

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. ( DIAGNOSTICO)

INFORME DE SERVICIO SOCIAL  
T I T U L A C I O N  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
LOPEZ ALONSO LIDIA

ASESOR:

MVZ. M EN C. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ R.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1895

FALLA DE ORIGEN



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 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  
MÉXICO

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

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

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

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez 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 informe de Servicio Social de la Alumna Lidia López Alonso, con número de cuenta: 8610760-8 para obtener el TÍTULO de: Médica Veterinaria Zootecnista.  
de artritis encefalitis caprina. (Diagnóstico).

que presenta la pasante Lidia López Alonso  
con número de cuenta: 8610760-8 para obtener el TÍTULO de:  
Médica Veterinaria Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 5 de Octubre de 1994.

PRESIDENTE	<u>M. en C. Raúl Mar Cruz</u>	
VOCAL	<u>Dr. Jorge Luis Cortés P.</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. H. Alejandro Martínez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Rodolfo Córdoba P.</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Marco Antonio Mendoza S.</u>	



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MVZ. Rogelio Barroso Ramos.

Jefe del departamento de servicio social.

Alumna: López Alonso Lidia.

Carrera: Médico Veterinario Zootecnista.

Número de cuenta: 8610760-8.

Programa Servicio Social Titulación:

Comportamiento inmunológico de la cabra frente al virus de Artritis encefalitis caprina. (Diagnóstico.)

Período de realización del servicio social:

Iniciación: 18 de octubre de 1993. Término: 18 de abril de 1994.

Responsable del programa: MVZ. M en C. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez. Profesor asociado B tiempo completo en las asignaturas de Virología veterinaria, Inmunología, Enfermedades infecciosas monogástricos y Microorganismos patológicos poco comunes.

Lugar de realización del servicio social: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Departamento de virología.

Nombre del Jurado de examen profesional.

Presidente: MVZ. Raúl Mar Cruz.

Secretario: MVZ. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez.

Vocal: MVZ. Jorge Tortora Pérez.

Primer suplente: MVZ. Rodolfo Córdoba.

segundo suplente: MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra.

## AGRADECIMIENTOS

A mi Dios: Por ser el creador de mis días, por darme la oportunidad de vivir y de conocerte, porque has estado junto a mi en todo momento y me muestras el camino de tu voluntad, por el amor que me has mostrado y porque eres la razón de mi existencia. La gloria y honra de mi ser sea dada a tí. TE AMO.

A mis Padres: Por brindarme su ayuda y dedicarme su tiempo e interes para superarme, por darme su vida y cariño.

A mis Hermanas Verónica y Noemí: Porque han sido un ejemplo para mi vida por apoyarme y alentarme en los momentos difíciles.

A mis Asesores: Por su tiempo para la revisión de este trabajo, porque con sus observaciones se logro obtener un mejor trabajo.

En especial al MVZ. M en C. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez. Por su amistad, y paciencia para sus tesisas.

A los seres que han contribuido para mi preparación los " ANIMALES " .

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	9
DISEÑO EXPERIMENTAL	11
CALENDARIO DE ACTIVIDADES	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	25
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	33
APENDICE	34
BIBLIOGRAFIA	35

**INTRODUCCION:**

**ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS CAPRINOS: ASPECTOS INMUNOLOGICOS Y DE DIAGNOSTICO.**

**NOMBRE DEL PROYECTO:**

Estudio preeliminar sobre la posible presencia de un factor reumatoide en cabras con síndrome artrítico.

**ANTECEDENTES DEL PROYECTO:**

Artritis (gr. Arthron, articulación, itis inflamación), denominado también como reumatismo en el cual las lesiones inflamatorias se circunscriben a las articulaciones. La artritis aguda se caracteriza por dolor, calor, enrojecimiento y tumefacción por inflamación, infección o traumatismo. (Agraz, 1989).

En general la artritis reumática también conocida como enfermedad del colágeno es un padecimiento frecuente e invalidante que afecta a seres humanos y animales domésticos, generalmente es un problema crónico. Es una enfermedad que además de afectar principalmente las articulaciones puede dañar a otros sistemas del organismo, tiende a presentar evolución progresiva hasta llegar a la destrucción articular, en casos avanzados se puede presentar anquilosis ósea. El primer signo de la enfermedad es sinovitis; caracterizada por gran infiltración de neutrófilos. Conforme se desarrolla la enfermedad la sinovial empieza a inflamarse y proliferar, estos crecimientos externos de la sinovial se extienden dentro de la cavidad articular denominándose annus. Estas proliferaciones están formadas por

tejido vascular fibroso, y son capaces de liberar enzimas proteolíticas que erosionan el cartilago articular y las estructuras óseas que lo rodean. Al evolucionar la artritis los neutrófilos pueden ser remplazados por linfocitos y se forman nódulos linfoides. (Tizard; 1992)

No se conoce con certeza la causa de la artritis reumatoide pero es muy probable que se deba al deposito crónico de complejos inmunes en la sinovial, no se ha identificado el antígeno agresor pero se sospecha de IgG y colágena, el desarrollo de autoanticuerpos contra IgG es característico de la artritis reumatoide. Los autoanticuerpos tipo IgM se llaman factores reumatoides; se orientan contra los epitopes de los dominios CH2 de la IgG unida a los antígenos. (Tizard; 1992)

La presencia de agregados IgG o de complejo de factor reumatoide da por resultado la activación del sistema clásico del complemento, con lo que se produce inflamación y liberación de histamina, la producción de factores quimiotácticos para los leucocitos polimorfonucleares y los mononucleares y el daño de la membrana con lisis celular, los lisosomas y las enzimas liberadas en el interior del espacio sinovial por los leucocitos amplifican aún más las respuestas proliferativa e inflamatoria de la membrana sinovial. El infiltrado mononuclear que se observa de la manera característica en el interior de la sinovial, incluye la reunión perivascular de linfocitos T y B, linfoblastos, células plasmáticas y macrófagos. La acción inmunológica de los linfocitos conduce a la liberación de linfocinas responsables de

la acumulación de macrófagos y a la síntesis continua de inmunoglobulinas con la formación del factor reumatoide. (Stites, 1983, Hill, 1979)

Se sabe que este factor reumatoide es una gamaglobulina de alto peso molecular (19 S), que se encuentra en el suero de individuos con artritis reumatoide, y la cual es caracterizada por reaccionar con gamaglobulinas de bajo peso molecular (7 S), esto sugiere que el factor reumatoide es un autoanticuerpo, que se encuentra circulando en el torrente sanguíneo ( Butler y Vauhhan, 1964; Thoren, 1990; Newkirk, 1992; Nielsen, 1992).

Por lo regular tiene una aparición poliarticular, caracterizada por cambios inflamatorios en la membrana sinovial y en las estructuras articulares con atrofia y rarefacción de los huesos. (Sousa, 1988).

En etapas avanzadas de la artritis reumatoide, aparecen deformaciones y anquilosis, postulandose diferentes etiologías , tales como agentes bacterianos , mecanismos autoinmunitarios infecciones virales o traumatismos, tales como golpes, caídas, por reposar o dormir en pisos duros, así también influyen otros factores predisponentes como estrés, equivocada planeación genética y elección de raza inadecuada al clima y sistema de cría, alojamientos húmedos y desasados, sistema intensivo sin ejercicio del animal, regimen de alimentación inadecuado, se menciona cierta predisposición hereditaria que se asocia a un factor ambiental de la enfermedad. ( Agraz; 1989 ).

Algunas alteraciones en la cantidad de minerales puede

producir artritis . El acúmulo de hierro, se caracteriza por el aumento de absorción del hierro a nivel intestinal el cual es acumulado en el organismo, y no es metabolizado adecuadamente siendo depositado en órganos tales como corazón, páncreas y articulaciones provocando múltiples manifestaciones como lesiones en células endoteliales, causadas por neutrófilos y células T, siendo el hierro un elemento importante para el desarrollo de toxicidad inflamatoria, la acumulación del hierro puede actuar como un depósito mal acumulado ya que esto se ha demostrado por la presencia de cantidades detectables de hierro en articulaciones de la rodilla, la tasa detectable puede ser más que suficiente para permitir la producción de sustancias potencialmente tóxicas que irritan el tejido a través de quimiotaxis de células inflamatorias. (Souza, M, 1989)

El desbalance en la relación calcio-fosforo 2:1, produce abultamiento de los huesos de la cara, cansancio y casi imposibilidad para mantenerse en pie, claudicación marcha insegura y vacilante, rigidez muscular, artritis y sinovitis, osteodistrofia fibrosa. La gestación y lactancia en las hembras, y alimento rico en fosforo llegan a provocar descalsificación o una alimentación exclusivamente seca, suplementos mal elaborados con un exceso de calcio produce desviación lateral de las extremidades anteriores. (Agraz, 1989, Zarate, 1993)

En cabritos se puede presentar artritis por la contaminación del cordón umbilical recién cortado, con camas sucias contaminadas con bacterias o exudados purulentos de otros

cabritos que presentan la infección. El agente patógeno puede provenir de la vagina de la madre en el momento del parto, puede introducirse por vía digestiva al mamar de ubres sucias o biberones no esterilizados. (Agraz 1989)

Se cree que algunos agentes infecciosos tales como Micoplasmas, Clamidas, Brucelas, Streptococos y Estafilococos puedan formar trombos o bien producir toxinas como es el caso de los dos últimos agentes que pasan a circulación general. Después de la sépticemia producen sinovitis o los agentes patógenos se alojan en otros órganos particularmente en membranas sinoviales de las articulaciones, pulmones hígado y riñones. (Inman R.1992)

La destrucción de tejidos que se presenta en la artritis es amplificada por los anticuerpos anticolágena, provocando elevados títulos de anticuerpos tanto a la colágena natural como a la desnaturalizada las cuales se encuentran en artritis reumatoide (Hudson, 1980; Agraz, 1984; Ungar, 1991; Shewen, 1993).  
ver cuadro 1.

Por otro lado existe una enfermedad viral denominada artritis encefalitis caprina (AEC), producida por un retrovirus de la subfamilia lentivirinae, el cual necesita de células de rápida proliferación para facilitar la replicación viral. Es un virus RNA y contiene 3 genes estructurales. El gen env codifica glicoproteínas virales, gag codifica proteínas centrales del virus y el gen pol que codifica enzimas incluyendo la transcriptasa reversa la que convierte el RNA viral en DNA durante el ciclo de la replicación viral. (Nayaran O, 1992). Este

virus está relacionado antigénicamente con el virus de la neumonía progresiva ovina (Maedi Visna ) ( Peterson 1990; Celer y col 1983). Esta enfermedad se caracteriza por la inflamación de membrana sinovial produciendo artritis en animales adultos y encefalitis en animales jóvenes, la infección principal parece darse durante las primeras semanas posteriores al nacimiento, el virus infecta principalmente linfocitos CD4 y macrófagos, la transmisión se presenta de hospedador a hospedador por fluidos del cuerpo tales como calostro y leche, exudado nasal o por heridas como mordeduras, laceraciones o a través de tatuajes en los cuales hay contacto con sangre de animales enfermos (Nayaran, 1992 Peterson, 1990, García, M. 1992).

La enfermedad tiene una distribución amplia, con gran riesgo de difundirse a otros países, esto puede estar dado por la comercialización de animales provenientes de países infectados. Se sabe que la enfermedad se ha detectado serológicamente en México desde 1983. (Nazara, 1983). Presentandose evidencias preliminares del aislamiento e identificación del virus en 1986. (Gay, 1986), y sugiriendo que ha sido introducida en México por la importación de caprinos procedentes de países en los cuales existe la enfermedad. El cuadro clínico se manifiesta principalmente en el sistema nervioso, articulaciones, pulmón y glándula mamaria.

La infección persistente del virus es particular en el tejido articular, el cual provoca una continua acción de los mecanismos inmunes humorales y celulares, contra células que presentan antígenos virales en su membrana, esto genera una

necrosis severa y difusa de tejido articular y otros tejidos como pulmón y tejido nervioso ( Ferrin, 1991 ).

La enfermedad específicamente se puede manifestar en cabritos de 2 a 4 meses de edad presentando leucoencefalomielitis, fiebre moderada, en el 60% de los casos se observan lesiones nerviosas que producen depresión, ceguera, reflejo pupilar anormal, opistótonos, torticolis, vueltas en círculo y disfagia ( González y col; 1987).

Los animales mayores de 1 año manifiestan cojera, aumento de tamaño de las articulaciones carpianas, signos de dolor y depósitos calcareo, además de la pérdida de peso y problemas de mastitis. ( González y col. 1987). Estudios histopatológicos demuestran que las lesiones son caracterizadas por focos de proliferación de la sinovial con intensa infiltración y proliferación de linfocitos y macrófagos, frecuentemente los linfocitos son ordenados en nódulos acumulados en las paredes de los centros germinales linfocitos B, células plasmáticas y linfocitos CD8 son la principal subclase de células en la lesión. El fluido sinovial contiene muchos linfocitos, macrófagos y partículas virales pequeñas y complejos inmunes de glicoproteínas virales y anticuerpos. La articulación del carpo suele ser frecuentemente la más afectada, en los animales aumenta progresivamente la claudicación y caquecía a pesar de haber buen apetito. (Nayaran, 192).

Por otro lado los métodos de diagnóstico empleados son muy variados, basándose en análisis clínicos, exámenes serológicos

tales como pruebas de inmunodifusión en agar gel ó pruebas más sensibles como ELISA, que detectan anticuerpos séricos de este virus. Otro método empleado es el denominado Índice Clínico (IC), el cual se calcula a través de la diferencia obtenida entre el diámetro de la articulación carpocubital y el diámetro del metacarpo. Un animal es clínicamente negativo para AEC cuando su IC es igual o inferior a 5.5 cm, un animal con diámetro de 6 a 6.5 cm es considerado clínicamente sospechoso, un IC igual o superior a 7 cm indica un animal positivo. Sin embargo este método debe ser comparado con pruebas serológicas para descartar que las lesiones inflamatorias presentes en el animal sean producidas por otros factores. (Harris, 1990).

Se sabe que el factor reumatoide es una gamaglobulina de alto peso molecular (19 S), que se encuentra en el suero de individuos con artritis reumatoide; y se sugiere que en cabras seropositivas a AEC también se presenta la formación de factor reumatoide, ya que el virus al dañar las células sinoviales estimula la formación de complejos inmunes que a su vez van a actuar como antígenos dando lugar a anticuerpos circulantes en torrente sanguíneo. (Nayaran, 1992).

## OBJETIVOS Y METAS DEL PROYECTO.

### Objetivo General:

Desarrollar y aplicar una metodología diagnóstica sencilla y confiable que ayude a detectar la presencia del factor reumatoide en cabras seropositivas a ARC y en cabras con síndrome artrítico.

### Objetivos Especificos:

- a) Evaluar la técnica de hemoaglutinación indirecta, con el fin de detectar al factor reumatoide en cabras.
- b) Producción de un suero hiperimmune en cabras contra eritrocitos de carnero.
- c) Estandarización de la técnica del factor reumatoide en cabras por medio de la prueba de hemaglutinación directa de gamaglobulinas totales adheridas a eritrocitos de carnero.

### Objetivo academico:

Aplicación de los conocimientos adquiridos por las cátedras de inmunología, virología y enfermedades infecciosas I poligástricos.

### Objetivo social:

Los problemas articulares en el caprino son de gran importancia dados sus hábitos de pastoreo y alimentación, ya que la mayor parte de su alimento lo obtienen por medio de ramoneo, por lo que cualquier daño que limite su movimiento repercute sobre su alimentación y esta a su vez altera la producción caprina.

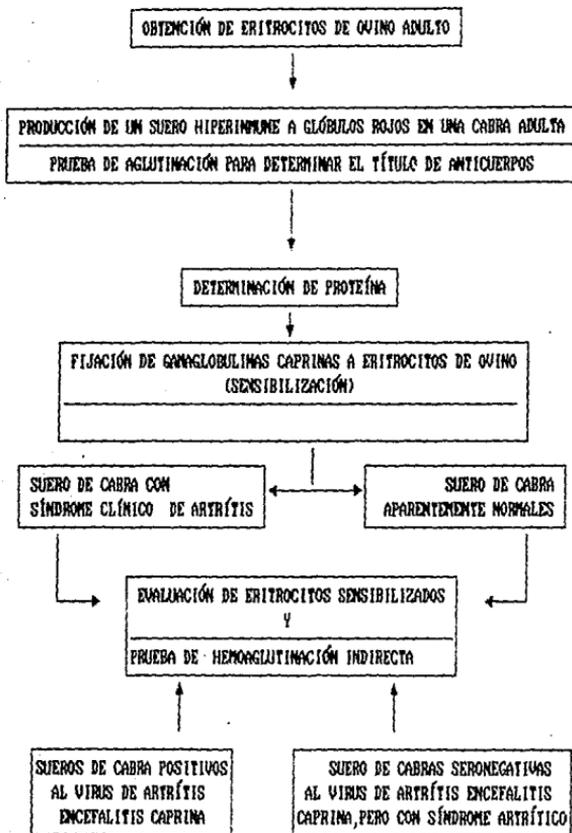
CUADRO No. 1

CAUSAS PREDISPONENTES DE ARTRITIS.

FÍSICA	TRAUMATISMO (golpes, pisos, patas etc.)
QUÍMICA	FIERRO, COLÁGENA.
NUTRICIONAL	Deficiencias o alteraciones en (calcio fosforo, selenio.)
BIOLÓGICA	Bacterias (Clamidas, Micoplasmas, Brucelas Streptococcus; Staphylococcus. Virus ( Artritis Encefalitis caprina )
OTRAS	COMPLEJOS INMUNES, HEREDITARIOS

Martínez 1993

DISEÑO EXPERIMENTAL



CALENDARIO DE ACTIVIDADES

OCT NOV DIC ENE FEB MAR ABR MAY

RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA	X	X						
OBTENCIÓN DE ERITROCITOS DE OVINO ADULTO		X						
PRODUCCIÓN DE UN SUERO HIPERINMUNE			X	X		X	X	
EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN			X	X	X			
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA	X	X	X					
EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA							X	X X
PRODUCCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE A GAMAGLOBULINAS CAPRINAS						X	X	X
OBTENCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE A GAMAGLOBULINAS DE CABRA							X	X
OBTENCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE A G.R. DE CARNERO.							X	

### Material y Métodos:

El presente trabajo fué realizado del 18 de octubre de 1993 al 18 de Junio de 1994 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo No.4 ubicada en la carretera Cuautitlán Teoloyucan Km. 2.5 Ciudad Cuautitlán Izcallí.

Las actividades se dividieron en tres etapas a las cuales se les asignó un tiempo de acuerdo a su importancia y producción.

Primer etapa: Se produjo un antisuero contra globulos rojos de carnero, en una cabra adulta, por medio de un calendario de inmunización, con el fin de obtener un suero hiperimmune, para lo cual se utilizó un carnero raza merino de 3 años, y un macho cabrío raza nubia de 2 años.

Para la producción de dicho antisuero primeramente se obtuvo mediante una jeringa hipodérmica de 10 ml. con aguja del número 20, conteniendo 5 ml de solución de Alsever la cantidad de 5 ml de sangre de carnero, posteriormente se lavaron los eritrocitos de la siguiente manera:

1.- Se centrifugó la sangre a 2500 rpm por 10 min. desechando el sobrenadante.

2.- Al paquete celular se agregó SSF estéril 3 ml aproximadamente y centrifugando nuevamente a 2500 rpm 7 a 10 min.

3.- Repitiendo el paso anterior 2 o 3 veces, eliminando el sobrenadante.

4.- El paquete de glóbulos rojos se concentró a 1 ml y se le adicionó 1 ml de adyuvante completo de Freund.

Todos los pasos se realizaron en un medio completamente estéril .

5.- Se inoculó a una cabra el preparado en dos sitios diferentes 1 ml subcutáneo y 1 ml intramuscular.

A los 15 días se dió una segunda inoculación.

A los 30 días se dió una tercera inoculación .

A los 45 días se sangró para obtener el suero .

La calendarización real para la producción del suero hiperinmune fué la siguiente:

El 4 de Noviembre de 1993 se dió la primera inoculación a la cabra.

19 de Noviembre de 1993 se dió la segunda inoculación.

2 de Diciembre de 1993 se dió la tercera inoculación .

16 de Diciembre de 1993 se inició el sangrado de la cabra 20 ml cada tercer día hasta el 20 de Diciembre de 1993 reuniendo 30 ml de suero, este fué centrifugado a 2500 rpm por 10 min y congelado a -20 C. hasta su uso.

Para encontrar la dilución a la que debería trabajar el suero hiperinmune de cabra se realizó una prueba de hemoaglutinación.

#### Metodología de la prueba de hemoaglutinación:

En una microplaca de fondo en U se adiciono 50  $\mu$ l de PBS en 12 pozos, agregandó solo al primer pozo 50  $\mu$ l del suero problema y a partir de aquí se realizaron diluciones dobles para los 11 pozos restantes, se agregó además 50  $\mu$ l de eritocitos lavados con PBS ( ver apendice) y preparados al 2% a cada

pozo, e incubando 90 min. en estufa bacteriológica (Blue M Electric Company) a 37 C, dejar reposar por 90 min. a temperatura ambiente, observando posteriormente la microplaca en un aparato de lectura para microplacas (Microtiter Cooke Engineerin Company).

Segunda etapa: En esta fase se sensibilizaron glóbulos rojos de carnero con:

- a).- Gamaglobulinas de cabra adulta clinicamente normal, las cuales fueron obtenidas mediante la técnica de "Bradford".
- b).- Antigamaglobulinas de cabra contra glóbulos rojos de carnero.
- c).- Determinación proteica de gamaglobulinas totales de suero normal caprino y de suero hiperimmune de cabra, por medio de la prueba de Bradford.

Para la sensibilización de eritrocitos se siguió el siguiente procedimiento:

Inicialmente el suero de cabra clinicamente normal y el suero hiperimmune de cabra, empleados para sensibilizarse con glóbulos rojos de carnero, se descomplementaron para evitar lisis de los eritrocitos, por lo que estos sueros se introdujeron en baño María a 56 C durante 30 minutos.

Al suero de cabra normal y al suero antiglóbulos rojos de carnero se le determinó su título en base a una prueba de hemaglutinación, haciendo diluciones dobles de 50  $\mu$ l.

Los eritrocitos se trabajaron de la siguiente manera:

- 1.- En una jeringa hipodérmica de 10 ml se colocaron 5 ml de

solución de Alsever, se obtuvo en la misma jeringa 5 ml de sangre de carnero, se homogenizó suavemente.

2.- Posteriormente se colocó la solución en tubos para centrífuga 5 ml en cada uno, centrifugando a 2500 rpm durante 10 minutos, retirando el sobrenadante y agregando 3 ml de PBS.

3.- Volviendo a centrifugar y retirando el sobrenadante agregando nuevamente PBS y repitiendo en 3 ocasiones, en la última centrifugación se retiró el sobrenadante sin agregar más PBS.

4.- En 98 ml de PBS se agregó 2 ml de eritrocitos.

5.- Mezclando a partes iguales V/V, eritrocitos al 2% y gamaglobulinas de cabra (suero hiperinmune), se incubó en la estufa bacteriológica a 37 C durante 15 minutos.

Este material fue utilizado para correr pruebas de hemoaglutinación.

La determinación de la concentración de proteínas séricas se efectuó por medio de dos técnicas:

Prueba de sulfito de sodio:

material: 3 tubos de ensayo de 5-10 ml.  
3 pipetas de 5 ml.  
1 pipeta de 1 ml.  
1 ml de suero de cabra normal.  
1 ml de suero hiperinmune de cabra.  
1.9 ml de sulfito de sodio a diferentes concentraciones, 14%, 16%, 18%.

Procedimiento:

- 1.- Añadir 1.9 ml de cloruro de sodio a diferentes concentraciones 14%, 16%, 18% en cada tubo respectivamente.
- 2.- Agregar 0.1 ml de suero a cada tubo.
- 3.- Mezclar y reposar 1 hr.
- 4.- Hacer la lectura de precipitación en los tubos.

#### INTERPRETACION

18% = < 5 mg de proteína / ml  
 16%, 18% = 5-15 mg " " / ml  
 18%, 16%, 14% = 15 mg " " / ml

#### Prueba de sulfato de amonio "Bradford":

La precipitación de las gamaglobulinas por este método se debe a que las moléculas de agua que solvatan a las moléculas de anticuerpos, son desplazadas por los iones sulfato y amonio que además neutralizan los grupos cargados de la proteína, la cual llega al punto isoeléctrico y precipita.

#### Método:

- 1.- Con NaOH 2N se ajustó a 7.8 el pH de la solución saturada de sulfato de amonio, inmediatamente antes de la precipitación.
- 2.- A un volumen de suero contenido en un tubo cónico se adicionó lentamente y con agitación constante medio volumen de sulfato de amonio saturado ( la concentración final de este quedo a 1/3 de saturación ) se ajusto el pH a 7.8 con NaOH 2N.
- 3.- Se continuó agitando durante 10 a 15 min. después de terminada la adición de sulfato de amonio.
- 4.- Se centrifugó la suspensión a 3500 rpm durante 15 min.

5.- El precipitado se disolvió con solución salina a pH 7.8 hasta alcanzar un volumen igual al original de suero.

6.- Se repitieron los pasos 2, 3, 4 y 5.

7.- Se repiten los pasos 2, 3 y 4.

8.- El sedimento de la última centrifugación se disolvió en la solución salina amortiguadora de boratos hasta alcanzar la mitad o un tercio de volumen original de suero.

9.- Se dializó con la solución salina amortiguadora de boratos en frío a 4°C y se mantuvo en agitación durante 3 a 5 días, haciendo dos cambios diarios del amortiguador para eliminar completamente el sulfato de amonio.

10.- Ya completada la diálisis se sacó la muestra y se centrifugó a 2500 rpm en frío durante 10 min para eliminar cualquier precipitado que pueda haberse formado.

11.- Se agregó una solución de azida de sodio en polvo, a una concentración final 0.1%, conservándose en refrigeración.

12.- Se determinó la concentración de proteínas en la solución por espectrofotometría a 595 nm.

13.- No determinándose la pureza del producto por inmunoelectroforesis.

Tercera etapa: Se hicieron pruebas de hemoaglutinación y pruebas de hemoaglutinación indirecta.

Fundamentos:

Reacción de hemoaglutinación:

Si se aplica un inmunosuero a una suspensión de partículas antigénicas, estas últimas forman acúmulos. En la aglutinación

las partículas quedan asociadas en retículo por los anticuerpos divalentes, combinándose cada extremidad de la molécula de anticuerpo con un sitio antigénico idéntico portado por dos partículas distintas.

La aglutinación pasiva o indirecta consiste en adsorber antígenos solubles a una partícula grande e insoluble, como por ejemplo poliestireno, latex, o eritrocitos. Cuando se utilizan eritrocitos la técnica se denomina hemoaglutinación pasiva o indirecta y es capaz de detectar cantidades muy pequeñas de anticuerpos. Los eritrocitos cubiertos con proteína son aglutinados en presencia de antisuero específico contra la proteína adsorbida.

Los sueros a probar primero se descomplementan y luego se adsorben con un volumen igual de eritrocitos con el objeto de eliminar anticuerpos heterófilos. Para obtener resultados reproducibles la concentración de eritrocitos a sensibilizar con el antígeno debe estandarizarse, puesto que hay una relación inversa entre la concentración de células y el título de anticuerpos.

Para conocer el título de anticuerpos en un suero, se efectúan diluciones seriadas de este en un diluyente apropiado y luego se añaden cantidades constantes de una suspensión de eritrocitos sensibilizados con antígeno específico. La dilución de suero más alta que provoque una clara aglutinación se considera como punto final de la reactividad y representa el título de anticuerpos en el suero.

El material utilizado fué:

15 sueros de cabra seropositivos a AEC.

10 sueros de cabras con síndrome artrítico seronegativos a AEC.

25 sueros de cabras clínicamente normales.

suero antiglóbulos rojos de carnero.

glóbulos rojos de carnero al 2%.

Solución Salina Fisiológica

1 micropipeta de 50  $\mu$ l

7 microplacas de fondo en U.

Los sueros de cabras seropositivos a AEC se obtuvieron de cuatro ranchos entre ellos Cuatro milpas 2 animales, F.E.S.C 7 animales, la serpentina en Querétaro 3 animales, CECAF 3 animales.

Los sueros de cabras con síndrome artrítico se obtuvieron de los ranchos de Tlalnepantla y Cuautitlán 4 animales, y de los ranchos de cuatro milpas 1 animal, CECAF 4 animales, y Ajuchitlan 1 animal.

Los 25 sueros de cabras clínicamente normales, se obtuvieron de la FESC.

Los animales enfermos fueron elegidos de acuerdo a la observación clínica de artritis a nivel de las articulaciones la edad de estos animales se encontraba entre 1 a 8 años.

Los animales clínicamente normales se eligieron por no manifestar signos clínicos de artritis.

#### Metodología de la prueba de hemoaglutinación (HE):

En una microplaca de fondo en U se adicionó 50  $\mu$ l de PBS en 12 pozos, se agregó sólo al primer pozo 50  $\mu$ l del suero problema y a partir de aquí se hicieron diluciones dobles para los 11 pozos restantes, agregando además 50  $\mu$ l de eritocitos lavados con PBS ( ver apendice) y preparados al 2%, sensibilizados con gamaglobulinas hiperinmunes de cabra a cada pozo, e incubando 90 min. en estufa bacteriológica (Blue M Electric Company) a 37 C, dejando reposar por 90 min, a temperatura ambiente, observando posteriormente la microplaca en un aparato de lectura para microplacas (Microtiter Cooke Engineerin Company).

#### Prueba de hemoaglutinación indirecta (HI):

En una microplaca de fondo en U, se colocó 50  $\mu$ l de SSF, se agregó 50  $\mu$ l de un suero problema sólo al primer pozo y se efectuaron diluciones dobles de 50  $\mu$ l a partir de este hasta completar los 11 pozos restantes, se añadió 50  $\mu$ l de gamaglobulinas hiperinmunes de cabra ( 1/64) a cada pozo y se introdujo a la estufa bacteriológica por 15 minutos posteriormente se agregó 50  $\mu$ l de glóbulos rojos de carnero al 2% y nuevamente se colocó en la estufa bacteriológica por 1:30 hr, la observación se realizó 1 hr después de reposar a temperatura ambiente.



Figura 1.



Figura 2.



Figura 3.



Figura 4.



Figura 5.



Figura 6.

Figura 1. Obtención de eritrocitos de carnero.

Figura 2. Obtención de suero hiperinmune de cabra.

Figura 3. Preparación de las pruebas de hemoaglutinación.  
indirecta.

Figura 4. Incubación de microplacas en estufa bacteriológica.

Figura 5. Cabras seropositivas a AEC, observese las lesiones  
articulares.

Figura 6. Articulación de cabra seropositiva a AEC, mostrando  
lesiones características en forma de granos de arroz.

## RESULTADOS:

El total de sueros trabajados fué de 50, de los cuales 15 fueron seropositivos a la enfermedad AEC, comprobado por pruebas de inmunodifusión doble en agar gel, 10 sueros fueron de animales con síndrome artrítico de etiología desconocida.

Los resultados de las pruebas de sulfito de sodio que se realizaron a los sueros problema mostraron concentraciones mayores de 15 mg/ml de proteína, ya que en los 3 tubos de ensaye se presentó precipitación.

La técnica de sulfato de amonio permitio conocer la cantidad de gamaglobulinas contenidas en el suero hiperimmune de cabra, la lectura se realizó en una dilución 1/1000, determinandose una cantidad de gamaglobulinas de 30.95 mg/ml.

Se evaluaron eritrocitos a diferentes concentraciones, 0.5%, 1%, y 2%, los mejores resultados fueron los de eritrocitos al 2%, los cuales se utilizaron para la prueba de hemoaglutinación indirecta.

Con el fin de estandarizar el título de gamaglobulinas de cabra, se aplicó la prueba de hemoaglutinación utilizando diluciones dobles de 1/2 a 1/1024.

### Titulación:

1/4 aglutinación

1/8 aglutinación

1/16 aglutinación

1/32 aglutinación

1/64 aglutinación  
1/128 aglutinación  
1/256 aglutinación  
1/512 ligera aglutinación  
1/1024 sedimentación

Se tomó la dilución 1/512 como referencia para determinar 4 a 8 unidades inhibitoras de hemoaglutinación, por lo tanto la dilución que resultó para control de aglutinación fué 1/64.

Los resultados de las pruebas de hemoaglutinación indirecta fueron los siguientes:

Los 25 sueros de cabras aparentemente sanas mostraron títulos bajos 1/2 (n=5), 1/4 (n=1), 1/8 (n=1), y 18 sueros no tuvieron titulación. (ver gráfica 1).

Los 10 sueros de cabras con síndrome clínico artrítico presentaron títulos de 1/4 (n=3), 1/8 (n=5), 1/32 (n=2). (ver gráfica 1).

Los 15 sueros de cabras seropositivas a AEC, manifestaron títulos 1/4 (n=9), 1/8 (n=1), 1/16 (n=4), 1/32 (n=1). (ver gráfica 1).

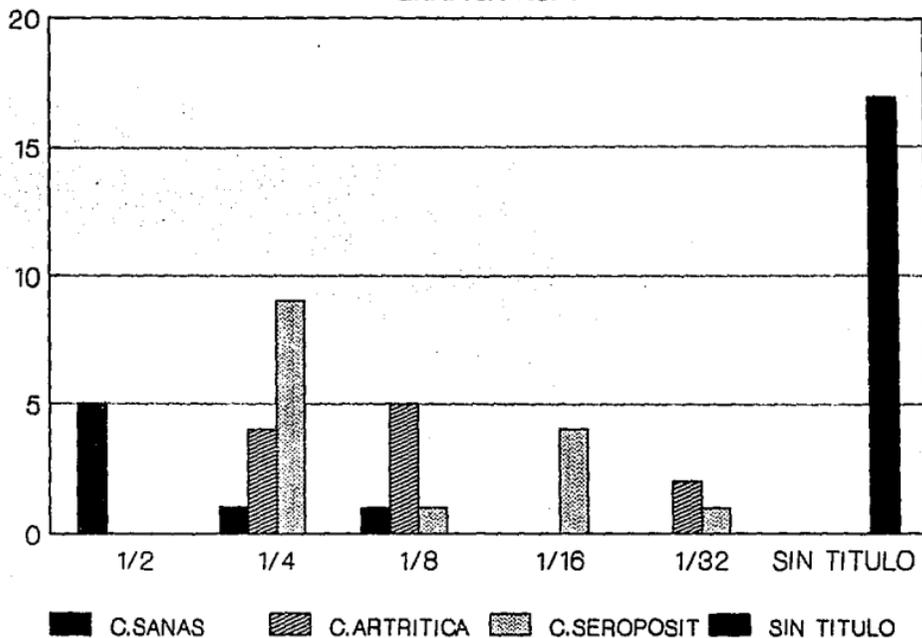
Primeramente las pruebas que se trabajaron fueron de hemoaglutinación, se consideró que los resultados de estas no son confiables puesto que hay variación en ellas al repetir las pruebas, por lo que hay que estandarizar.

Posteriormente se realizaron pruebas de hemoaglutinación indirecta con SSF, los sueros evaluados correspondieron a:

5 cabras seropositivas a AEC, con un promedio de rosetas T de 35%.  
10 sueros de cabra seropositivas a AEC, comprobado por pruebas de inmunodifusión doble en agar gel.  
10 sueros de cabra con síndrome artrítico, y 25 sueros de cabras aparentemente normales.

# PRESENCIA DE UN FACTOR REUMATOIDE EN CABRAS

GRAFICA No. 1



(n=50)

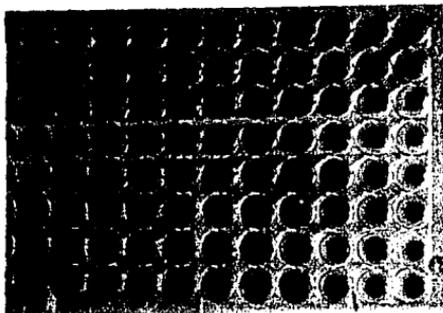


Figura 7.

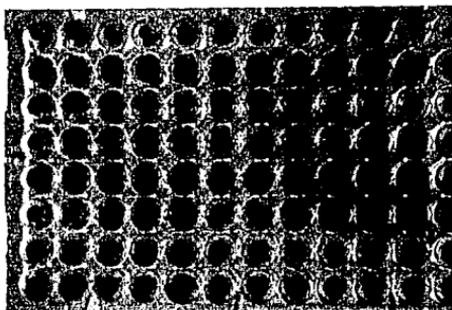


Figura 8.

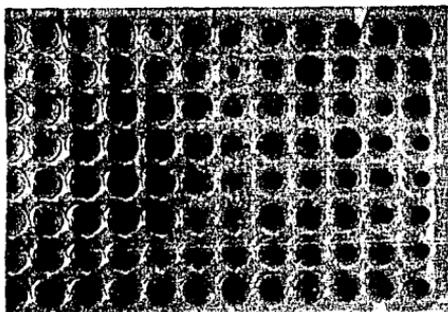


Figura 9.

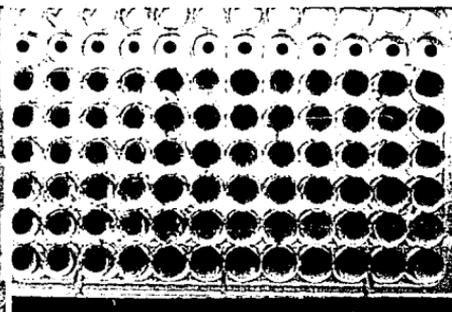


Figura 10.

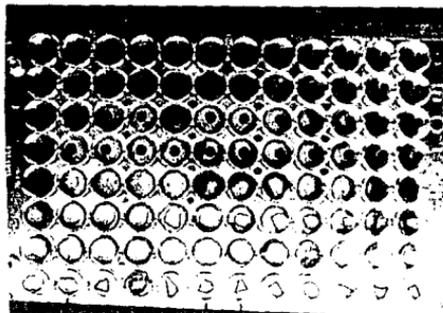


Figura 11.

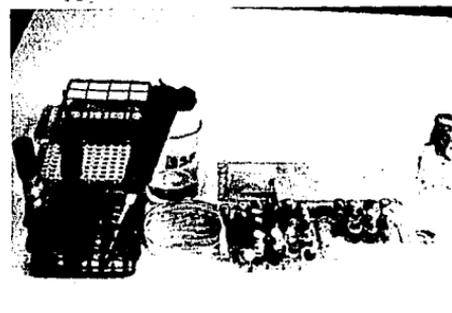


Figura 12.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 7 y 8. Microplaca de fondo en U, mostrando hemoaglutinación en la mayoría de los pozos lo que sugiere que estos sueros contienen el Factor Reumatoide.

Figura 9. Microplaca de fondo en U, manifestando sedimentación lo que sugiere que estos sueros no contienen Factor Reumatoide.

Figura 10. Microplaca de fondo en U, trabajada con suero de cabra con síndrome artrítico, observese la hemoaglutinación que existe en los primeros pozos y que sugiere la presencia de Factor Reumatoide.

Figura 11. Eritrocitos de carnero a diferentes concentraciones, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%.

Figura 12. Material para efectuar las pruebas de hemoaglutinación indirecta.

## CONCLUSIONES:

A través de la realización de las pruebas de hemoaglutinación, indirecta encontramos resultados repetibles, considerando que los animales aparentemente sanos tienen titulación baja porque en su suero parece no existir el Factor reumatoide que es un anticuerpo circulante en torrente circulatorio y que reacciona con los anticuerpos del propio animal.

En los sueros de cabras con síndrome clínico artrítico y en animales seropositivos a AEC, se observan títulos de 1/4 hasta 1/32 lo que nos sugiere que en estos animales, se detectaron anticuerpos circulantes que reaccionan con los propios anticuerpos y que van ocasionando destrucción de los tejidos articulares provocando la signología clásica de la enfermedad, estas titulaciones se pueden considerar ya que van aumentando de acuerdo al grado de daño en el animal, es decir los animales que tengan mayor cantidad de anticuerpos circulantes ( FR ) tendrán mayor titulación en una prueba de hemoaglutinación indirecta y consecuentemente mayor lesión articular.

La importancia de la aplicación de esta prueba a los animales con problemas articulares es que se podría detectar el Factor Reumatoide que interfiere en pruebas específicas tales como la prueba de ELISA, ya que esta prueba se utiliza para detectar antígenos ó anticuerpos puede ser realizada utilizando suero.

o líquido cerebroespinal, heces, leche o lavado nasal y ótico, además de líquido genital. El factor reumatoide es un problema para aquilatar la especificidad de IgM. La absorción de IgG del suero con proteína A, o bien la agregación de IgG, reduce grandemente resultados falsos positivos propios es Factor Reumatoide, que se presenta por la unión del antígeno utilizado en la propia prueba de ELISA, con el autoanticuerpo, que es el FR. Por lo que al eliminar al Factor Reumatoide mediante la purificación de sueros que lo presenten, se eliminan las IgG inespecíficas, lo que nos permite obtener resultados óptimos al efectuar pruebas de ELISA, disminuyendo así los falsos positivos.

En cuanto a las pruebas de hemoaglutinación hace falta estandarizar la técnica utilizando sueros absorbidos con la proteína A, es decir utilizando proteínas específicas IgM, para obtener resultados que confirmen la presencia del Factor Reumatoide.

### Recomendaciones y Sugerencias:

El presente trabajo tiene gran importancia tanto para los productores de cabras como para los MVZ, ya que los caprinos es una de las especies con mayor futuro de explotación, por lo que es muy interesante el estudio de las enfermedades que puedan alterar la producción de estos animales, así como estudiar las causas que las producen y si es posible un tratamiento efectivo. En este trabajo se trató de estandarizar una prueba para diagnosticar a los animales con problemas articulares encontrando que la prueba de hemoaglutinación indirecta resulta ser útil para la posible detección del factor reumatoide. Las sugerencias para los compañeros que retomen el trabajo sería que se trabajaran nuevamente estas pruebas pero con gamaglobulinas absorbidas aparentemente con proteína A, esto posiblemente ayudará a obtener resultados más claros, así mismo recomendaría que se estandarizara la prueba de hemoaglutinación que considero de gran valor para comparar resultados entre las dos pruebas y determinar cual es la más adecuada para su utilización, es muy probable que al eliminar proteínas inespecíficas por absorción esta técnica puede funcionar bien como la técnica de hemoaglutinación indirecta, lo que permitiría que el laboratorio de virología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán funcionara como una institución en la que se realizaran pruebas de diagnóstico.

## APENDICE.

### Solución PBS:

En una balanza analítica se pesaron las sales para mayor exactitud de peso, el material empleado fué el siguiente:

Solución A:	1 litro
NaCl	8.0 gm
KCl	0.2 gm
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.132 gm
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.1 gm
agua destilada	800 ml

### Solución B:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 gm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 gm
agua destilada	200 ml.

### Procedimiento:

1.-Disolver cada una de las sales en agua desmineralizada en el orden de la lista.

2.-Introducir la solución A y solución B separadas en autoclave a 15 lbs durante 15 minutos.

3.-Mezclar la solución A y solución B cuando estén tibias, vertir la solución B en A agitando lentamente.

4.-Refrigerar a 4 grados centígrados.

## BIBLIOGRAFIA

- Agraz, G.A. 1989. Enfermedades del aparato locomotor. Caprinotécnica 3 ed. Limusa. México.
- Butler, Jr. V.P. and Vaughan. 1964. Hemoagglutination by rheumatoid factor of cells coated with animal gamma globulins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116: 583-593.
- Cambell D.H. Gavey J.S. Cremer N. E. y Sussdorf, D.H. 1970. *Methods immunology*, 2 ed, W.A. Benjamin, Inc. pp. 183-224.
- Celer, V. Jr.; Zanoni, P. G; Peterhans, E. 1993. Comparison of various antigens in the diagnosis of caprine arthritis encephalitis virus using the ELISA test. *Med. Prha.* 38 (4): 237-244.
- García M. Índice Clínico no diagnóstico e profilaxia da artrite encefalite caprina AEC. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 43 (4) 263-270.
- González, L, Gelabert, J.L; Marco J.C. and Saez, O.C. (1987) Caprine arthritis encephalitis in the Basque Country, Spain. *The Veterinary Record.* 120: 102-109.
- Gay G. Valdivieso N. Tron F. y Enriquez O. Informe preliminar del aislamiento e identificación del virus productor de la artritis encefalitis caprina en México. *Memorias reunión de investigación pecuaria en México 1986.* p 215 UNAM-SARH México D.F. 1986.
- Harris, F. D. 1990 Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *Review. New Engl. J. Med.* 322: 1277-1289.
- Hsiung D.G. Henderson J. R. *Diagnostic Virology.* 1964. Yale University.

- Hudson, L. 1980. Practical immunology. Ed. Blackwell. pp 134.
- Nayaran O. Zink M. Gorrell M. McEnte M. Sharma D. Adams R. Lentivirus Induced Arthritis in animals. J. Rheumatol 1992 (suppl 32) 19: 25-32= USA.
- Nazara S. Trigo F. Madrigal V. Informe preliminar sobre la prevalencia de la artritis encefalitis caprina en México. Memorias Reunión de investigación Pecuaria en México. 1983 . p 550-552.
- Newkirk, M.M. 1992. Identification of IgG reumatoid factors by a novel method utilizing immunoblotting. Journal of immunological Methods 148: 93-99.
- Nielsen, O.L. 1992. Detcción of IgM reumatoid factor in canine serum using a standardized enzyme-linked immunosorbent assay.
- Peretz. G. Le. C.A.E.V. Revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. Revue Med. Vet. 1993 144, 2. 93-98.
- Petersson, G. 1990. Pathology and epidemiology of lentiviral Infeccions of goats. Maedi Visna related diseses. 119-127.
- Perrin G.G. and Polak, B. (1991) L-arthritis encephalite caprine . Point. Vet. (139): 713-718.
- Shewen, P.E. 1993. Ontario Veterinary College University of Guelph. Veterinary immunology course 93-355. lecture notas.
- Sousa, M. 1988. Le fer et I-immunite. La Recherche .200: 744-753.
- Stiles, P. Daniel. al et. 1983. Inmunologia básica y clínica Ed. Manual Moderno. México.
- Tizard , 1992. Inmunologia Veterinaria. Ed Interamericana . México.

Thoren, T. Kerstin 1990. A comparative Study of Different methods for Measurement of Rheumatoid Factor in Dog Serum. Journal Vet. Med. A 37: 430-438.

Ungar, W. H. 1991 Circulating immune complexes in bovine leukemia virus (BLV) infected cattle. Veterinary immunology and immunopathology 34: 173-179.