



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**DIAGNOSTICO DE HERPES CAPRINO CpHV-1  
POR MEDIO DE LA TECNICA DE  
INMUNOHISTOQUIMICA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**SAMANTHA PAULINA LLANOS SALINAS**

**ASESORES: DRA. I. EUGENIA CANDANOSA ARANDA  
DRA. LAURA COBOS MARIN**

**MEXICO, D.F. 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Dedicatoria

A mis padres, Miguel Llanos y Claudia Salinas, y a mi hermano Jonathan Llanos Salinas, gracias por ser mi familia, por su apoyo, su cariño y su comprensión, sin ustedes no habría podido alcanzar la más grande de mis metas, gracias por estar siempre a mi lado, por siempre apoyarme en todas las decisiones que tomo, y por ayudarme a ser mejor persona, sin ustedes no habría podido lograr todo lo que soy, gracias por ser mis consejeros y mis amigos, los amo muchísimo y espero jamás decepcionarlos.

A mi princesa Espuma (chikis), por estar conmigo a lo largo de estos 8 años de vida, gracias por las desveladas y los grandes momentos que hemos vivido juntas, aunque muchos te ven como una mascota, nosotros te vemos como parte de la familia.

A los compañeros y amigos que logre a lo largo de esta maravillosa carrera, principalmente a Lidia, Lalo, Lexy, Héctor, David, Ale y a las “ceiepanitas” Nancy, Elena, Marina, Marilú y Ana, gracias por apoyarme a lo largo de este camino, les agradezco las enseñanzas, su compañía, su amistad, y los momentos tan divertidos y frustrantes que hemos vivido.

Al MVZ Daniel Leguel Acosta por brindarme la oportunidad de crecer como persona y como profesionalista, y a la metiche de Susana Rull, mi hermana por elección y no por imposición, gracias a ambos por haberse cruzado en mi camino, por ayudarme y apoyarme, por las grandes anécdotas tanto profesionales como de vida, ambos son una dupla muy buena, simplemente gracias por a verme brindado su amistad.

A Rodrigo Gonzales Escobar, no tengo palabras para agradecerte el cariño, comprensión, amor, amistad y apoyo que me has brindado en este tiempo, gracias por reaparecer en mi vida, por dejarme volar a tu lado, y haberme permitido robarte un poco del tiempo que merecía estar contigo para poder culminar una de las metas más grandes de mi vida, gracias por ayudarme a encontrar la fuerza que necesitaba, por complementarme, por estar conmigo en los momentos difíciles

*El hombre sabio, para serlo  
recorrió primero la oscuridad;  
porque la oscuridad es el camino a la luz,  
y la luz el camino a la sabiduría.  
Dios creó la luz en la oscuridad:  
todo viaje a la luz parte de las sombras.*

*Speculum aeternum (fragmento)  
Siglo IX*

## **Agradecimientos**

Al proyecto PAPIIT IN228511-3 "AISLAMIENTO, TIPIFICACION MOLECULAR Y DIAGNÓSTICO SEROLOGICO DE HERPESVIRUS CAPRINO TIPO 1, EN MÉXICO" financiado por la dirección General de Apoyos al Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) por las facilidades otorgadas para la realización de este tema, especialmente a los académicos y administrativos que laboran dentro de la Unidad de Servicios de Diagnostico y Constatación (USEDICO), principalmente a la MVZ Esp. Myrna Alicia Vicencio Mallen por permitirme y facilitarme el uso de las instalaciones desde el comienzo de mi servicio social, hasta la culminación de este trabajo, gracias por estar siempre pendiente de nosotros, por su paciencia, consejos y enseñanzas.

A la M.C. MVZ Edith Maldonado Castro y al Químico Celedonio Gómez, por apoyarme en el manejo de la técnica de inmunohistoquímica, les agradezco la paciencia y la disposición al explicarme mis dudas.

Les agradezco también a la Sra. Roció Valdez y al Sr. Eloy García, por el apoyo que me brindaron a lo largo de todo este tiempo, por sus consejos, sus anécdotas, pero sobre todo por su valiosa amistad.

Al DR. Alejandro de la Peña Moctezuma, por el apoyo brindado a lo largo de mi estancia, de verdad es un verdadero placer trabajar a su lado, gracias por crear un armonioso lugar de trabajo, por ser un excelente profesor y una excelente persona.

Dra. Irma Eugenia Candanosa Aranda, no tengo palabras para agradecerle el apoyo brindado desde el principio, y la confianza que me tuvo al brindarme este tema, gracias por permitirme conocerla como académica y como persona.

Y por ultimo quiero agradecer a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, y a mi casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, por mi formación profesional y desarrollo personal. Cada día de mi vida estaré esforzándome para poder retribuir todo lo que me han brindado

## CONTENIDO

|   | PÁGINA    |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>                       | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>                  | <b>2</b>  |
| <b>REVISION DE LITERATURA.....</b>        | <b>4</b>  |
| • PROPIEDADES DE LOS HERPESVIRUS.....     | 4         |
| • ANTECEDENTES .....                      | 5         |
| • CARACTERÍSTICAS DE LOS HERPESVIRUS..... | 6         |
| • TRANSMISIÓN.....                        | 8         |
| • PATOGENIA.....                          | 9         |
| • LATENCIA .....                          | 10        |
| • SIGNOS Y LESIONES.....                  | 11        |
| • DIAGNOSTICO.....                        | 13        |
| <b>HIPOTESIS.....</b>                     | <b>14</b> |
| <b>OBJETIVO GENERAL.....</b>              | <b>14</b> |
| <b>OBJETIVO PARTICULAR .....</b>          | <b>14</b> |

|  |    |
|--|----|
| <b>MATERIAL Y METODOS</b> .....  | 15 |
| • OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA CpHV-1.....  | 15 |
| • IMPLEMENTACION Y ESTANDARIZACION DE LA IHQ EN CULTIVO CELULAR.....   | 15 |
| • ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE IHQ PARA LA DETECCION DE CPHV.....  | 16 |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 22 |
| • PRODUCCION DE ANTICUERPOS CONTRA CpHV-1.....   | 22 |
| • IMPLEMENTACION Y ESTANDARIZACION DE LA IHQ EN CULTIVO CELULAR.....   | 23 |
| • IDENTIFICACION DEL CpHV-1 EN MUESTRAS DE TEJIDO DE CABRA CON LESIONES<br>SUGERENTES POR MEDIO DE LA TECNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA..... | 23 |
| <b>DISCUSION</b> .....   | 25 |
| <b>CONCLUSION</b> .....  | 28 |
| <b>REFERENCIAS</b> .....   | 29 |

**INDICE DE ANEXOS**

|  | PAGINA |
|--|--------|
| FIGURAS.....   | 34     |
| CUADROS.....   | 36     |
| GUIA RAPIDA PARA DIAGNOSTICO DE CpHV-1 POR MEDIO DE IHQ..... | 40     |

## **INDICE DE ABREVIATURAS**

**CpHV-1** Herpesvirus Caprino tipo 1

**IHQ** inmunohistoquímica

**BoHV-1** Herpesvirus Bovino tipo 1

**FMVZ** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**IgC** Glicoproteína C

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**MDBK** Células de riñón de bovino de la línea Madin-Darby **ELISA** Ensayo Inmuno Enzimático

**SN** Seroneutralización

**USEDICO** Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación

**CEIEPAA** Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal del Altiplano

**DAB** Diaminobenzidina



## RESUMEN

LLANOS SALINAS, SAMANTHA PAULINA. Diagnóstico de herpesvirus caprino CpHV-1 por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (bajo la dirección de Dra. I. Eugenia Candanosa Aranda y Dra. Laura Cobos Marín)

El objetivo del presente trabajo fue implementar la técnica de inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales y policlonales, para identificar la presencia de CpHV-1 en órganos con lesiones sugerentes a las producidas por el virus, de cabras pertenecientes a un rebaño de Tequisquiapan. Se revisaron los archivos de diagnóstico de la USEDICO de los años 2010 a 2011, seleccionando los casos sugerentes de infección por CpHV-1. Se implementó la técnica de inmunohistoquímica estreptoavidina-biotina-peroxidasa en 45 casos con lesiones sugerentes a CpHV-1, observando positividad con el anticuerpo policlonal en 24 casos de cabritos menores a 15 días (53.3%) y en 4 casos (8.9%) de animales adultos. Con el anticuerpo monoclonal fueron positivos 25 casos de cabritos menores a 15 días (55.5%) y 4 de los casos adultos (8.9%). Se logró implementar la técnica de inmunohistoquímica con ambos anticuerpos, para el diagnóstico de CpHV-1. La técnica de IHQ empleada con el anticuerpo policlonal elaborado en la UNAM puede ser útil como una prueba rutina; ya que demostró tener una alta correlación con los anticuerpos monoclonales y tiene la ventaja de ser más económica que al usar los monoclonales. Se confirma la presencia de CpHV-1 en los tejidos con lesiones compatibles de cabras en México.

## Introducción

Los pequeños rumiantes, (ovinos y caprinos), son especies domésticas ampliamente distribuidas en el territorio nacional, siendo en la mayoría de los casos, la única fuente de sustento para sectores poblacionales de menores recursos económicos.<sup>1</sup>

A nivel mundial, la cría de la especie caprina ha estado asociada a grupos marginales, donde la producción de leche y carne se destina principalmente al autoconsumo. En México la producción caprina es una actividad tradicional que se encuentra estrechamente ligada al desarrollo cultural de la población<sup>1</sup>. En la actualidad, adquieren mayor importancia debido a que se está estimulando su producción, con la finalidad de mejorar la calidad de vida de sus propietarios.

Las patologías asociadas con problemas reproductivos adquieren una relevancia especial, dado que producen pérdidas productivas y reproductivas.<sup>2</sup>

En México, un informe realizado en 2009 y publicado en 2011 sugiere la presencia del Herpes caprino 1 (CpHV-1) en un rebaño caprino ubicado en Tequisquiapan, Querétaro, observándose lesiones como vulvovaginitis pústular y ulcerativa, y balanopostitis pústular ulcerativa. En este estudio, se observaron cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en diferentes órganos de dos animales adultos y un mortinato: Para la identificación del virus se realizó microscopía electrónica y cultivo celular; sin embargo, no se hizo la identificación del tipo y especie viral, ya que no se contaban con las técnicas diagnósticas para ello.<sup>3</sup>

En junio del 2011 se encontró en el mismo rebaño un grupo conformado por 5 machos, con lesiones sugerentes al CpHV-1 del cual se seleccionó uno que

mostrara la lesión más evidente y se recolecto una muestra de prepucio que se remitió al laboratorio de virología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMVZ), para realizar el aislamiento viral y su posterior identificación.

La inmunohistoquímica (IHQ) es un método basado en las reacciones inmunoenzimáticas en las que se emplean anticuerpos mono o policlonales que permiten la localización histológica del antígeno y su correlación con la morfología del tejido. Además, la técnica permite detectar la presencia de partículas virales en células no viables, lo que puede resultar útil cuando las muestras no se pueden conservar adecuadamente para el aislamiento viral.<sup>4,5,6</sup>

Un anticuerpo monoclonal se refiere a moléculas de anticuerpos específicas a un único epítipo, originalmente producidas por una célula B y que comparten una secuencia idéntica. Los anticuerpos policlonales son moléculas de anticuerpos que difieren en las características de su epítipo y en la secuencia de aminoácidos de su región de complementariedad, pero comparten un objetivo específico común.<sup>7</sup>

La IHQ juega un papel importante en el diagnóstico histopatológico de diversas enfermedades. El desarrollo de anticuerpos para epítipos resistentes a la fijación de tejidos y la disponibilidad de un sistema de detección altamente sensible hacen de la IHQ una herramienta práctica para la patología.<sup>5</sup> En años recientes esta técnica se ha convertido en un importante instrumento para el diagnóstico histopatológico.

Debido a la evidencia de lesiones sugerentes a la presencia de CpHV-1 en hatos caprinos mexicanos es necesario contar con las herramientas diagnósticas como la IHQ para la identificación del virus e informar a los productores de caprinos para

que consideren a este agente como una posible causa de pérdidas económicas en su hato.

## **REVISION DE LITERATURA**

### **Propiedades de los herpesvirus**

La familia herpesviridae agrupa un extenso conjunto de más de 130 especies de virus que comparten un conjunto de características y que infectan un rango amplio de especies animales. Los herpesvirus tienen un especial interés debido a su elevada incidencia de infección, su diversidad evolutiva y su implicación en importantes enfermedades en humanos y animales. En animales, los herpesvirus causan infecciones respiratorias, infecciones en genitales, conjuntivitis, abortos, enfermedades neurológicas y encefalitis. Constituyen una de las 22 familias de virus que tienen relevancia en la medicina veterinaria.<sup>8</sup>

La familia herpesviridae comprende 3 subfamilias:

- Alphaherpesvirinae, que incluye a los virus citolíticos de crecimiento rápido.
- Betaherpesvirinae, compuesta por virus citomegálicos de crecimiento lento.
- Gammaherpesvirinae, formada por virus que se desarrollan en los linfocitos y que pueden transformarlos en tumorales.<sup>9,10</sup>

La familia alfaherpesvirus incluye virus que se caracterizan por tener una amplia gama de hospedadores, un ciclo de reproducción corto, y una capacidad de inducir una infección latente. Las partículas víricas de los herpesvirus son lábiles y no tienen una supervivencia fuera del organismo infectado. En general, su

transmisión requiere un contacto físico que conlleve a la aposición de epitelios húmedos, como por ejemplo el coito.<sup>10</sup>

Este virus pertenece a un grupo de Alfa herpesvirus que infectan a varias especies de rumiantes y cuyo prototipo es el Herpesvirus Bovino 1 (BHV1), responsable de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR). Infecciones cruzadas experimentales han mostrado que otras especies de rumiantes son receptivas al BHV1. El CpHV-1 consigue lograr la infección con éxito en el ternero y en el cordero, con excreción viral y seroconversión.<sup>11</sup> Los rumiantes salvajes parecen a salvo, excepto la cabra montés (*Capra ibex*), en la que se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-CpHV1. Sin embargo, parece que la virulencia del CpHV1 se limita al hospedador natural.<sup>11</sup>

### **Antecedentes**

En 1972 en el condado de Santa Cruz, California, en una crianza de cabras Alpino-Francesa, murieron cuatro cabritos de una semana de edad luego de presentar una infección generalizada, disnea, inapetencia y dolor abdominal, se enviaron muestras al laboratorio de patología y virología en la escuela de medicina veterinaria de la universidad de California, donde se detectaron cuerpos de inclusión intranucleares, semejantes a los del virus herpes.<sup>12</sup>

Algunos años más tarde, el CpHV-1 fue identificado en cabritos del valle de Bregaglia, en Suiza. La distribución geográfica de la infección de CpHV-1 en la cabra no ha sido objeto de estudios sistemáticos. Sin embargo, los datos existentes sugieren una distribución mundial con prevalencias variables. Así, la infección ha sido identificada en Australia, Canadá, Estados Unidos, Nueva

Zelanda y parece predominante en Europa, especialmente en la cuenca mediterránea. En efecto, en países donde las cabras tienen un papel económico como España, Italia, Grecia y Francia, se observan fuertes prevalencias.<sup>8,13,14,15</sup>

## **CARACTERISTICAS DEL HERPESVIRUS**

### **Estructura**

Presenta cuatro estructuras morfológicas bien diferenciadas:

- El núcleo: es de naturaleza nucleoproteica, incluye una molécula de DNA
- La cápside: es una estructura formada por cuatro proteínas dispuestas en un patrón icosaédrico que encierra al núcleo
- El tegumento: es un conjunto de proteínas de origen vírico que se disponen de manera aparentemente desordenada envolviendo la cápside.
- La envoltura: es una membrana lipídica que envuelve el tegumento y en la que se encuentran diferentes proteínas víricas en su mayoría glicosiladas.

Todos los herpesvirus comparten además las siguientes características:

Codifican enzimas y factores relacionados con la síntesis y el metabolismo de ácidos nucleídos.

La síntesis de ADN viral y el ensamblaje de la cápside ocurren en el núcleo celular. A su paso por la membrana nuclear interna, la cápside de los herpesvirus adquiere una primera envoltura lipídica que pierde al llegar al citoplasma. La producción de la progenie viral va acompañada de la destrucción irreversible de la célula infectada.<sup>8,11,15,16,17</sup>

Tras la infección primaria, los herpesvirus establecen una infección latente de por vida en el hospedador natural pudiendo reactivarse periódicamente y dar lugar a brotes clínicos de la enfermedad. Durante esta fase de latencia el ADN viral se encuentra circulando y la expresión génica está limitada a unos pocos genes.<sup>18</sup>

### **Ciclo de replicación viral**

La replicación de todo virus consiste en la síntesis de nuevas partículas víricas, y en el caso de los herpesvirus, implica la síntesis y ensamblaje de los cuatro elementos estructurales que componen a un virus.<sup>8</sup>

El CpHV entra a las células por fusión de su envoltura con la membrana plasmática celular, en un proceso independiente de pH y dependiente de la unión de glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular. Diversos estudios han demostrado que las diferentes glicoproteínas virales, como la IgC en el caso de CpHV-1, son requeridas en el proceso de entrada del virus a la célula.<sup>19,20</sup>

Después de la entrada a las células del hospedero, el CpHV es transportado a través de los microtúbulos hasta el núcleo; donde de manera ordenada y secuencial replica su genoma usando proteínas virales y celulares. Dependiendo del momento en que los genes virales son expresados durante la replicación son clasificados en tres clases: inmediatos tempranos, tempranos y tardíos.<sup>16</sup> Luego del ensamblaje, los viriones abandonan el núcleo y se dirigen hacia la membrana citoplasmática externa por procesos de gemación a partir de membranas intracitoplasmáticas, adquiriendo su envoltura y tegumento. Luego son

transportados dentro de vesículas intracelulares a la membrana citoplasmática para su posterior liberación de la célula. La replicación del genoma del CpHV comienza a las dos horas siguientes de la infección inicial del animal, con la expresión de antígenos en la superficie celular entre las tres a cuatro horas siguientes a la infección; liberación de partículas virales y dispersión a las ocho horas posinfección.<sup>16,19,20.</sup>

## **TRANSMISIÓN**

Los animales infectados de forma aguda y latente son la principal fuente de infección. En la forma aguda, el virus es excretado en las secreciones oculares, nasales y genitales. La transmisión del virus se lleva a cabo por vía genital o respiratoria. Parece que la presencia de animales portadores latentes es responsable del mantenimiento de la infección en el seno del rebaño. La evolución de la infección por CpHV1 es por tanto dependiente de los episodios de reactivación y de re-excreción vírica.

En las formas respiratoria y genital que se observan en las cabras adultas, es típico encontrar una infección local caracterizada por epiteliotropismo. La diseminación vírica comienza en el organismo con una viremia asociada a los leucocitos, que puede conducir a una infección generalizada, y a aborto al atravesar la barrera placentaria. La transmisión por vía oral y nasal ha sido demostrada experimentalmente, y raramente produce signos, pero puede ser responsable de abortos en la cabra adulta. En cambio, los cabritos recién nacidos



pueden infectarse por vía nasal en el periodo perinatal, así como al final de la gestación como consecuencia de una infección intrauterina.<sup>9,11,21</sup>

## **PATOGENIA**

Las partículas víricas de los herpesvirus son lábiles y no tienen una buena permanencia fuera del organismo infectado.<sup>11</sup> La vía de entrada del CpHV-1 puede ser nasal y genital<sup>2,9</sup> En general, su transmisión requiere un contacto directo, principalmente uno físico que conlleve la aposición de epitelios húmedos.

Después de una infección intranasal, se presenta una replicación local produciendo una lesión epitelial en la cavidad nasal, seguida por una viremia asociada a células mononucleares, que puede llevar a una infección sistémica y abortos. El virus finalmente alcanza el tracto genital, con la aparición de las lesiones características: vulvovaginitis ulcerativa en hembras y balanopostitis ulcerativa en machos, ambas con altos títulos virales.<sup>22</sup>

En los animales infectados la enfermedad tiene una presentación aguda y latente. Durante la presentación aguda, el virus es excretado vía ocular, nasal y genital<sup>12,22</sup>

La viremia asociada con la inoculación intranasal ha sido demostrada experimentalmente mediante la recuperación del virus o su detección por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en fetos abortados,<sup>12</sup> los informes tanto de infección natural como experimental, indican que el aborto y los neonatos muertos causados por el CpHV-1 son resultado de la viremia.<sup>12,22</sup> Se sugiere que el virus permanece latente en la placenta, y cuando pasa al feto, produce lesiones

necróticas diseminadas, ya que los fetos abortados y neonatos muertos demuestran la presencia del CpHV-1 o el ADN viral en hígado.<sup>12,22</sup>

En el caso de los neonatos la enfermedad sistémica está caracterizada por una elevada morbilidad y mortalidad provocada por una enteritis necrótica.<sup>23</sup>

Por el contrario, después de una infección genital hay una replicación viral masiva, restringida a la mucosa genital, con aparición de eritema, edema, vesículas y úlceras de distribución multifocal.<sup>22</sup>

Cuando las cabras son inoculadas intravaginalmente de manera experimental, la presencia de la infección se manifiesta con lesiones genitales, y el virus se puede aislar 5 a 7 días post infección a partir de hisopos vaginales y no de hisopos oculares, nasales o rectales; sugiriendo que la infección genital puede establecerse sin causar viremia.<sup>24 25</sup>

## **LATENCIA**

El CpHV-1 se mantiene en estado latente, como los otros herpesvirus, establece latencia durante toda la vida del hospedero en neuronas ganglionares del sistema nervioso periférico. Luego de la replicación inicial en el epitelio mucoso, la nucleocapside del virus es direccionada por transporte axonal retrogrado hasta el cuerpo de la neurona sensorial dentro del ganglio trigémino, allí el DNA es insertado en el núcleo de la neurona; entrando en un estado de transcripción restringida, el cual le permite evadir la respuesta inmune del hospedero.<sup>18</sup>

La reactivación podría producirse de manera natural, por ejemplo en caso de estrés en la época reproductiva, o durante el celo por los cambios hormonales. Esto sugiere que la re-excreción vírica se efectuaría a través del semen en los

machos debido al estrés del apareamiento, y en las secreciones vaginales de las hembras estresadas por el coito. La inyección de glucocorticoides requiere la utilización de dosis elevadas para inducir una reactivación experimental. El virus puede reactivarse, produciendo partículas virales, las cuales migran en forma centrífuga usando un transporte axonal anterogrado de la misma neurona por la cual ascendieron, alcanzando el sitio inicial de replicación, para poder así dispersarse a otros animales susceptibles.<sup>18</sup> En este caso, el virus se aísla sobre todo de raspados vaginales, pero también de muestras nasales, oculares y rectales, lo que sugiere varios emplazamientos de latencia.<sup>15</sup>

## **SIGNOS CLINICOS Y LESIONES A LA NECROPSIA**

- En el cabrito

La forma generalizada se observa de una a dos semanas de edad; se presenta debilidad progresiva, fiebre, dolor abdominal, cianosis y ritmo cardiaco acelerado. El miocardio está edematoso. A la percusión y a la palpación, el contenido intestinal es líquido. Tras la manipulación del animal se presenta emisión de heces acuosas, amarillas, con estrías de sangre, pero no hay diarrea.<sup>23,26,27</sup> En el tracto digestivo se observan distribuidas lesiones inflamatorias y necróticas en la mucosa, a veces hemorrágicas; en el ciego y colon se puede presentar ulceración de la mucosa, con necrosis y edema, acompañado de inflamación de la submucosa: Las células hepáticas se muestran hinchadas y vacuoladas, con presencia de cuerpos de inclusión intranucleares.<sup>21,28</sup> También se observa conjuntivitis, mucosidad nasal de serosa a purulenta, úlceras en los septos nasales y erosiones en la cavidad bucal. Puede verse neumonía intersticial no

purulenta. Cuatro días después de la infección pueden presentarse lesiones ulcerosas en la piel y pezuñas.<sup>28</sup> De uno a cinco días sobreviene la muerte, precedida de un estado comatoso. Algunos cabritos sobreviven o mueren al cabo de dos meses en estado de debilidad.

- En el adulto

Tenemos tres formas: respiratoria, genital y abortos.

Se ha descrito en la cabra adulta una neumonía aguda, asociada a CpHV-1 y a Mannheimia haemolytica. La consolidación roja se localiza en los lóbulos craneoventrales del pulmón, acompañada en ocasiones de exudado pleural fibrinoso, esta patología se observa muy raramente.<sup>21</sup>

Los síntomas clínicos de la forma genital, recuerdan a los de la Vulvovaginitis Pústular Infecciosa provocada por el BHV1. La mucosa de la vulva y de la vagina presenta hiperemia, petequias y edema, así como numerosas pápulas y vesículas que se fusionan para formar úlceras. Los signos sistémicos de la enfermedad no son observados. Las lesiones desaparecen de cuatro a seis días. Lesiones similares se observan en el pene y el prepucio del macho cabrío.<sup>9,11,14,22,26,28</sup>

Estas alteraciones suelen curarse espontáneamente en dos semanas aproximadamente y, las tasas de concepción no se ven afectadas.

Los abortos producidos por el CpHV-1 tienen lugar durante la segunda mitad de la gestación; la mayoría poco antes del parto. No hay signos que nos prevengan su aparición. La infección experimental puede inducir aborto, ya sea por vía intravenosa, o por vía nasal.<sup>21</sup> Los fetos no presentan lesiones macroscópicas; Sin embargo, el examen histopatológico del hígado, pulmones y bazo revela necrosis

multifocal.<sup>28</sup> Se pueden observar hemorragias en pulmón. En las cavidades corporales pueden encontrarse exudados sanguinolentos.<sup>21</sup>

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del CpHV-1 se realiza a partir de tres pruebas, dos de ellas son serológicas: el Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) y la seroneutralización (SN) y una prueba molecular: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- ELISA. Cabe señalar que no se cuenta con pruebas comerciales para el diagnóstico de CpHV-1 y debido a que existe una reacción cruzada con el BoHV-1, para el diagnóstico serológico se han utilizado pruebas comerciales de ELISA para Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) como: SERELISATM IBR/IPV gB Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Lyon, France) y gE (Herdchek Anti-IBR gE, Idexx, Germany), ambas pruebas son ELISAS competitivas.<sup>23,29</sup>
- SN. Esta prueba se realiza en cultivo celular empleando células de riñón bovino de la línea Madin-Darby (MDBK) infectadas con 75 UFP (unidades formadoras de placa) de la cepa BA-1 de CpHV-1 o 75 UFP de la cepa Iowa de BoHV-1.<sup>30,31</sup>
- PCR Y PCR EN TIEMPO REAL. Esta prueba se realiza a partir de hisopos nasales/vaginales, de muestras de tejido y células MDBK infectadas. Los iniciadores que se han empleado amplifican una región conservada del gen glicoproteína C (gC).<sup>12,32,33</sup>

## **Hipótesis**

Con la implementación de la técnica de inmunohistoquímica se podrá identificar el Herpes virus caprino en órganos con lesiones sugerentes, provenientes de algunos rebaños caprinos en el altiplano mexicano.

## **Objetivo general**

Implementar la técnica de inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales y policlonales para identificar la presencia de CpHV-1 en órganos de cabras con lesiones sugerentes a las producidas por el virus

## **OBJETIVO PARTICULAR**

1. Producir anticuerpos policlonales contra CpHV en conejos.
2. Implementar y estandarizar la técnica de inmunohistoquímica en cultivos celulares infectados con el virus de CpHV
3. Identificar el CpHV en muestras de tejido con lesiones sugerentes, obtenidas de cabras pertenecientes a rebaños de Tequisquiapan, Querétaro, con la técnica de inmunohistoquímica.

## **Material y métodos**

El presente trabajo corresponde a un estudio descriptivo, retrospectivo y experimental. Se utilizaron casos patológicos con lesiones sugerentes de CpHV-1, pertenecientes al acervo del servicio de diagnóstico de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO), perteneciente al Centro de Enseñanza e Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### **Obtención de anticuerpos contra CpHV-1**

#### ***Virus.***

El virus empleado para la elaboración del antisuero fue obtenido a partir de una muestra de prepucio perteneciente a un animal del mismo rancho de Tequisquiapan de donde proceden la muestras con lesiones sugerentes<sup>41</sup>

Dicho aislamiento se remitió a microscopia electrónica y el diagnóstico ultraestructural reportó partículas virales intranucleares e intracitoplasmáticas compatibles con Herpesvirus. Además, se le realizaron pruebas de inmunofluorescencia utilizando el mismo anticuerpo monoclonal que en este trabajo y la prueba mostró, una respuesta positiva.

Se utilizó un conejo de la raza Nueva Zelanda, de 2 kg de peso, el cual se inmunizó con un inóculo obtenido de cultivo celular infectado con CpHV-1 junto con un adyuvante completo de Freund (5 mg/ml de proteína viral+ 1 mL de

adyuvante) durante 4 semanas (1 inyección por semana), posteriormente se hizo una toma de muestra sanguínea para evaluar la respuesta del animal mediante la prueba de inmunodifusión en gel agar. Esto se realizó en placas de Petri donde se pone agar bufferado al 2%, donde se colocó el suero del conejo y el antígeno. Se incubó durante 48 horas, a las 24 horas se realizó una primera lectura y a las otras 24 horas se hizo una lectura definitiva.

Una vez que se comprobó que se produjeron los anticuerpos contra el virus el animal permaneció vivo hasta la semana 10. Posteriormente, se realizó el sangrado por medio de punción intracardiaca, con el animal previamente anestesiado con xilacina y así obtener la mayor cantidad de sangre.

## **Implementación y estandarización de la IHQ de CpHV-1 en cultivos celulares**

### ***Anticuerpo primario***

- Anticuerpo monoclonal: este anticuerpo fue donado por el doctor Etienne Thiry del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Laboratorio de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Lieja, en Bélgica.<sup>15</sup>

La prueba se estandarizó colocando en una placa de 96 pozos cultivos celulares MDBK infectados con 100µl del CpHV-1, dejándolas incubar 48 horas a una temperatura de 37°C.

Posterior a esto se colocó acetona al 30% durante 10 minutos, esto con el fin de fijar la mayor cantidad de células posibles a la superficie de la placa.



Posteriormente se realizaron diluciones dobles del anticuerpo primario, utilizando dos filas de la microplaca de 96 pozos. El anticuerpo se diluyó comenzando en 1/500 hasta 1/2000, colocando 50µl a cada pozo, posteriormente se dejó incubar por 30 minutos a 37°C, y 30 minutos a temperatura ambiente.

Se utilizó un anticuerpo secundario anti conejo marcado con peroxidasa, realizando diluciones dobles seriadas comenzando de 1/400 a 1/800, colocando 50µl a cada pozo. Posteriormente se dejó incubar a 37°C por 30 minutos, y después 30 minutos a temperatura ambiente.

Se procedió a revelar la placa, agregando 50µl de Diaminobenzidina (DAB) como solución reveladora, a cada uno de los pozos y dejando actuar por 15 minutos.

Se detuvo la reacción con agua destilada y se agregó 50µl de hematoxilina como solución de contraste durante un minuto, se dejó secar a temperatura ambiente.

## **Implementación y estandarización de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para detectar CpHV-1**

Para lograr la identificación del antígeno viral se empleó la técnica de IHQ estreptoavidina-biotina-peroxidasa.

### ***Anticuerpo primario***

Se utilizaron dos anticuerpos:

- Anticuerpo policlonal: elaborado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.
- Anticuerpo monoclonal: donado por el doctor Etienne Thiry del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del

Laboratorio de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Lieja, en Bélgica.<sup>10</sup>

## Testigos

- **Testigo positivo:** Se realizó la inoculación del virus de CpHV-1<sup>1</sup>, en un hámster sirio dorado, éste fue sacrificado a los 4 días por medio de dislocación cervical<sup>34</sup>, se seleccionaron secciones de hígado y pulmón. Este testigo fue inoculado en el bioterio del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

**Testigo negativo:** Se utilizaron 2 testigos negativos, el primero correspondió a una sección de hígado de un hámster clínicamente sano, donado por el laboratorio de Bacteriología de la USEDICO, el segundo testigo correspondió a la sección de hígado de un bovino, tomado del acervo perteneciente a la USEDICO.

En ambos casos, las muestras de tejido fueron fijados en formalina amortiguada al 4% e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 3 µm de grosor y fueron colocados en laminillas electrocargadas<sup>2\*, 7</sup>.

## Criterios de inclusión

Para el estudio inmunohistoquímico, se revisaron los archivos de diagnóstico de la USEDICO, de los años 2010 y 2011, con casos de cabras con lesiones sugerentes de infección por CpHV-1.

Se obtuvieron los bloques de parafina que contenían secciones de hígado, pulmón, bazo e intestino, previamente procesados por el método habitual de

---

<sup>1</sup> Obtenido en el departamento de microbiología de la FMVZ de la UNAM

<sup>2</sup> \*VWR Micro slides superfrost plus Cat. No. 48311-703

inclusión en parafina.<sup>35</sup> Se realizaron cortes de 3 µm de grosor y estos fueron colocados en laminillas electrocargadas.<sup>7</sup>

### **Método de estreptoavidina-biotina-peroxidasa**

Para este procedimiento se emplearon laminillas con un testigo positivo, un testigo negativo y 6 casos problemas colocados en laminillas electrocargada, todos procesados simultáneamente.

#### **Preparación de los tejidos:**

Las secciones fueron desparafinadas en una estufa a 60°C por 1 h. Posteriormente, los tejidos se sumergieron inmediatamente en xilol, realizando 2 lavados de 5 min cada uno. Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas se sumergieron en alcohol etílico a diferentes concentraciones: 100%, 96%, 80%, 70% y 50%, realizando un lavado de 3 minutos cada uno por cada concentración de alcohol y finalmente se sumergieron en agua destilada por 3 minutos a temperatura ambiente.

#### **Recuperación antigénica**

La recuperación antigénica se realizó por medio de la olla de recuperación antigénica, a una temperatura de 120°C por 10 min, utilizando un amortiguador de citrato de sodio concentrado a 20X con un pH 6.0<sup>3\*\*</sup> (10mL de amortiguador + 190 mL agua destilada).

---

<sup>3</sup> \*\*20X immuno/DNA Retriever with citrate, Bio SB Inc. Santa Barbara, CA, USA LOT 120109

### **Inhibición de la peroxidasa endógena**

Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena se utilizó un bloqueador de peroxidasa comercial<sup>4£</sup>, aplicando 4 gotas sobre el tejido, se dejó actuar por 5 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente.<sup>6</sup>

### **Aplicación de anticuerpo primario**

Se procedió a la aplicación del anticuerpo primario, empleando un diluyente de anticuerpos<sup>5££</sup>. El primer anticuerpo trabajado fue el anticuerpo policlonal de suero de conejo, a una dilución 1:10, de éste se aplicaron 100 µL en cada laminilla, y se dejó incubar 60 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

### **Aplicación de anticuerpo secundario**

Se utilizó un anticuerpo secundario comercial<sup>6¥</sup> marcado con biotina, aplicando 4 gotas sobre el tejido, e incubando 15 min en la cama húmeda, a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo se realizaron lavados con agua destilada con ayuda de una piseta.

### **Aplicación de estreptoavidina**

Se aplicaron 4 gotas de un inmunodetector de ratón/conejo<sup>7€</sup>, dejándolo incubar 15 min en la cámara húmeda, a una temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de éste, se realizaron lavados con agua destilada

### **Aplicación del cromógeno**

Para la preparación del cromógeno, se agregaron 2 gotas de cromógeno Diaminobenzidina (DAB)<sup>8Ω</sup> en 1 mL de diluyente inmunodetector ratón/conejo<sup>9π</sup> en

<sup>4</sup> £ Mouse/rabbit Immunodetector peroxidasa block, Bio SB Inc. Santa Barbara, CA, USA LOT 080906

<sup>5</sup> ££ Antibody diluent, Spring Bioscience. Pleasanton, CA 94566 LOT 101229

<sup>6</sup> ¥ Mouse/rabbit Immunodetector biotin link, Bio SB Inc. Santa Barbara, CA, USA LOT 081806

<sup>7</sup> € Mouse/rabbit Immunodetector HRP label, Bio SB Inc. Santa Barbara, CA, USA LOT 081706

<sup>8</sup> Ω Immunodetector DAB Chromogen Bio SB Inc. Santa Barbara CA, USA LOT 063006

un vial; a cada tejido se le aplicaron 100  $\mu$ L, reposando 5 min como tiempo de revelado. Enseguida se realizó un lavado suave con agua destilada sobre cada laminilla para detener la reacción del revelado. Los tejidos se contrastaron con hematoxilina de Mayen, sumergiéndolas en la tinción por 2 min, y después se les dio un lavado con agua corriente, hasta que esta salió clara. Posteriormente, las laminillas se sumergieron en agua destilada, por 3 min. La deshidratación de los tejidos se hizo realizando lavados de 3 min cada uno en alcoholes de diferentes concentraciones: 50%, 70%, 80%, 96% y 100%, y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente a las laminillas se les colocó un cubre objetos sellándolas con resina sintética

Las secciones fueron evaluadas con microscopia, una reacción positiva se determinó al observar un color ocre en el citoplasma y/o núcleo de las células, lo que significó la presencia de partículas virales de herpes.

Una vez que se obtuvieron los resultados positivos con el anticuerpo policlonal, se procedió a realizar la misma prueba, sustituyendo el anticuerpo primario por el anticuerpo monoclonal, a una dilución de 1:100, para comprobar el resultado.

Una reacción positiva empleando el anticuerpo monoclonal se determinó al observar un color ocre en el citoplasma y/o núcleo de las células de los tejidos, lo que significó la presencia de CpHV-1.

La intensidad de la inmunotinción fue graduada semicuantitativamente con una escala de 0 a 3: Grado 0, sin tinción; Grado 1 tinción débil (color ocre claro); Grado 2 tinción moderada (color ocre); y Grado 3 tinción intensa (ocre oscuro). (Figuras 3-5)

---

<sup>9</sup>  $\pi$  Mouse/rabbit Immunodetector DAB buffer, Bio SB Inc. Santa Barbara CA, USA LOT 072806

## Resultados

### 1. Producción de anticuerpos contra CpHV-1

Del conejo Nueva Zelanda previamente utilizado se obtuvieron 20 ml de suero, el cual fue utilizado como anticuerpo policlonal. Para verificar que el suero contara con anticuerpos dirigidos a CpHV-1, se realizó la prueba de precipitación inmunodifusión gel agar, resultando positivo a la dicha prueba, ya que formó líneas de precipitación.

### 2. Implementación y Estandarización de la prueba de IHQ con en cultivo celular

Para dicha técnica se decidió emplear la acetona por 10 minutos para que el cultivo celular quedara fijado a la superficie de los pozos. Este método de fijación no fue de gran ayuda ya que con los lavados las células fueron desprendiéndose de la superficie. Se decidió aumentar el tiempo de fijación a 15 minutos, pero la acetona provocó que la superficie del pozo adquiriera una coloración blanquecina, la cual interfería al momento de observar la placa. Debido a esto se decidió estandarizar la técnica sobre las laminillas con tejidos de cabras con lesiones sugerentes a CpHV-1.

Al estandarizar la técnica en las laminillas, se utilizó el anticuerpo monoclonal a 1:100 y 2 laminillas, una con el testigo positivo y una con el testigo negativo, y se siguió el protocolo recomendado por el *kit* de inmunohistoquímica<sup>36</sup>, dando como resultado positividad en el testigo positivo.

Al estandarizar la técnica con el anticuerpo policlonal, se hicieron varios intentos, utilizando diluciones 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10, fue hasta la dilución 1:10 que se mostró positividad en el testigo positivo.

### **3. Identificación del CpHV-1 en muestras de tejido de cabra con lesiones sugerentes por medio de la técnica de IHQ**

- ***Selección de casos***

Como producto del estudio retrospectivo que se realizó al acervo de la USEDICO de los años 2010 y 2011, se seleccionaron 45 casos, de los cuales 38 correspondieron a cabras menores a 15 días y 6 cabras adultas de entre 1 a 5 años. De los archivos de la USEDICO se obtuvieron los bloques de parafina y las laminillas de cortes teñidas con hematoxilina eosina. Los datos de los casos seleccionados se muestran en el cuadro 1 y 2.

- ***Resultados histopatológicos***

De los 38 casos de cabras menores a 15 días, se evaluaron los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina, de los cuales se encontraron 18 casos con lesiones sugerentes a CpHV-1. Las lesiones que se presentaron con mayor frecuencia en el hígado fueron: degeneración vacuolar, eritropoyesis extramedular, hepatitis neutrofílica, y en algunos casos hepatitis necrótica; en 6 de estos casos se encontraron cuerpos de inclusión intranucleares intralesionales, sugerentes a CpHV-1. (Figura 1) A nivel intestinal se encontraron las siguientes lesiones: enteritis linfocítica con descamación epitelial y congestión, infiltración perivascular ligera, acortamiento de las vellosidades, y en algunos casos enteritis necrótica.

Con respecto a los 6 adultos con lesiones sugerentes a CpHV, las más frecuentes fueron: hepatitis linfocítica y neutrofílica periportal y degeneración vacuolar.

En caso de las hembras adultas las lesiones genitales iban de vaginitis linfocítica a vulvovaginitis con erosión de la mucosa; mientras que en los machos adultos se encontró balanopostitis ulcerativa y pustular. Solo en 2 casos de animales adultos

se encontraron cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos intralesionales, sugerentes a CpHV-1. (Figura 2)

- **Inmunohistoquímica**

Del total de los 45 casos con lesiones sugerentes a CpHV-1 que fueron procesados con estreptoavidina-biotina-peroxidasa y anticuerpo policlonal, se observó positividad en 28:de éstos 24 correspondieron a cabritos menores a 15 días (53.3%) y 4 casos (8.9%) a animales adultos. En algunos casos se detectó reacción inespecífica, que sugiere que se debe realizar la purificación del anticuerpo

Mediante el protocolo utilizado en IHQ fue factible la detección de antígenos de CpHV-1 en el citoplasma de los hepatocitos y en macrófagos localizados en pulmón y vena central del hígado.

Con el anticuerpo monoclonal en los 45 casos para comprobar la eficiencia del anticuerpo policlonal, se encontró que 25 casos de cabritos menores a 15 días (55.5%) mostraron positividad, al igual que 4 de los casos adultos (8.9%).

Con los datos obtenidos con el anticuerpo monoclonal se decidió segmentar por grupos dependiendo de su grado de positividad, quedando 27 casos con positividad ligera (color ocre claro), 6 con positividad moderada (color ocre), y 3 con positividad intensa (ocre oscuro) (Figuras 3-5)<sup>37</sup>



## Discusión

El presente trabajo estableció como objetivo implementar la técnica de inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales y policlonales para identificar la presencia de CpHV-1 en órganos de cabras con lesiones sugerentes a las producidas por el virus.

Algunos autores mencionan que la prueba de IHQ juega un papel importante en el diagnóstico histológico de diversas enfermedades.<sup>5</sup> El desarrollo de anticuerpos para epítopes resistentes a la fijación de tejidos y la disponibilidad de un sistema de detección altamente sensible hacen de la inmunohistoquímica una herramienta práctica para la patología.<sup>4,5,6</sup>

Muchos estudios han confirmado a la IHQ en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina como una herramienta diagnóstica, eficaz para la identificación del agente etiológico causante de enfermedades infecciosas.<sup>38,39,40</sup> Los antígenos pueden ser demostrados en 80% o más de los especímenes utilizando tinción de IHQ<sup>40</sup>, pero teniendo en cuenta que los tejidos deben ser fijados en formol neutro o “bufferado” idealmente en un tiempo no mayor a 48 horas, ya que las estructuras tridimensionales de las proteínas tisulares se alteran en grado variable durante este proceso.<sup>7,35</sup>

Aunque algunos antígenos tisulares (epítopes) son resistentes a la fijación con formol e inclusión en parafina, otros epítopes pierden su reactividad antigénica después de estos procesos de rutina<sup>38</sup>.

Esta situación posiblemente explique los casos histológicamente sugerentes a CpHV-1, pero que por IHQ resultaron negativos, dado que en ocasiones las

muestras llegan a pasar más de 48 horas fijadas en formol. Otro factor que llega a alterar el resultado es el rebaje que sufren los tejidos mientras se encuentran embebidos en parafina.

Es por esto que la mayoría de los autores coincide que un resultado positivo por IHQ confirma el diagnóstico, pero un resultado negativo en un tejido o tratado individualmente no siempre es definitivo<sup>38, 30, 40</sup>.

Se realizó el estudio con un anticuerpo monoclonal dirigido contra CpHV-1 y también con anticuerpo policlonal de suero de conejo para comparar los resultados con ambos y comprobar la eficiencia de este último, ya que en los laboratorios donde se trabajó no se cuenta con la tecnología suficiente para obtener un anticuerpo monoclonal.

Si bien es cierto que los anticuerpos monoclonales son usualmente superiores a los policlonales en cuanto a su especificidad, estos últimos tendrán algunas ventajas como la presencia de la mezcla de anticuerpos contra varios epítopes del virus. Esto incrementa la posibilidad de unión al antígeno, porque al menos algunos epítopes resistirán el procesamiento del tejido; mas anticuerpos se depositaran por molécula antigénica, incrementando la eficiencia de la detección.<sup>35</sup>

Una de las principales desventajas del anticuerpo policlonal es su elaboración, ya que este puede contener otro tipo de anticuerpos en el suero además de aquellos para lo que se inmunizo al animal. Esto puede explicar la tinción inespecífica que se llevo a encontrar en las muestras de pulmón, y que no fueron encontradas con el anticuerpo monoclonal.

Como en todas las pruebas de laboratorio, el control de calidad debe de estar presente para poder asegurar que el resultado este bien. Aquí usamos controles

positivos y negativos, los cuales fueron sometidos al mismo proceso que nuestras muestras problema.

En este trabajo hubo una buena correlación (cuadro 3) entre los resultados obtenidos con el policlonal y el monoclonal contra el antígeno de CpHV-1, lo que confirma la especificidad del primero. Lo anterior sugiere que el anticuerpo policlonal podría ser utilizado en pruebas de rutina para el diagnóstico de CpHV-1 y tendría la ventaja de ser una prueba más económica y accesible que al usar anticuerpos monoclonales.

La mayor ventaja del diagnóstico por medio de IHQ es que los resultados pueden ser vistos e interpretados con relación a las características histológicas de los tejidos.

También nos permite el diagnóstico retrospectivo de casos en que no haya muestras de tejido mas fresco disponible. Además que nos permite la visualización de la distribución del agente, simultáneamente con las lesiones histológicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el anticuerpo monoclonal se puede afirmar la presencia del CpHV-1 en los animales cuyas muestras se emplearon en este estudio. Ello se relaciona con las lesiones sugerentes observadas en los cortes histológicos de hígado, como degeneración vacuolar, hepatitis necrótica y en algunos casos presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilicos.<sup>3,</sup>

14, 15, 18, 22

De acuerdo a los resultados obtenidos en el cultivo celular de la muestra de prepucio y posteriormente enfrentado al anticuerpo monoclonal sugiere que es el mismo encontrado en los cortes histológicos evaluados por IHQ, confirmando la presencia del Herpesvirus en el rebaño

## **Conclusión**

Se logró implementar la técnica de inmunohistoquímica para el anticuerpo monoclonal y policlonal para el diagnóstico de CpHV-1. La técnica de IHQ empleada con el anticuerpo policlonal elaborado en la UNAM puede ser útil como una prueba de rutina; ya que demostró tener una alta correlación con los anticuerpos monoclonales y tiene la ventaja de ser más económica que al usar los monoclonales

Se confirma la presencia de CpHV-1 en los tejidos con lesiones compatibles obtenidos de cabras en Tequisquiapan, México.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. [http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo\\_tie rras/manuales/Manejo\\_cria\\_rep.pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tie rras/manuales/Manejo_cria_rep.pdf)
2. Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile
3. CANDANOSA AE, SIERRA GM, SÁNCHEZ A, SALAS G, MÉNDEZ A, COBOS L, ALVAREZ L. Vulvovaginitis y balanopostitis pustular asociada con infección de herpes virus caprino – 1 en cabras (Querétaro, México). XVIII Congreso Nacional de Patología Veterinaria. 2-4 septiembre del 2009. Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (Jalisco). Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, AC, FMVZ, Universidad Nacional Autónoma de México, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, U de G. 2009
4. RUIZ R. Diagnóstico de parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) en perros domésticos por inmunohistoquímica (tesis de licenciatura). México (D.F.) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2005
5. BUYS J, LARA C, ORTIZ C. Interpretación básica de inmunohistoquímica, características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. Patología, Revista latinoamericana 2007; 45: 126-140
6. HAINES D, CHELACK B. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. J Vet Diagn Invest 1991; 3: 101-112

7. PROPHET EB, MILL B, ARRINGTON JB, SOBIN LH. Métodos histotecnológicos del instituto de patología de las fuerzas armadas (AFIP), 2° ed. México; 1995
8. PIÑOL, R. J., QUEROL M. E., SERRA H. X., Expresión de la Glicoproteína E del BoHV-1 en Escherichia coli. Determinación de una Secuencia Citotóxica (Tesis Doctorado en ciencias).Bellaterra (Barcelona) España: Universidad Autónoma de Barcelona. 2004.
9. GREWAL AS, WELLS R. Vulvovaginitis of goats due to a herpesvirus. Aust Vet J. 1986; 63:79–82.
10. FENNER F. Virología veterinaria. España: Acribia, 1992
11. THIRY J., KEUSER V., MUYLKENS B., MEURENS F., GOGEV S., THIRY E, ET AL. Ruminant alpha herpesviruses related to bovine herpesvirus 1. Veterinary Research. 2006; 37:169-190
12. SAITO J, GRIBBLE D, BERRIOS P, KNIGHT H, MCKERCHER D. A new herpesvirus isolate from goats, preliminary report. Am J Vet Res 1974; 35: 847- 848
13. HORNER, G. W. Caprine herpesvirus eradication from infected flocks. Surveillance, N.Z., 1988, 15:18
14. TARINGAN, S., WEBB, R.F. KIRKLAND D. Caprine herpesvirus from balanoposthitis, Aust. Vet. J., 1978, 64: 321,
15. THIRY, J. et al. Serological evidence of caprine herpesvirus 1 infection in Mediterranean France. Vet. Microbiol., 2008 128(3/4): 261-268.

16. ROIZMAN B., PELLET P. The family herpesviridae: A brief introduction. 4th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.
17. MINSON, A. C., DAVISON, A., EBERLE, R., DESROSIERS, R. C., FLECKENSTEIN, B., MCGEOCH, D. J., ET AL. Family Herpesviridae, In Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1a ed. San Diego. Academic Press, 2000.
18. RUIZ J. JAIME J. VERA V., Latencia del herpesvirus bovino-1: el papel de los transcritos relacionados con latencia. Acta biol, Colomb, 2008, 13:3-22
19. WITTELS, M. & SPEAR, P. G. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. Virus Research. 1990; 18: 271-29.
20. HUEMER, H. P., LARCHER, C., DIERICH, M. P. , FALKE, D. Factors influencing the interaction of herpes simplex virus glycoprotein C with the third component of complement. Arch Virol 1992; 127: 291
21. SMITH K. Herpesviral abortion in domestic animals. Vet J 1997; 153: 253-268
22. ENGELS M., ACKERMANN M., Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. Veterinary Microbiology. 1996; 53: 3-15.
23. METTLER F., ENGELS M., WILD P., BIVETTI A. Herpesvirus infection in kids in Switzerland, Schweiz. Arch. Tierheilkd. 1979; 121: 655– 662.

24. TARIGAN S, WEBB RF, KIRKLAND D, Caprine herpesvirus from balanoposthitis. *Aust Vet J.* 1987; 64:321.
25. A. PRATELLI, M. CORRENTE, C. BUONAVOGLIA M. TEMPESTA\*. A preliminary study on the pathogenicity of a strain of caprine herpesvirus-1. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 1999; 22: 137-143.
26. HORNER GW, HUNTER R, DAY AM. An outbreak of vulvovaginitis in goats caused by a caprine herpesvirus. *N Z Vet J.* 1982; 30:150–152.
27. BERRIOS PE, MCKERCHER DG, KNIGHT HD. Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *Am J Vet Res.* 1975; 36:1763–1769.
28. SMITH M. SHERMAN D., *Goat medicine*, 2° edition, USA edit Wiley-Blackwel, 2009
29. EUMEDIA Redacción. El Herpesvirus Caprino es altamente prevalente. *El Mundo Veterinario.* 2008; 214: 12-15.
30. MILLER, J.M., VAN DER MAATEN, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45:790–794.
31. LEMAIRE, M., SCHYNTS, F., MEYER, G., THIRY, E., 1999. Antibody response to glycoprotein E after bovine herpesvirus type 1 infection in passively immunised, glycoprotein E-negative calves. *Vet. Rec.* 144, 172–176
32. ELIA GABRIELLA, TARSITANO ELVIRA, CAMERO MICHELE, BELLACICCO ANNA LUCIA, BUONAVOGLIA DOMENICO, CAMPOLO MARCO, et al. Development of a real-time PCR for the detection and



- quantitation of caprine herpesvirus 1 in goats. *Journal of Virological Methods*. 2008;148:155–160.
33. TEMPESTA M, PRATELLI A, GRAZIA G, VITO M, BOUNAVOGLIA C. Detection of caprine Herpesvirus 1 in sacral ganglia of latently infected goats by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1999; 37: 1598-1599
34. Norma oficial mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres
35. HAINES DB, CHELACK BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J vet Diagn Invest* 1991; 3: 101-112
36. Manuel kit de Inmunohistoquímica aparece en:  
<http://www.biosb.com/wp-content/uploads/PI-0009-Rev.-B-MR-ImmunoDetector-HRP-DAB-Kit1.pdf>
37. HERNANDEZ JC. et al. Expresión de endotelina-1 y receptores para endotelina ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en arteria pulmonar en un modelo de daño pulmonar agudo. *Neumot Cir Torax*, 2010; 69: 97-102
38. MORÓN C. MUÑOZ M. YASUDA M. KE,PER R. ROMAN R., Determinacion mediante inmunohistoquímica de infección por virus de la fiebre amarilla y virus de la hepatitis B. *Rev Peru Med Exp. Salud publica*. 2003;20: 28-30

39. WALKER DH, HUL-MIN FENG, LADNER S. Immunohistochemical diagnosis of typhus rickettsioses, using an anti-lipopolysaccharide monoclonal antibody. *Mod pathol.* 1997; 10: 1038-1042.
40. WALKER DH, HUDNALL SD, SZNLAWAKI WK, FENG H-M. Monoclonal antibody-based immunohistochemical diagnosis of rickettsial pox: the macrophage is the principal target. *Mod pathol* 1999; 12: 529-534.
41. GONZALEZ L. Aislamiento, identificación molecular y serológica del Herpesvirus Caprino tipo 1 en un hato ubicado en Tequisquiapan, Queretaro, Mexico. (tesis de licenciatura) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2012.

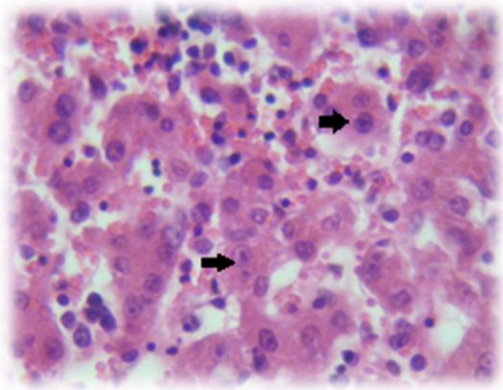


Figura 1. Corte histológico de hígado con presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos sugerentes a CpHV-1 (flechas)

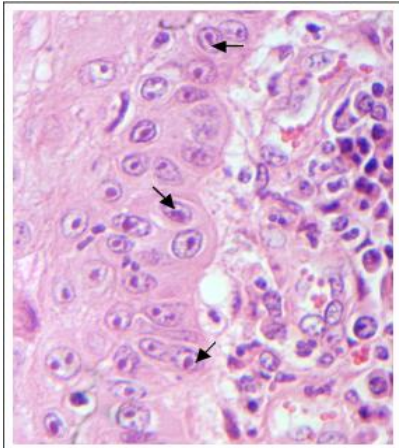


Figura 2. Corte histológico de prepucio, con presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos sugerentes a CpHV-1 (flechas)

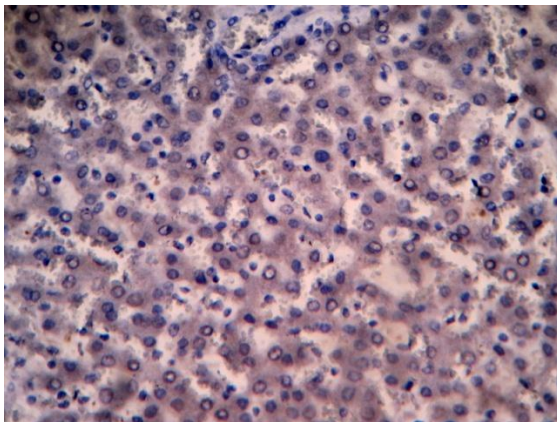


Figura 3. Corte histológico de hígado, con lesión de CpHV-1 que muestra inmunopositividad ligera en los hepatocitos (color ocre sobre el citoplasma de la célula) Técnica de inmunohistoquímica (ABP)

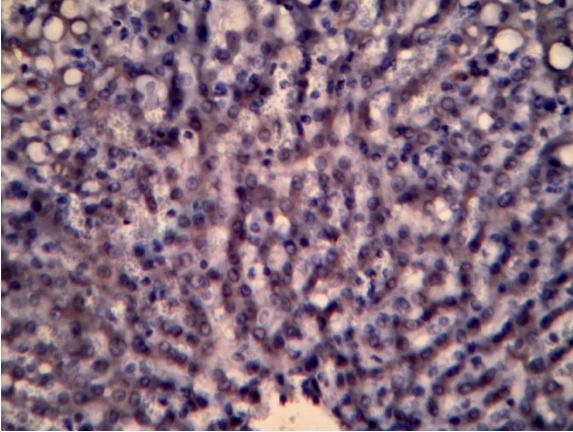


Figura 4. Corte de hígado con lesión de CpHV-1 que muestra una inmunopositividad moderada en los hepatocitos. (Color ocre sobre el citoplasma de la célula) Técnica de inmunohistoquímica (ABP)

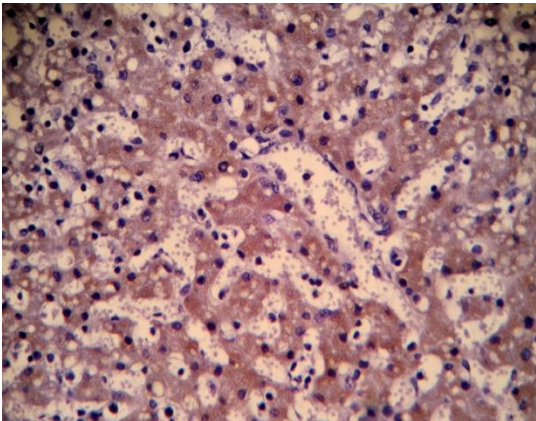


Figura 5. Corte histológico de hígado, con lesión de CpHV-1 que muestra una inmunopositividad intensa en los hepatocitos. (color ocre sobre el citoplasma de la célula) Técnica de inmunohistoquímica (ABP)

## Casos para herpes caprino

| Cabras de 0 a 15 días | Edad DIAS | Sexo   | Cuerpos de inclusión | CAUSAS DE MUERTE                                       |
|-----------------------|-----------|--------|----------------------|--|
| SDC10/037             | 0         | Macho  | No                   | Colibacilosis  |
| SDC10/042             | 0         | Macho  | No                   | broncoaspiración, problema congénito                   |
| SDC10/043             | 2         | Macho  | No                   | Bronconeumonía   |
| SDC10/070             | 4         | Hembra | Si                   | insuficiencia cardiopulmonar, herpes                   |
| SDC10/076             | 0         | Hembra | Si                   | sufrimiento fetal, herpes                              |
| SDC10/104             | 7         | Hembra | No                   | indigestión simple                                     |
| SDC10/271             | 3         | Hembra | Si                   | inmadurez fetal, herpes                                |
| SDC10/273             | 4         | Hembra | Si                   | broncoaspiración, herpes                               |
| SDC10/368             | 0         | Macho  | Si                   | broncoaspiración y herpes                              |
| SDC10/380             | 0         | H Y M  | No                   | no se identificó la causa                              |
| SDC10/382             | 0         | Hembra | No                   | Traumatismo  |
| SDC10/456             | 15        | Hembra | No                   | Colibacilosis  |
| SDC10/457             | 9         | Macho  | No                   | Colibacilosis  |
| SDC10/458             | 15        | Hembra | No                   | Colibacilosis  |
| SDC10/461             | 7         | Hembra | No                   | anomalía congénita                                     |
| SDC10/471             | 15        | Hembra | No                   | Colibacilosis  |
| SDC11/024             | 0         | Macho  | No                   | Herpes   |
| SDC11/033             | 0         | Macho  | No                   | Broncoaspiración                                       |
| SDC11/059             | 4         | Macho  | No                   | Colibacilosis  |
| SDC11/066             | 0         | Hembra | No                   | Traumatismo  |
| SDC11/079             | 0         | Macho  | No                   | aborto por estrés, causado por problemas nutricionales |
| SDC11/082             | 0         | Hembra | No                   | aborto por estrés, causado por problemas nutricionales |
| SDC11/083             | 2         | Macho  | No                   | conducto arterioso persistente                         |
| SDC11/084             | 1         | H Y M  |                      | Colibacilosis  |
| SDC11/093             | 1         | H Y M  | No                   | Broncoaspiración                                       |
| SDC11/111             | 0         | Hembra | No                   | insuficiencia cardíaca                                 |
| SDC11/112             | 0         | Hembra | No                   | conducto arterioso persistente                         |
| SDC11/113             | 0         | Macho  | No                   | conducto arterioso persistente                         |
| SDC11/142             | 8         | Macho  | No                   | broncoaspiración y enteritis                           |
| SDC11/149             | 5         | Hembra | No                   | bronconeumonía y enteritis                             |
| SDC11/157             | 6         | Macho  | No                   | insuficiencia cardiopulmonar                           |
| SDC11/159             | 0         | Macho  | No                   | ruptura hepática por traumatismo                       |
| SDC11/160             | 3         | Hembra | No                   | Colibacilosis  |
| SDC11/240             | 15        | Hembra | No                   | Colibacilosis  |
| sdC11/422             | 0         | Hembra | Si                   | inmadurez fetal  |
| SDC11/441             | 0         | Macho  | No                   | sufrimiento fetal causado por parto distócico          |
| SDC11/447             | 0         | Macho  | No                   | ruptura hepática por traumatismo                       |
| SDC11/451             | 2         | Macho  | No                   | Colibacilosis  |
| SCD11/500             | 12        | Macho  | No                   | eutanasia, artritis                                    |

Cuadro 1. Edad, género y causa de muerte de los 38 casos de cabritos menores a 15 días, enfrentados a la prueba de inmunohistoquímica USEDICO, CEIEPAA

| ADULTOS   | AÑOS | SEXO   | Cuerpos de inclusión | causa de muerte                          |
|-----------|------|--------|----------------------|--|
| SDC10/112 |      | Macho  | Si                   | Timpanismo alimenticio, herpes           |
| SDC10/460 | 3    | Hembra | No                   | parasitosis crónica y deshidratación     |
| SDC10/473 | 1.5  | Hembra | No                   | metritis séptica por e. coli             |
| SDC10/480 | 4    | Hembra | No                   | parasitosis crónica y deshidratación     |
| SDC11/067 | 5    | Macho  | Si                   | choque endotóxico por ruptura intestinal |
| SDC/009   | SD   | Macho  | No                   | sin dato                                 |

Cuadro 2. Edad, género y causa de muerte de los 6 casos de cabras adultas, enfrentados a la prueba de inmunohistoquímica. USEDICO, CEIEPAA

| ADULTOS          | EDAD EN AÑOS | GENERO | POLICLONAL | MONOCLONAL |
|------------------|--------------|--------|------------|------------|
| <b>SDC10/112</b> |              | Macho  | -          | -          |
| <b>SDC10/460</b> | 3            | Hembra | +          | +          |
| <b>SDC10/473</b> | 1.5          | Hembra | -          | -          |
| <b>SDC10/480</b> | 4            | Hembra | +          | +          |
| <b>SDC11/067</b> | 5            | Macho  | -          | +          |
| <b>SDC12/009</b> | SD           | Macho  | +          | +          |

Cuadro 3.- Resultados obtenidos con IHQ al desafiarlos con anticuerpo primario policlonal y anticuerpo monoclonal (cabras adultas)

| <b>Casos para herpes caprino</b> |                  |             |                   |                   |
|----------------------------------|------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| <b>Cabras de 0 a 15 días</b>     | <b>Edad DIAS</b> | <b>Sexo</b> | <b>POLICLONAL</b> | <b>MONOCLONAL</b> |
| SDC10/037                        | 0                | Macho       | +                 | +                 |
| SDC10/042                        | 0                | Macho       | +                 | +                 |
| SDC10/043                        | 2                | Macho       | ++                | ++                |
| SDC10/070                        | 4                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC10/076                        | 0                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC10/104                        | 7                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC10/271                        | 3                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC10/273                        | 4                | Hembra      | +                 | -                 |
| SDC10/368                        | 0                | Macho       | +                 | +                 |
| SDC10/380                        | 0                | H Y M       | -                 | -                 |
| SDC10/382                        | 0                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC10/456                        | 15               | Hembra      | -                 | -                 |
| SDC10/457                        | 9                | Macho       | -                 | -                 |
| SDC10/458                        | 15               | Hembra      | -                 | -                 |
| SDC10/461                        | 7                | Hembra      | +                 | +++               |
| SDC10/471                        | 15               | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC11/024                        | 0                | Macho       | -                 | -                 |
| SDC11/033                        | 0                | Macho       | -                 | -                 |
| SDC11/059                        | 4                | Macho       | +                 | +                 |
| SDC11/066                        | 0                | Hembra      | -                 | -                 |
| SDC11/079                        | 0                | Macho       | +                 | ++                |
| SDC11/082                        | 0                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC11/083                        | 2                | Macho       | +                 | +                 |
| SDC11/084                        | 1                | H Y M       | -                 | -                 |
| SDC11/093                        | 1                | H Y M       | +                 | +                 |
| SDC11/111                        | 0                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC11/112                        | 0                | Hembra      | -                 | -                 |
| SDC11/113                        | 0                | Macho       | -                 | +                 |
| SDC11/142                        | 8                | Macho       | -                 | -                 |
| SDC11/149                        | 5                | Hembra      | -                 | -                 |
| SDC11/157                        | 6                | Macho       | ++                | +                 |
| SDC11/159                        | 0                | Macho       | +                 | -                 |
| SDC11/160                        | 3                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC11/240                        | 15               | Hembra      | +                 | -                 |
| sdc11/422                        | 0                | Hembra      | +                 | +                 |
| SDC11/441                        | 0                | Macho       | +                 | +                 |
| SDC11/447                        | 0                | Macho       | -                 | +                 |
| SDC11/451                        | 2                | Macho       | -                 | -                 |
| SCD11/500                        | 12               | Macho       | +                 | +                 |

Cuadro 4.- Resultados obtenidos de IHQ al desafiarlos con anticuerpos policlonal y monoclonal (cabras menores a 15 días)

## **GUIA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO DE HERPES CAPRINO TIPO 1 (CPHV-1)**

1. Desparafinado de laminillas en el horno a 60° de temperatura por 2 horas
2. Desparafinado de laminillas en Xilol 2 veces por 5 minutos cada vez
3. Deshidratado de laminillas de alcohol a agua (3 minutos por cada dilución)
4. Olla de recuperación antigénica a 120° por 10 minutos, en una solución de citrato (198mL de agua + 2mL de citrato)
5. Realizar un lavado con agua destilada y montar en cámara húmeda
6. Colocar sobre la laminilla 3 gotas del bloqueador de peroxidasa (ImmunoDetector Peroxidase blocker) por 5 minutos, posteriormente lavar con agua destilada.
7. Cubrir el tejido con el anticuerpo primario (1:10 en caso de anticuerpo policlonal, 1:100 en caso de anticuerpo monoclonal), dejándolo incubar por 1 hora en la cámara húmeda, posteriormente lavar con agua destilada.
8. Cubrir el tejido con el marcador de biotina (ImmunoDetector Biotin Link) por 15 minutos, posteriormente lavar con agua destilada.
9. Cubrir el tejido con la peroxidasa (ImmunoDetector HRP Label) por 15 minutos, posteriormente lavar con agua destilada
10. Preparar el cromógeno DAB (ImmunoDetector DAB Chromogen) dos gotas por cada mililitro de buffer (ImmunoDetector DAB Buffer) incubar por 5 minutos y enjuagar con abundante agua
11. Contrateñir con hematoxilina por 2 minutos, y enjuagar con abundante agua
12. Deshidratado de la laminilla
13. Montaje