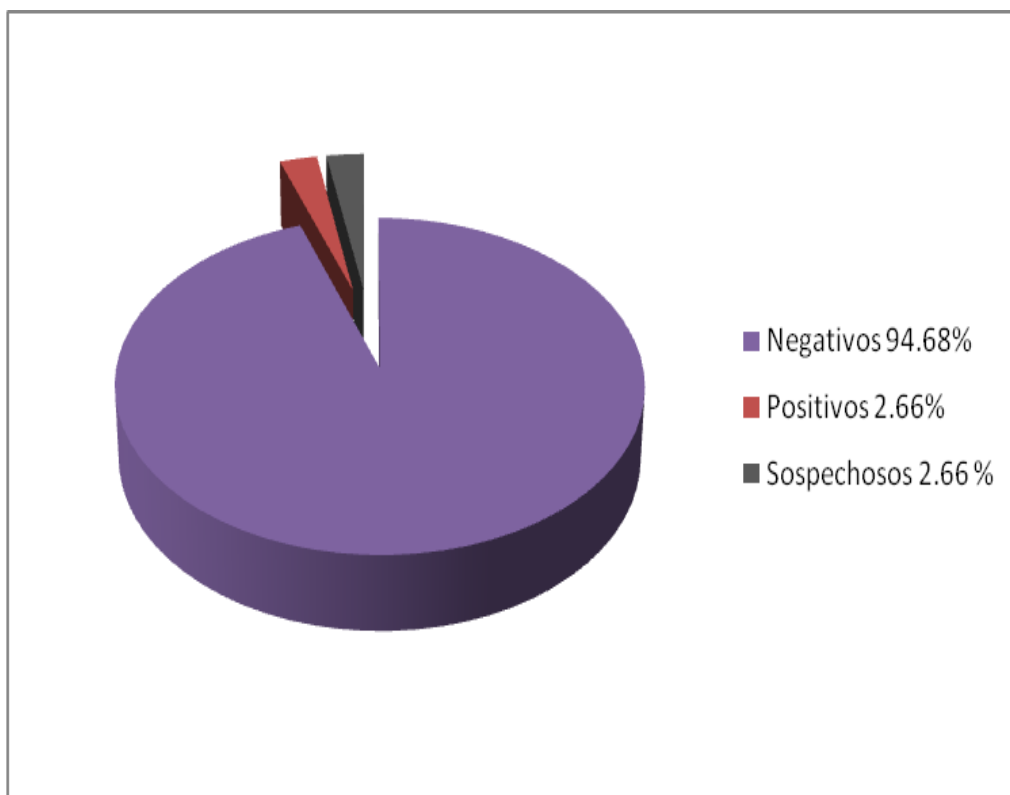
CN= Control negativo

Figura 7. Resultados obtenidos en el líquido seminal en el total de muestras evaluadas por ELISA competitiva de ovinos y caprinos



En la figura 7 se observa la cantidad de machos ovinos y caprinos muestreados y los resultados obtenidos en el líquido seminal, clasificándolos como positivos, sospechosos y negativos a la prueba de ELISA competitiva.

Figura 8. Porcentaje de animales positivos, negativos y sospechosos en la prueba de ELISA competitiva



La figura 8 muestra el porcentaje que se obtuvo de animales positivos (2.66% n=2), animales sospechosos (2.66% n= 2) y de animales negativos (94.68% n=71) a la prueba de ELISA competitiva.

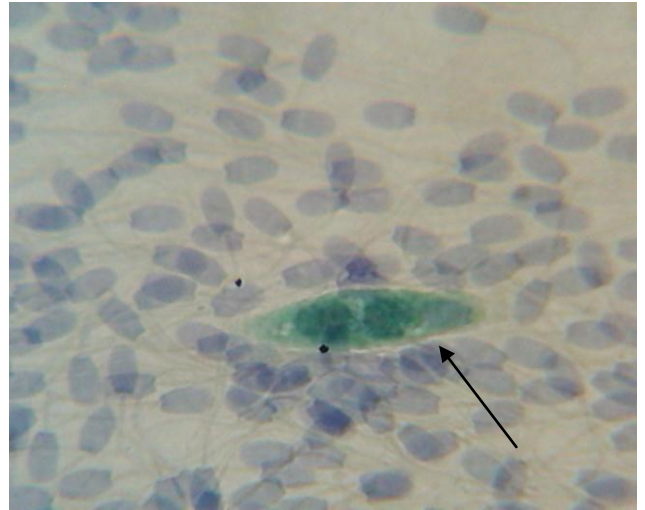
7.2 Resultados a la tinción de Papanicolaou

En la observación al microscopio de las 75 laminillas con tinción Papanicolaou se identificaron células epiteliales, en mayor cantidad en las muestras de semen que se obtuvieron por electroeyaculación y vagina artificial. Las muestras del centro de inseminación artificial (CIA) mostraron escasas células epiteliales.

Figura 9. Células epiteliales teñidas con Papanicolaou a partir de frotis realizados con el paquete celular de muestras de semen de ovinos y caprinos

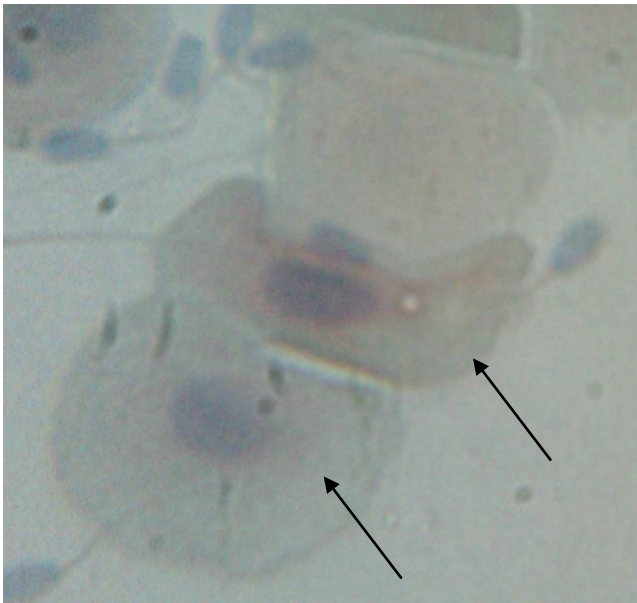


Célula epitelial superficial. Aumento 100x

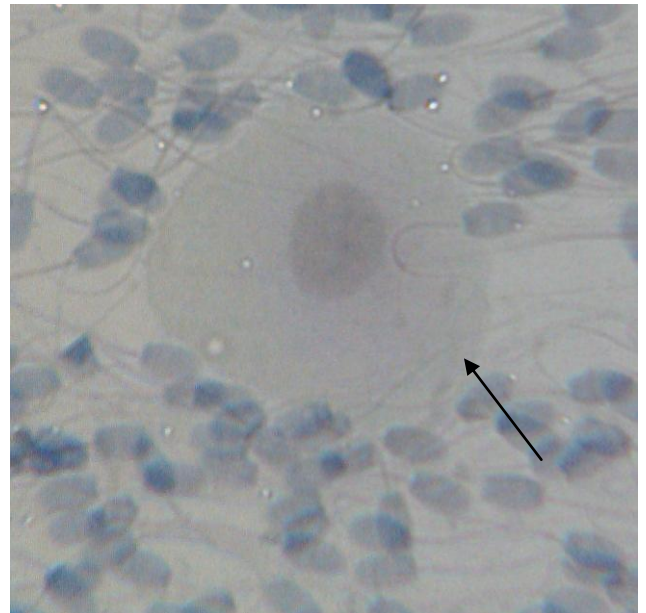


Célula epitelial intermedia con núcleo central.

Aumento 100x.

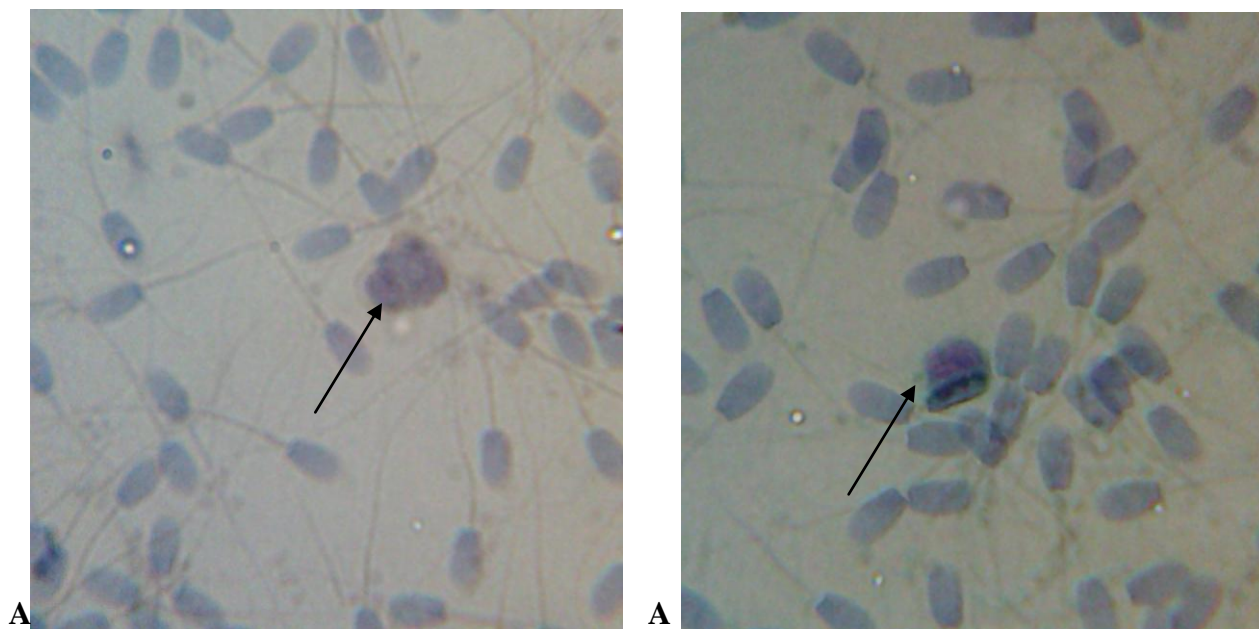


Células epiteliales basales con núcleo central y citoplasma abundante. Aumento 100x.

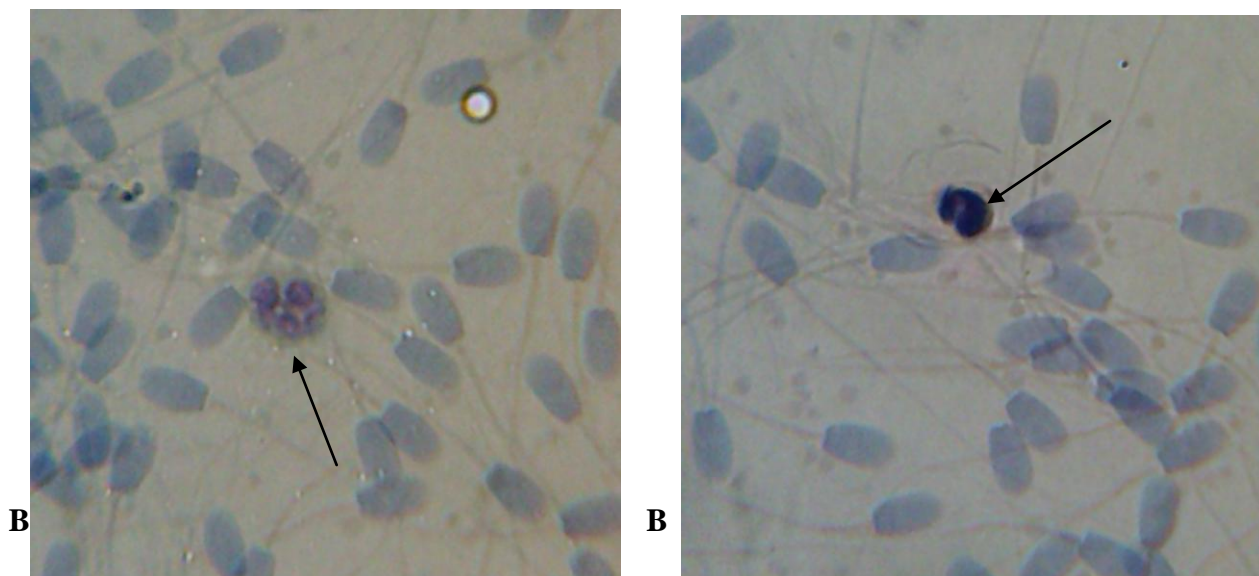


También se pudieron observar células de defensa como macrófagos en 3 muestras y polimorfonucleares (PMN) en 2 muestras (Figura 10B). En una de las muestras con resultado positivo en ELISA competitiva se observaron gran cantidad de macrófagos (Figura 10A).

Figura 10. Células de defensa teñidas con Papanicolaou a partir de frotis realizados con el paquete celular de muestras de semen de ovinos y caprinos



Muestra de semen con macrófagos y resultado positivo a ELISA competitiva. Aumento 100x.

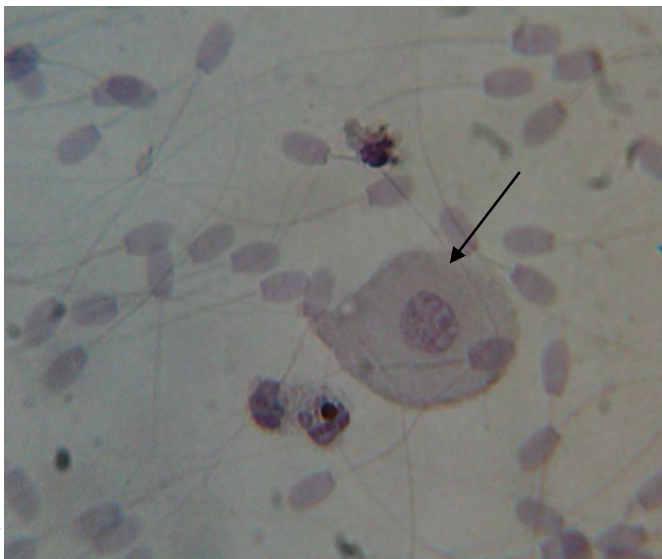


Muestra de semen con PMN y resultado positivo a ELISA competitiva. Aumento 100 x.

7.3 Resultados a la prueba de Inmunocitoquímica

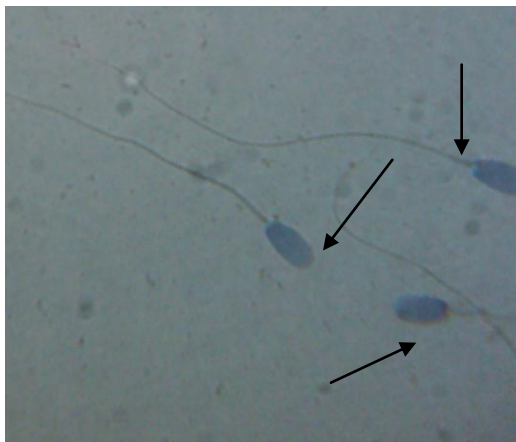
En las laminillas utilizadas para Inmunocitoquímica se pudo observar al igual que con la tinción de Papanicolaou, células epiteliales (Figura 11 A) y de defensa (Figura 11 B). También se logró identificar linfocitos (Figura 11 C). Todos ellos con resultados negativos a esta técnica. Sin embargo, en dos muestras se obtuvo un resultado positivo caracterizado en una por un color marrón alrededor y en el interior de células epiteliales y la otra por leucocitos ésta segunda muestra correspondió con un resultado positivo en la prueba de ELISA competitiva.

Figura 11 Célula epitelial en la prueba de inmunocitoquímica

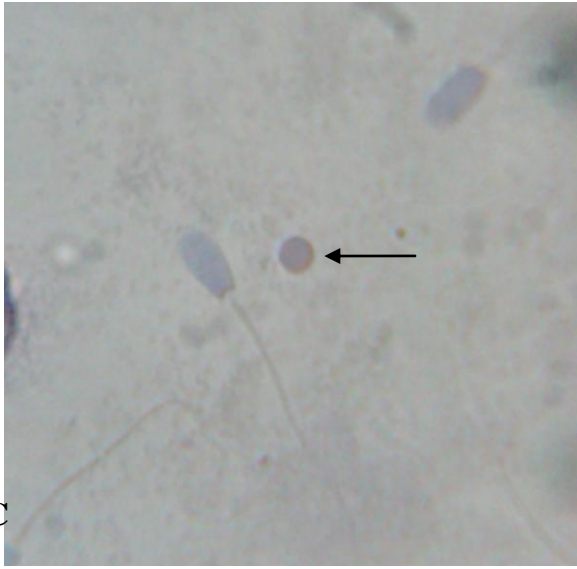


A

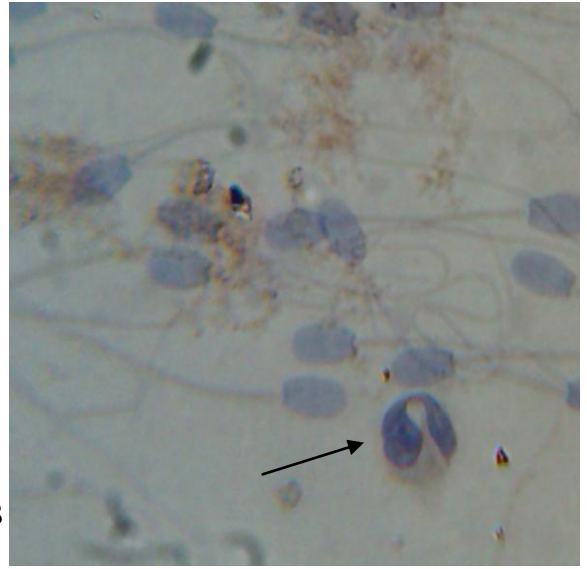
Inmunocitoquímica negativa en célula basal. Aumento 100 x



Espermatozoides negativos en la prueba de Inmunocitoquímica. Aumento 100 x

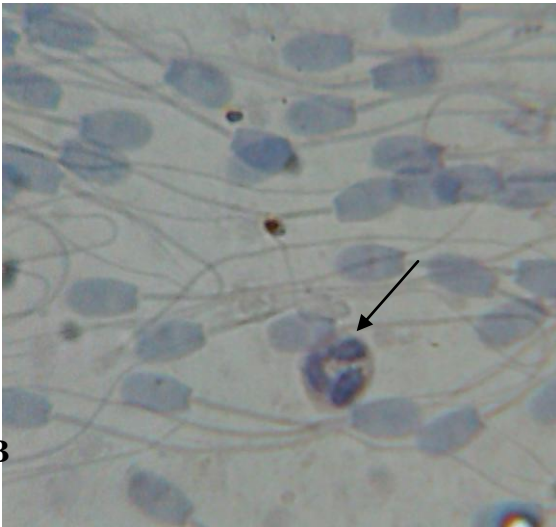


C

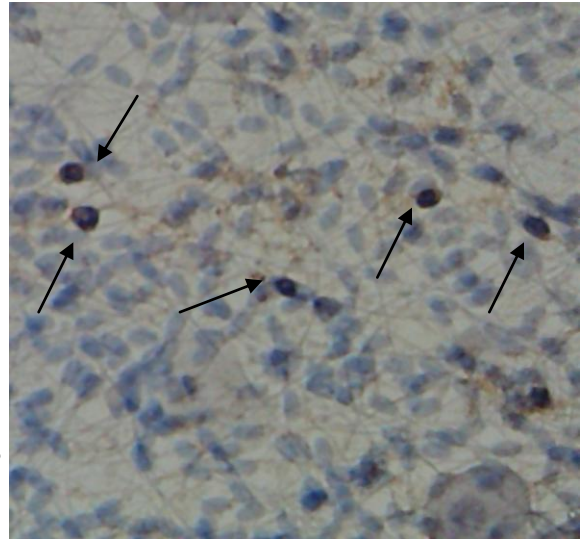


B

Immunocitoquímica negativa que muestran linfocitos y PMN Aumento 100x.



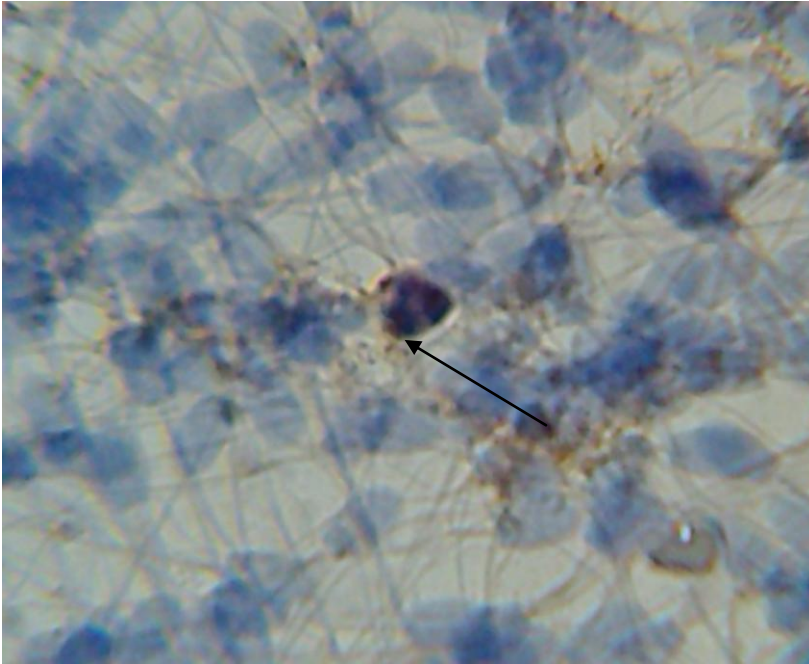
B



B

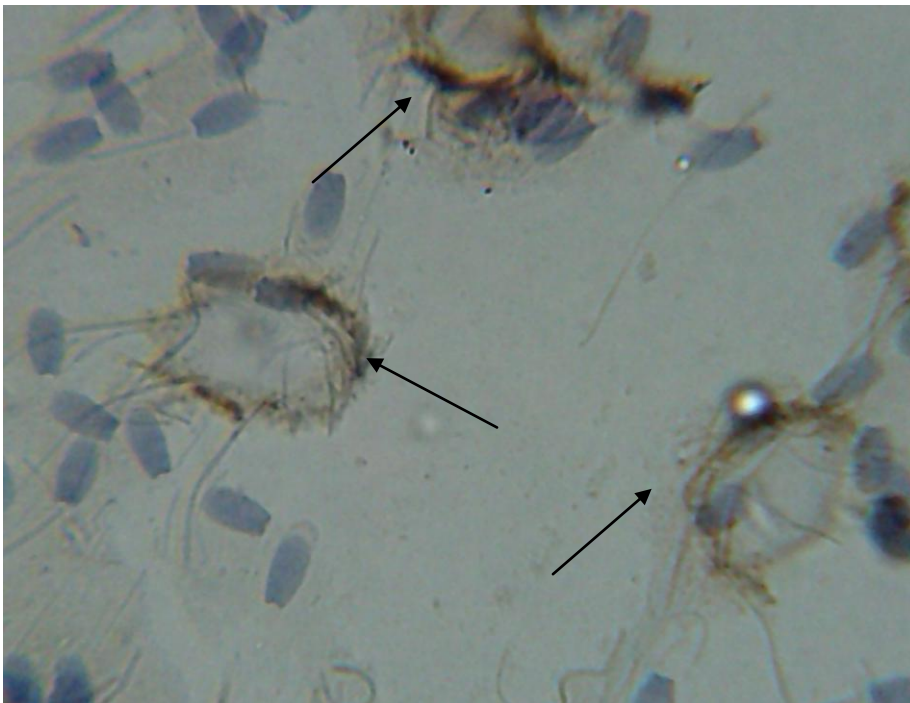
Immunocitoquímica negativa con PMN. Aumento 100x y Aumento 40x

Figura 12. Unión Antígeno-Anticuerpo en la prueba de Inmunocitoquímica



A

Macrófago con marcaje positivo en la prueba de Inmunocitoquímica. Un precipitado de color marrón se observa en la célula. Aumento 100x



B

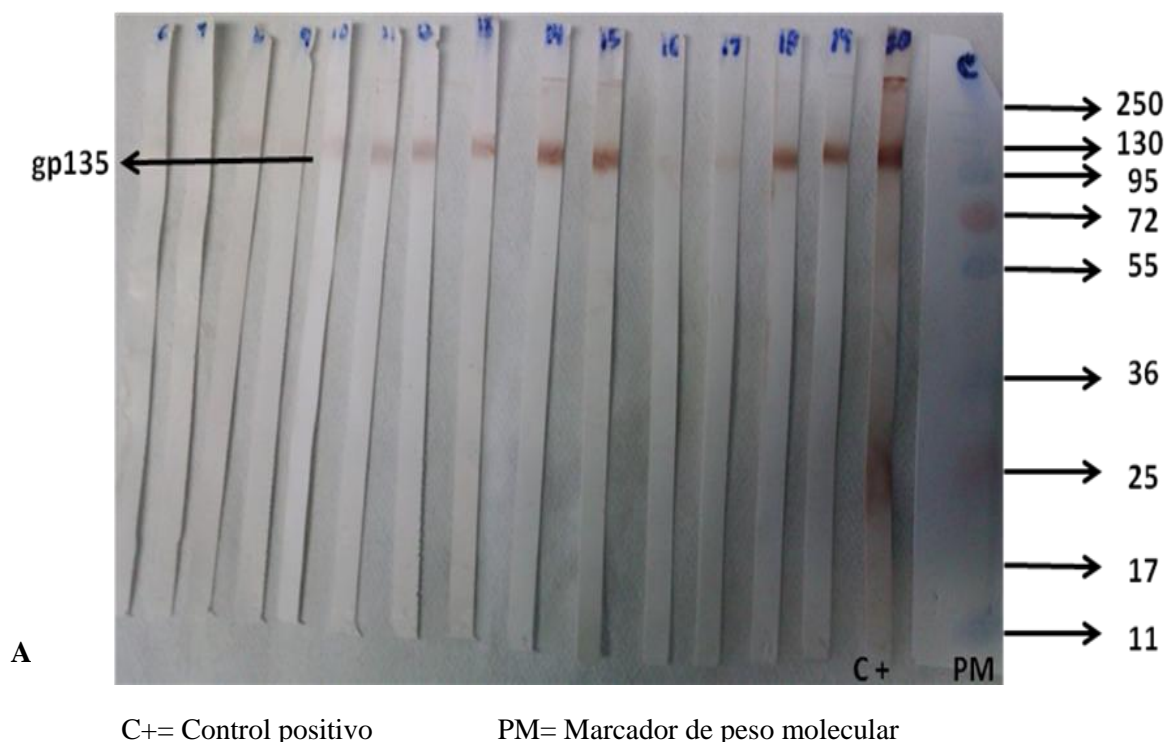
Células epiteliales con marcaje positivo en la prueba de Inmunocitoquímica. Aumento 100x

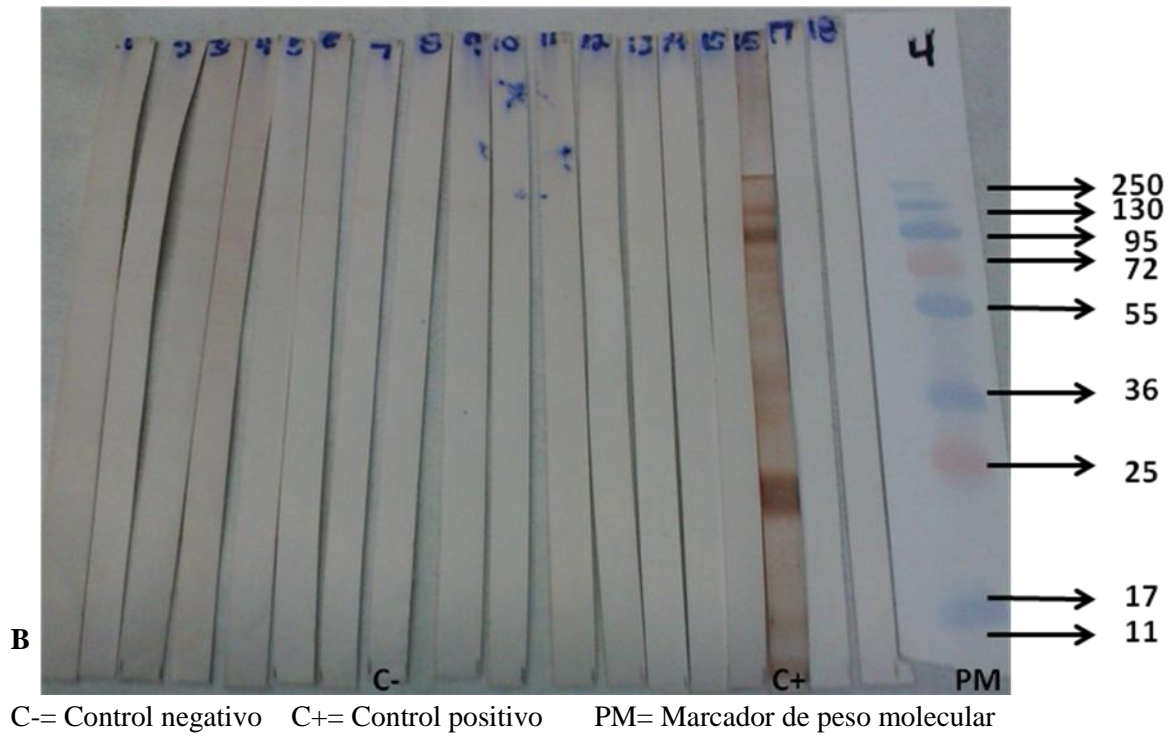
7.4 Resultados a la prueba de Western blot

La cantidad de semen obtenido en cada eyaculado es variable, debido a esto, solo fue factible evaluar 50 muestras de líquido seminal por Western blot, de las cuales 20 resultaron positivas, predominando el reconocimiento de la proteína gp135 (Figura 13 A) en la mayoría de las muestras de líquido seminal, también fue posible observar la p25 (Figura 13 C) en tres muestras y adicionalmente se observaron las proteínas 36, 17 y 11 (Figura 13 C) en menor frecuencia. Las muestras que fueron positivas y sospechosas en la prueba de ELISA, al igual que las 2 muestras positivas en Inmunocitoquímica se confirman como positivas con esta prueba, demostrando que la sensibilidad del Western blot es mas alta.

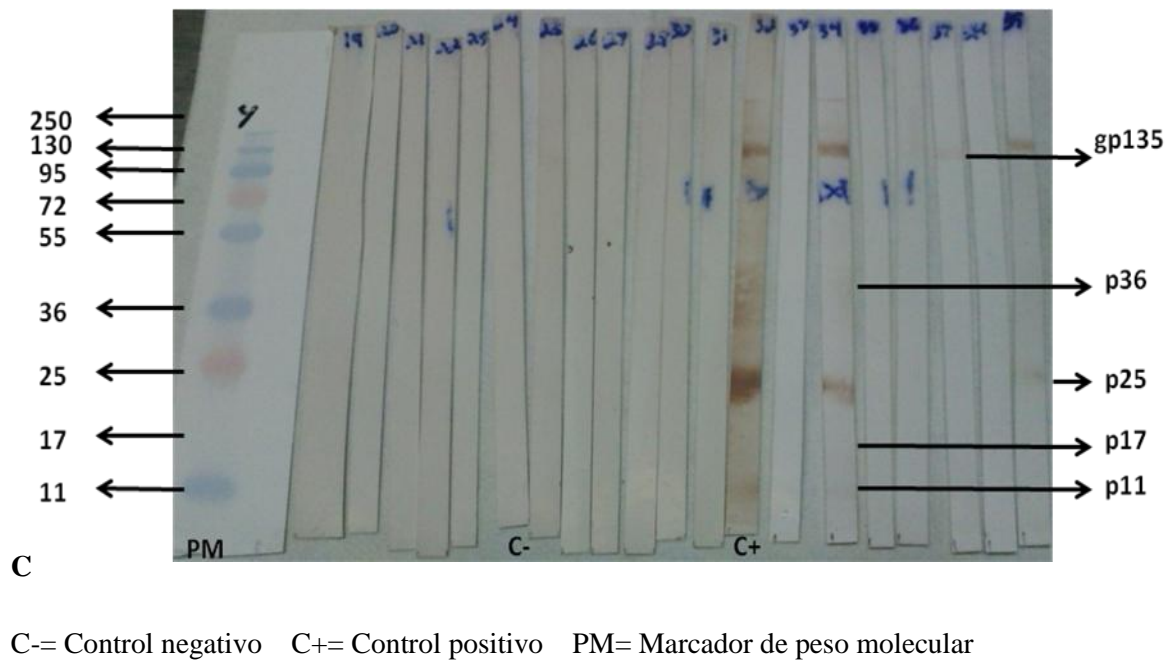
El número total de muestras positivas en Western blot fue de 9 muestras de pajilla, 8 muestras por vagina artificial y 3 muestras por electroeyaculación.

Figura 13. Resultados obtenidos de la evaluación de líquido seminal de ovinos y caprinos en Western blot. En cada tira se evaluó un líquido seminal y se puede observar que la proteína viral reconocida principalmente fue la gp135 (A),





Esta imagen muestra claramente que en esta membrana todas las muestras dieron resultado negativo.



Se observan los resultados obtenidos en la evaluación del líquido seminal, los cuales reconocieron las proteínas p36, p25, p17 y p11.

8. Discusión.

Diversos trabajos han descrito enfermedades que pueden ser transmitidas a través del semen (apéndice III), dado a que éste, puede infectarse a partir de microorganismos localizados en testículos, glándulas sexuales anexas, o bien del tracto urinario y de la cavidad prepucial (Novelo, 2001).

La inseminación artificial tiene como objetivo mejorar la calidad genética y también prevenir la entrada ocasional de agentes infecciosos (apéndice III) (Catena y Cabodevila, 1999). Sin embargo la técnica no esta exenta de riesgos, pues puede convertirse en una vía de diseminación o fuente de propagación de enfermedades virales a nivel nacional e internacional. Debido a que a partir de una muestra de semen (un eyaculado) es factible obtener varias dosis para realizar la inseminación artificial en varias hembras, lo cual puede incrementar el riesgo de diseminación de enfermedades virales (Catena y Cabodevila, 1999).

Ya se ha demostrado que entre los LVPR que infectan ovinos y caprinos puede haber reacción cruzada entre las proteínas virales. En este trabajo, se reconfirmó con el kit de ELISA utilizado, ya que esta elaborado con anticuerpos monoclonales de cabra, así como las proteínas virales en Western blot de origen caprino, tal y como lo describe Pérez, 2005.

En el presente estudio, se logró la detección de anticuerpos específicos a la proteína gp135 de los LVPR en líquido seminal, utilizando el ELISA competitivo, además, se reconoció la proteína gp135 y la p 25 en la prueba de Western blot. Adicionalmente se identificaron células positivas en el semen con la prueba de Inmunocitoquímica, tal como lo describe Travassos *et al.*, 1998 y 1999 en estudios realizados en machos caprinos infectados de forma natural y experimental, en los cuales detectaron la presencia del virus en células mononucleares de sangre, líquido seminal y células no espermáticas por medio de PCR. Travassos *et al.*, 1999 demostraron que las células no espermáticas, como son monocitos/macrófagos y células epiteliales pueden tener la forma proviral de LVPR en el semen. La susceptibilidad a la infección por LVPR está bien demostrada en las células

epiteliales de glándula mamaria, donde el virus se replica abundantemente sin daño aparente.

En un estudio realizado por Martínez *et al.*, 2005, demostraron la presencia del antígeno viral en el aparato reproductor de machos caprinos con las pruebas de PCR, Inmunohistoquímica, Western blot y ELISA, esto permite utilizar la prueba para detectar machos ovinos y caprinos potencialmente capaces de transmitir la enfermedad. Es por esto que no hay duda de la presencia de LVPR en tracto genital de machos y en el semen, por lo que la detección de anticuerpos en el líquido seminal es indirecto de la infección del animal como se demostró en el presente estudio.

Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008 confirmaron la presencia de ADN proviral de LVPR en semen de machos naturalmente infectados, confirmando las observaciones de Travassos *et al.*, 1998. El trabajo de Peterson *et al.*, 2008 se centró en la detección de ADN proviral de LVPR en semen y la zona genital de pequeños rumiantes por medio de rt-PCR y ELISA. Encontrando que varios órganos sexuales, como epidídimo, próstata y las glándulas bulbouretrales pueden contribuir directamente con la eliminación del virus en el semen eyaculado. Ali Al ahmad *et al.*, 2008 también corroboró este hecho utilizando la hibridación *in situ* y detectando positividad en la cabeza, cuerpo y cola de epidídimo, constatando la presencia de LVPR en esta zona.

El manual de la OIE, 2004 reporta que la técnica de ELISA puede también aplicarse en la evaluación de leche, detectando 10 veces menos títulos de anticuerpos a LVPR que el suero, es por ello que se espera una menor sensibilidad, ya que la vía primaria de transmisión de LVPR es por calostro y leche. Ramírez *et al.*, 2009 hicieron estudios comparativos con 3 kits de ELISA indirecta, en líquido seminal y sangre, que manejaron a diferentes diluciones para ver la sensibilidad y especificidad a cada prueba, demostrando que el semen presenta 250 veces menos título de anticuerpos que el suero. Este trabajo demuestra que el semen puede ser utilizado para detectar la infección a LVPR en animales asintomáticos y ser una excelente ayuda para los centros de inseminación artificial para evitar que animales de importación sean un problema al diseminar la infección en el país, esto sería un plus, ya que subirían los costos a la exportación sabiendo que van libres a la

infección de LVPR. Esto podría llevar en un futuro a la posible erradicación de LVPR si se manejan las pruebas adecuadamente.

El control de la infección por LVPR se enfoca principalmente hacía las hembras, dejando a un lado a los machos ovinos y caprinos, no obstante esta comprobado que el virus esta presente en los machos y pueden actuar como portadores y eventualmente ser importantes en la transmisión de LVPR (Travassos *et al.*, 1998 y 1999; Martínez, 2003; Martínez *et al.*, 2005; Pérez, 2005; Peterson *et al.*, 2008; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2009).

Cruz *et al.*, 2009 refieren que las técnicas de biología molecular, especialmente PCR detecta la presencia de LVPR en forma de provirus en semen y de células mononucleares de sangre periférica, estos datos sugieren que el semen infectado con LVPR puede ser potencialmente infeccioso, sin embargo, para probar la transmisibilidad vía sexual de LVPR es necesario conducir la inseminación in vivo de machos con eyaculados positivos en hembras no infectadas.

Recientemente Reina *et al.*, 2011 en un estudio preliminar, han puesto en duda que el macho ovino y caprino pueda transmitir la enfermedad por medio de semen, ya que utilizaron semen de un macho infectado con LVPR en varias hembras mediante inseminación artificial, los estudios preliminares sugieren que el semen del macho infectado con LVPR no diseminó la infección, contrario a lo reportado por Travassos *et al.*, 1998 y 1999.

Los kits comerciales de ELISA tienen diferencia en la respuesta de los animales, debido al número de proteínas, ya que no todos los kits tienen el mismo número de proteínas. Algunos tienen dos o una sola proteína. Generalmente las proteínas son: de envoltura (gp 135) que es proteína de superficie, (gp 44) una proteína de transmembrana o de la cápsida (p 25 o p28). No todos los animales producen anticuerpos contra todas las proteínas durante toda la etapa de infección, además de la latencia viral.

Aunque el kit comercial de ELISA competitivo que se utilizó en el presente estudio solo detecta anticuerpos a la gp135 de envoltura de LVPR en líquido seminal sin diluir, se necesitan hacer estudios a la muestra de suero y de líquido seminal del mismo animal para corroborar la concordancia del resultado en la prueba de ELISA. Pero para semen los resultados nos indican que es poco sensible.

9. Conclusiones.

En base a los resultados en las muestras de liquido seminal obtenidos en este estudio, podemos concluir que la prueba de ELISA competitiva si detecta anticuerpos en semen sin diluir, pero con el material empelado tiene baja sensibilidad y da muchos falsos negativos de acuerdo a la prueba de Western blot.

Las muestras con resultado sospechoso con la prueba de ELISA competitiva y con resultado positivo a la prueba de Western blot, provenían de animales importados de Estados Unidos, lo que refuerza la importancia de la detección de la infección de LVPR.

La tinción de Papanicolaou nos permitió diferenciar los grupos celulares presentes en el paquete celular.

La prueba de Inmunocitoquímica es adecuada como diagnóstico complementario para detectar antígeno viral en el paquete celular.

La prueba de Western blot tiene mayor sensibilidad que la prueba de ELISA y la prueba de Inmunocitoquímica.

10. Bibliografía.

1. Adams. DS, Gorham. JR. The gp135 of caprine arthritis-encephalitis virus afford greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. Res. Vet. Sci. 40; 157-160. 1986.
2. Aguilar TMC. “Detección de antígeno del virus de Artritis Encefalitis Caprina en células epiteliales del prepucio caprino.” (Tesis de licenciatura). FESC. UNAM. México; 30-31. 2009.
3. Ali Al Ahmad. MZ, Fieni. F, Pellerin. JL, Guiguen. F, Cherel. Y, Chatagnon. G, Bouzar. AB, Chebloune. Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and genital tract tissues of male goat. Theriogenol. 69; 473-480. 2008.
4. Amorena. B, González. B, Andres. S, de Andrés. D, Vargas. A, Lujan. A. “Mecanismos patológicos y respuesta inmune” OVIS; 27-40. 2001.
5. Amorena. B, Monleón. E, Pacheco. C, Pérez. M, Monzón. M, García. E, Rota. C. Tendencias actuales en los métodos de diagnóstico de interés epidemiológico. Med. Vet. 14; 305-318. 1997.
6. Amorena. B, Reina. R, de Andrés X. Glaria. I, Crespo. H, Ramírez. H, Jáuregui. P, San Román. B, Grilló. MJ, de Andrés. D. Maedi-Visna. Experiencias de control de la enfermedad mediante la aplicación de vacunas. X foro de Aranda. Tierras.147; 32-39. 2008.
7. Artritis Encefalitis Caprina y Maedi Visna. Capítulo 2.7. 3/4. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2008: http://www.oie.int/ESP/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.07.03-04.%20Artritis-Encefalitis%20caprina%20y%20Maedi%20Visna.pdf (Consulta 09/11/2010)
8. Begara. I, Luján. L, Collie, DD, Miller. HR, Watt. NJ. Early pulmonary cell response during experimental Maedi-Visna virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 55; 115- 126. 1996.

9. Benavides. J, García-Pariente. C, Ferreras. MC, Fuertes. M, García-Marin. JF, Pérez. V. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4 an 6 month-old lambs. *J. Vet.* 2007 (174); 655- 658.
10. Berriatua. E, Alvarez. V, Extramania. B, Gonzalez. L. Daltabuit. M, Juste. RA. Transmission and control implications of seroconversión to Maedi-Visna virus in Basque dairy sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* 60; 265-279. 2003.
11. Blacklaws. BA, Beriatua. E, Torteinsdottir. S, Watt. NJ, de Andres. D, Klein. D, Harkhiss. GD. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiology.* 101; 199-208. 2004.
12. Blacklaws. BA, Bird. P, Allen. D, Roy. DJ, MacLennan. IC, Hopkins. J, Sargan. DR, McConnell. I. Initial Lentivirus-host interactions within lymph nodes: a study of maedi-visna virus infection in sheep. *J. Virol.* 69; 1400-1407. 1995.
13. Brinkhof. JMA, Moll. L, van Maanen, Houwers. DJ. Use of serology and polymerase chain reaction for the rapid eradication of small ruminant lentivirus infections from a sheep flock. A case report. *Res. Vet.* 88; 41-43. 2010.
14. Brodie. SJ, de la Concha-Bermejillo. A, Snowden. GD, Demartini. JC. Current concepts in the epizootiology, diagnosis and economic importance of ovine progressive pneumonia en North America: a review. *Small Ruminant Res.* 27; 1- 17. 1998.
15. Brodie. SJ, Pearson. LD, Snowden GD, et al. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Arch.Virol.* 130; 413-428. 1993.
16. Brodie. SJ, Snowden. GD, Demartini. JC. Ovine progressive pneumonia advances and prospects for control. *Sheep. J. Res.* 8; 116-126. 1992.
17. Bruett. L, Barber. SA, Clements. JE. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virol.* 271; 132-141. 2000.
18. Can. A. *Molecular Virology.* In the 2nd Ed. Academic. Press. San Diego. 5; 128-260. 1997.
19. Catena. M, Cabodevila. J. Evaluación de semen bovino congelado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Campus Universitario. Tandil. Argentina. 3; 18-31. 1999.

20. Chebloune. Y, Karr. B, Sheffer. D, Leung. K, Narayan. O. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Virol.* 77; 2037-2051. 1996.
21. Cheevers. WP, McGuire. TC. The lentiviruses: Maedi-Visna, Caprine Arthritis Encephalitis and Equine Infectious Anemia. *Adv. Virus Res.* 1988 (34); 189- 215.
22. Coffin. JM. Retroviridae. The viruses and their replication, in: Fields. BN. Knipe. DM. Howley. PM (Eds.). Lippincot-Raven Publisher, Philadelphia. 1767-1835. 1996
23. Crawford TB, Adams DS. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178; 713-719. 1981.
24. Cruz. JCM, Gouveia. AMG, Souza. KC, Braz. GF, Teixeira.BM, Heinemann MB, Leite. RC, Reis. JKP, Pinheiro. RR, Andrioli. A. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Ruminant. Res.* 85; 149-152. 2009.
25. Cunha. CAK, Soares de Castro. R, da Silva. TMF. Lentivirus de pequenos ruminantes (CAEV e Madis-visna) revisao e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 3; 87-97. 2001.
26. Daltabuit. TME. “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) Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología Animal. 2006.
27. de Andres. D, Klein. D, Watt. NJ, Berriatua. E, Torsteinsdottir. S, Blacklaws. BA, Harkiss. GD. Diagnostic test for small ruminal lentiviruses. *Vet. Microbiology.* 107; 49-62. 2005.
28. de la Concha Bermejillo. A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 13. 1997.
29. de la Concha-Bermejillo A. Retrovirus en Ovinos y Caprinos: Maedi y Artritis Encefalitis Caprina. Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas 77841; and Texas Agricultural Experiment Station, San Angelo, Texas 76901 USA. 1999.

30. de la Concha-Bermejillo. A, Magnus-Corral. S, Brodie SJ et al. Shedding of ovine lentiviruses in the semen of infected rams. *Amer. J. Vet.* 57; 684-688. 1996.
31. de la Concha-Bermejillo. A. *Sheep and Goat. Research Journal. Hair Sheep Workshop. Other Research.* 2005.
32. Denner. J. Transspecies transmissions of retroviruses: New cases. *Minireviews. Virol.* 369; 229-233. 2007.
33. Díaz. AE, Aguilar. R F, Vázquez. N J. *Manual para el diagnóstico de enfermedades de Ovinos y Caprinos en México. Comité de salud y producción ovina y caprina. CONASA.* 26-28. 2005.
34. Ellis. TM. Blood leukocyte infection rates in caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Aust. Vet J.* 8; 302-303. 1990.
35. Gay. G, Valdivieso. N, Tron. F, Enríquez O. Informe preliminar del aislamiento viral del virus productor de la Artritis Encefalitis Caprina en México. *Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México-SARH, México DF.* 215. 1986.
36. Gendelman. HE, Narayan. O, Molineaux. S. et al. Persistent replication of lentiviruses role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc, Natl. Academic. Sci. USA.* 82; 7086-7090. 1985.
37. Houwers. DJ, Koenig. G, de Boer. GF, Schaake. J Jr. Maedi-Visna control in sheep I. Artificial rearing of colostrum-derived lambs. *Vet. Microbiology.* 8; 179-185. 1983.
38. Houwers. DJ. Economic importance, epidemiology and control. In: Pétursson. G, Hoff-Jorgensen. R. (Eds) *Maedi Visna and related diseases.* Kluwer Academic Publishers, Massachusetts. 83-117. 1990.
39. *International Classification Taxonomy Viruses. (ICTV) Cite this publication as: ICTV dB Management. 00. 061. 06. Lentivirus. The Universal Virus Database, version 4. Buchen- Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. 2009.*
40. Ivis. In: *Recent Advances in Goat Diseases, Tempesta. : (Ed) International Service, Ithaca NY. (www. Ivis. Org) last updated. 24/07/2007.*
41. Juste. R, Wang. J, de la Concha-Bermejillo. A. Dynamics of cell associated viremia and antibody response during the early phase of lentivirus infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 59; 563-568. 1998.

42. Kennedy-Stoskopf. S, Narayan. O. Neutralizing antibodies to Visna lentivirus mechanisms of action and possible role in virus persistence. *J. Virol.* 59; 37-44. 1986.
43. Klenerman. P, Hill. A. T cells and viral persistence lesions from diverse infections. *Nat. Immunol.* 9; 873- 879. 2005.
44. Knowles. DP, Evermann. JF, Schropshire. C, Vanderschalie. J, Bradway. D, Gezon. HM, Cheever. WP. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine-arthritis encephalitis virus. *J. Microbiology.* 32; 243-245. 1994.
45. Lamara. A, Fieni. F., Mselli-Lakhal. L, Tainturier. D, Chebloune. Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulose cells. *Virus Res.* 79; 165-172. 2001.
46. Lamara. A, Fieni. F., Mselli-Lakhal. L, Tainturier. D, Chebloune. Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Res.* 87; 69-77. 2002.
47. Leroux. C, Lerondelle. C, Chastang. J. Mornex. JF. RT-PCR detection of lentivirus in milk or mammary secretions in sheep or goats from infected flocks. *Vet. Res.* 28; 115-121. 1997.
48. Leroux. C, Mornex. JF. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Ruminant Res.* 76; 68-76. . 2008.
49. Luján. L, Bandiola. JJ. “Maedi-Visna”. *Ovis.* Vol. 72. 2001.
50. Martínez RH. “Diseminación del virus de Artritis Encefalitis Caprina (AEC) a partir de machos caprinos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor”. (Tesis doctoral). FESC- UNAM. México. 2003
51. Martínez RHA. *Artritis Encefalitis Caprina.* CONASA. México. 2007
52. Martínez. RHA, Ramírez. AH, Tórtora. PJ, Aguilar. SA, Garrido. FGI, Montaraz. CJA. Efecto del virus de Artritis Encefalitis Caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Vet. México.* 2; 159-176. 2005.
53. Morilla. A, Bautista. C. *Manual de Inmunología.* 51-62. 1986.
54. Murphy. FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ. *Vet. Virol,* 3rd edition. Academic Press. 1999

55. Narayan. O y Cork. L. Caprine Arthritis Encephalitis virus. Vol 3. In: Virus infection of ruminants. New York. USA: Elsevier. 441-452. 1990.
56. Narayan. O, Clements. JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. J. Gen. Virology. 70; 1617- 1639. 1989.
57. Narayan. O, Kennedy-Stoskopf. S, Sherer. D, Griffin. DE, Clements. JE. 1983.
58. Nieves. PBM. Seguimiento de la infección por el virus de Maedi-Visna en una explotación de ganado ovino. Dto.de salud animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense (Tesis de licenciatura). 7-8. 2004.
59. Novelo. BR. “Muestreo serológico para la determinación de anticuerpos contral el virus de la Artritis Encefalitis Caprina en machos caprinos con y sin artritis clínica.” (Tesis de licenciatura). FESC. UNAM. México. 2001.
60. Peluso. R, Haase. AT, Stowring. L, Edwards. M, Ventura. P. A Trojan horse mechanism for the spread of visna virus monocytes. Nucleic Acids Res. 16; 4116-4173. 1988.
61. Pepin. M, Vitu. Ch, Russo. P, Mornex. JF, Peterhans. E. Maedi-Visna virus infections in sheep: a review. Vet Res. 29; 341-367. 1998.
62. Peretz. G, Asso. J, Devillechaise. P. Le CAEV: Revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. Revue Méd Vet. 2; 93-98. 1993.
63. Pérez. SA. “Identificación de anticuerpos contra proteínas de Lentivirus en machos ovinos por las técnicas de inmunoelectrotransferencia (Western blot) y ELISA Indirecta”. (Tesis de licenciatura). FESC. UNAM. 2005
64. Peterhans. E, Greeland. T, Badiola. J, Harkiss. G, Bertoni. G, Amorena. B, Eliaszewicz. M, Juste. RA, Krassing. R, Lafont. JP, Lenihan. P, Petursson. G, Pritchard. G, Thorley. J, Vitu. C, Mornex.JF, Pepin. M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. Vet. Res. 35; 257-274. 2004
65. Peterson. K, Brinkhof. J, Houwers. DJ, Colenbrander. B, Gadella. BM. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminant. Theriogenology. 69; 433-442. 2008.

66. Petursson. G, Andresdóttir. V, Andresson. OS, Georgsson. G, Palsson. PA, Rafnar. B, Torsteinsdóttir. S. Lentivirus diseases of sheep and goats research: Maedi-Visna and Caprine Arthritis Encephalitis. Progress in sheep and goat research. Oxford: Speedy A. W. 107-129. 1992.
67. Petursson. G, Georgsson. G, Palsson. P. Maedi-visna virus. In: Dinker Z, Morein B, eds. Virus infections of ruminants. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 431-440. 1990.
68. Radostits. OM, Gay.CC, Blood. DC, Hinchcliff. KW. Veterinary Medicine. 9th Edition. WB Saunders Company. Ltd. London. 2000.
69. Ramírez. AH, San Román. B, Glaria. I, Reina. R, Hernández. MM, de Andrés. X, Crespo. H, Hichou. B, Cianca. S, Goñi. C, Grandas. A, García-Pastor. L, Vijil. LE, Quintín. F, Grilló. MJ, de Andrés. D, Amorena. B. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. Theriogenol. 72; 1085-1096. 2009.
70. Ramírez. AH. “Contribución al diagnóstico y a la filogenia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes.” (Tesis doctoral) Universidad Pública de Navarra, Departamento de Producción Agraria. Instituto de Agrobiotecnología. Pamplona. 2010.
71. Ramírez. C, Trigo. FJ. Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la neumonía progresiva ovina en México. Reunión de investigación pecuaria en México. 1983.
72. Reina, R. Glaria, I. Cianca, S. Crespo, H. de Andrés, X. Goñi, C. Lasarte, JM. Luján, L. Amorena, B, de Andrés, DF. Use of small ruminant lentivirus-infected rams for artificial insemination. J. Vet. 1; 106-107. 2011.
73. Reina. R, Berriatua. E, Lujan. L, Juste. R, Sánchez. A, de Andrés. D, Amorena. B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses. J. Vet. 182; 31-37. 2009.
74. Rodríguez. RA. “Evaluación del sistema inmune en lechones colonizados con un probiótico” (Tesis de maestría). FESC. UNAM. México 1998.
75. Rosati. S, Pittau. M, Tolari. F, Erre. G, Kwang. J. Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. Vet. Microbiology. 45; 363- 370. 1995.

76. Rowe. JD, East. N, Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 13; 35-53. 1997.
77. Ryan. S, Tiley. L, McConnell. L, Blacklaws. B. Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *J. Virol.* 74; 10096-10103. 2000.
78. Saltarelli. M, Querat. G, Konings. DA, Vigne. R, Clements. JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virol.* 347-364. 1990.
79. Sanna. E, Sanna. MP, Vitali. CG, Renzoni. G, Sanna. L, Spano. Sm Rossi. G, Leoni. A. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Comp. Pathology.* 121; 271-276. 1999.
80. Shah. C, Boni. J, Huder. JB, Vogt. HR, Muhlherr. J, Zanoni. R, Miserez. R, Lutz. H, Schupbach. J. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates evidence for regular sheep to goat transmission and worldwide propagation trough livestock trade. *Virol.* 1; 12- 26. 2004.
81. Sigurdsson. B, Grimsson. H, Palsson. P.A, Maedi, a chronic, progressive infection of sheeps lungs, *J. Inf. Dis.*: 233-241. 1957
82. Sihvonen. L, Estola. T, Tuomi. J. Experimental maedi infection in sheep. I. Detection of virus, clinical course, histopatology. *Acta. Vet. Scand.* 21; 113-123. 1980.
83. Tizard. IR. *Introducción a la Inmunología Veterinaria.* Octava edición. Elsevier. 510-511. 2009.
84. Torsteinsdottir. S, Mattiasdottir. S, Vidarsdottir. N, Svansson. V, Petursson. G. Intratracheal inoculation as an efficient route of experimental infection with maedi visna virus. *Res. Vet. Sci.* 75; 245- 247. 2003.
85. Travassos. C, Beenoit. C, Valas. S, da Silva. A, Perrin. G. Detection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalment. *Vet. Res.* 29; 578-584. 1998.

86. Travassos. C, Benoit. C, Valas. S, da Silva. A, Perrín. G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*. 32; 101-106. 1999.
87. Trigo. TFJ. La Artritis Encefalitis Caprina. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Ciudad Universitaria. México D.F. *Ciencia Veterinaria*. 5; 49-66. 1991.
88. Vega. AM. “Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de raza Latxa del País Vasco”. (Tesis doctoral) Universidad de León. Facultad de Veterinaria. 2006.
89. VMRD, Inc. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Test Kit, cELISA. Diagnostic Test Kit. 2011: <http://www.vmr.com/products/testkits/detail.aspx?CATNO=289-5>. (Consultado:5/05/2011)
90. Watt. NJ, Scott. PR, Gessert. M. Maedi visna ovine progressive pneumonia virus infection: a comparative study of the disease in the United Kingdom and the United States. *Agri-practice*. 16; 29-34. 1995.
91. Welsh. RM, Selin. LK, Szomolanyi-Tsuda. E. Immunological memory to viral infections. *Annu. Rev. Immunol*. 22; 714-743. 2004.
92. Zanoni. RG, Vogt. HR, Pohl. B, Botther. J, Bommeli. W, Peterhans. E. An ELISA based whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentivirus. *J. Vet. Med. B*. 41; 662-669. 1994.

11. Apéndice I

Solución al 0.5% de DAB en TRIS-HCL

DAB (Diaminobencidina) 5mg

TRIS-HCL 0.05% pH 7.6 10ml

H²O² 50µl

Se disuelve la DAB en el TRIS, se le agrega el peróxido y se filtra con papel filtro Waltman. Debe prepararse momentos antes de usarse, utilizando guantes.

TRS-HCL 0.05% pH 7.6

TRIZMA BASE 1.39g (0.011M) 11mM

TRIZMA HCL 6.06g (0.039M) 39mM

Agua bidestilada 1 L

Mezclar las sales en un matraz aforado y llevar a un litro, ajustar el pH a 7.6, y almacenar en refrigeración.

Albumina 2%

2g-----100ml

x-----20ml = **0.4g de Albumina en 20ml de PBS pH 7.4**

Peróxido de hidrógeno 3%

2ml de peróxido de hidrógeno al 30% en 18ml de PBS pH 7.4

Solución buffer fosfatada (PBS)

1 sobre de PBS (SIGMA, phosphate buffered saline) pH 7.4

1000 ml agua destilada

Se diluye en 1000ml de agua destilada y se almacena en refrigeración

Suero policlonal

200µl de suero por laminilla

Se hace una dilución 1/50

75 laminillas X 200µl = 16000µl.

320µl de suero policlonal en 15680µl de solución diluyente de suero

Anticuerpo monoclonal (anti-goat igG-Fc Calbiochem Novabiochem Corporation)

200µl por laminilla

Dilución 1/1000

75 laminillas X 200µl = 16000µl.

16µl de Ac monoclonal en 15984µl en agua inyectable estéril

Apéndice II

Solución de bloqueo al 5%

150ml de PBS pH de 7.4
1ml de tween 20
7.5g de leche descremada

Solución de lavado al 2%

500ml de PBS con pH de 7.4
1ml de tween 20
7 g de leche descremada

Dilución conjugado 1/1000

2297 μ l de solución de lavado
3 μ l de Anti- IgG de cabra peroxidado

Diaminobencidina

10 ml de PBS pH 7.4
5mg de diaminobencidina
5 μ l de H²O²

Apéndice III.

Tabla 7. Agentes patógenos ocasionalmente presentes en semen

Agente patógeno	Bovinos		Pequeños rumiantes	
	Presencia	Transmisión	Presencia	Transmisión
Virus de fiebre aftosa	+	-	+	-
Virus de lengua azul	+	+	+	+
Virus de peste bovina	+	*	+	*
Virus de IBR	+	+	*	*
<i>Campylobacter spp</i>	+	+	+	-
<i>Brucella ovis</i>	-	-	+	*
<i>Leptospira</i>	+	+	+	*
<i>Mycoplasma</i>	+	+	+	+
<i>Trichomonas</i>	+	+	-	-
<i>Toxoplasma gondii</i>	+	+	+	+

(*)Puede estar presente (-) No se trasmite.
Travassos *et al* 1998 y 1999; Novelo, 2001

Fuente. de la Concha. 1997;

25	Ovino	Suffolk	Hidalgo	24.64	Azul			*	-	-	-	+	-	-	-	+		*
26	Ovino	Hampshire	Edo. México	7.5	Azul			*	-	-	-	++	-	-	-	++		*
27	Ovino	Hampshire	Edo. México	19.1	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	++		*
28	Ovino	Hampshire	Edo. México	1.06	Azul			*	-	-	-	++++	-	-	-	++++		*
29	Caprino	-----	Irapuato	-1.5	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-		*
30	Caprino	-----	Irapuato	-5.2	Azul			*	-	-	-	+	-	-	-	+	*	
31	Caprino	-----	Irapuato	-6.4	Azul			*	-	-	-	+	-	-	-	+		*
32	Caprino	-----	Irapuato	-1.1	Azul			*	-	-	-	+	-	-	-	+	*	
33	Caprino	-----	Irapuato	-10.7	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-		*
34	Caprino	-----	Irapuato	2.49	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-	*	
35	Caprino	-----	Irapuato	1.3	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-		*
36	Caprino	-----	Irapuato	-3.6	Azul			*	-	-	-	+	-	-	-	-		*
37	Caprino	-----	Irapuato	0.95	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-	*	
38	Caprino	-----	Irapuato	-0.95	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-		*
39	Caprino	-----	Irapuato	-3.7	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-		*
40	Caprino	-----	Irapuato	18.52	Azul			*	-	-	-	+	-	-	-	+	*	
41	Caprino	-----	Irapuato	8.66	Azul			*	-	-	-	++	-	-	-	++	*	
42	Caprino	-----	Irapuato	9.02	Azul			*	-	-	-	++	-	-	-	++	*	
43	Caprino	-----	Irapuato	1.7	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-		*
44	Caprino	-----	Irapuato	-3.8	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-		*
45	Caprino	-----	Irapuato	-4.62	Azul			*	-	-	-	++	-	-	-	++		*
46	Caprino	-----	Irapuato	3.95	Azul			*	-	-	-	++	-	-	-	++	*	
47	Caprino	-----	Irapuato	2.37	Azul			*	-	-	-	+	-	-	-	+	*	
48	Caprino	-----	Irapuato	11.72	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
49	Caprino	-----	Irapuato	-3.6	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
50	Caprino	-----	Irapuato	6.56	Azul			*	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
51	Caprino	-----	Irapuato	0.24	Azul			*	-	-	-	+	-	-	-	+	N	N

52	Caprino	-----	Irapuato	10.42	Azul		*	-	-	-	++	-	-	-	++	N	N
53	Caprino	-----	Irapuato	8.66	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	N	N
54	Caprino	-----	Irapuato	14.25	Azul		*	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
55	Caprino	-----	Irapuato	-3.6	Azul		*	-	-	-	++	-	-	-	+	N	N
56	Caprino	-----	Irapuato	-6.1	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	N	N
57	Caprino	-----	Irapuato	-3.92	Azul		*	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
58	Caprino	-----	Irapuato	13.25	Azul		*	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
59	Caprino	-----	Irapuato	2.97	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	N	N
60	Caprino	-----	Irapuato	10.11	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	-	N	N
61	Caprino	-----	Irapuato	10.33	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	N	N
62	Caprino	-----	Irapuato	2.49	Azul		*	-	-	-	++	-	-	++	++	N	N
63	Caprino	-----	Irapuato	-1.42	Azul		*	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
64	Caprino	-----	Irapuato	-3.91	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	N	N
65	Caprino	-----	Irapuato	14.84	Azul		*	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
66	Caprino	-----	Irapuato	9.85	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	N	N
67	Ovino	Suffolk	Edo. México	12.11	Azul		*	-	-	-	+++	-	-	-	+++	N	N
68	Ovino	Suffolk	Edo. México	9.68	Azul		*	-	-	-	++	-	-	-	+	N	N
69	Caprino	Toggenburg	Querétaro	-28.8	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	*	
70	Caprino	Toggengurg	Querétaro	9.96	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	*	
71	Caprino	Saanen	Querétaro	34.6	Azul	*		-	-	-	+	-	-	-	++	*	
72	Caprino	Saanen	Querétaro	-24.2	Azul		*	-	-	-	-	-	-	-	+	*	
73	Caprino	Saanen	Querétaro	1.78	Azul		*	-	-	-	+	-	-	-	+	*	
74	Caprino	Saanen	Querétaro	31.55	Azul	*		+	-	-	+	+	-	-	+	*	
75	Caprino	Murciana/G	Querétaro	5.22	Azul		*	-	-	-	+++	+	-	-	++	*	

DO= Densidad óptica ¿?= Sospechoso M= Macrófago PMN= Polimorfonucleares L= Linfocitos
EP=Epiteliales N= No realizada + pocas células presentes ++ células moderadas +++ células abundantes
++++ células muy abundantes