



**AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA ARTRITIS
ENCEFALITIS CAPRINA A PARTIR DE
CABRAS SEROPOSITIVAS Y ESTANDARIZACIÓN
DE UNA TÉCNICA DE PCR PARA SU DIAGNÓSTICO**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

Mara Daltabui Test

Asesor

Dr. Álvaro Aguilar Setién

México, D.F.,

2001

10303



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1.- Resumen	2
2.- Introducción	4
➤ Distribución de la enfermedad de artritis encefalitis caprina	4
➤ Etiología	5
➤ Cuadro clínico	7
➤ Respuesta inmune	9
➤ Vías de transmisión	12
➤ Diagnóstico	14
➤ Detección del Virus	16
➤ Diagnóstico diferencial	17
➤ Tratamiento	18
3.-Objetivos	19
4.-Material y Métodos	20
➤ Animales	20
➤ Pruebas de inmunodifusión para la detección de animales positivos.	20
➤ Aislamiento viral	21
➤ Identificación del virus por PCR.	23
➤ Aislamiento viral.	26
5.-Resultados	28
➤ Aislamiento Viral:	28
➤ Diagnóstico por PCR.	29
➤ Reaislamiento viral:	30
6.-Discusión	32
7.-Literatura citada	35

RESUMEN

En México desde la década de los ochentas existen reportes clínicos y serológicos que sugieren la presencia del virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC); sin embargo a la fecha no existen reportes del aislamiento y identificación absoluta del virus. El presente trabajo tuvo por objeto aislar e identificar al virus a partir de animales enfermos en nuestro medio. Con este fin se seleccionó un hato de cabras lecheras con historia clínica de la enfermedad, localizado en el Km 28.5 de la carretera federal a Cuernavaca (C.P.I.P.S.A, UNAM). De dicho hato se seleccionaron dos cabras con signos de artritis, que además resultaron seropositivas al VAEC por la prueba de inmunodifusión doble. Para el aislamiento viral, de los animales seleccionados se obtuvieron células monocíticas del torrente circulatorio (mediante gradiente de Ficoll- Hypaque), las cuales fueron co-cultivadas con células de membrana sinovial de cabra (CMSC). Cuando se constató la aparición de efecto citopático (ECP) en las CMSC, la identificación del VAEC se llevó a cabo detectando al provirus mediante una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la ayuda de iniciadores o "primers" que amplificaron una región específica del gen gag del VAEC (iniciador 1: 5'caa atg ggg atg aga cct g 3'(superior) 3'act ttc cgt aac cgt ata 5' (inferior), primer 2 formado por: 5'ggg gat gag acc tga aga a3' (superior) 3'act ttc cgt caa cgg tat a 5' (inferior)). Con el objeto de reproducir los postulados de Koch, dos cabras adultas seronegativas al VAEC fueron inoculadas con el virus aislado. Los animales

infectados experimentalmente fueron clínicamente observados y se procedió a aislar e identificar al VAEC siguiendo la metodología descrita.

Las CMSC co-cultivadas con monocitos de las cabras seleccionadas originalmente, mostraron ECP a las 4 semanas post-infección que consistió en la formación de células gigantes multinucleadas (sincicios). Mediante las pruebas de PCR, se obtuvieron productos de amplificación de 249 pares de bases, identificando de esta manera al virus aislado como VAEC. Una de las cabras infectadas experimentalmente desarrolló poliartritis cinco semanas después de la infección. De ambos animales se logró aislar e identificar al VAEC mediante PCR. Se concluye que el VAEC se encuentra presente en el territorio nacional.

A causa de la globalización de los mercados y el aumento en el intercambio de ganado caprino, la identificación temprana y su reporte será importante para prevenir la diseminación de la enfermedad.

La prueba de PCR puede ser utilizada para el diagnóstico específico de cepas virales que se encuentren presentes en México.

INTRODUCCION

Actualmente existen 696,514,300 cabras en el mundo. Aproximadamente el 6% se encuentra en países desarrollados y 94% en países en desarrollo; de las cuales 56.5 % están en Asia, 32.4% en África, 4.0% en Sudamérica, 2.8 % en América del Norte y Central, 2.7% en Europa, 1.3% en la desaparecida URSS y 0.3% en Oceanía (16).

Aun con su gran resistencia, las cabras son susceptibles a enfermedades como la artritis encefalitis caprina (AEC), la cual es un padecimiento viral que ha emergido con gran importancia en muchos países, sobre todo en aquéllos dedicados a la producción láctea y que utilizan básicamente razas de origen europeo (1).

DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA

El virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) fue reconocido a principio de los años 70s (2) y aislado por primera vez en 1980 en los Estados Unidos por Crawford y colaboradores (3) , a partir de membrana sinovial de cabras afectadas con artritis. Posteriormente, el virus fue también aislado en Nueva Zelanda e Inglaterra y en muchas otras partes del mundo (3).

En México se han realizado diversos estudios serológicos para determinar la seroprevalencia de la AEC, utilizando la prueba de inmunodifusión y estos estudios indican que los animales importados son seropositivos al virus de AEC (9.10) Así por ejemplo, en un estudio de un total de 1,627 sueros de cabras

criollas provenientes de 12 estados del país, ninguno presentó anticuerpos contra el virus; sin embargo, 857 sueros de cabras lecheras provenientes en su mayoría de los Estados Unidos, 232 (27.1%) fueron positivos; este estudio comprendió cabras de la zona norte, centro y sur del país (11).

La AEC, que también es conocida como “rodilla grande”, leucoencefalomielitis - artritis de las cabras, Leucoencefalomielitis viral, infección por retrovirus caprino o artritis encefalitis caprina viral; es una enfermedad que afecta a diversos aparatos y sistemas de los caprinos domésticos a todas las edades y probablemente a todas las razas; se manifiesta en forma persistente durante toda la vida del animal infectado (5,6,7,8,9).

ETIOLOGÍA

La AEC es producida por un virus ARN que se clasifica dentro de la familia Retroviridae y la subfamilia lentivirinae, caracterizados por causar enfermedades crónicas degenerativas de diversos sistemas y órganos. Otros retrovirus que se encuentran en esta familia son el virus de la anemia infecciosa equina, el de maedi-visna o neumonía progresiva ovina (NPO) y virus que causan inmunodeficiencias, como el virus de la inmunodeficiencia humana, del simio, felina y bovina. Los retrovirus poseen una gran capacidad para mutar, esto explica en parte las dificultades del sistema inmunológico para detectarlos y eliminarlos, así como los problemas para desarrollar vacunas contra ellos (12,13,14,15,16,17,18)

Se postula que la morfogénesis del virus de la AEC es similar a la del virus de la NPO ya que tiene proteínas estructurales similares, con reacción cruzada de los determinantes antigénicos donde está involucrada la proteína gp135 y p28, además de la similitud de ambos virus por replicarse en líneas celulares de ovino. Sin embargo, los experimentos de hibridación con ácidos nucleicos indicaron que los virus de la AEC y de la NPO son diferentes, ya que comparten sólo el 20% de la homología de secuencia entre sus genomas; no obstante, son indistinguibles en reacciones de inmunodifusión donde está involucrada la glicoproteína de superficie de un peso molecular de 135,000 Daltons (gp 135) y la proteína interna, de un peso molecular de 28,000 Daltons (p 28) (12,19).

El virión es una partícula envuelta que mide entre 80 y 100 nm de diámetro . La envoltura viral se deriva de la membrana de la célula infectada durante el proceso de gemación. Contiene en su núcleo una cadena sencilla de ácido ribonucleico, con un peso molecular de aproximadamente 5.5×10^6 Daltons y una densidad de 1.14 a 1.16 g/ml en sacarosa; además, posee una transcriptasa reversa. El genoma es diploide (20). Se han reportado diferentes cepas del virus de la AEC (21,22,23,24,25).

Este virus está compuesto por aproximadamente 60% de proteína, 35% lípidos, 3% carbohidratos y 1% de ARN (14,26). Está formado por 3 genes estructurales, gag, pol y env, los cuales codifican las proteínas del virus (figura1).

FIGURA 1
PROTEÍNAS QUE CODIFICAN LOS GENES DEL VIRUS DE LA AEC

GENES	PROTEÍNAS QUE CODIFICAN	PESO MOLECULAR
gag	Cápside Matriz Nucleoproteínas gp28 respuesta humoral y está involucrada en la presentación de artritis	28,000 Daltons 16,000 Daltons 14,000 Daltons
pol	Enzimas virales: ribonucleasa H, integrasa viral, proteasa viral y transcriptasa reversa. Integrasa Transcriptasa reversa	32,000 Daltons 66,000 Daltons
env	Glicoproteína de superficie gp 135 que contiene los receptores para la célula husped Glicoproteína transmembranal gp 50 o 40 que facilita la fusión celular.	135,000 Daltons 50,000 Daltons

Fuente: Putney y Montelaro, 1990; Narayan y cols, 1992; Pétursson y cols, 1992, Clavijo y Thorsen, 1995a; Perry y cols, 1995.

Además, cuenta con dos genes accesorios que codifican la regulación de proteínas, tat y rev y, un gen vif antes llamado Q, el cual es esencial para una rápida y eficiente replicación del virus (27). También se ha demostrado que el gen codificador de la envoltura (env) gp 135 esta ligado a la adsorción del virus (28).

CUADRO CLÍNICO

El CAEV se caracteriza por producir una infección lenta, en ocasiones subclínica. El periodo de incubación varía de días, o meses, hasta años. Se

estima que la enfermedad en su forma clínica ocurre sólo en un 30% a 40% de los animales en un hato infectado (25,29).

Los signos clínicos en AEC, dependen de la edad del animal, ya que la enfermedad produce poliartritis en cabras adultas, mientras que en cabritos entre 2 y 4 meses de edad produce una leucoencefalitis. Los signos clínicos en cabritos incluyen fiebre moderada en el 60% de los casos y lesiones nerviosas que producen signos de depresión, ceguera, reflejos pupilares anormales, opistótonos, torticolis, vueltas en círculos y disfagia. Los signos en cabras adultas mayores a un año de edad incluyen generalmente cojeras y articulaciones del carpo aumentadas de tamaño. El cuadro articular comienza por lo general en forma gradual, los animales pierden peso, con signos de dolor articular sobre todo en climas fríos. Se aprecia distensión de las bolsas supraespinosas. Las articulaciones afectadas más severa y frecuentemente son las carpales, seguidas de las tarsianas y de la femoro – tibia- patelar. En casos severos ocurre restricción del movimiento debido al dolor y desviación de la articulación, siendo posible observar algunas cabras deambulando apoyadas en sus carpos.

El líquido sinovial varía de acuerdo al estadio de la infección. En los casos agudos es de color café-rojizo, debido a la presencia de eritrocitos y con una viscosidad disminuida. La población celular fluctúa de 1,000 a 20,000/mm, conteniendo más de un 90% de células mononucleares, donde predominan linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Los datos hematológicos y de química sanguínea son normales.

RESPUESTA INMUNE

Durante la infección inicial de los monocitos inmaduros (promonocitos) y monocitos maduros, la replicación viral es restringida pero durante la diferenciación de monocitos infectados a macrófagos ocurre un incremento de la expresión viral, la velocidad de replicación del virus se incrementa de 50 a 1000 veces cuando maduran los monocitos a macrófagos tisulares y por lo consiguiente en las respuestas inflamatorias. Esta regulación de la expresión del virus de AEC durante la diferenciación del monocito es un paso esencial para la patogénesis de la enfermedad. El incremento en la replicación viral conduce a la secreción de una cantidad considerable de interferón γ (IFN γ) por los linfocitos T y células asesinas naturales lo que induce a la expresión del complejo principal de histocompatibilidad tipo I y II, de antígenos de la superficie viral, en macrófagos tisulares infectados y finalmente, a la producción de citocinas y otros mediadores inflamatorios por el sistema inmune. Las citocinas son moléculas inmunorreguladoras con actividad múltiple, incluyendo la estimulación y proliferación de fibroblastos y células epidermales, maduración de linfocitos T y activación de linfocitos B. La interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral son citocinas producidas en macrófagos (derivados de monocitos) La infección por el virus a los monocitos/macrófagos ocasiona variaciones en la producción y actividad de las citocinas, por lo que causa una desregulación en la respuesta inmune que puede contribuir a la patogénesis de la AEC. (30,31).

El interferón secretado por el incremento en la replicación viral, inhibe la proliferación y maduración de monocitos, además causa una dramática reducción en la fusión del virus con las células del hospedador, en la que está involucrada la gp 50 y debido a ello reduce la eficiencia de diseminación del virus. Sin embargo, el interferón en macrófagos incrementa la expresión antigénica, además induce la secreción de prostaglandina E₂ (PGE₂) por los macrófagos, la cual tienen funciones inmunosupresoras, incluyendo la inducción de células del fenotipo supresor-citotóxico y la supresión de la proliferación de células T (32).

Como se mencionó anteriormente el interferón tiene un potente efecto en la inhibición de la fusión de célula a célula. La resistencia a la fusión puede ser debida a un mecanismo que involucra la estabilización que induce el interferón a las membranas plasmáticas. Se sabe que si hay fusión celular esto conduce a la formación de células gigantes multinucleadas (sincicios), siendo esto característico del efecto citopático que causan los lentivirus; este mecanismo está mediado por la glicoproteína de superficie del virus. En un animal vivo la producción local de interferón puede inhibir la transmisión del virus de célula a célula; esto puede explicar por qué raramente se encuentran células multinucleadas en los tejidos blanco inflamados de rumiantes infectados con lentivirus (32).

Estudios más recientes encontraron que el incremento en la replicación viral está regulado por la porción repetitiva terminal larga (LTR) del VAEC, la cual es activada en los monocitos inmaduros por el IFN γ (33).

La gp 135 y la p 28 revisten un gran interés por su importancia en la respuesta inmune humoral del hospedero y por la inducción de la artritis en cabras infectadas con el virus, como resultado de un proceso inmunopatológico por la expresión de éste. Aunque estudios recientes han confirmado que la proteína de transmembrana también juega un papel importante en la respuesta inmune y desarrollo de la artritis (10,34) .

Se sugiere que la restricción de la expresión del virus en cabras asintomáticas es mediada primariamente por linfocitos T citotóxicos y una respuesta inmune dominante de tipo 1 y en cabras artríticas se encuentra una respuesta inmune tipo 2, la cual no es propicia para el control de la replicación del virus además de los cambios antigénicos en los epítopes reconocidos por linfocitos T citotóxicos como sucede con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (35, 36, 37,38).

Cabras infectadas experimentalmente con VAEC producen una respuesta humoral, usualmente detectada en los primeros 40 a 60 días usando ELISA, aunque se presentan algunas respuestas tempranas a los 21 días, alcanzando un título máximo entre 49 y 77 días, con una disminución progresiva pero quedando presente por lo menos 9 meses. Se sabe que estos virus usualmente no inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, pero sí una fuerte producción de anticuerpos precipitantes (39). En cabritos con pocas semanas de nacidos, cuando la inmunidad pasiva desaparece, los anticuerpos contra las proteínas codificadas gag, son los primeros que se detectan en animales infectados, seguidos por anticuerpos contra proteínas codificadas env

por lo que los anticuerpos contra la proteína de transmembrana son detectados después de los anticuerpos contra la p25 (34).

Se ha comprobado que la seroconversión de animales seronegativos a animales serologicamente positivos, puede ser demorada por muchos meses después de la infección natural con el VAEC. Considerando que en muchos hatos caprinos se tiene entre 65 y 81% de animales seropositivos al VAEC; se puede pensar que todos los animales de un hato en un determinado tiempo van a presentar la infección (40).

VÍAS DE TRANSMISIÓN

La vía de transmisión más importante es la oral, a través de la ingestión de calostro, debido por una parte a la importante concentración de células de la línea monocito/macrófago susceptibles de hospedar al virus y, por otra parte, a la gran permeabilidad de la mucosa intestinal del cabrito recién nacido. Los anticuerpos presentes no proveen protección para el cabrito. Otra fuente importante de transmisión es la leche (después de que deja de ser calostro) de hembras infectadas, por lo que el virus infecta al cabrito durante el amamantamiento (16,40,41). No hay datos que indiquen la transmisión transplacentaria (periodo fetal), y si es que ocurre, es un suceso raro. El VAEC generalmente se encuentra como un provirus RNA en una pequeña fracción de monocitos/macrófagos circulando en sangre, siendo del 3% en cabras menores de 5 años y en cabras mayores de 5 años el 8%, por lo que el paso de pequeñas cantidades de sangre probablemente represente un bajo riesgo de

transmisión (17). Otras probables formas de transmisión son contacto con adultos infectados, exposición a secreciones como saliva, heces, secreciones urogenitales (se ha demostrado la presencia del virus en células del moco estral) o del aparato respiratorio que contaminen el alimento o agua, aerosoles, equipo, agujas contaminadas con sangre, lesiones cutáneas y tatuajes; siendo esto más probable en poblaciones caprinas con alta densidad, a lo que se agregan factores como estrés e inmunosupresión (16,17, 25, 41). También se sabe que existe transmisión entre hembras en lactación a partir de la utilización de la máquina ordeñadora, por el deficiente manejo de la misma, desinfección incompleta de las pezoneras y las manos del ordeñador, aplicación de inyecciones sin cambio de aguja entre cada animal y principalmente por ordeñar cabras infectadas y cabras sanas al mismo tiempo (21, 25, 43). Es posible encontrar el VAEC en el espermatozoides de machos infectados, pero parece que el riesgo de transmisión es extremadamente reducido, tanto en las condiciones de monta natural como en las de inseminación artificial. Las conductas durante el apareamiento son una fuente importante de infección, como el lamido del ojo, el olfateo y el consumo de orina del macho así como el mordisqueo y succionamiento de los pezones (25,43). Otra posible vía de infección es el contacto con loquios postparto de hembras infectadas, debido a que se han detectado células infectadas con el VAEC utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (25).

Algunos autores sugieren que la transmisión sexual puede ser posible debido a que el virus se replica preferentemente dentro de monocitos-macrófagos y son los responsables de la transmisión del virus, de esta manera

elude al sistema inmune, por lo que los macrófagos infectados de la superficie de las mucosas pueden transferir el virus a un animal susceptible (40, 44, 45).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico representa un problema complejo debido al largo período de incubación de la enfermedad, ya que no todos los animales que se encuentran infectados con el VAEC presentan anticuerpos o lesiones clínicas. En la figura 2 se citan las pruebas diagnósticas que pueden servir para esta enfermedad (9).

FIGURA 2
PRINCIPALES PRUEBAS DIAGNOSTICAS PARA LA AEC

PRUEBA	DETERMINACIÓN
1) Examen del líquido sinovial	Observación de una monocitosis y linfocitosis.
2) Poblaciones de linfocitos	Aumento del % de linfocitos T y B.
3) Microscopia electrónica	Morfología e identificación viral.
4) Activación policlonal de células B	Detección de anticuerpos en animales aparentemente seronegativos.
5) Inmunodifusión	Detección de anticuerpos contra la gp 135 y p 28.
6) ELISA	Detección de anticuerpos.
7) Inmunotransferencia	Detección de anticuerpos contra la gp 28, p 70 y gp 135 y Ácido nucleico del virus.
8) Inmunoperoxidasa	Detección de antígenos gp 135 y p 28 utilizando anticuerpos peroxidados contra la IgG caprina.
9) Radioinmunoensayo	Detección de antígenos gp 135 y p 28 Utilizando anticuerpos marcados con yodo.
10) Transcriptasa inversa	Detección de antígeno a través de la actividad de la aranscriptasa reversa del virus.
11) Reacción en cadena de la polimerasa	Detección del ácido nucleico del virus y producción de antígenos recombinantes para usarlos en otras pruebas.
12) Hibridación de slot blot	Determinación de acido nucleico del virus y diferenciación de cepas.
13) Quimioluminiscencia	Detección de antígeno utilizándola en la Prueba de hibridación de slot blot.
14) Cultivo celular	Detección del virus por efecto citopatico, inmunofluorescencia, microscopia electrónica

Detección del Virus

1.- Cultivo celular

Para el aislamiento del VAEC se utilizan órganos de cabras adultas con lesiones clínicas o el macerado de órganos como bazo, glándula mamaria, nódulos linfoides, médula ósea, membrana sinovial, plexo coroideo, pulmón y SNC que se inoculan a células susceptibles (23).

Otra forma de aislamiento viral es a partir de co-cultivos de células de la línea monocito/macrófago obtenidos de sangre periférica (se sabe que la persistencia de macrófagos infectados en sangre periférica es del 3% y del 8% en cabras mayores de 5 años) y sembradas en cultivos tisulares (46). También se puede realizar el aislamiento a partir de macrófagos alveolares, calostro, leche y líquido sinovial (23,33,40).

Para la obtención de antígeno del virus se han utilizado cultivos de membrana sinovial caprina, células de testículo y células de músculo fetal caprino como substratos para la replicación viral (47).

2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta prueba ha sido evaluada a partir de células mononucleares extraídas de leche y de sangre, detectando en éstas la presencia del provirus de la AEC, para lo cual se requiere la presencia de por lo menos el ADN de 15,000 células, con una sensibilidad y especificidad de 97% (40,45)

También se ha utilizado esta prueba para detectar el virus en cultivos celulares infectados pudiéndose detectar el ADN proviral en 100 ng de ADN de células de membrana sinovial de cabra, después del primer día de infección. Además puede detectar el ADN proviral en aproximadamente 15 células infectadas o 188 partículas virales (24).

La PCR provee un método rápido, sensible y específico para la detección de ácidos nucleicos virales aun en animales seronegativos (24).

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Hay que considerar las enfermedades que producen lesiones en el sistema nervioso central de cabras jóvenes y en éstas se incluyen traumatismos en columna vertebral, abscesos en vértebras, listeriosis, toxoplasmosis, enterotoxemia, polioencefalomalacia y deficiencia de cobre. La forma artrítica de la AEC debe diferenciarse de la artritis bacteriana que puede ser producida, entre otras, por bacterias de los géneros : *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Erysipelothrix*, *Brucella*, *Mycoplasma* y *Chlamydomphila*, así como de otras condiciones sépticas, nutricionales y traumáticas. La neumonía producida por la AEC, debe ser diferenciada de aquellas causadas por otros virus, neumonías bacterianas, parasitarias y por *Micoplasmas* (9, 48,49).

TRATAMIENTO

El tratamiento contra la AEC no ha sido exitoso y sólo es de naturaleza sintomática. Las cabras pueden ser tratadas con antibióticos de amplio espectro para evitar complicaciones por bacterias oportunistas. La forma artrítica de la AEC puede ser mejorada transitoriamente con una buena alimentación, poniendo una capa más gruesa de cama y administrando sustancias antiinflamatorias como los corticosteroides; también puede recurrirse a la administración de complejo B como tratamiento paliativo. Sin embargo, los animales tratados recuperan sus actividad física normal y esto exacerba el daño en las articulaciones inflamadas (50).

OBJETIVOS

1. AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE MEMBRANA SINOVIAL DE CABRA A PARTIR DE CÉLULAS MONONUCLEARES TOMADAS DEL TORRENTE SANGUÍNEO DE ANIMALES SEROPOSITIVOS.
2. INFECTAR ANIMALES SERONEGATIVOS A PARTIR DEL SOBRENADANTE DE CULTIVOS INFECTADOS DE MEMBRANA SINOVIAL DE CABRA.
3. AISLAR EL VIRUS DE LA ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA A PARTIR DE LOS ANIMALES INFECTAD EXPERIMENTALMENTE.
4. ESTANDARIZAR E IMPLANTAR LA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

El muestreo serológico se efectuó en el C.E.P.I.P.S.A (Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal) , de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, localizado en la carretera federal a Cuernavaca en el Km 28.5

El centro, que se encontraba libre del VAEC empezó a importar animales de la zona norte del país y de EUA en 1995, tiempo después los animales adquiridos empezaron a presentar signología típica de la enfermedad y en pruebas de inmunodifusión resultaron positivas .

El grupo muestreado en este trabajo lo formaron 20 hembras de raza Nubia con una edad promedio de 2 años. Estos animales se encontraban en distintas fases de la enfermedad.

Dentro de los signos encontrados, los más frecuentes fueron pérdida de peso, neumonía y artritis en carpos y tarsos.

2.- Pruebas de inmunodifusión para la detección de animales positivos.

Para la obtención de los sueros se sangraron los animales por la vena yugular recolectando 15 ml de sangre sin anticoagulante utilizando agujas y tubos para extracción sanguínea si vacío estériles y su porta agujas correspondiente. El segundo paso fue el de centrifugar la sangre a 1000 g por 10 min eliminando el

coágulo y obteniendo el suero, éste a su vez fue alicuotado en microtubos de polipropileno de 1.5 ml y congelando a -20C hasta su procesamiento. A cada tubo se le anotó el número del animal correspondiente. Se utilizaron reactivos comerciales de inmunodifusión para el diagnóstico de la artritis encefalitis caprina (Veterinary Diagnostic Technology Inc.: Caprine Arthritis Encephalitis / Ovine Progressive Pneumonia Antibody test Kit.). Las pruebas de inmunodifusión se prepararon en cajas de Petri de 5cm de diámetro las cuales fueron llenadas con 5 ml de agarosa al 1% . Una vez solidificada la agarosa se hicieron siete perforaciones de un diámetro de 0.5mm , una central y las seis restantes alrededor de la perforación central , equidistantes una de otra a 0.5 mm, una central y las seis restantes alrededor de la perforación central, equidistantes una de otra a 0.5 mm. En el pozo central se depositó el antígeno (50 ul), y en los otros pozos se colocaron: el suero testigo positivo (50 ul), el suero testigo negativo (50 ul), y en forma alternada los sueros de los animales en estudio.

Al terminar de colocar las muestras, se dejaron incubar en cámaras húmedas durante 48h a 4C . Al final de este periodo se observaron las pruebas con luz indirecta a bien de constatar la formación de líneas de precipitación

3.- Aislamiento viral

Para el aislamiento viral se utilizaron cultivos celulares de membrana sinovial de cabra (CMSC) donados por el Dr. Andrés de la Concha – Bermejillo (Texas A & M) . Las CMSC fueron cultivadas en botellas de 25 cm² utilizando medio BHK-21 con 10% de suero fetal bovino (SFB) adicionado de piruvatos, glutamina ,

penicilina – estreptomycin y gentamicina . Al obtener una monocapa completa se le cambió el medio de cultivo por medio BHK-21 con 2% de SFB . Los cultivos se mantuvieron a 37C con 5% de CO₂ .

El aislamiento viral se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por de la Concha-Bernejillo (1997).

Se recolectaron 15ml de sangre con anticoagulante (EDTA) por punción de la vena yugular utilizando agujas y microtubos de polipropileno de 1.5ml de los animales que resultaron positivos a las pruebas de inmunodifusión y con signos de artritis. Los tubos se centrifugaron a 2,500 g por 15 min. Con una pipeta Pasteur se tomó el plasma y se descartó. Con otra pipeta se tomó la capa blanca y se mezcló con solución de Hanks (Gibco) (por cada 10 ml de sangre se utilizaron 5 ml de solución de Hanks.) A un tubo estéril de 15 ml se le adicionaron 5ml de Ficoll-Hypaque (Sigma) más la mezcla de la capa blanca obtenida con la solución de Hanks . Se centrifugaron los tubos a 1500 g por 30 min. Al terminar de centrifugar se obtuvo de la interfase la capa de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) y se transfirieron a otro tubo con 10 ml solución de Hanks.

Los tubos se centrifugaron a 1,000 g por 10 min. Para lavar las PBMC Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se volvió a suspender en 10 ml de solución de Hanks y se centrifugó a 800 g por 10 min. Las células se suspendieron en 5ml de solución de Hanks. Finalmente las células se contaron en una cámara de Neubauer.

A los monoestratos confluentes de CMSC de botellas de 25cm² se les adicionaron 5 X 10⁶ PBMC.

El co - cultivo se mantuvo por 3 días. Al cuarto día se eliminaron las PBMC no adheridas dejando sólo las CMSC. Cada quinto día se revisaron las botellas para observar efecto citopático y cada séptimo día se cambió el medio de cultivo a medio de mantenimiento (BHK-21 2% SFB.)

4.- Identificación del virus por PCR.

a) Extracción del ADN celular:

Los cultivos celulares que presentaban sincicios fueron tripsinizados y distribuidos en viales de 1.5 ml (5×10^6 células) . Posteriormente se les agregó 1 ml de tapón de extracción (50 nM KCL, 10 mM Tris-CHL ,pH 8.3, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mg/ml gelatina, 0.45%NP40, 0.45% Tween 20) y 6ul de proteinasa K (Gibco) y fueron puestos en baño María a 56C por 1hr. Al finalizar la incubación en baño María se metieron los viales en agua a punto de ebullición por 5 min a fin de parar la reacción y se guardaron a 4C.

b) Iniciadores utilizados:

Los criterios que se tomaron para el diseño de los iniciadores fueron los siguientes:

I.- Utilizar como base la región más conservada del virus (gen gag codón de iniciación ATG 512 a codón de finalización TAA) .

II - Que los iniciadores tuvieran una longitud de 18 a 19 oligonucleótidos cada uno.

III.- Una diferencia de temperaturas entre iniciadores (superior e inferior) menor a 1.5 C

IV- Una concentración de guaninas y citocinas de alrededor del 50%.

El genoma viral se obtuvo del Ncbscape.

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=n&from=0>

Se empleó el programa OLIGO para poder descartar iniciadores que tuvieran sitios falsos de unión por debajo del umbral de error y que tuvieran la posibilidad de unirse entre si. Se encontraron dos pares de iniciadores del gen gag que cumplieron con los requisitos anteriores.

El primer par formado por:

5'CAA ATG GGG ATG AGA CCT G 3'superior

3'ACT TTC CGT AAC CGT ATA 5'inferior

El segundo par formado por:

5'GGG GAT GAG ACC TGA AGA A 3'superior

3'ACT TTC CGT CAA CCG TAT A 5'inferior

Como testigos se utilizaron iniciadores que detectan el virus de la neumonia progresiva ovina, secuencia donada por el Dr. Andrés de la Concha - Bermejillo (Universidad de Texas A & M).

5'CCA GGG AAT CCA ATG CTA GTA AAG C 3'superior

3'CCT GGC CTT AAT GCT TGT GCT AAC A 5' inferior

c) Reacción de amplificación:

Para las reacciones de amplificación se utilizó una mezcla (PCR), que contenía la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*), el amortiguador 10X, los nucleótidos, los iniciadores superiores e inferiores, y agua ultra pura (UP). Estos reactivos se

guardaron independientemente en congelación. Para las amplificaciones se agregaron los reactivos en el siguiente orden: Mezcla (PCR), ADN y por último el aceite mineral para evitar la evaporación. Para los testigos negativos de ADN se utilizaron células de membrana sinovial de cabra sin infectar y para los controles negativos de PCR se utilizó la mezcla sin DNA. Las concentraciones finales de las amplificaciones fueron las siguientes:

- UPH₂O 12 ul por muestra.
- Buffer (10X) (Boeringer) 10 ul por muestra.
- dntp's 10 ul (Bioselec) por muestra.
- Oligo A 1 ul por muestra.
- Oligo B 1 ul por muestra.
- Taq polimerasa (Bioselec) 1 ul por muestra.
- ADN 15 ul por muestra.

El programa de PCR utilizado para las amplificaciones fue el siguiente:

- 95C /5min
- 96C/4min 1 ciclo
- **94C/31 seg**
- **55C/31 seg 30 ciclos**
- **74C/31 seg**
- 74C/10 min 1 ciclo

El aparato empleado para las amplificaciones fue un termociclador marca Biorad, Hercules, California, EUA

El volumen final de las amplificaciones fue de 50 μ l. Al término de las reacciones de PCR, los tubos se guardaron a 4C.

d) Análisis de los productos de reacción:

1.- Por cada tubo de reacción de PCR se utilizó un microtubo de polipropileno estéril para hacer la mezcla de corrimiento. A cada microtubo se les agregaron, 40 μ l de la reacción de PCR y 10 μ l de Azul de bromofenol (50% glicerol, 49.5 ml UPH_2O , 0.5 ml 1M PBS, 0.2 g azul de bromofenol) . Se prepararon geles de agarosa al 1% y se tñieron con bromuro de etidio a una concentración final de 10mg/ml . En los geles se colocó un marcador molecular comercial de peso 123 pb (Gibco). Se realizaron las electroforesis a 100 V en tapón TBE 1X (Tris-base, ácido bórico, EDTA, UPH_2 , pH 8.0) hasta que el colorante alcanzó el final del gel. Los geles se revisaron con luz ultravioleta en un transluminador y se fotografiaron.

5.- Aislamiento viral.

Después de aislar el virus in vitro y haber confirmado por PCR que efectivamente era el virus de la artritis encefalitis caprina, se usaron 2 cabras Toggenburg de 4 meses de edad libres de la enfermedad para el aislamiento viral in vivo, estos animales se mantuvieron en cuartos de aislamientos en el Instituto Nacional de Investigación Forestal y Agropecuario (INIFAP).

El manejo que se les dio antes de empezar con el aislamiento fue una cuarentena de 20 días y una desparasitación con Ivermectina (1.5 ml/50 kg de peso).

A estas dos cabras se les inoculó por vía intravenosa (vena yugular) 30 ml de sobrenadante (medio BHK-21 más VAEC1.5 X 10⁵ TCID₅₀). Cada 7 días se tomaron muestras de sangre para las pruebas de inmunodifusión.

Cuando se detectó por inmunodifusión la seroconversión de las cabras, se recolectaron 15 ml de sangre y se siguió el protocolo de aislamiento e identificación viral.

RESULTADOS

Aislamiento Viral:

El aislamiento del VAEC, de los animales seropositivos se pudo realizar con éxito, inoculando a los cultivos celulares una concentración promedio de 5×10^6 células/ml de células mononucleares, siendo esta concentración la adecuada para causar efecto citopático (Foto1)

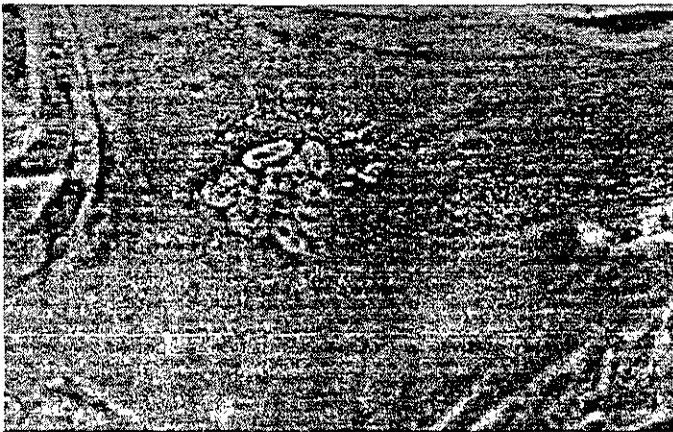


Foto 1
Co-cultivo de células de membrana sinovial de cabra y células mononucleares.
presencia de sincicios (250X) .

Se pudo observar efecto citopático en un tiempo mínimo de 4 semanas, caracterizado por formación de células gigantes (sincicios).

Diagnóstico por PCR:

Se logró la estandarización de una técnica de PCR para el diagnóstico de la artritis encefalitis caprina en México, amplificando el gen gag , la región más conservada del genoma viral.

Para la amplificación se utilizaron oligos específicos para el gen gag, obteniendo productos de amplificación de 249 pb, confirmando así la existencia del virus (foto 2).

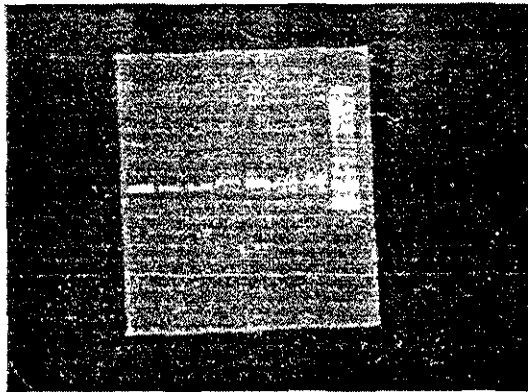


Foto 2
Detección del virus de la artritis encefalitis caprina por PCR, carriles 1 al 7 VAEC, carril 8
marcador molecular

Los testigos que se utilizaron fueron (foto 3):

- 1- ADN extraído de CMSC sin infectar.
- 2- Testigos negativos de ADN.
- 3- ADN de CMSC infectadas con el VAEC y utilizando iniciadores específicos para detectar la porción repetitiva terminal larga (LTR) del VNPO.

Los amplicones se corrieron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y visualizados por luz ultravioleta.

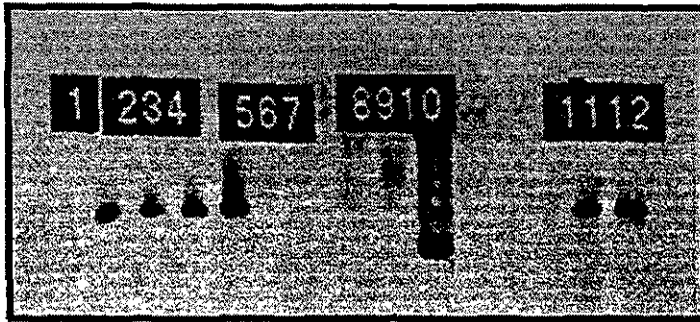


Foto 3

Las muestras de los carriles 2-5 representan las amplificaciones controles, los carriles 6-7 representan a los testigos negativos (UPH2O). Los carriles 8-9 células de membrana sinovial de cabra no infectadas. La línea 10 son los marcadores de peso molecular, 123 pb (DNA leader, Gibco BRL). Los carriles 11-12 corresponden a las células de membrana sinovial de cabra infectadas con el virus mexicano S-25

Reaislamiento viral:

El VAEC fue aislado con éxito de las dos cabras infectadas experimentalmente, a las cinco semanas post-infección, siguiendo la metodología previamente descrita para el aislamiento original del virus. Al igual que en el primer caso, en el

aislamiento de las cabras infectadas experimentalmente se pudo observar el efecto citopático en un tiempo mínimo de 4 semanas. Estas mismas células infectadas se utilizaron para las pruebas de PCR siguiendo la metodología descrita , obteniendo también productos de amplificación de 249 pb, con lo cual se confirmó el aislamiento.

Una de las cabras desarrolló poliartritis crónica en los carpos y tarsos ocho semanas posinfección (Foto 4).



Foto 4
Cabra con poliartritis crónica en carpos y tarsos

DISCUSIÓN

En la actualidad la prevalencia de la artritis encefalitis caprina en nuestro país es incierta, durante la década de los ochentas Nazara y colaboradores realizaron el primer estudio de artritis encefalitis caprina en México, a nivel de estudio serológico y clínico patológico en cabras domésticas jóvenes y adultas de razas lecheras y criolla (11). De este estudio se determinó que la enfermedad se encuentra en el territorio nacional, sin embargo el aislamiento viral no se había realizado.

Se presenta en este trabajo, el primer aislamiento del VAEC y la estandarización de una técnica de diagnóstico de PCR, que en comparación a otras técnicas de diagnóstico cuenta con una mayor sensibilidad y especificidad .

En 1997 se presentó la oportunidad de intentar por primera vez en México el aislamiento del VAEC, a través de técnicas aprendidas en la Universidad de Texas A & M bajo la asesoría del Dr. Andrés de la Concha-Bermejillo. Las técnicas que fueron adquiridas en esta universidad, se referían principalmente al diagnóstico de la NPO, mismas técnicas que fueron utilizadas en la estandarización de la técnica de PCR para el VAEC. Marcándose como las principales diferencias, cambios en las temperaturas y en los tiempos del termociclador, en los volúmenes de los dntp, del ADN proviral y de los iniciadores. Vale la pena mencionar que los iniciadores utilizados para la estandarización fueron diseñados específicamente para el desarrollo de este trabajo de investigación.

El aislado se basó en las características del efecto citopático en CMSC (foto 1) y por la identificación del ADN proviral que se amplificó por PCR utilizando los iniciadores diseñados para una región conservada del genoma del virus, gen gag (foto 3). Por otro lado y siguiendo los postulados de Koch, la enfermedad fue reproducida en dos cabras que fueron diagnosticadas como negativas, las cuales fueron infectadas por el virus experimental aislado.

Los lentivirus, como el VAEC, en su ciclo de replicación incluyen la integración del provirus a los cromosomas de la célula huésped, el genoma viral se vuelve parte del ADN celular y es duplicado durante la división celular, por lo que los animales infectados se mantendrán en este estado de por vida y el aislamiento viral se puede obtener años después de la infección (4).

La globalización y la tecnificación ha ayudado a que la erradicación de la enfermedad sea aún más difícil, por lo que la única alternativa actual de control, se basa primordialmente en estudios serológicos y/o virológicos y en la eliminación de los animales infectados.

La prueba de PCR en México se utiliza únicamente en la investigación por su alto costo, este tipo de investigaciones están dirigidas a que en un futuro los costos de la prueba disminuyan y se pueden ofrecer a los productores como otra opción de diagnóstico, rápida y barata.

Al no existir vacunas que protejan contra la infección ocasionada por el VAEC (50), la mejor forma de prevención es el adecuado manejo de los animales, dentro de este podemos realizar las siguientes técnicas de prevención para evitar el contagio con animales sanos:

- 1 Sacrificio de animales seropositivos

2. Aislamiento de recién nacidos, evitando cualquier contacto con las secreciones de la madre, particularmente en la ingestión de calostro
3. Proporcionar calostro, previamente calentado a 56° C durante una hora.
4. Colocar a los cabritos con hembras recién paridas pero libre de la enfermedad, utilizando incluso calostro de vacas.
5. Proporcionar sustitutos de leche de hembras sanas o pasteurizada.
6. Corregir prácticas de manejo que permiten la transferencia de fluidos y sangre entre los animales, como tatuajes, cirugías menores, castraciones, etc.
7. Monitorear serológicamente el rebaño en períodos regulares de seis meses separando las cabras sanas de las infectadas. Dos pruebas serológicas negativas a intervalos de seis meses indican que el rebaño es libre del VAEC, siempre y cuando no hayan ocurrido contacto con cabras infectadas durante los 12 meses previos al muestreo.

Finalmente podemos concluir que la mejor forma de tratar la artritis encefalitis caprina, es el diagnóstico temprano de la enfermedad y el adecuado manejo de las técnicas de prevención y aislamiento en rebaños infectados.

Con este trabajo se confirma el aislamiento del VAEC en México.

LITERATURA CITADA

1. Dawson, M. Caprine arthritis-encephalitis. In practice 1987; 8-11.
2. Pawlisch RA, Maes RK. Caprine arthritis-encephalitis virus isolated from Michigan goats. Am J Vet Res 1984; 45 (9): 1808-1811.
3. Crawford TB, Adams DS, Cheveers WP, Cork LC. Chronic arthritis in goats caused by retrovirus. Science. 1980a; 207 (29): 997-999.
4. De la Concha-Bermejillo A. Maedi-Visna and Ovine Progressive Pneumonia. Vet Clin North Am Food animal Pract. 1997 ;13:13-33
5. Crawford TB, Adams PS. Caprine arthritis encephalitis: Clinical features and presence of antibody in selected goat populations. JAVMA 1981; 178 (7): 713-719.
6. Alvarez Del VJL. Seroprevalencia de la artritis encefalitis caprina en algunos estados de la república (Tesis de licenciatura). México (Estado) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1984
7. Dinter Z, Morein B. Virus infections of ruminants. Netherlands: El Sevier Science Publishers B.V, 1990.
8. Dunn P. The goatkeeper's veterinary book. In: Farming Press. London, 1990.
9. Trigo JF. La artritis-encefalitis caprina. Ciencia Veterinaria 1991; 5: 49-66.
- 10 González RMG Estudio de la enfermedad viral: Artritis encefalitis caprina por medio de la prueba de inmunodifusión, frotis de líquido sinovial y biopsia

- de muestras obtenidas a partir de cabras de rastro y de algunos casos clínicos (tesis de licenciatura) México (Edo) México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1994.
11. Nazara CS De J. Estudio de la artritis encefalitis caprina en México (Tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1991.
 12. Pastoret PP, Portetelle D. Les infections des animaux par rétrovirus. *Ann Méd Vét* 1990; 134: 361-383.
 13. Putney SD, Montelaro RC. Lentivirus. In: Regenmortel, MHV, Neurath AR, editors. *Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines*: Elsevier Science Publishers B.V, 1990: 307-344.
 14. Pétursson G, Andrésdóttir V, Andrésón ÓS., Georgsson G, Pálsson PA, Rafnar B, Torsteinsdóttir S. Lentivirus diseases of sheep and goats: Maedi-Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis. In: *Progress in sheep and goat research*. Oxford: Speedy, A.W, 1992: 107-129.
 15. Ryan PD, Greenwood LP, Nicholls JP. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl- β -glucosaminidase activity in dairy goats. *J Dairy Res* 1993; 60: 299-306
 16. Smith MC, Sherman DM. *Goat medicine*. USA: Lea Febiger, 1994.
 17. Olvera AMA. Revisión bibliográfica sobre la enfermedad de artritis encefalitis caprina de 1980-1992 (tesis de licenciatura) México (DF) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, 1994.
 - 18 James FE. Comparative features of retroviral infections of livestock *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1990; 13 (3): 127-136

19. Angus AA, Gordon DH, Neil JW. Quantitative analysis of immunohistological changes in the synovial membrane of sheep infected with maedi- visna virus. *Clin Immun Immunopath* 1994; 72 (1): 21-29.
20. Rederick A. Murphy, E. Paul J. Gibbs, Marian C. Horzinek, Michael J. Studdert. *Veterinary Virology*, Third edition, 1999. Academic Press.
21. Perrin GG. L'arthrite encéphalite caprine. *Point Vét* 1991; 23: 713-718.
22. Smith JH, Myers FL. CAE antibody test kit commercially available. *Dairy Goat J* 1991; 69 (4): 42-43.
23. Amerighno E, Rivera H, Rosadio R, De Martini J. La artritis encefalitis caprina viral (AECV) en el Perú: estudio clínico, serológico, histopatológico y aislamiento. *Rev Latamer Peq Rumin* 1993; 1(1): 63-75.
24. Clavijo A, Thorsen J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Rum Res* 1996; 22: 69-77.
25. Rowe JD, East NE. Risk factor for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Food Animal Retroviruses* 1997; 13 (1): 35-53.
26. Lichtensteiger CA, Knowles DP, Mc Guire TC, Cheevers PW. Recombinant GP 135 envelope glycoproteins of caprine arthritis-encephalitis lentivirus variants inhibit homologous and heterologous variant-specific neutralizing antibodies. *Virology* 1991; 185: 2-9.
27. Harmache A, Bouyac M, Audoly G, Hieblot C, Peveri P, Vigne R, Suzan M. The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J Virol* 1995, 69 (6): 3247-3257.

28. Hullinger GA, Knowles DP, Mc Guire TC, Cheevers WP. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology* 1993; 192: 328-331.
29. Motha M.J, Ralston C.J. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet Microbiol* 1994; 38: 359-367.
30. Werling D, Langhans W, Geary N. Caprine arthritis encephalitis virus infection changes caprine blood monocyte responsiveness to lipopolysaccharide stimulation in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 43: 401-411.
31. Lechner F, Machado J, Bertoni G, Seow HF, Dobbelaere DA, Peterhans E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J. Virol* 1997; 71 (10): 7488-7497.
32. Zink MC, Narayan O. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol* 1989; 63 (6): 2578-2584
33. Tong-Starksen ES, Sepp T, Pagtakhan SA. Stati pathway is involved in activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat in monocytes. *J Virol* 1997; 71 (1): 771-777.
34. Rosati S, Pittau M, Tolari F, Erre G, Kwang J. Genetic and antigenic characterization of CAEV (Caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Vet Microbiol* 1995; 45: 363-370.
35. Jackson MK, Knowles DP, Stem TA, Harwood WG, Robinson MM, Cheevers WP. Genetic structure of the pol-env region of the caprine arthritis encephalitis lentivirus genome *Virology* 1991; 180 389-394

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

36. Lichtensteiger, CA, Cheevers WP, Davis WC. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis virus. *J Gen Virol* 1993; 74: 2111-2116.
37. Clavijo A, Thorsen J. Bacterial expression of the caprine arthritis-encephalitis virus gag and env proteins and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res* 1995a; 56 (7): 841-848.
38. Perry LL, Wilkerson MJ, Hullinger GA, Cheevers WP. Depressed CD4⁺ T lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis. *JID* 1995; 171: 328-334.
39. Vitu C, Russo P, Vignoni M. Arthrite-encephalite caprine: Essai d'une préparation vaccinale adjuvée-II. Étude de la réponse anticorps. *Comp Immun Microbiol Infect dis* 1993; 16 (2): 137-144.
40. Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, De Rock E, Pedersen NC. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res* 1993; 54 (11): 1858-1862
41. Mérida MJA. Determinación de linfocitos T y B en sangre periférica de cabras seropositivas al virus de artritis encefalitis caprina (AEC) (tesis de licenciatura). México (Edo) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1995.
42. Peretz G, Asso J, Devillechaise P. Le C.A.E.V: Revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. *Revue Méd Vét* 1993; 144 (2): 93-98.
43. Greenwood PL. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Preventive Veterinary Medicine* 1995a, 22: 71-87

44. Gazit A, Sarid R, Mashiah P, Archambault D, Dahlberg JE, Tronick SR, Yaniv A. Defective viral particles in caprine arthritis encephalitis virus infection. *Virology* 1992; 189: 344-349.
45. Gopal RP, Walter SJ, Walid H. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (11): 3042-3043.
46. Ellis TM. Blood leukocyte infection rates in caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Aust Vet J* 1990; 67 (8): 302-303.
47. Hötzel I, Bastos E. de S, Ravazzolo AP, Moojen V. Caprine arthritis-encephalitis virus: Isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26: 1175-1179.
48. Castro AE, Heuschele WR. Caprine arthritis encephalitis. 1er ed. U.S.A: *Veterinary Diagnostic Virology*. Moasby-Year Booking, 1992.
49. Zarate RJJ Artritis y padecimientos articulares en caprinos. *Memorias del Seminario Nacional sobre Producción y Comercialización del Ganado Caprino*; 1993 Noviembre 10-12; Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León) México. México (DF): Asociación Mexicana de Producción Caprina ,AC, 1993: 78-83.
50. Narayan O, Zink MC, Gorrell M, Mc Entee M, Sharma D, Adams R. Lentivirus induced arthritis in animals. *J Rheumatol* 1992; (supplement 32) 19: 25-32.
51. Dalvit P, Cazzola L, Fent P, Galeazo M. (Caprine arthritis encephalitis (CAE). control by administering bovine immunoglobulin or bovine colostrum at birth: Performance and mortality in kids) artritis encefalite virale caprina (CAEV):

Risanamento mediante somministrazione alla nascita di immunoglobuline bovine o calostro bovino: prestazione productive e mortalità dei capretti. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 1991; 12 (4): 53-56.

52. Wierschem J. CAE-Prevention and control whose responsibility is it?. *Dairy Goat J* 1991; 69 (4): 55-56.
53. Padilla RG, García CJ, De León TM. Transferencia de embriones de cabras seropositivas a la artritis encefalitis caprina y su efecto en las crías nacidas de cabras receptoras seronegativas. *Memorias IX Congreso Nacional Caprino*; 1992; FAUA, Nuevo León (Monterrey) México. Monterrey N.L., México, 1992: 28-30.
54. Péretz G. Prévention des arthrites des chèvres dues au C.A.E.V. *Centre d'écopathologie animale*, 1992; (5): 6-29.
55. Greenwood PL, North RN, Kirkland PD. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. *Aust Vet J* 1995b; 72: 341-344.
56. Bel Kahla A, Tainturier D, Zaïem B. Apparition du syndrome arthrite encéphalite dans un troupeau de chèvres en Tunisie. *Revue Méd Vét* 1991; 142 (2): 111-113.
57. Peretz G, Cimarosti I. Conséquences de l'arthrite-encéphalite caprine sur la production laitière. 41^{ème}. Réunion Annuelle de la Fédération Européenne de Zootechnie; 1990 Juillet 9-12; Toulouse, France, 1990: 1-9.

Isolation of Caprine Arthritis Encephalitis Virus From Goats In Mexico

M. Daltabuit Test, A. de la Concha-Bermejillo, L.E.L. Espinosa, E. Loza Rubio, and A. Aguilar Setién

ABSTRACT

A lentivirus was isolated from 2 goats in Mexico that were seropositive to caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) by the agar gel immunodiffusion (AGID) test. The lentivirus was identified as CAEV by the observation of giant multinucleated cells (syncytia) in goat synovial membrane (GSM) monolayers co-cultivated with blood mononuclear (BMN) cells from the seropositive goats, and by amplifying a DNA segment of the CAEV *gag* gene using the polymerase chain reaction (PCR) technique. Subsequently, cell supernatants from the GSM cells co-cultivated with BMN cells were used to infect 2 CAEV-seronegative goats. These goats seroconverted to CAEV as determined by the AGID test, and CAEV was re-isolated from these goats. One of the goats developed polyarthritis 8 mo after inoculation. Previous serological surveys indicate that infection with CAEV is prevalent among goats in Mexico. To our knowledge this is the first report of CAEV isolation in Mexico. Because of globalization of markets and increased trading among nations, the rapid identification and reporting of diseases such as CAEV are important to prevent the dissemination of these diseases.

RÉSUMÉ

Un lentivirus fut isolé de deux chèvres qui s'étaient avérées séropositives pour le virus de l'arthrite-encéphalite caprine (VAEC) par

une épreuve d'immunodiffusion en gel (AGID). Le lentivirus fut identifié comme étant le VAEC suite à l'observation de cellules géantes multinucléées (syncytium) sur une monocouche de cellules de membrane synoviale de chèvre (GSM) co-cultivées avec des mononucléaires sanguins (BMN) provenant des chèvres séropositives, ainsi que par amplification d'un segment d'ADN du gène *gag* du CAEV par réaction d'amplification en chaîne par la polymérase. Par la suite, les surnageants des cultures de cellules GSM co-cultivées avec les BMN furent utilisés pour inoculer deux chèvres séronégatives pour le VAEC. Une séroconversion envers le VAEC fut mise en évidence par épreuve AGID, et le VAEC ré-isolé de ces chèvres. Un des deux animaux présenta des signes de polyarthrite 8 mois après l'inoculation. Des enquêtes sérologiques antérieures avaient permis de mettre en évidence que l'infection par le VAEC était présente chez les chèvres au Mexique. Toutefois, il s'agirait du premier rapport faisant état de l'isolement du VAEC au Mexique. Étant donné la globalisation des marchés et l'augmentation des échanges commerciaux entre les pays, l'identification rapide et la notification des personnes concernées lors de maladie telle que l'arthrite-encéphalite caprine sont importantes afin de prévenir la dissémination de ces maladies.

(Traduit par le docteur Serge Messier)

Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is a species of the genus *Lentivirus* in the family *Retroviridae*.

and it is closely related to ovine lentivirus (OvLV) and to the human immunodeficiency virus (HIV) (1,2). Caprine arthritis encephalitis virus was first isolated in 1980 from a goat with arthritis (3). The disease is most commonly recognized as chronic degenerative polyarthritis, interstitial mastitis or chronic encephalomyelitis of adult goats, but occasionally is seen as acute leukoencephalomyelitis in kids (4). Prevalence of CAEV infection is worldwide, but it is most prevalent in countries where dairy goats are raised intensively (5). In the USA, CAEV prevalence ranges from 31% to 81% (4,6). In a study done in Mexico, the CAEV seroprevalence ranged from 17% to 35% (average 27%) in imported goats, but the infection was non-existent among native goats (7). The clinical and pathological aspects of the disease in a flock of dairy goats in Mexico have also been reported; however, attempts to isolate CAEV from these animals were unsuccessful (8).

Dairy and meat goats are important sources of income in rural Mexico. Since the infection of goats with CAEV can result in serious economic losses to goat producers, confirming the existence of this virus in Mexico is important in order to take the appropriate measures to prevent its spread.

The 2 animals (S-25 and 647) used in this study for virus isolation were obtained from a flock of 20 dairy goats located approximately 50 km north of Mexico City. These two 2-year-old Nubian goats had been born in Mexico; however, goats imported from the United States were often introduced to this flock for

UIM en Inmunología, CMN Siglo XXI Hospital de Pediatría, I.M.S.S. Apartado Postal 73/032 03020 Mexico D.F., (Daltabuit, Espinosa, Aguilar Setién); Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University Agricultural Experiment Station, 7887 US Highway 87 North, San Angelo, Texas 76901 USA (de la Concha-Bermejillo), CENID-Microbiología INIFAP, Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, 01115, México D.F. (Daltabuit, Loza Rubio, Aguilar Setién)

Address correspondence and reprint requests to Dr A. Aguilar Setién, telephone: (525) 533-4992; fax: (525) 761-0952; e-mail: aaguilas@data.net.mx

Received November 9, 1998

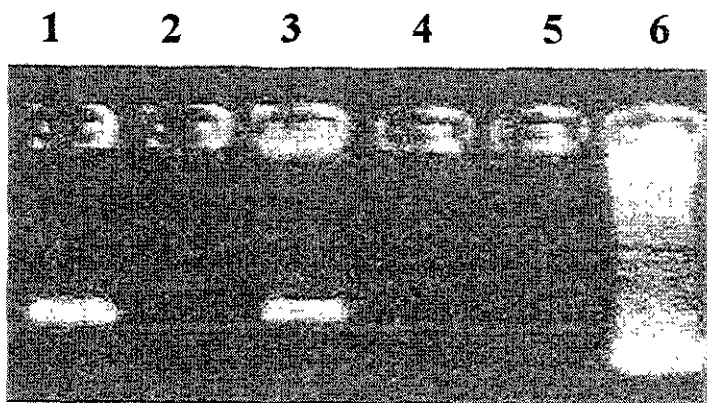


Figure 1. PCR detection of caprine arthritis encephalitis virus in caprine primary synovial membrane cells (CPSMC). Lanes 1 and 3: Mexican caprine arthritis encephalitis virus isolate using specific positive primers; Lane 2: uninfected caprine primary synovial membrane cells with designed primers; Lane 4: Mexican caprine arthritis encephalitis virus with ovine progressive pneumonia specific primers; Lane 5: water control; Lane 6: molecular weight markers.

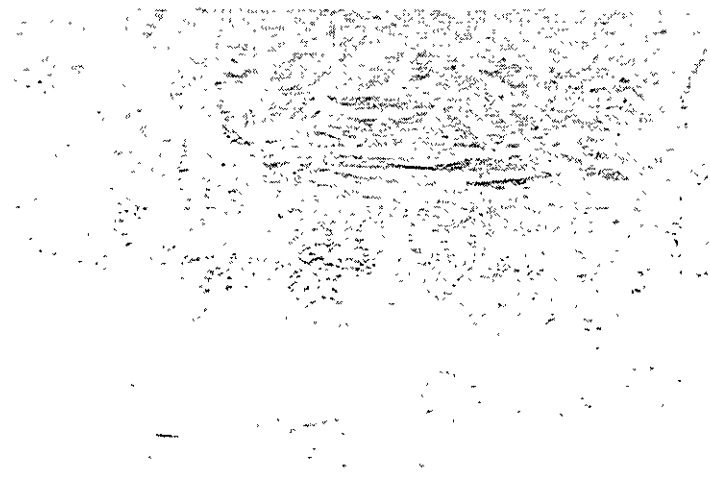


Figure 2. Micrograph of caprine primary synovial membrane cells, co-cultivated with mononuclear cells from a seropositive goat. Note syncytium formation (250 \times).

breeding purposes. Half of the animals in the flock tested seropositive to CAEV by the agar gel immunodiffusion (AGID) test (Veterinary Diagnostic Technology Inc., Wheat Ridge, Colorado, USA). Goats S-25 and 647 were seropositive to CAEV antibodies and were showing clinical signs of arthritis, dyspnea and chronic weight loss. For the purpose of isolating virus, blood mononuclear cells (BMNC) were separated by means of Ficoll-sodium diatrizoate (1.077 \times g) centrifugation. Blood MNC were co-

cultivated with cell cultures of *Mycoplasma*-free goat synovial membrane (GSM) cells that had been propagated in Dulbecco-modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 mg/mL, and 2 μ M L-glutamine. Goat synovial membrane cell monolayers were checked twice a week for evidence of cytopathic effects and passed every 2 wk for 6 mo until characteristic multinucleated giant cells (syncytia) appeared. At this point virus in cell

supernatants was titrated by an end-point dilution assay (9).

To confirm the identity of the isolate as CAEV, a portion of the CAEV *gag* gene was amplified by the polymerase chain reaction (PCR). For this purpose, GSM cells were infected with 1×10^6 TCID₅₀ of the putative CAEV. After 30 d, GSM cells were trypsinized, counted, aliquoted and kept at -70°C until used. DNA was extracted from GSM cells using non-ionic detergents and proteinase K. Caprine arthritis encephalitis virus DNA was amplified through 25 cycles of PCR in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 200 μ mol of each deoxyribonucleotide triphosphate, 10 pmoles each of sense and antisense primer, and 2.5 U of the thermostable *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polymerase. The CAEV primer pairs that were used were specific for the *gag* gene; this resulted in the amplification of a 249-bp product (forward 5' CAA ATG GGG ATG AGA CCT 3' and reverse primer 5'ATA TGC CAA CTG CCT TTC A 3'). The reactions were performed in an automated DNA thermocycler (BioRad, Hercules, California, USA). Each cycle started with a 31-second denaturation step at 94°C , followed by cooling to 53°C and this was held for 31 s to allow primer annealing. Each cycle ended with a chain-elongation step of 31 s at 72°C . One tenth volume of amplified DNA product was resolved by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. Controls included DNA extracted from non-infected GSM cells and samples without DNA (the latter was a control for DNA contamination), and amplification of DNA using primers specific for ovine lentivirus long terminal repeat (LTR) (Fig. 1) (10).

Two 4-month-old CAEV-seronegative goats were inoculated with 30 mL of GSM-BMNC co-culture supernatant containing 1.5×10^6 TCID₅₀ of the CAEV isolate. Serum from these animals was collected weekly before inoculation and at weeks 1 to 11 post-inoculation. Blood MNC were collected and co-cultivated with GSM cells as above. One of the 2 goats developed polyarthritis and was killed 8 mo after infection. A complete necropsy was performed and tissues, including synovium, were collected.

fixed in 10% buffered formalin solution, embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m, stained with hematoxylin and eosin, and examined under a light microscope.

Characteristic CAEV-associated cytopathic effect, consisting of multinucleated giant cells (syncytia), were observed in the GSM cell monolayers co-cultivated with BMNC from the 2 CAEV-seropositive goats (S-25 and 647) after 6 mo of passing the cultures every other week (Fig. 2). Lysis of the GSM cells was not seen concurrently with the syncytia. Caprine arthritis encephalitis virus proviral DNA was amplified from GSM monolayers co-cultivated with BMNC from these 2 seropositive goats, but not from the negative controls; nor was DNA isolated in any of the PCR reactions where OvLV LTR specific primers were used. Furthermore, inoculation of 2 CAEV-seronegative goats with GSM cell supernatants co-cultivated with BMNC from the 2 seropositive goats, resulted in seroconversion 7 wk after inoculation. Caprine arthritis encephalitis virus was re-isolated from these 2 goats 8 wk after inoculation. One of these goats developed chronic polyarthritis particularly affecting the carpal and tarsal joints. On post mortem examination, there was thickening of joint capsules and excess transparent fluid. Microscopically, there was synovial villi hypertrophy, edema, and diffuse infiltration of lymphocytes, plasma cells, and macrophages.

An important characteristic of lentiviruses is that their replication cycle includes the integration of a DNA intermediate (the provirus) into the host cell's chromosomes (11). The viral genome thus becomes part of the cellular DNA and is duplicated during cell division. As a result, once a goat is infected with CAEV, it remains infected for life, and CAEV can be isolated from seropositive goats years after the original infection. The majority of CAEV-infected animals do not show clinical signs of the disease. However, these animals shed virus and may be the source of infection for non-infected goats.

Ingestion of colostrum or milk from infected does is the most important route of transmission. However, the virus can also be transmitted by prolonged close contact and possibly by

other routes (5). Because presently there are no effective vaccines to prevent CAEV infection, control measures rest mainly on identification of infected animals by serological or virological means and segregation or elimination of such animals from the flock (12). Furthermore, due to viral latency and delayed seroconversion in CAEV-infected animals, a negative serologic test is no guarantee of a negative infectious status. These factors make the goal of eradicating CAEV difficult (5).

Previous serological surveys indicate that infection with CAEV is prevalent among goats in several Mexican states (7). However, to our knowledge this is the first report of CAEV isolation in Mexico. Globalization of markets and increased trading among nations make identification and reporting of communicable diseases such as CAEV crucial, in order to prevent the dissemination of these diseases.

Small ruminant lentiviruses share morphologic, genetic, and pathogenic characteristics. In fact, OvLV has been transmitted to goats by experimental inoculation, and CAEV has been transmitted to sheep (13); however, there is little evidence that cross-species transmission of these 2 viruses occurs under natural conditions (14). Studies in Norway and Australia indicate that the goat disease may exist for a number of years in a region without being transmitted to sheep (15).

A phylogenetic analysis of nucleotide sequences from a region of the *pol* gene has shown that the degree of variation and heterogeneity between several field isolates of small ruminant lentiviruses (CAEV and OvLV) is as great as that seen among the primate lentiviruses HIV-1 and HIV-2 and simian immunodeficiency virus, suggesting common evolutionary mechanisms (16). Another study showed that the homology between visna virus (the prototype strain of OvLV) and CAEV encompasses mostly the 5' region of the genome including the U5 region of the LTR and the *gag* and *pol* genes and a small region of the *env* gene (17).

The isolate reported here was identified as CAEV based on the characteristic CPE induced in GSM cell monolayers. In addition, proviral

DNA was amplified by PCR using primer pairs designed from the CAEV *gag* gene, but not by using primer pairs designed from the OvLV LTR. This isolate also induced seroconversion and polyarthritis in CAEV seronegative goats. However, the possibility that this isolate could fall into the OvLV cluster cannot be ruled out completely. Studies on the heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR have shown that primer pairs chosen in conserved parts of the LTR and *gag* genes of the Icelandic visna virus 1514 strain and of the *pol* gene of CAEV are able to amplify DNA from several CAEV and OvLV isolates. Therefore, further analyses are necessary to fully characterize the virus isolate described in this report.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Carolina Bekker and Susan Reichert. Also our thanks to Isabel Pérez Monfort who corrected the English version of the manuscript. This work was supported by CONACYT (Mexico) No. 0016PM.

REFERENCES

1. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop SA, et al. eds. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (1995). Wien, New York: Springer Verlag, 1995. 586 pp.
2. EGBERINK H, HORZINEK MC. Animal immunodeficiency viruses. *Vet Microbiol* 1992; 33: 311-331
3. CRAWFORD TB, ADAMS DS, CHEEVERS WP, CORK L. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 1980; 207: 997-999.
4. CRAWFORD TB, ADAMS DS. Caprine arthritis encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 178: 713-719.
5. ROWE JD, EAST NE. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection [Review]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997; 13: 35-53.
6. CUTLIP RC, LEHMKUHL HD, SACKS JM, JACKSON TA. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 200: 802-805.
7. NAZARA SJ, TRIGO FJ, SUBERBIE E, MADRIGAL V. Estudio serológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Tec Pecu Mex* 1985; 48: 98-101.

8. NAZARA SJ, TRIGO FJ, SUBERBIE E, MADRIGAL V. Estudio clinico-patologico de la artritis-encefalitis caprina en Mexico. *Vet Mex* 1985; 16: 91-100.
9. JUSTE RA, KWANG J, DE LA CONCHA-BERMEJILLO A. Dynamics of cell-associated viremia and antibody response during the early phase of lentivirus infection in sheep. *Am J Vet Res* 1998; 59: 563-568.
10. JUSTE RA, OTT TL, KWANG J, DE LA CONCHA-BERMEJILLO A. Effects of recombinant interferon- γ on ovine lentivirus replication. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16: 989-994.
11. DE LA CONCHA-BERMEJILLO A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997; 13: 13-33.
12. NARAYAN O, CORK LC. Caprine arthritis-encephalitis virus. In: Dinter Z, Morein B, eds. *Virus infections of ruminants*. Amsterdam: Elsevier, 1990: 441-452.
13. BANKS KL, ADAMS DS, MCGUIRE TC, CARLSON J. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res* 1983; 44: 2307-2311.
14. PETURSSON G, GEORGSSON G, PALSSON P. Maedi-visna virus. In: Dinter Z, Morein B, eds. *Virus infections of ruminants*. Amsterdam: Elsevier, 1990: 431-440.
15. PETURSSON G, ANDRESDOTTIR V, ANDRESSON OS. Lentivirus diseases of sheep and goats: maedi-visna and caprine arthritis encephalitis. In: Speedy AW, ed. *Progress in sheep and goat research*. Wallingford, UK: CAB International, 1992: 107-129.
16. LEROUX C, GREENLAND T, MORNEX JF. Molecular characterization of field isolates of lentiviruses of small ruminants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 427-429.
17. PYPPE JM, CLEMENTS JE, MOLINEAUX SM, NARAYAN O. Genetic variation among lentivirus: homology between visna virus and caprine arthritis encephalitis virus is confined to the 5' *gag-pol* region and a small portion of the *env* gene. *J Virol* 1984; 51: 713-721.