

FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



FALLA DE ORIGEN

COMPORTAMIENTO INMUNOLOGICO DE LA
CABRA FRENTE AL VIRUS DE ARTRITIS
ENCEFALITIS CAPRINA (AISLAMIENTO VIRAL).

INFORME DE SERVICIO
SOCIAL TITULACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A I
MARIA TERESA ALVARADO HERNANDEZ

ASESOR. MVZ. HUMBERTO A. MARTINEZ RODRIGUEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

:995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo
SERVICIO SOCIAL-TITULACION: Comportamiento inmunológico de la
cabra frente al virus de artritis encefalitis caprina.
(Aislamiento del virus).

que presenta la pasante: Alvarado Hernández María Teresa.
con número de cuenta: 8508562-2 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista.

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

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx., a 4 de Enero de 1995

PRESIDENTE	<u>M. en C. Guillermo Oviedo Fernández.</u>	
VOCAL	<u>Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez.</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Humberto A. Martínez Rodríguez.</u>	
1er. SUPLENTE	<u>MVZ. José A. Licea Vega.</u>	<u>José Antonio Licea</u>
2do. SUPLENTE	<u>MVZ. Miguel Angel Pérez Razo.</u>	

A mi madre **SOLEDAD**, que gracias a su cariño, hoy veo concluidos mis estudios profesionales, le doy gracias también porque con su esfuerzo y trabajo me apoyó en este largo camino, este logro le pertenece también a ella y se lo dedico porque siempre estuvo a mi lado. Que Dios te bendiga siempre madre.

A mis tíos **CARMEN Y LUIS**, Que como mis segundos padres también me apoyaron, les doy las gracias. Que Dios los proteja.

A mis hermanos **ANTONIO, LOURDES, VIRGINIA, J.CARLOS Y LAURA**.

Gracias por ser los mejores amigos del mundo. Que Dios ilumine su camino con felicidad, alegría y salud. Los quiero mucho.

A mi padre **JOSE**, por darme la vida se lo agradezco profundamente.

A **ALEJANDRO**, por ser un buen amigo y compañero, porque juntos hemos compartido importantes momentos que han unido más nuestras vidas en un cariño sincero. Que Dios conserve esta amistad y la haga más grande y este cariño nunca se extinga.

A mi asesor **MVZ. ALEJANDRO H. MARTINEZ**. Le doy las gracias por compartir conmigo sus conocimientos profesionales al igual que su amistad.

A las personas que laboran en el **LAB. DE VIROLOGIA** de Campo 4, así como a las personas que laboran en el **LAB. DE INMUNOLOGIA POSGRADO** de Campo 1. Les doy las gracias por su colaboración en este trabajo.

A mis compañeros y amigos de estudio con quienes compartí esta importante etapa de mi vida les doy las gracias por su amistad.

I N D I C E.

INTRODUCCION.....	1
CUADRO # 1	9
OBJETIVOS.	10
CUADRO METODOLOGICO.	11
CALENDARIO DE ACTIVIDADES.	12
TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE PARA LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN GEL.	13
TOMA DE TEJIDOS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA E HISTOPATOLOGIA.	14
IMPLEMENTACION DE UN CULTIVO CELULAR.	16
SOLUCIONES	16
MEDIOS DE CULTIVO	20
CUADRO # 2	22
ANTIBIOTICOS	23
CULTIVO CELULAR	25
RECONOCIMIENTO DEL CRECIMIENTO DE LOS VIRUS SOBRE CULTIVOS CELULARES	27
REUTILIZACION DE MATERIAL DESECHABLE EN CULTIVOS CELULARES.	30
PREPARACION DE UN CULTIVO PRIMARIO.	34
ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE E.L.I.S.A.	36
SOLUCIONES	39
METODOLOGIA PARA LA PRECIPITACION DE GAMA GLOBULINAS DE CABRAS	41

CUANTIFICACION DE PROTEINAS	43
TITULACION DEL CONJUGADO	45
TITULACION DEL ANTIGENO	49
RESULTADOS.	53
DISCUSION.	55
CONCLUSION.	57
BIBLIOGRAFIA.	58

INTRODUCCION.

La artritis encefalitis caprina (AEC), también conocida como Leucoencefalitis viral es una enfermedad de curso crónico, ocasionada por un virus de la familia retroviridae y subfamilia Lentivirinae. (Alvarez 1984). Clínicamente se caracteriza por incoordinación y parálisis en animales de entre 2 a 4 meses de edad, además de ataxia en cabritos y encefalitis (González y col 1987; Dawson 1987), frecuentemente tienen una neumonía intersticial similar a la observada en las ovejas llamadas Neumonía Progresiva Ovina (DPP) estas lesiones se observan en cabras de diferentes edades, las cuales tienen como signos principales neumonía o encefalitis dependiendo primordialmente de la edad (Dawson 1987). En animales adultos, se caracteriza por una artritis crónica degenerativa, incoordinación y excitación. (González y col 1987; Dawson 1987). Además se a reportado recientemente manifestaciones en glándula mamaria, el daño producido en este órgano es una inflamación difusa con induración, en algunas cabras la inflamación es muy marcada y decrece con el tiempo, pero nunca recupera su tamaño ni su consistencia, bajando considerablemente su producción. (Dawson 1987).

A la necropsia se han encontrado lesiones tales como mineralización de la cápsula articular, tendones y vainas de los tendones carpales, además de formación de higromas en las mismas (Robinson y col 1986; Surman y col 1987). A nivel microscópico

se han encontrado lesiones tales como: hiperplasia de la membrana sinovial, infiltración de células mononucleares en tejido conectivo y nervios, necrosis de la cólgena articular y mineralización difusa subsinovial (Nazara 1991). Las lesiones en el sistema nervioso se restringen primariamente a la materia blanca e incluye infiltración perivascular de células mononucleares y varios grados de desmielinización (Kennedy y col 1985). En las articulaciones se presenta una artritis caracterizada por proliferación de células en la estructura de la membrana sinovial e infiltración de células mononucleares. Las articulaciones del carpo son frecuentemente más afectadas en los animales adultos (Kennedy y col 1985).

El virus se transmite principalmente por leche y calostro de cabras infectadas, infectando así a su cría, el virus se elimina también por otras secreciones y puede provocar infecciones intrauterinas (Alvarez 1984; Padilla y col 1992).

Las manifestaciones clásicas de artritis encefalitis caprina son:

La artritis clínica raramente se manifiesta antes de la madurez sexual, aunque hay excepciones. Las primeras articulaciones en afectarse son las carpales, seguida de las articulaciones de los corvejones; la cojera no siempre es aparente, pero si está presente puede variar su severidad y moverse de una articulación a otra. Los casos son afebriles, no hay anorexia, sin embargo, hay pérdida gradual de condición que se refleja en la calidad de pelo (Dawson 1987).

Aunque las cabras de todas las edades pueden ser afectadas, la encefalitis generalmente afecta a cabritos de 1 a 4 meses de edad, presentándose lesiones en el sistema nervioso central. La manifestación de encefalitis más dramática y frecuentemente encontrada, es la paresia del tren posterior, seguida del desarrollo de lesiones en médula espinal, evidencia de complicaciones cerebrales pueden ser menos aparentes, pero pueden inducir ceguera, tremor, opistótonos y torticolis. Los casos generalmente progresan hasta la postración en un periodo de días a semanas y requiriendo muchas veces eutanasia; sin embargo, existen antecedentes de recuperación en los animales, que raramente ocurre (Dawson 1987).

Se estima que la enfermedad en su forma clínica ocurre en menos de un 25% de los animales en un hato infectado. Sin embargo, pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra el virus de AEC han presentado en algunas poblaciones más de un 80 - 90 % de seropositividad a este virus (Crawford y col 1980).

Estudios realizados en México revelaron que en cabras importadas el 27% presentó anticuerpos a AEC. Sin embargo, hasta 1985 no se había encontrado seropositividad en caprinos criollos con la prueba de inmunodifusión (Avalos y col 1992). Por otra parte, cabras infectadas con el virus de AEC pueden permanecer como portadoras independientemente de su estado clínico (Dawson 1987)., lo que aunado al intercambio entre hatos y la forma de transmisión del virus hacen posible que este se encuentre en caprinos criollos (Alvarez 1984).

Avalos y col. (1991), realizaron un estudio sobre la prevalencia del virus de AEC en el estado de Nuevo León, donde encontraron animales seropositivos en un 7.2% de los hatos estudiados por medio de la prueba de inmunodifusión (Avalos y col. 1992), utilizando un antígeno de virus de la OPP; ya que este presenta antigenicidad cruzada con AEC (Cultip y col. 1977).

La prueba de inmunodifusión ha demostrado ser un método simple y confiable para detectar anticuerpos en cabras y borregos infectados con los virus anteriormente referidos (AEC, OPP). Aunque estos dos virus son de entidades distintas, son clasificados dentro de la familia retroviridae y de subfamilia lentiviridae, ambos tienen sitios antigénicos en común sobre sus estructuras protéicas y glicoprotéicas asociados con cada virus (Cultip y col. 1977).

El reconocimiento serológico es muy importante en rebaños de cabras lecheras donde se ha detectado alta prevalencia del virus. La identificación efectiva de la infección de artritis encefalitis caprina para el diagnóstico y control o acreditación usan pruebas serológicas, incluida la de E.L.I.S.A. (Ensayo inmunoabsorbente ligada a enzimas), en Australia y Estados Unidos (Kirrland y col. 1987).

Para la técnica de ELISA, al igual que en otras pruebas serológicas se emplean grandes cantidades del antígeno viral. Incrementa la producción y utilización del antígeno viral de AEC a partir del cultivo celular (Kirrland y col. 1987).

La utilización de los cultivos celulares disminuye la molestia y los gastos propios del uso de animales o huevos embrionados como medio de conservación de diversos virus. El virus de AEC, se ha aislado en células de membrana sinovial de cabra (Ellis y col 1987; Surman y col 1987; Pyper y col 1988; Ellis y col 1988; Knowles y col 1991;), de cornea fetal de cabra (Heckert y col 1992), de cornea de cabrito recién nacido (Surman y col 1987; Nazara 1991), en células de pulmón (Ellis y col 1987; Heckert y col 1992; Ellis y col 1988), y en co-cultivo con células de membrana sinovial (Ellis y col 1987; Robinson 1986 González y col 1987).

El cultivo celular es fundamental, puesto que los virus solo se multiplican en el interior de la célula viva, que se obtiene a partir de órganos y tejidos frescos, este sistema es el más funcional y la mayoría de los virus de importancia médica pueden ser aislados en cultivos celulares (Mohanty y col 1988).

La introducción de estos sistemas significó un gran adelanto en la virología, gracias a estos se ha logrado aislar virus por mucho tiempo desconocidos, se ha facilitado el estudio de aquellos que no se conocían, se han podido preparar muchas de las vacunas que actualmente se utilizan y se ha estudiado la interacción que se establece entre los virus y las células huésped (Mohanty y col 1988).

CARACTERISTICAS DEL
VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA
EN CULTIVOS CELULARES.

El virus AEC muestra características de los retrovirus como son densidad de gradiente de sucrosa de 1.15 g/ml, contiene un RNA de 60 a 70 S y una transcriptasa reversa (RNA dirigida - DNA polimerasa) (Clements y col 1980; Cheevers y col 1981).

El virus de AEC es un retrovirus no oncogénico. La envoltura de este virus esta constituida por una glicoproteína de peso molecular 140 000 daltons o gp 140, y es responsable de la antigenicidad que provoca la reacción de neutralización viral. La otra proteína en la envoltura del virus es una proteína p28, de alta antigenicidad siendo esta la parte que se comparte antigenicamente con el virus de Maedi Visna (Narayan y col 1990).

Un aspecto importante a considerar en las infecciones por este retrovirus es la variación antigénica que va ocurriendo conforme progresa la enfermedad, es decir, que el virus va cambiando su composición antigenica, con lo cual es capaz de mantener una infección persistente mediante la evasión de la respuesta inmune (Dixon y col 1983; Eliss y col 1983). Causa una infección persistente aunque en el hospedador es una infección subclínica. La persistencia del virus es debido en parte a la infección de los monocitos y macrófagos del sistema inmunológico, o en parte por el fracaso de los animales para desarrollar anticuerpos neutralizantes del virus (Kennedy y col 1985).

A pesar de la falta de anticuerpos neutralizantes, los animales producen anticuerpos que reconocen antígeno interno y la glicoproteína de la envoltura. En los animales que se detectan anticuerpos se asume que tienen una infección activa (Kennedy y col 1985).

Recientes estudios muestran alta prevalencia de anticuerpos en cabras en Estados Unidos, que indican un alto índice de infección viral (Kennedy y col 1985).

Este virus es susceptible a inactivación por medios químicos tales como formalina e hipoclorito, por la fragilidad de sus lipoproteínas en la envoltura, por lo tanto estas sustancias se emplean como desinfectantes (Narayan y col 1990).

El cultivo del virus en membrana sinovial caprina, tiene un ciclo de crecimiento de 15 a 20 hrs en las que el virus se extiende en las células (Narayan y col 1990). La mayor parte de los virus maduros son producidos por gemación en la membrana celular, no obstante gran número de partículas son producidas por el retículo endoplásmico en forma de vesículas intracitoplasmáticas (Narayan y col 1990).

Los efectos citopáticos en el cultivo celular por efecto del virus de AEC, es la formación de sincitios, el número de núcleos varía de 3 a 20, por sincitio. Los sincitios se forman de los 14 a 60 días después de el establecimiento del cultivo. De los órganos empleados para el cultivo los que mayor número de sincitios presentan son los derivados de tejido pulmonar, seguidos de membrana sinovial y nódos linfoides. En estos

cultivos también se encuentran partículas virales maduras, intracitoplasmáticas y extracelulares, las cuales pueden identificarse morfológicamente en el microscopio electrónico como lentivirus y fueron detectados en el cultivo por inmunofluorescencia. (Gonzalez y col 1987; Narayan y col 1990).

Los sincitios también son indentificados por tinción de el cultivo celular con hematoxilina y eosina, usando el microscopio de luz (Grewal y col 1986).

El virus de AEC también a sido aislado en cultivos de pulmón, nódos linfáticos, medula espinal y plexo coroideo, considerándose positivo a el aislamiento del virus, cuando el efecto citopático es detectado al microscopio, es la formación de sincitios, en un tiempo no mayor a 70 días. (Gonzalez y col 1987).

Otro procedimiento también empleado en el aislamiento del virus de AEC es la utilización de cultivos y co-cultivos de Leucocitos de Sangre Periferica (PBL), en el cual la sangre tiene que ser heparinizada y lavada con solución balanceada de Hank's baja en sales de calcio y magnesio. El virus puede ser aislado de cabritos, a los 3 meses de edad usando PBL. (Pawlish 1984; y Kennedy y col 1985). Usando calostro, leucocitos. (Ellis y col 1984). Líquidos sinovial, leche. (Robinson 1986; Surman y col 1987).

También se ha cultivado en células de ovario de Himalayan Tahr, también conocida como JH10V y CRL 6274 (East y col 1993), y en otros tipos de células (Ver cuadro # 1).

CUADRO # 1

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO CELULAR DEL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA

TEJIDO	MEDIO	TIEMPO	TEMPERATURA	CONCENTRACION DE S.F.B.	OBSERVACIONES.	REFERENCIA.
MS LECHE LECICO	ENGLE'S		37 C	5 - 10 %		CRAMFORD 1988.
	DULBECCO'S			15 %		
CORNEA OVS	EAGLE'S	14 - 21 DIAS		5 %		DAHLBERG, J.E. V COL 1981
CORNEA	HANM'S			10 %	A.A L-GLUTAMINA 100 MG/ML STIRP 100 U/ML PENI	ROBERTA HECKERT 1992.
MS LS LECHE LECICO CON OVS	DULBECCO'S		37 C	15 %	TX CON TRIPSIMA	CRAMFORD Y COL 1998 ADAMS Y COL. 1988
LEPCO N.S.	DULBECCO'S					ELLIS - TN 1990
N.S. CEL. ARTI. CEL. SINOV. CONOIDE Y VITROV. COB	EAGLE			10 %	100 U/ML PENI 100 MG/ML STIRP	BLONDI. C.G. V COL 1989.
N.S. ARTI. UALINA TENDON CO CUL N.S.		15 - 20 DIAS IN-FECCION 7-10 D EFECTO CLITOP.				UET. JOUR 63.1986
N.S. CAP						MARAYAN O CLEMENTS
FUL CAP CON OVS FETO	HANM'S			10 %	200 U/ML L-GLUTAMINA 100 U/ML PENI 100 MG/ML STIRP	HECKERT, MOMB V COL. 1992.
N.S. UALIS NEUTRALIZACION.	DULBECCO'S			5 %		SIMILITIOS EFECTO KLAJER V COL. 1982 DE INFECCION.
N.S.	N-199			20 %	1er PASE A LAS 3 SEMANAS	N.A. ACHOUR, MAGHER. 1989.
N.S. CAP MACROF CAP						CLEMENTS V COL. 1989 CHRISTIAN V COL. 1989 PETURSSON V COL 1986
N.S. CO-CEL DE N.S.FETO.						MARAYAN V COL. 1988 ELLIS V COL 1983
COB OVS	EAGLES	14-21 DIAS		4 %	ADICIONAR ANTIBIOTICO	DAHLBERG. 1981
N.S.						OLIVER V COL. 1982.
N.S.						REMOUD V COL. 1990.
N.S.	n- 139			10 %	ADICIONAR ANTIBIOTICO	CHARLEY P. FOUCAUD C 1987.

N.S. MEMBRANA SIMOVIAL. FDI. PENICILINA CAP. CAPRINA. ARTI. ARTICULAR
 CO. OVI. CONOIDE OVIINA. STIRP. ESTERONCIMA. P.S. TIEMPO SIMOVIAL. SINOV. SIMOVIAL
 TX. INTRAVITRO. S.F.B. SUELO TESTAL BOVINO. CEL. CLASIA. CEL. CLASIA. LECICO. SIMOVIAL
 CO. CUL. CO-CELIVO. CO. CONOIDE. N. NASAL. S.P. SANGRE PERIFERICA

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL: Establecer las bases para un método de diagnóstico sencillo, sensible y eficiente para la identificación de la artritis encefalitis caprina.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Preparación de soluciones, reactivos, medios e ingredientes indispensables para realizar un cultivo celular.

- Preparación de material por medio de las técnicas y procedimientos necesarios que permitan utilizarlos como un soporte de células cultivadas in vitro.

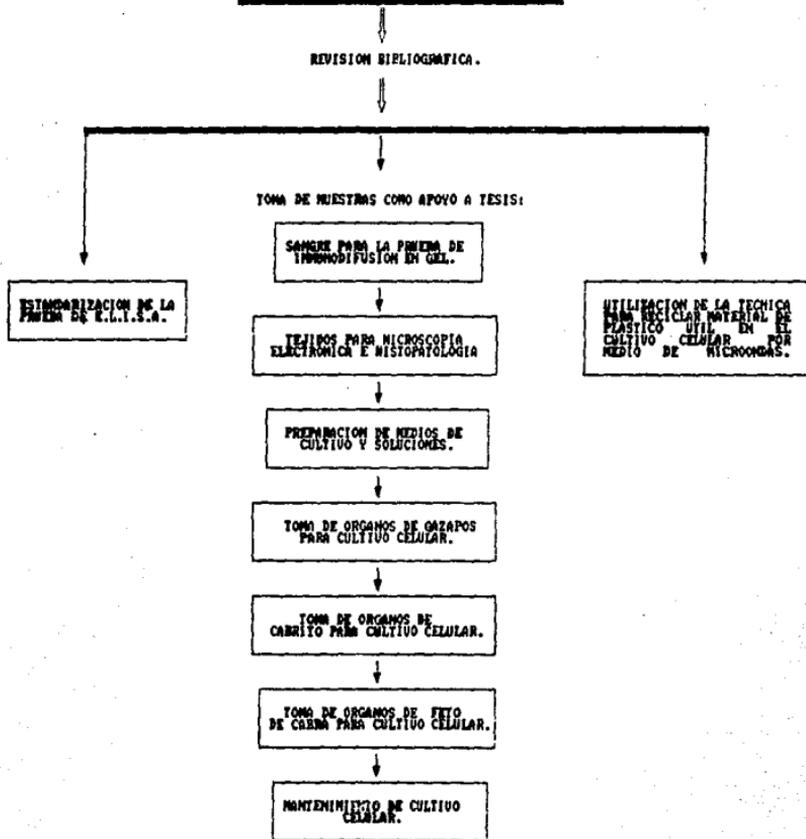
- Realizar cultivos primarios a partir de membrana sinovial y cornea de fetos caprinos y cabras adultas, así como de conejos y gázapos.

OBJETIVOS ACADEMICO: El aplicar las bases teóricas aprendidas en las asignaturas tales como: Clínica ovina y caprina, Virología y Zootecnia caprina.

OBJETIVO SOCIAL: Beneficiar a criadores y productores de cabras, poder contar con diferentes métodos de diagnóstico de esta enfermedad para prevenir la introducción de esta al país por animales importados y así controlar su diseminación en el país.

CUADRO METODOLOGICO.

COMPORTAMIENTO INMUNOLOGICO DE LA CABRA FRENTE AL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA. ACTIVIDADES REALIZADAS



CALENDARIO DE ACTIVIDADES.

1 9 9 3.

ACTIVIDADES .	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE PARA INMUNODIFUSION EN GEL.	X							
ALIMENTACION, MANEJO Y ORDENO DE LAS CABRAS.	X							
TOMA DE MUESTRAS DE LAS CABRAS PARA PRUEBAS DE SANGRE, LIQUIDO SINOVIAL	X							
TINCION DE LIQUIDO SINOVIAL (GIRSA).	X							
TOMA DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA E HISTOPATOLOGIA.		X						
ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE Z.L.T.S.A.		X						
PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.				X	X	X	X	X
UTILIZACION DE LA TECNICA PARA RECICLAR MATERIAL.				X			X	X
TOMA DE ORGAMOS PARA CULTIVO CELULAR DE CONEJO.				X	X			
TOMA DE ORGAMOS PARA CULTIVO CELULAR A PARTIR DE CORDERO.						X	X	
MANTENIMIENTO CULTIVO CELULAR.				X	X	X	X	X
REVISION BIBLIOGRAFICA.		X	X	X	X	X	X	X
ASISTENCIA A CURSO DE APROXIMAZJE EN EL AREA.					X			

**TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE
PARA LA PRUEBA DE
INMUNODIFUSION EN GEL.**

Se apoyó en la toma de muestras de sangre en un rancho de APAZCO, En el Centro de capacitación agropecuaria y forestal CECAF, Ubicado Km 39.5. Carretera Los Reyes-Tlahuelilpan. Apazco Edo. de México. Para la catedra de ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS CAPRINOS, ASPECTOS INMUNOLOGICOS Y DE DIAGNOSTICO.

Las muestras fueron tomadas de la vena yugular, utilizándose equipo vacutainer y agujas de calibre 21, previa asepsia con torundas de algodón y alcohol, la sangre se recolecto en tubos vacutainer. Marca Becton Dicknson, SST Gel and Clot Activator y se identificaron.

Se muestrearón 25 cabras y se trabajaron los tubos para obtener el suero.

Se mantuvieron los tubos inclinados por lapso de 3 hrs aproximadamente, desprendiendose el coágulo con un palillo de punta plana, para posteriormente centrifugar a 2500 rpm de 7 - 10 minutos, se separó el suero en otro tubo, previamente identificado. Se almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

TOMA DE TEJIDO PARA
HISTOPATOLOGIA Y
MICROSCOPIA ELECTRONICA.

En esta actividad se apoyó a mantener dos caprinos en aislamiento, proporcionando alimento (concentrado, silo y alfalfa) y agua a libre acceso. Se ordeño diariamente a la cabra durante el periodo que estuvo en el corral.

A estos dos animales se les tomó muestra de sangre y líquido sinovial. Realizándose las siguientes pruebas: en sangre biometria hemática, química sanguínea y prueba de tarjeta para brucella.

Se sacrificaron los animales con pistola de embolo oculto, después de lo cual se realizó la necropsia. Tomándose muestras de órganos tales como: membrana sinovial, glándula mamaria, pulmón, cerebro, nodos linfáticos preescapulares y precrurales, al igual que de riñón; estas muestras se procesaron inmediatamente para el estudio de histopatología y microscopía electrónica.

Para histopatología se tomaron muestras de 1 cm cúbico, se depositaron en formalina bufferada al 10 % durante 48 horas para su fijación.

Por otro lado las muestras para microscopía electrónica se lavaron con una solución buffer de cocodilato 0.1 M de Na, después se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en buffer cocodilato 0.1 M durante una hora. Al término de este tiempo se lavaron 3 veces con el buffer antes mencionado, después de lo

cual fueron post-fijadas con tetraóxido de osmio al 1% en cacodilato durante una hora, al termino del cual se lavarón con buffer.

IMPLEMENTACION DE UN CULTIVO CELULAR.

Este trabajo muestra las actividades desarrolladas en el servicio social. Para implementar un cultivo celular primario de cornea y riñon de gazapo y conejo, de articulación y cornea de feto de cabra y cabras adultas. En el laboratorio de Virología de campo No 4 en colaboración con el laboratorio de Inmunología de campo No 1 de la FES-CUAUTITLAN.

S O L U C I O N E S .

La importancia del uso de las soluciones en la preparación de cultivos celulares, es indispensable para tener un medio con el cual lavar las células y tejidos, estas soluciones tienen las características necesarias para conservar temporalmente las células antes de sembrarlas en el medio de cultivo.

SOLUCION BUFFER SALINA FOSFATADA.

La solución buffer salina fosfatada es muy importante para el lavado de las células, conservando la presión osmótica y el pH de las células. Para preparar un litro de esta solución se requiere lo siguiente:

SOLUCION A.

Na Cl	8.0	gramos.
KCl	0.2	gramos.
Ca Cl 2 H2O	0.132	gramos.
Mg Cl 2 . 6 H2O	0.1	gramos.
Agua desmineralizada	800	ml.

SOLUCION B.

Na ₂ HPO ₄	1.15 gramos.
KH ₂ PO ₄	0.2 gramos.
Agua desmineralizada	200 ml.

PROCEDIMIENTO.

1.- Se disolvió cada sal por separado en agua desmineralizada de acuerdo al orden de la lista.

2.- Se esterilizaron en autoclave las soluciones por separado, a 15 libras de presión por 14 minutos.

3.- La solución A en B se mezclaron perfectamente por agitación. Posteriormente se verificó que el pH final fuera 7.0.

4.- Se distribuyó en volúmenes de 500 a 1000 ml, en botellas estériles.

5.- Se cultivó de 1 a 5 ml en caldo triglicolato, para pruebas de esterilidad.

6.- se almacenó en refrigeración a 4°C. Hasta su uso.

SOLUCION SALINA DE HANK'S.

Es una solución balanceada de sales que contienen rojo de fenol como indicador de pH además de sales, glucosa y un sistema buffer a base de bicarbonatos, el metabolismo de las células en el cultivo producirá alteraciones en la concentración de hidrogeniones detectables por el rojo de fenol. El rojo de fenol tiene un color púrpura a pH 8.2 o mayor, tomando un tono rojo a pH 7.2, anaranjado a pH 6.8 y amarillo a pH de 6.6 o menor. La solución de Hank's por tener una concentración de 0.035 % de bicarbonato de sodio se emplea como medio de crecimiento

momentaneo al inocular las células. Para preparar un litro, de esta solución se requiere:

SOLUCION A.

Na Cl	80.0	gramos.
KCL	4	gramos.
Ca Cl2	1.4	gramos.
Mg SO 4 . 7H2O	2.0	gramos.
Agua desionizada.	Aprox.	450 ml.

SOLUCION B.

Na HPO4	0.6	gramos.
KH2 PO4	0.6	gramos.
Glucosa	10	gramos.
Agua desionizada.	Aprox.	450 ml.

SOLUCION C.

Rojo de fenol 1 %	16	ml.
-------------------	----	-----

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Se disolvieron los constituyentes en el orden enlistado.
- 2.- Se adicionó la solución B en la solución A.
- 3.- Se adicionó el rojo de fenol en la mezcla de A y B.
- 4.- Se aforó a 1 000 ml con agua desionizada.
- 5.- Se esterilizó por filtración y presión positiva.
- 6.- Almacenando en refrigeración 4º C.

TRIPSINA.

Es una enzima con la cual se dispersan las células para cultivo, por medio de la digestión del colágeno que mantiene unidas a las células.

Para preparar un litro de tripsina al 0.25 % se requiere:

Tripsina (1:250).	2.5 gramos.
Penicilina	1 ml.
Estreptomicina	1 ml.
Solucion salina de Hank's	1000 ml.

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Se adicionó la tripsina y los antibióticos a la solución salina de Hank's.
- 2.- Se esterilizó por filtración presión positiva.
- 3.- Se distribuyó asépticamente en volúmenes de 20 ml.
- 4.- Almacenando en congelación -20°C . Cada botella es descongelada al momento de ser usada.

MEDIOS DE CULTIVOS.

Estas soluciones son de gran importancia porque ellas guardan los nutrientes, energía y presión osmótica que necesitan las células para multiplicarse.

Los medios de cultivo se agrupan en cuatro tipos dependiendo del propósito para el cual se emplean:

1g.- El de los medios esenciales para la sobrevivencia inmediata de las células, estos han sido definidos en forma precisa por lo tanto es importante controlar la presión osmótica y el pH, así como también proveer una fuente de energía y ciertos iones orgánicos (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

2g.- Los medios esenciales para sobrevivencia prolongada las células toman en cuenta factores tales como soluciones balanceadas que contengan suero, esto ayuda a prolongar más la vida de las células. Otros estudios han demostrado que los factores pueden ser reemplazados por mezclas sintéticas las que incluyen en su fórmula elementos como: aminoácidos esenciales, oxígeno, vitaminas y proteínas séricas. También se ha demostrado que las células sobreviven menos en ausencia de proteínas séricas. Este es el grupo de mayor importancia en su empleo ya que la mayoría de los medios existentes en el mercado se encuentran en este grupo (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

3g.- Este grupo abarca medios esenciales para crecimiento indefinido y son los medios sintéticos que en su fórmula no incluyen suero (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

4g.- Finalmente los medios esenciales de funciones especializadas. Están aún en sus etapas tempranas de desarrollo y presentan composición más compleja que tendrán que ser adaptada para el tipo de células u órganos que se quieran cultivar (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

Los medios de cultivo empleados en el desarrollo de células para el aislamiento de el virus de AEC, pertenecen al segundo grupo según la clasificación anterior. Según la concentración del suero se puede dividir en 1 % de mantenimiento y de 5 - 10 % de crecimiento. Ver el cuadro # 2.

Se empleó en el presente trabajo el medio de cultivo L - 15 (LEIBOVITZ) (1-X) con L - Glutamina. Para el uso de cultivos de tejido de laboratorios IN VITRO S.A de C.V.

Al igual que el medio de cultivo DULBECCO'S de laboratorio IN VITRO S.A de C.V.

Se utilizo SUERO FETAL BOVINO de laboratorio IN VITRO S.A de C.V.

La preparación de el medio de cultivo para esté trabajo se manejaron los dos medios anteriormente mencionados al igual que diferentes concentraciones de suero fetal bovino que van desde 7 % la más baja hasta el 15 %. Además se adicionó el medio con antibiótico penicilina - estreptomicina y nistatina.

CUADRO # 2.

MEDIOS DE CULTIVO.

ORGANO	MEDIO	S.F.B. %	ANTIBIOTICO	BIBLIOGRAFIA
MANTENIMIENTO DE CELULAS CONEJA FETO QUINO.	MEDIO MINIMO ESPECIAL DE EAGLE'S (MEM)	5%	SI SE EMPLEAN	KIRLAND Y COL 1987.
CELULAS DE M.S DE CABRA	MEM MODIFICADO DE DUBELCO'S.	2-5%		LICHTENSTEIGER Y COL 1991.
CO-CULTIVO M.S DE CABRA Y L.S DE FETO DE CABRA.	MEM	28%	PENICILINA ESTREPTOMICINA POLIMIXINA B.	PAULITSCH Y COL 1984.
CELULAS DE M.S DE CAMPO DE CABRA. CELULAS DE CONCHA DE FETO QUINO. CELULAS DE TESTICULO CAFRINO.	MEM MODIFICADO DE DUBELCO'S	10%		DAHLBERG Y COL 1981.
M.S. CABRA CONCHES INSALES FLAJO COMIDEO Y WOVOCITOS	MEM	10%	ANTIBIOTICO 3% DE CO2	ELLIS Y COL 1984.
M.S. DE CABRA MEMBRANA DE LA ARTICULACION CARPAL DE CABRITO PRIURO DE CALASRO	MEM (GIBCO)	10%	GENTAMICINA 16 MICROGRAMOS POR MILILITRO GLUTAMINA.	MURRAY Y COL 1988. PYPER Y COL 1988.
M.S. CABRA.	MEM MODIFICADO DUBELCO'S	5-10%		KNOLES Y COL 1984. GRENAL Y COL 1986.
M.S. CABRA. L.S. LEUCOCITOS CON OUS.	MEM MODIFICADO DUBELCO'S	15%	ANTIBIOTICO	ROBINSON Y COL 1986. GRENAL Y COL 1986. SUTMAN Y COL 1987.

M.S. MEMBRANA SINONIAL.
L.S. LIGAMEN SINONIAL.
CON OUS. CONCHA QUINO.

S.F.B % CONCENTRACION DE
SUERO FETAL BOVINO.

ANTIBIÓTICOS.

La utilización de los antibióticos en los cultivos celulares, a permitido controlar la contaminación de bacterias, hongos, micoplasmas y levaduras, empleándose de rutina en la preparación y manejo de los medios de cultivo celular.

Los antibióticos que más se utilizan son: penicilina, estreptomycin, neomicina, polimixina B, anfotericina y nistatina.

- **PENICILINA:** Este antibiótico se obtuvo en forma liofilizada y estéril.

Se disolvió en forma estéril con agua desionizada.

La solución ya preparada, se esterilizó por filtración y presión positiva, distribuyéndose en forma estéril en volúmenes de 1 a 2 ml.

Se recomienda preparar una solución concentrada de 100 000 UI/ml.

La dosis que se emplea es de 100 UI x ml de medio de cultivo. Se emplea de la solución preparada ya descrita 1 ml por cada litro de medio.

Se almacena a temperatura de -20g C.

- **ESTREPTOMICINA.** Este antibiótico se obtuvo en forma de polvo liofilizado y estéril.

Se recomienda preparar una solución concentrada de 100 000 miligramos / ml.

La dosis recomendada es de 100 microgramos por ml. Se utiliza de la preparación anterior 1 ml por cada litro de medio. Se almacena a temperatura de - 20g C.

- NISTATINA: Este antibiótico es casi insoluble en el agua. Se preparó una solución concentrada de 50 000 U/ml. En forma estéril con agua desionizada.

La dosis recomendada por mililitro es de 25 U / ml de medio, de la solución concentrada se empleó 0.5 ml por litro de medio. Se almacenó a temperatura de - 20g C.

En el presente trabajo se emplearon antibióticos comerciales de los laboratorios IN VITRO S.A de C.V.

Penicilina - estreptomina 10 000 U/mcg/ml. Presentación frasco de 10 ml.

Nistatina suspensión 10 000 U/ml. Presentación del frasco con 10 ml.

Se almacenaron en congelación - 20g C.

CULTIVO CELULAR.

Como se sabe los virus se replican exclusivamente en el interior de células vivas, algunos virus se multiplican únicamente en un determinado tipo de células y algunos no han podido ser cultivados bajo ninguna condición en laboratorio. El cultivo "in vitro" de los virus resulta esencial para estudiar su mecanismo de replicación para el diagnóstico (Mohanty y col 1988).

Se consideran tres tipos generales de cultivos celulares.

1º CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS. Se refiere a cultivos de células derivados de tejidos de órganos obtenidos generalmente a partir de fetos e inmediatamente usados para su estudio, por lo cual poseen un número normal de cromosomas, de una capacidad limitada de crecimiento "in vitro", a lo sumo de 5 o 10 divisiones. Sin perder sus características morfológicas (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

2º CULTIVOS CELULARES DIPLOIDES. Este cultivo se considera una extensión del primero, siendo un cultivo mantenido a través de pasajes, en el caso de células de tejido normal, deben de conservar el número diploide de cromosomas lo cual limita aproximadamente a unos cincuenta pasajes puesto que de ahí en adelante empezaran a sufrir alteraciones morfológicas las células. A este tipo de cultivo celular se le a denominado cepas celulares (Fenner y col 1987).

LINEAS CELULARES. Se entiende por este tipo de cultivos a

las células que han sido propagadas por más de cincuenta pasajes, o son células que derivan de tejidos malignos o que durante su pasaje se vuelven malignos por desarrollar un número anormal de cromosomas. Frecuentemente no mantienen mucho la semejanza con las células que le dieron origen, tanto morfológicamente como bioquímicamente (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

Las líneas celulares continuas más comunes son:

- Línea celular Vero.
- En perro (MDCK). Madin Dardy Canine Kidney.
- En ternera (MDBK).
- En gato (CFK).
- En ratón (1929, 3T3).
- En hamster (BHK - 13).

La ventaja de las líneas celulares continuas, sobre los cultivos celulares primarios es la posibilidad de propagarlas indefinidamente mediante subcultivos de las células a intervalos de tiempo regulares. Al igual que otras células, estas mantienen su viabilidad durante muchos años si se congelan en un medio que contenga suero y dimetilsulfóxido.

**RECONOCIMIENTO DEL CRECIMIENTO
DE LOS VIRUS SOBRE CULTIVOS
CELULARES.**

Algunas de las técnicas más sencillas comúnmente utilizadas para el reconocimiento de crecimiento de los virus son:

HEMOADSORCION Y HEMOAGLUTINACION. Esta técnica es empleada generalmente cuando los virus a reconocer en los medios de cultivo pertenecen a las familias ortomixovirus, paramixovirus o togavirus los cuales se forman por gemación de las membranas y tienen la capacidad de adsorber eritrocitos, dichos fenómenos. es conocido como hemoadsorción y se debe a la incorporación en la membrana plasmática de proteínas víricas de nueva síntesis que fijan eritrocitos. la hemoaglutinación es un fenómeno diferente, aunque relacionado, en el que los eritrocitos son aglutinados por los virus libres (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

INMUNOFLUORESCENCIA. Los antígenos víricos intracelulares de nueva síntesis pueden detectarse mediante tinción de la monocapa celular, fijada con un anticuerpo específico frente al virus, marcado con un colorante fluorescente o con una enzima como la peroxidasa (Fenner y col 1987).

INTERFERENCIA. La replicación de un virus en una célula generalmente interfiere la replicación de otros virus (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

EFFECTOS CITOPATICOS. Son los efectos sobre las células en las que se replican los virus, es la evidencia visible del daño celular a medida que los virus afectan a nuevas células de cultivo. A estos daños son los que se llaman efectos citopáticos y a los virus se les llama citopatogénicos (Fenner y col 1987).

La mayoría de los efectos citopáticos pueden comprobarse fácilmente en cultivos celulares no fijados y no teñidos, con baja iluminación en el microscopio óptico, bajando el condensador y dejando el diafragma parcialmente cerrado para lograr suficiente contraste (Mohanty y col 1988).

La fijación y tinción de las monocapas celulares pone de manifiesto mayores detalles para el diagnóstico, principalmente cuerpos de inclusión y sincitios (Fenner y col 1987; Mohanty y col 1988).

En el caso del virus de AEC el daño celular que se presenta en los cultivos celulares es el de sincitios. El número de núcleos que puede contener el sincitio va desde 3 a 20. Se da como positivo el cultivo cuando se manifiesta como efecto citopático el sincitios (Paelisch y col 1984; Cheevers y col 1985; Ellis y col 1988). Los sincitios se forman de los 14 o 60 días después de la inoculación de cultivos (Narayan y col 1980; Gonzalez y col 1987; Narayan y col 1990). Usualmente se presentan alrededor de los 18 a 21 días post-inoculación, en este tiempo aproximadamente un 20% del cultivo se ha infectado (Kirrland y col 1987). Considerandose negativos los que no presenten cambios citopáticos y sincitios en 70 días post-

inoculación (Cheevers y col 1985; Kirrland y col 1987). Los sincitios pueden ser detectados también por medio de tinción del cultivo celular con hemoxilina-eosina (Grewal y col 1986).

Se a demostrado que la temperatura también es un factor para la formación de sincitios, ya que hay mayor formación de sincitios a temperatura entre 37^o a 39^o C (Blondi y col 1989).

En el cultivo celular de testiculo el efecto citopático por la infección del virus AEC se determina por monitoreo en un microscopio de contraste de fases (Dahleberg y col 1981).

REUTILIZACION DE MATERIAL DESECHABLE EN CULTIVOS CELULARE.

El material plástico es usualmente utilizado en el laboratorio en cultivos celulares, especialmente para la propagación y ensayos con virus, el crecimiento celular en la superficie plástica es siempre superior al que se obtiene en el material de vidrio, debido a que existe una mejor adhesión en el material plástico no tóxico, las delgadas paredes de los utensilios de plástico, facilitan también la observación microscópica de los cultivos, especialmente para la evaluación de la actividad citopática de los virus. La desventaja de los recipientes de plástico reside en el hecho de que tradicionalmente se trata de material desechable, que se utiliza una sola vez, elevando ostensiblemente los costos. Los utensilios de plástico, no obstante, pueden ser reutilizados después de un tratamiento de óxido de etileno. Sin embargo el equipo esterilizador es caro y el proceso de desgasificación es lento. Publicaciones recientes nos indican que las microondas son eficientes en la esterilización de alimentos (Culkin & Fung 1987) y recipientes de plástico (Sanborn y col 1982).

En el Laboratorio de Virología, campo No 4 es necesario implementar un método de desinfección, lavado y esterilización que permita la reutilización del material plástico. Después de una breve fase de experimentación, se puede demostrar que un tratamiento que involucraba desinfectantes clorinados y un

tratamiento con microondas, parece una combinación ideal para lograr el reciclaje de los utensilios de plástico. El procedimiento que aquí se describe, es eficaz para descontaminar y reciclar utensilios de plástico y no se ha observado algún caso de contaminación viral cruzada debido a posibles deficiencias en el método de esterilización.

M E T O D O.

Como aparato esterilizador se utilizó un horno de microondas marca Emerson. Modelo 9003B, que opera con frecuencia de microondas de 2450 MHz.

El procedimiento para el reciclaje del material plástico para cultivos celulares fué el siguiente:

A.- El material plástico conteniendo cultivos infectados o no infectados, se sumerge en un recipiente abierto de plástico, conteniendo de 10 a 15 litros de hipoclorito de sodio al 2 % con agua corriente, permaneciendo ahí un periodo mínimo de 16 horas. La solución de hipoclorito desprende y desintegra las células, así como también, inactiva los sobrenadantes y los virus liberados al romperse las células. Ejerce también una función de limpieza sobre la superficie interna y externa del plástico.

B.- Los utensilios de plástico son agitados antes de ser retirados del hipoclorito, para desprender completamente los detritos celulares y enjuagados inmediatamente seis veces en agua corriente.

C.- Después de un escurrimiento rápido, los utensilios de plástico son colocados en bandejas con 15 litros de agua

destilada, donde son enjuagados otras seis veces.

D.- Finalmente, el material es transferido a otra bandeja que contenga 15 litros de agua destilada proveniente de un destilador de vidrio, enjuagándose otras seis veces, para luego ser escurrido y secado en una estufa a 48^o C.

E.- El material es esterilizado inmediatamente antes de su utilización. Antes de iniciar el proceso de esterilización en el horno de microondas se coloca un frasco de vidrio conteniendo aproximadamente 300 ml de agua corriente (hasta la mitad del frasco) en el centro de la placa de vidrio del horno. Los frascos son esterilizados en posición vertical con las tapas flojas, en un número máximo de cuatro a seis; las cajas de Petri y las placas para microtitulación son esterilizadas evitando colocar una sobre la otra y con la superficie donde se produce el crecimiento celular hacia arriba con las tapas cerradas.

F.- La esterilización se realiza durante 6 a 8 minutos, utilizando el selector fuerte del horno con agua corriente, en la llave del agua, antes de iniciar un nuevo ciclo de esterilización, esta última operación evita el sobrecalentamiento del vidrio y el deterioro del plástico.

Este simple, rápido y relativamente económico procedimiento de desinfección lavado y esterilización, permite la reutilización del material plástico sin deterioro significativo de la calidad de la superficie para el crecimiento celular.

El procedimiento viene siendo utilizado por otros laboratorios de virología desde hace tres años con resultados

excelentes, sin problemas de contaminación viral cruzada, bacteriana o fungosa (Cheryl y col 1991).

PREPARACION DE UN CULTIVO PRIMARIO.

En el presente trabajo se empleó como material biológico 2 gazapos, 1 feto de cabra y 1 cabrito lactante.

El primer cultivo que se preparó fué a partir de células de riñón y cornea de los gazapos, estos fuerón sacrificados con cloroformo, extrayendoseles los riñones y la cornea, lavándose con solución buffer para retirar los detritos celulares y el exceso de eritrocitos, posteriormente se trituró el riñón por presión con una jeringa y la cornea fué cortada en trozos pequeños con tijeras, colocandose en la caja de fondo plano: A-1, A-2, A-3 A-4, con 2 ml de medio de cultivo al 7% previamente preparados. Observándose cada 3 días para evaluar se crecimiento y mantenimiento. Se incubaron en la estufa a 37_o C.

Se empleó la técnica de esterilización de material por microondas en cajas de falcón como material a reutilizar. Se lavarón y se esterilizarón según la técnica ya descrita y colocándose en una caja 10 ml de medio de cultivo L-15 al 7% de suero fetal bovino, incubándose a 37_o C por 24 hrs en la estufa para confirmar la esterilidad del medio, despues de este plazo se llevó a cabo un pase de células de riñón de gazapo de 20 días de sembrado, observándose cada 3 días para evaluar su crecimiento y mantenimiento.

A los 30 días se tomó de la caja 5 ml de medio de cultivo con células de riñón de conejo y se resembraron en un tubo de Leighton. El mantenimiento de estas células fue con medio L-15

adicionado con 10% de suero fetal bovino e incubadas en la estufa a 37° C.

Del cultivo existente en la caja de fondo plano (A-1, A-2, A-3, A-4), se retiraron los trozos de el medio a los 30 días, para dejar únicamente las células ya adheridas, observándose y manteniéndolas con medio L-15 al 10% suero fetal bovino.

Las muestras de membrana sinovial obtenidas del cabrito se depositaron en la caja de fondo plano (B-1, B-2), con medio L-15 al 15% suero fetal bovino. La membrana sinovial se lavó con solución buffer, para retirar el exceso de detritos celulares y de eritrocitos, para posteriormente recortarlos con tijeras en pequeños trozos y colocarlos en la caja de fondo plano, observándose cada 3 días y evaluando su crecimiento y mantenimiento.

De el feto de cabra se obtuvo membrana sinovial y se realizó un cultivo en la caja de fondo plano (C-1, C-2), se lavó con solución buffer y se corto en pequeños trozos con tijeras, se colocó medio Dulbacco's al 15% observándose cada 3 días evaluando su crecimiento y mantenimiento.

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE E.L.I.S.A.

E.L.I.S.A: (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.)

Es una prueba en la que se destaca su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía (Specter y col 1986; Sánchez y col 1987). Esta técnica tiene mayor sensibilidad que la hemaglutinación, fijación de complemento y al ser comparada con técnicas serológicas convencionales más sensibles tales como: inmunofluorescencia (FIA), inmunolectroforesis y radioinmunoensayo (RIA), (Specter y col 1986; Sánchez y col 1987), resulta más versátil ELISA ya que se puede emplear en el campo de la parasitología, bacteriología, micología, virología, inmunología, endocrinología, toxicología y biotecnología, entre otras.

Con esta técnica se pueden estudiar grandes poblaciones en un corto plazo, de una manera sencilla y rutinaria, sin precisar instalaciones costosas (Sánchez y col 1987).

E.L.I.S.A. ha sido una útil herramienta en detección y cuantificación de antígenos virales y anticuerpos (Specter y col 1986).

Hay varios métodos para emplear esta técnica, tales como:

- Método indirecto: Detección de anticuerpos.
- Método sandwich: Detección de antígenos.
- Ensayo captura: Detección de IgM.

El método que se empleó en el presente trabajo es el método indirecto para detectar anticuerpos, del suero de las cabras (Specter y col 1986).

Se emplearon microplacas de plástico con 86 pozos, 12 columnas y 8 líneas, con capacidad de 300 microlitros. Esta es la superficie sólida que se empleó en el presente trabajo, la superficie sólida es aquella en la que se lleva a cabo la reacción, esta puede ser tubos, discos, tarjetas de diferentes materiales tales como: plástico, poliéster, vidrio o hule. Es importante tomar en cuenta el tipo de material ya que influyen en la reacción enzimática, siendo importante la durabilidad y resistencia de la superficie sólida, la cantidad de pozos y la capacidad de cada pozo (Specter y col 1986).

Por otra parte la técnica de ELISA forma parte de las pruebas de reacciones serológicas que utilizan conjugados, se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática (Sánchez y col 1987).

El conjugado es una sustancia que mantiene una doble actividad que es principalmente anticuerpos y enzimas. Para ello es necesario ponerlo en contacto con sus antígenos homólogos en medio líquido (Spencer y col 1986).

Al estar uno de los componentes marcados con una enzima, sobre un soporte inmunoadsorbente, el complejo antígeno - anticuerpo queda inmovilizado y por tanto podrá facilitar ser revelado mediante la adición de un sustrato específico que al

actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista ó cuantificable utilizando un espectofotómetro ó colorímetro ó lector de ELISA (Sánchez y col 1987).

En el presente trabajo se empleó como antígeno el virus de AEC, de la prueba de inmunodifusión en gel. Caprine arthritis-encefalitis / Ovine progressive pneumonia antibody tes kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc. El cual cuenta con:

Antígeno AEC - OPP.

Suero control positivo.

Suero control negativo.

Para lo cual primeramente se llevo a cabo:

S O L U C I O N E S .

Se prepararon las soluciones requeridas de la siguiente forma:

1.- SOLUCION SATURADA DE SULFATO DE AMONIO.

SOLUCION.	CANTIDAD.
SULFATO DE AMONIO.	80 grs.
AGUA DESTILADA	100 ml.

PREPARACION: Se disolvió perfectamente, por agitación.

Dejándose reposar toda la noche.

2.- SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA.

SOLUCION	CANTIDAD	CANTIDAD A USAR.
CLORURO DE SODIO	0.85 grs	17 grs.
AGUA DESTILADA.	100 ml.	2000 ml.

PREPARACION: Se disolvió perfectamente, por agitación.

3.- BUFFER DE CARBONATOS.

SOLUCIONES	CANTIDAD	CANTIDAD A USAR
CARBONATO DE SODIO.	1.59 grs	0.159 grs
BICARBONATO DE SODIO.	2.93 grs	0.293 grs
AGUA DESTILADA.	1000 ml	100 ml

PREPARACION: Se disolvió perfectamente.

Se mantuvo en refrigeración a 4g.

4.- BUFFER DE FOSFATOS.

SOLUCIONES	CANTIDAD	H2O DESTILADA	CANTIDAD A USAR AGUA DESTILADA
------------	----------	------------------	-----------------------------------

Solución A.

FOSFATO DE SODIO.	27.6 grs	1000 ml	3.864 grs/140 ml
-------------------	----------	---------	------------------

Solución B.

FOSFATO DE SODIO

MONOBASICO.	53.65 grs	1000 ml	19.314grs/360ml
-------------	-----------	---------	-----------------

PROCEDIMIENTO. Se disolvió cada sal por separado en agua destilada..

Mezclando la solución A en B.

Y aforando a 1000 ml. Posteriormente se ajustó el pH a 7.2.

Se mantiene en refrigeración.

NOTA: Para el PBS- TWEEN, se usó a una concentración del 1%. Y en nuestra preparación se usaron 900 ml de Buffer de fosfatos de la solución ya explicada y se adicionaron 0.9 ml. de TWEEN.

**METODOLOGIA PARA PRECIPITACION DE
GAMA - GLOBULINAS DE CABRAS.**

Preparación y elaboración de GAMAGLOBULINAS CAPRINAS
para la utilización de la técnica de E.L.I.S.A.
INDIRECTA en el LAB de INMUNOLOGIA en CAMPO No 1.

1.- Se midió la cantidad de suero de cabra (12 ml de suero).

2.- En una bureta se colocó la solución saturada de sulfato de amonio.

3.- Se colocó el suero en un matraz, después este matraz se colocó en un recipiente con hielo para mantenerlo en temperatura baja, y se mantuvo en constante agitación. En agitador de placa Vortex - Scorpión Scientific.

4.- Se agregó el mismo volumen de sulfato de amonio (12 ml) por medio de un goteo constante y lento. Siendo muy importante que no se forme espuma.

5.- Una vez agregado todo el volumen se mantuvo en agitación en el recipiente con el hielo por 30 min más.

6.- Posteriormente se centrifugó. Centífuga Beckman. Modelo J2 - 21, a 15 rpm por 15 min.

7.- Se retiró el sobrenadante, y se reconstituyó el volumen con solución salina fisiológica (12 ml).

8.- Se volvió a precipitar con solución saturada de sulfato de amonio. Usando los pasos antes mencionados.

9.- Después de la centrifugación se retira el sobrenadante

y se reconstituyó en 5 ml de solución salina fisiológica.

10.- Se dializaron las gamaglobulinas. Colocándose en una membrana de diálisis en un vaso de precipitado con agua destilada caliente, se sacó la membrana y se anudó la membrana por un extremo y se introdujo a la membrana los 5 ml de líquido obtenido, una vez terminado se anuda el extremo libre.

NOTA: La membrana se manipuló con la mayor asepsia posible para evitar contaminación.

11.- Esta membrana se coloca suspendida dentro de un vaso de precipitado con 2000 ml de solución salina fisiológica de 24 a 48 horas en refrigeración y agitación.

12.- Se retiró la membrana y se colocó las gamma - globulinas en un frasco limpio en refrigeración.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Por otro lado se determinó la cuantificación de proteínas.

Utilizando el método de Coomassie 6.250 (Lowry).

Reactivo de azul brillante de Coomassie 6.250:

Se preparó etanol al 95%, disolviéndose 100 mgr de reactivo de azul brillante de Coomassie en 50 ml de etanol preparado.

Agregando 100 ml de H₃PO₄ al 85% w/v. y aforando a 1000 ml.

Preparandolo de la siguiente manera:

500 ml de reactivo de Lowry, disuelto en 50 mg de azul brillante de Coomassie en 25 ml de etanol (al 50%), y 50 ml de H₃PO₄ al 85% w/v.

Para el método ordinario de proteínas se realizó de la siguiente forma:

1.- Se pipeteó en un tubo de ensaye 12 X 10 mm, es decir, 0.1 ml de solución de proteínas conteniendo entre 10 y 100 microlitros.

2.- Se agregó 5 mililitros (ml) de reactivo de Lowry y mezclando por agitación en el vortex.

3.- Se midió la absorbancia a 595 nm después de incubado y antes de 1 hr.

4.- El blanco contenía 4 ml de buffer adicionado y 5 ml de reactivo de Lowry.

5.- Se colocó 0.01 g de Albúmina, aforando a 100 ml de agua destilada.

6.- En 5 tubos de ensaye colocar 100 microlitro de la dilución anterior.

7.- Se realizaron las siguientes diluciones:

Microlitros/ml de Gama globulinas	Vol. (ml)
20	0.2
40	0.4
60	0.6
80	0.8
100	1.0

Se aforó a 1 ml con solución salina fisiológica.

8.- Se adicionó a cada tubo de ensaye 5 ml de reactivo de Lowry.

9.- Lectura a 595 nm en el espectrofotómetro.

Diluciones	D.D (595 nm)	
20	0.132	Primera lectura.
40	0.182	
60	0.244	
80	0.297	
100	0.333	
Lectura de la doble dilución 1/20:		
20	0.157	
Correlación:	0.996	
Desviación estandar:	2.3	
Muestra:	0.157	
Concentración de proteínas:	1.161 mg/ml	

LA TITULACION DEL CONJUGADO.

Empleando un conjugado comercial ANTIGDAT (Ro) 176 R2 B601 en ELA laboratorio SIGMA. Se tituló de la siguiente manera:

1.- Se sensibilizaron las placas para trabajar.

Disolviendo 0.50 mg (50 mg/ml)/ml gamaglobulinas en buffer de Carbonato a pH 9.6.

2.- Colocando 200 microlitros de la solución anterior de gamaglobulinas en los pozos a trabajar.

3.- Se incubó 3 hrs a 37°C y toda la noche a 4°C.

4.- Se lavó cada pozo 3 veces con buffer de fosfatos (PBS) / Tween, con intervalo de 3 min entre cada lavada.

5.- Se preparó leche descremada al 5%. Para preparar 5 ml se adiciono 0.25 gr de leche descremada y 5 ml de PBS/tween.

6.- Se bloqueó con leche descremada colocando 200 microlitros por pozo, incubando a 37°C por 1 hr.

7.- Se lavó 3 veces cada pozo con intervalo de 3 min con PBS/tween.

8.- Se realizaron diluciones del conjugado (en PBS/tween).

La cantidad total final de cada pozo fue de 100 microlitros, y todas las diluciones se realizaron por triplicado.

En los pozos 1,2,3 de la línea A, se colocaron 100 microlitros de buffer de Carbonatos.

En los pozos 4,5,6 de la línea A, se colocó la dilución 1:50, la cual se realizó de la siguiente manera: Se colocaron 196 microlitros de PBS/tween y 4 microlitros de conjugado.

En los pozos siguientes se colocaron previamente 100 microlitros de PBS/tween.

En los pozos 7,8,9 de la línea A, se colocó la dilución 1:100, esta se realizó de la siguiente manera: De cada uno de los pozos 4,5,6 de la línea A se tomó 100 microlitros, los cuales se depositaron en los pozos 7,8 y 9 de la línea A respectivamente.

En los pozos 10,11,12 de la línea A, se colocó la dilución 1:200, esta se realizó de la siguiente manera: De cada uno de los pozos 7,8 y 9 de la línea A se tomaron 100 microlitros, los cuales se depositaron en los pozos 10,11 y 12 de la línea A respectivamente.

En los pozos 1,2,3 de la línea B se colocó la dilución 1:400, esta se realizó de la siguiente manera: De cada uno de los pozos 10,11 y 12 de la línea A se tomaron 100 microlitros, los cuales se depositaron en los pozos 1,2 y 3 de la línea B respectivamente.

En los pozos 4,5,6 de la línea B se colocó la dilución 1:800, esta se realizó de la siguiente manera: De cada uno de los pozos 1,2 y 3 de la línea B se tomaron 100 microlitros, los cuales se depositaron en los pozos 4,5 y 6 de la línea B respectivamente. Y de estos últimos se desecharon 100 microlitros dejando de esta manera todos los pozos con 100 microlitros como ya se mencionó previamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANCO		1:50			1:100			1:200			
B		1:400		1:800								

9.- Se incubó a 37°C por 1 hr.

10.- Se lavó 3 veces con intervalos de 3 min cada uno con PBS/tween.

11.- Se preparó el sustrato. Orthophenilendimetico (OPH).

10.8 mg OPH / 1 ml metanol.

Preparando 0.0108 mg/1.574 ml metanol, en un matraz 5 ml.

De la mezcla de OPH y metanol se toman 0.1 ml y se mezcla con 9.9 ml de solución salina fisiológica.

Inmediatamente antes de usarse se agregó 10 microlitros de H2O2 al 3%. Se preparó 1 ml H2O2: 0.9 ml H2O + 0.1 ml de H2O2 al 30%

Se colocó 100 microlitros en cada pozo.

12.- Se incubó a 37°C por 1 hr.

13.- Se detuvo la reacción con ácido sulfurico 4N.

Se preparó 20 ml.

1 mol = 2 N en el ácido sulfurico.

1 mol = 98.08 gr = peso molecular.

2 mol = 196.16 gr - 1000 ml

X - 20 ml

X = 3.9232 gr/20 ml.

1.84 gr (gravedad especifica) - 1 ml

3.9232 gr - X

$$X = 2.1321 \text{ gr.}$$

2.1321 - 97.6% (pureza).

X - 100%

$$X = 2.18 = 2.2 \text{ ml}$$

2.2 ml + 18.8 ml agua destilada = 20 ml de ácido sulfurico
4N.

14.- Se agregó 50 microlitros a cada pozo.

15.- Se leyó inmediatamente despues de agregar el ácido
sulfurico. En un lector de ELISA. Bio - Rad. Modelo 450.

RESULTADOS:

LINEA	A		B
BLANCO 1	-0.567	1:400	1 0.134
2	-0.655		2 -0.301
3	-0.643		3 -0.084
1:50 4	0.373	1:800	4 -0.240
5	0.521		5 -0.472
6	0.521		6 -0.275
1:100 7	0.340		
8	0.399		
9	0.393		
1:200 10	0.264		
11	0.242		
12	0.048		

Se determinó que los resultados obtenidos por la titulación del conjugado, el titulo apropiado para emplearse es el de 1:100 Ya que este titulo de dilución es donde se emplea menor cantidad de conjugado y es representativo los titulos que se detectan en

la respuesta a la prueba.

Titulación del antígeno viral, virus de AEC. A partir de un antígeno comercial utilizado en la prueba de inmunodifusión doble en agar. (Veterinary Diagnostic Technology, Inc. USA).

La que consistió en una glicoproteína externa Gp 135 y una proteína interna Gp 28, con la cual se realizó la sensibilidad de la placa. Procedente de un Kit comercial.

Se trabajó por triplicado y con una cantidad de 100 microlitros por pozo.

1.- Dilución del antígeno.

Se trabajaron las siguientes: 1:10, 1:50, 1:250, 1:1250.

- Se trabajó en 4 tubos de ensayo separados colocando en el primer tubo 450 microlitros de buffer de carbonatos y 50 microlitros de antígeno dando la primer dilución 1:10.

- En los tres tubos restantes se colocaron previamente 400 microlitros de buffer de carbonatos.

- Del primer tubo se tomaron 100 microlitros y se depositaron en el tubo número dos, para obtener la segunda dilución 1:50.

- Del segundo tubo se tomaron 100 microlitros y se depositaron en el tubo tercer tubo, y la tercer dilución 1:250.

- Del tercer tubo se tomaron 100 microlitros y se depositaron en el cuarto tubo y se obtuvo la dilución 1:1250, a las que se les hicieron las pruebas por triplicado.

- Se emplearon los pozos 1,2,3 de la línea D como blanco para esta titulación y a estos pozos solamente se puso 100

microlitros de buffer de carbonatos.

- En los pozos 4,5,6 de la línea D se colocó la dilución 1:10 que previamente se preparó en el tubo de ensaye.

- En los pozos 7,8,9 de la línea D se colocó la dilución 1:50 del segundo tubo de ensaye.

- En los pozos 10,11,12 de la línea D se colocó la dilución 1:250 del tercer tubo de ensaye.

- En los pozos 1,2,3 de la línea E se colocó la cuarta dilución que es 1:1250, del cuarto tubo de ensaye.

2.- Se incubó a 37°C por 3 hrs y posteriormente en refrigeración toda la noche.

3.- Se lavó con PBS/tween 3 veces con intervalo de 3 min.

4.- Se bloqueó con leche descremada al 5 %.

Preparar 5 ml, reconstituir con PBS/ tween.

5.- Colocando en cada pozo 200 microlitros de leche descremada.

6.- Se incubó 1 hr a 37°C.

7.- Lavando con PBS/tween 3 veces con intervalo de 3 min.

8.- Diluyendo del suero positivo 1:10. Del virus de AEC. del Kit comercial antes mencionado.

Se prepararon: 2 ml.

Se emplearon 200 microlitros de suero positivo y 1.800 microlitros de PBS/tween.

Se colocaron 100 microlitros a cada pozo, incluyendo el pozo blanco.

9.- Se incubó a 37°C por 1 hr.

10.- Se lavó con PBS/tween 3 veces con intervalos 3 min.

11.- Preparación del conjugado.

Se empleó el título antes obtenido que es de 1:100.

Se prepararon 2 ml de la siguiente manera:

20 microlitros de conjugado + 1980 microlitros de PBS/tween.

Se colocaron 100 microlitros de conjugado en cada pozo.

12.- Incubar 1 hr a 37°C.

13.- Se lavó con PBS/tween 3 veces con intervalos de 3 min.

14.- Se preparó el sustrato OPH.

10.8 mg OPH / 1 ml metanol.

Se preparó: 0.0108 - 1 ml de metanol

0.017 - X

X = 1.574 ml metanol.

15.- De la mezcla de OPH, se tomó 0.1 ml y se mezcló con 9.9 ml de solución salina fisiológica.

Inmediatamente antes de usarlo se agregó, 10 microlitros de H₂O₂ al 3 %. Esta se preparó de la siguiente manera: 0.9 ml de agua destilada + 0.1 ml de H₂O₂ al 30 %.

16.- Colocando 100 microlitros en cada pozo.

17.- Se incubó 1 hr a 37°C.

18.- Se detuvo la reacción con ácido sulfúrico al 4 N

Se agregaron 50 microlitros a cada pozo.

Se tomó del que previamente se preparó.

19.- Se leyó inmediatamente después de agregar el ácido sulfúrico.

La lectura se realizó en un lector de ELISA. Microplate Reader. Bio - Rad. Modelo 450.

RESULTADOS

LINEA		D		C	
BLANCO	1	0.297	1:1250	1	0.359
	2	0.437		2	-0.033
	3	0.388		3	0.150
1:10	4	0.070			
	5	0.180			
	6	-0.044			
1:50	7	0.255			
	8	0.428			
	9	0.107			
1:250	10	0.248			
	11	0.006			
	12	0.082			

Por lo que se estandarizó la prueba de ELISA con un conjunto (Ig G - cabra + enzimas) con la identificación de antígeno de virus de ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA.

RESULTADOS.

En el cultivo primario de células de cornea y riñón de gazapo, se observó que el crecimiento de estas células fue en general hacia la periferia de la placa, formando una monocapa de un 40% a los 20 días de sembrada.

El cultivo de células de riñón que se realizó en la caja de falcón y el tubo de Leighton, no se observó adherencia de las células a la superficie de la caja o del tubo respectivamente optando por adicionar un explante de tráquea de que de aproximadamente 10 días de edad, con la finalidad de que tuviera una base de unión por la secreción mucoserosa que secreta la tráquea, se descarto este procedimiento ya que 6 días después se observó la alcalinización del medio de cultivo, originado probablemente por un exceso de secreción mucosa ya que se observó gran cantidad de esta sustancia en el medio.

Por otra parte en las células de membrana sinovial de cabrito se observó que el cultivo se desarrollo más eficientemente con una concentración de suero fetal bovino del 15%, aunque también su crecimiento fue en la periferia de la placa.

Las células del feto de cabra en la caja de falcón se adhirieron rapidamente a ella y se formó una monocapa de un 30%, se empleó el medio de Dubelcco's con 15% de suero fetal bovino, empleando en las mismas células por los autores: Grewal y col 1985; Robinson y col 1986; Surman y col 1987. En este trabajo se adicionó con antibióticos tales como: penicilina-estreptomina y nistatina.

La estandarización de la técnica de E.L.I.S.A., se evaluó con un antígeno empleado para la técnica de inmunodifusión en gel, dicho antígeno contiene como conservador azida de sodio, esta substancia interfiere en la reacción de la técnica de E.L.I.S.A. dando falsos positivos, la literatura nos marca que se pueden emplear antígenos comerciales para las pruebas de hemoaglutinación y de fijación de complemento (Specter y col 1986). Se debe tomar también en cuenta la presencia del factor reumatoide ya que este también da falsos positivos a la lectura de esta técnica. (Specter y col 1986).

D I S C U S I O N .

En el presente trabajo se realizaron diferentes actividades todas encaminadas a apoyar la cátedra de ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS CAPRINOS ASPECTOS INMUNOLOGICOS Y DE DIAGNOSTICO.

Se tomó en cuenta con mayor insistencia la parte de diagnóstico, para este fin se llevó a cabo un cultivo primario a partir de células de riñón y cornea de gazapo, para conocer la técnica de cultivo y el manejo de las substancias que se requieren para el cultivo de las células. Habilitándose una sección del laboratorio para este trabajo y así poder contar con un control estricto del material, desarrollándose en forma más eficiente y con mejores resultados, también se contó con el apoyo de una estufa de cultivo para el laboratorio, la cual se reinstaló, siendo más eficiente el desarrollo del cultivo celulares y al mismo tiempo su mantenimiento ya que se evita la evaporación excesiva de los medios gracias a la humedad que esta proporciona a la atmósfera, además es necesario contar con CO₂ para el metabolismo de las células, con esto los cultivos celulares son más productivos. El medio de cultivo Dubelcco con una concentración del 15% de suero fetal bovino aunado al empleo de la estufa de cultivo, dió el mejor resultado en el cultivo de células de membrana sinovial de feto caprino.

Se empleó la técnica de reutilización de material desechable, este método es sencillo y práctico, tiene como ventaja la reutilización del material disponible en el laboratorio de

Virología de campo 4. el equipo que se requiere es económico ya que se adquirió el horno de microondas necesario para llevar a cabo este procedimiento. El poder realizar esta técnica en el laboratorio reditua en mayor aprovechamiento del material disponible y en beneficio para el propio laboratorio, al reducir el costo de algunas de las técnicas en donde se emplean material desechable que puede ser reutilizados.

En cuanto a la estandarización de la prueba de E.L.I.S.A., es importante valorar los antígenos utilizados en la técnica de hemoaglutinación y/o fijación de complemento y se pueden emplear en la técnica de E.L.I.S.A. (Specter y col 1986), y así contar con esta prueba diagnóstica y continuar los trabajos para aislar el virus, obteniendo así un antígeno propio. .

CONCLUSIONES.

La importancia de este trabajo son las bases que se han fijado en primera instancia para el aislamiento del virus de AEC, con la implementación del cultivo celular y en segunda instancia como diagnóstico en la estandarización de la prueba de E.L.I.S.A., sin dejar de mencionar la implementación que se hizo en el laboratorio de Virología de campo No 4.

Por otra parte este trabajo permitió realizar otras actividades encaminadas a el apoyo a otros trabajos de investigación referentes a la misma cátedra, y así se pueden mencionar:

- El apoyo que se brindó en la toma de muestras de sangre para la prueba diagnóstica de inmunodifusión en gel, en la cual se reafirmaron conocimientos de manejo, así como de la toma aséptica de las muestras, conociéndose la explotación y su manejo general.

- Como apoyo en la toma de muestras para microscopia electrónica e histopatología, se destaca el manejo adecuado de las muestras y de las soluciones principalmente para el microscopio electrónico paso fundamental para obtener los resultados deseados.

B I B L I O G R A F I A .

- Achour, H.A.: Markoua, K. and Ghemam, Y.: Isolement et caractérisation du virus de l'arthrite et de l'encéphalite des caprins en Algérie. Maghreb Vétérinaire, 4: 15-17. (1989).

- Alvarez, V.: Seroprevalencia de la Artritis Encefalitis Caprina en algunos estados de la República.: Tesis de Licenciatura. Fac de Med. Vet y Zoo. Universidad Nacional Autónoma de México.: México, D.F. (1984).

- Avalos, R.R.: Ramirez, R.R.: Garcia, C.J.: Zapata, B.P.: Cervantes, V.R. Y Lehmkuhl, H.D.: Seroprevalencia del virus de la artritis encefalitis caprina en el estado de Nuevo León.: IX Congreso Nacional Caprino.: Monterrey, N.L.: FAUANL-AZTECA. México (1992).

- Blondi, I.: Grillet, C. et Thiogane, Y.: Formation de syncytia en culture et analyse de la composition protéique de plusieurs souches de virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV). Ann. Rech. Vét., 20: 153-158. (1989).

- Crawford, T.P.: Adams, D.S. AND Cheeves, W.P.: Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. Science, 207.: 977-979. (1980).

- Cultip, T.P.: Jackson, T.A. AND Cair, G.A.: Immunodiffusion test for Ovine Progressive Pneumonia. Am. J. Vet. res., 38: 7 (1977).

- Clements, J.E.: Narayan, D and Cork, L.C.: Caprin arthritis-encefalitis virus infection: characteristics of CAE

Virus. J. Gen Virol 50: (1980)

- Cheevers, W.P.: Knowles, D.P.: McGuire, T.C.: Cunningham, D.R.: Adams, D.S. and Gorham J.R. Chronic disease in goats orally infected with two isolated of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus. Laboratory investigation, Washington., 58: 510-517 (1985).

- Cheryl, A.R.: Romero, C.H.: Manual de técnicas de diagnóstico virológico. Un procedimiento simple para la reutilización de material plástico para cultivos celulares. Red de Cooperación técnica entre laboratorios de investigación y diagnóstico veterinario. F.A.O., Brasil. (1991).

- Dahlberg, J.E.: Gaskin, J.M. and Perk, K.: Morphological and immunological comparasion of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. Journal of virology., 39: 914-919. (1981).

- Dawson, M.: Caprine Arthritis Encephalitis.: In practice January.: 8-11 (1987).

- East, N.E.: Rowe, J.D.: Dahlberg, J.E.: Theilen, G.H. and Pedersen, N.C.: Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. Small Ruminant Research., 10: 251-262. (1993).

- Ellis, T.M.: Robinson, W.F. and Wilcox, G.E.: Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. Aus. Vet. J., 60: 324-329. (1984).

- Ellis, T.M.: Wilcox, G.E. and Robinson, W.F.: Antigenic variation of Caprin Arthritis-encefalitis virus Junin present

infeccion of goats. Journal of General Virology., 56: (1987).

- Ellis, T.M.: Robinson, W.F and Wilcox, G.E.: The pathology and aetiology on lung lesions in goats infected. Australian Veterinary Journal., 65: (1988).

- Ellis, T.M.: Robinson, W.F. and Wilcox, G.E.: Comparison of caprine arthritis-encephalitis viruses from goats with arthritis and goats with chronic interstitial pneumonia. Aus. Vet. Jou. , 65: 254-257. (1989).

- Fenner, F.: Bachman, P.A.: Gibbs, J.: Murphy, F.A and White, O.D.: Veterinary virology, ACADEMIC PRESS INC Harcourt Brace Jovanovich Publishers. San Diego California. (1987).

- Gonzales, L.: Gelabert, J.L.: Marco, J.C.: Saez D.C.: Caprine arthritis-encephalitis in the basque country, Spain. Vet Rec., 120: 102-109. (1987).

- Grewal, A.S.: Greenwood, E.P.: Burton, R.W.: Smith, J.E.: Batty, E.M and North, R.: Caprine retrovirus infection in New South Wales: Virus isolations, clinical and histopathological findings and prevalence of antibody. Aus Vet Jou., 63: 245-248. (1986).

- Heckert, R.A.: McNab, W.B.: Richardson, S.M.: and Briscoe, M.R.: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. Can J Vet Res., 56: 237-241. (1992).

- Javier, A.A.G.: Manuel ilustrado de practicas de virologia veterinaria. Tesis de licenciatura. F.E.S.C.- U.N.A.M. Mexico. (1988).

- Kirrland, P.D and Batty E.M.: Caprine arthritis-encephalitis virus: an efficient method for the large scale production of serological antigens. J Virol., 16: 323-326. (1987).
- Knowles, D.P JR.: Cheevers, W.P.: McGuire, T.C.: Brassfield, W.G and Stem, T.A.: Structure and genetic Variability of envelope glycoproteina of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. J Virol., 65: 5744 - 5750. (1991).
- Kennedy-Stoskopf, S.: Narayan, O. and Strandberg, J.D.: The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis encephalitis virus. J Comp Path., 95: 609-617. (1985).
- Lichtensteiger, C.A.: Knowles, D.P. Jr.: McGuire, T.C. and Cheevers, W.P.: Recombinante gp 135 envelope glycoproteins of caprine 'arthritis-encephalitis' lentivirus variants inhibit homologous and heterologous variant-specific neutralizing antibodies. Virology., 185: 2-9. (1991).
- Mohanty, S.B.: Dutta, S.K.: Virologia Veterinaria. Interamericana., México, D.F. (1988).
- Narayan, O.: Clements, J.E.: Strandberg, J.D.: Cork L.C. and Griffin, D.E.: Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. J. Gen. Virol., 50: 69-79. (1980).
- Narayan, O and Cork C.L.: Virus Infections of ruminantes.: Editorial Elsevier, Amsterdam, N.Y. (1990).
- Pyper, J.M.: Sheffer, D.: Clements, J.E.: Narayan, O and Rott, R.: Hyaluronidase enhances cell fusion and synthesis of viral DNA durin infection with caprine arthritis encephalitis

virus. Microbiol Pathog., 5: 399-406. (1988).

- Padilla, R.G.: Garcia, C.J. Y DE Leon, T.M.: Transferencia de embriones de cabras seropositivas a la artritis encefalitis caprina y sus efectos en las crías nacidas de cabras receptoras seronegativas., IX Congreso Nacional Caprino., Monterrey, N. L.: FAUANL - AZTECA. MEXICO. (1992).

- Pawlisch, A.R. and Maes, K.R.: Caprine arthritis-encephalitis virus isolated from Michigan goats. Am. J. Vet., 45: 1808-1811. (1984).

- Robinson, W.F and Ellis, T.M.: Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. Aus Vet Jou., 63: 237-241. (1986).

- Surman, P.G.: Daniels, E.: Dixon, B.R.: Caprine arthritis-encephalitis virus infection of goats in South Australia. Aus Vet Jou., 64: 266-271. (1987).

- Sánchez - Vizcaino, J.M.: Cambra, A.M.: Técnicas inmunoensimáticas ELISA en patología animal y vetetal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Office Internacional de Epizooties. París, Francia.: 3-36. (1987).

- Specter, S.: Lancz, G.J.: Clinical Virology Manual. Elsevier., New York.: 133-146. (1986).

- Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. Interamericana., México.: 133-161. (1987).