



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

2 96500

**"IDENTIFICACION DEL VIRUS DE ARTRITIS
ENCEFALITIS CAPRINA (AEC), POR MEDIO DE LA
TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA".**

**INFORME DE SERVICIO
SOCIAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
MARIA VERONICA GONZALEZ AYUSO**

**ASESORES: M. en C. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ
DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
M.V.Z. GERMAN GARRIDO FARIÑA
O.F.B. MARIA EUGENIA ROSALES**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



ASISTENTE SOCIAL
AZÚCAR
MEZ.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN. Q. Ma del Carmen Garcia Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlan

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de:

Informe de Servicio Social-Titulación: "Cátedra de enfermedades infecciosas de los caprinos: Inmunología y diagnóstico. Identificación del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) por medio de la técnica de Inmunoperoxidasa".
que presenta la pasante: María Verónica González Ayuso
con número de cuenta 8857784-7 para obtener el TITULO de Médica Veterinaria Zootecnista

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

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HA BLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 8 de diciembre de 2000

PRESIDENTE

M.C. Raúl Mar Cruz

VOCAL

Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez

SECRETARIO

M.C. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez

PRIMER SUPLENTE

Dr. Fernando Alba Hurtado

SEGUNDO SUPLENTE

M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez

Señor:

Concédeme Serenidad para aceptar
las cosas que no puedo cambiar,
Valor para cambiar las que sí puedo,
y Sabiduría para conocer la diferencia.

DEDICATORIA:

A mis Padres, a quienes debo la vida y la capacidad para estar en el lugar que hoy me encuentro. Principalmente a ti, Papá, que desde donde estás sé que te sientes orgulloso de saber que he logrado realizar uno de mis mayores anhelos, ya que sin las enseñanzas que me dejaste no hubiese podido lograrlo. A tí dedico este esfuerzo.

A mi familia amada: Edgar y Antonio, quienes son el motor que me impulsa a seguir adelante. Los amo y les dedico este éxito que, de alguna manera, también es suyo.

A Dios, a quien agradezco el maravilloso don de la vida.

AGRADECIMIENTOS:

A mi amado esposo, Antonio, quien decidió sacrificar su propio éxito para que yo pudiera alcanzar el mío. Te doy las Gracias infinitamente por tu apoyo. Te Amo.

A mi pequeño Edgar: Gracias por tus sonrisas y tu amor, que representan el aliciente más grande que puedo tener para alcanzar cualquier meta. Te quiero mucho.

Al M.V.Z. M. en C. Alejandro Martínez Rodríguez "Betito", porque sin su gran ayuda este trabajo no hubiera podido realizarse. No existen las frases suficientes para terminar de agradecerle todo lo que hizo para que este proyecto llegara a feliz término. GRACIAS.

A mi familia: Abuelita Socorro, Tía Lupita, Claudia, Nacho, Raúl, Alejandro y mi hermano Sergio, quienes siempre están en mi corazón y forman una parte muy importante de mi vida. Gracias por todo su apoyo y su cariño.

A la Señora Angélica Pérez, por ayudarme con mi pequeño cuando tanto la necesité para continuar con este trabajo. Gracias a ella y a toda su familia, de la que de alguna manera he pasado a formar parte.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, donde tuve la fortuna de vivir una de las mejores etapas de mi vida y a la que debo mucho de lo que ahora soy.

A todos los profesores que me brindaron sus conocimientos, enseñanzas y consejos para llegar a ser una buena profesionalista y mejor ser humano.

A mis compañeros: Enrique, Rogelio, Martín, Rafael, Rubén, Julián, y José Luis, por demostrarme que la amistad es uno de los valores más importantes que se pueden tener. Gracias por su buen humor durante los años que hemos pasado juntos, dentro y fuera de la Facultad.

Finalmente quiero agradecer a todos esos seres sin nombre que permitieron que mi aprendizaje fuera completo: los animalitos con los que trabajé a lo largo de todas mis prácticas de estudiante. Sería imperdonable no reconocer su gran valor dentro de mi enseñanza. ¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
Introducción	1
Objetivos	21
Descripción de Actividades	22
Cuadro Metodológico	23
Metodología	24
Resultados, Evaluación y/o Análisis	29
Fotografías	30
Apéndice I	32
Conclusiones	33
Sugerencias y Recomendaciones	35
Bibliografía	36

INTRODUCCIÓN

Desde los albores de la humanidad hasta nuestros días, la cabra ha sido una de las especies domésticas más importantes para el hombre; su carne y leche han constituido una fuente notable de alimento, así como su piel ha sido de gran utilidad para la elaboración de vestimenta. También se ha empleado como un control de la maleza y productora de abono orgánico de alta calidad y aún como animal de ornato y en ocasiones de compañía (Carrera, 1984; Santos, 1986).

Los caprinos se encuentran distribuidos en varios países, ubicándose principalmente en zonas áridas y semiáridas (Surman y col., 1987).

Las cabras de ciertos países desarrollados (Francia, Estados Unidos e Israel) son criadas principalmente para la producción láctea; esto corresponde a un 27% de la producción mundial (Bel-Kahla y col., 1991).

El ganado caprino es una de las especies domésticas a la que se ha dado poca importancia desde el punto de vista de la investigación científica y tecnológica. Sin embargo, destaca en la ganadería por su gran capacidad para producir leche, carne, piel, pelo y estiércol donde otras especies ni siquiera podrían subsistir (Carrera, 1984). Esta especie tiene muchas cualidades que la llevan a ocupar un lugar preponderante en la producción, tales como: tamaño pequeño, rusticidad y resistencia a ciertas enfermedades, gran capacidad de ramoneo, prolificidad e intervalo generacional corto y manejo de tipo familiar (DelAmo, 1988).

A pesar de que la población caprina en México se ha mantenido estable de 1979 a 1989, ha habido un incremento cualitativo a partir de 1967 debido a la importación de razas productoras de leche. La fuente de importación caprina ha sido principalmente los Estados Unidos de Norteamérica (Nazara, 1984).

Sin embargo, la producción caprina enfrenta retos, como la presencia de enfermedades que merman el rendimiento productivo. Por ello es necesario llevar a cabo estudios que nos permitan saber el grado de dispersión de las enfermedades dentro de los hatos caprinos, ya que conociendo lo anterior estaremos en posibilidad de controlar los padecimientos que afectan a esta especie (Robles, 1984).

Dentro de las enfermedades que afectan a la cabra en México, existen las de tipo parasitario, bacteriano, viral y aquellas causadas por hongos; además de las deficiencias vitamínicas y minerales y las malformaciones congénitas (Galina y Guerrero, 1984). De todas las anteriores las siguientes son las más frecuentes: Linfadenitis Caseosa, Queratoconjuntivitis, Coccidiosis, Ectima Contagioso, Mastitis, Paratuberculosis, Complejo Respiratorio Caprino, Brucelosis y Artritis Encefalitis Caprina (Galina y Guerrero, 1984).

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC), es producida por un retrovirus de la familia lentivirinae que afecta cabras domésticas de todas las edades, particularmente razas lecheras (Robinson y Ellis, 1986). En México es una enfermedad enzoótica que representa poco riesgo epizootiológico para la caprinocultura; existen reportes serológicos y patológicos que han demostrado su presencia en el país (Leyva y col., 1994).

Crawford y col. aislaron por primera vez este virus a partir de fragmentos de membrana sinovial de articulación, de la vaina del tendón y de co-cultivos de membrana sinovial fetal de cabras infectadas (Robinson y Ellis, 1986).

Por otra parte, el virus de AEC es un retrovirus no oncogénico (Narayan y Cork, 1990) cuya ultraestructura ha sido descrita por Clements y col. en 1980. Es un virus que mide de 90 a 130 nm con envoltura, que tiene una cadena simple de ARN de un peso molecular de aprox. 5.5×10^6 Daltons, y tiene una densidad de 1.14 a 1.16 g/ml en sacarosa (Nermut y Steven, 1987).

Este virus está compuesto por proteínas estructurales de las cuales dos destacan debido al papel que desempeñan en la respuesta inmunitaria del huésped; una glicoproteína de cubierta con peso molecular de 135 000 D (gp 135) y una proteína interna con peso molecular de 28 000 D (p28) (Robinson, 1986; Perrin, 1991; Smith, 1991).

El virus fue aislado en 1982 en Gran Bretaña a partir de una cabra artrítica. En años recientes, la AEC ha surgido como una enfermedad viral importante de las cabras de varios países que tienen industrias y granjas basadas en razas de origen europeo (Dawson, 1987).

Es una enfermedad viral que se encuentra presente en la mayoría de los hatos caprinos, y la razón por la que se considera alarmante es la rápida diseminación en las crías del hato (Padilla y col., 1992).

México está considerado como un país sospechoso sin confirmación definitiva. Sin embargo, estudios previos reportan los siguientes datos: (ver cuadros Nos. 1 y 2)

CUADRO No. 1

CABRAS SEROPOSITIVAS AL VIRUS DE AEC EN HATOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA

ESTADO	No. DE ANIMALES IMPORTADOS	POSITIVOS %
Guanajuato	9/25	36.0
Guerrero	16/54	29.6
Michoacán	15/52	28.6
Querétaro	14/40	35.0
Sonora	14/41	34.1

(Álvarez, 1984).

CUADRO No. 2

CABRAS SEROPOSITIVAS AL VIRUS DE AEC EN 13 ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA

ESTADO	CABRAS LECHERAS	POSITIVOS %
Chihuahua	31/180	17.2
Coahuila	64/220	29.1
Nuevo León	19/59	32.2
Sonora	14/41	34.1
Aguascalientes	---	---
Estado de México	47/138	34.1
Guanajuato	12/73	16.4
Michoacán	15/52	28.8
Puebla	---	---
Querétaro	14/40	35.0
Zacatecas	---	---
Guerrero	16/54	29.6
Oaxaca	---	---

(Nazara, 1991).

Epizootiología

Los estudios epizootiológicos han sido complicados, ya que un simple virus puede causar tres diferentes enfermedades en diferentes grupos de edades de los hospedadores. Estas enfermedades son: neumonía y leucoencefalitis progresiva en cabritos recién nacidos y cabras jóvenes (Narayan y Cork, 1990); artritis crónica y mastitis en cabras adultas (Crawford y col., 1980); y una neumonía progresiva y encefalitis esporádica y lenta en cabras adultas (Narayan y Cork, 1990).

Por otra parte, las complicaciones en la evaluación epizootiológica de AEC también son debidas a la estrecha relación antigénica de esta enfermedad con el virus de maedi-visna de ovinos (Robinson y Ellis, 1986).

El hecho de que en un hato se exponga casi el 100% de animales infectados puede explicarse por una combinación de factores. Primero, la infección persiste durante toda la vida de la cabra; estos animales llegan a ser importantes diseminadores del virus por vía calostrala o por secreciones respiratorias (Cheever y col., 1988). En segundo lugar, las infecciones son usualmente subclínicas y, de este modo, la distribución del virus es insidiosa (Perk, 1990). Las mastitis desarrolladas en cabras son aún más insidiosas que las artritis, debido a que los cambios inflamatorios ocurridos en la glándula mamaria pueden ser vistos hasta el examen histológico (Kennedy y col., 1985). En tercer lugar, en los hatos productores de leche donde se realiza un mayor manejo de los cabritos, se puede predisponer a la diseminación del virus debido a la alimentación artificial con leche infectada, así como por un mayor contacto físico que favorecería una posible transmisión horizontal, ya que los animales se encuentran juntos en lugares cerrados (Narayan y Cork, 1990).

Modo de transmisión

La persistencia del virus de AEC en los animales es una consecuencia de la habilidad del lentivirus para establecer una infección latente en los monocitos, lo que permite que las cabras sean portadoras del virus toda su vida y, por lo tanto, capaces de transmitirlo (Castro y Heuschele, 1992).

La leche constituye la principal vía de transmisión del virus. Esta transmisión puede llevarse a cabo ya sea por la ingestión directa de leche o calostro contaminados, o al ordeñar hembras para alimentación artificial de cabritos. La transmisión a través de la leche se debe, por un lado, a la concentración de monocitos y macrófagos susceptibles de hospedar al virus y, por el otro, a la gran permeabilidad de la mucosa intestinal del cabrito recién nacido (Perrin, 1991).

Aunque el calostro y la leche infectados contienen gran cantidad de anticuerpos contra el virus de la AEC, estos no previenen la infección del cabrito (Robinson y Ellis, 1986).

En los hatos lecheros de alta producción, la tasa de animales seropositivos está estrechamente ligada a la fase de lactancia; en los hatos lecheros tradicionales, este fenómeno es menos aparente (Perrin y Polack, 1987), lo que permite adelantar la hipótesis según la cual la máquina de ordeño tendría un papel predominante en la transmisión del virus; la cual sería fácilmente explicada por el "fenómeno de impacto" descrito en el caso de la vaca lechera por Heald en 1985, que consiste en una proyección violenta de microgotas de leche en toda la canalización debido a la ruptura o interrupción de la condición de vacío (Perrin, 1991). El virus es eliminado también en otras secreciones y puede darse la infección por vía intrauterina (Hernández, 1991).

Signos de la enfermedad

El virus de AEC inicialmente se asoció con dos formas de enfermedad, una encefalitis en cabritos y una artritis en cabras adultas, aunque recientemente se han reportado casos de mastitis indurativa en AEC y ocasionalmente una neumonía intersticial progresiva que puede producir signos de enfermedad respiratoria crónica (Michael, 1987). La artritis clínica rara vez se manifiesta antes de la madurez sexual, aunque hay excepciones. Las primeras articulaciones en afectarse son las carpales, seguidas de las tibio-tarsianas (corvejones), y después las fémoro-tibio-rotulianas (rodilla), las cuales presentan una inflamación unilateral o bilateral; la claudicación no siempre es aparente, pero si está presente puede variar su severidad y moverse de una articulación a otra (Dawson, 1987).

Los casos clínicos se manifiestan sin fiebre y el apetito se mantiene, pero hay una gradual pérdida de condición que se refleja en la calidad del pelo y signos de dolor, particularmente durante la época de frío (Castro y Heuschele, 1992); algunos casos pueden progresar rápidamente, sobretodo los asociados con problemas de claudicación, pero otros siguen un curso más prolongado que se caracteriza por períodos de recaída y remisión (Ellis, 1986; Gazkin, 1990).

En los primeros años de la década de los sesentas se empezó a estudiar una leucoencefalomielitis en cabritos de 1 a 4 meses de edad. Las principales lesiones histológicas que se encontraron fueron una infiltración perivascular de linfocitos y una mieloblastosis variable. Estas lesiones se acompañaron de neumonía intersticial moderada e hiperplasia del tejido linfoide pulmonar (Crawford y Adams, 1981). La artritis se caracteriza por una sinovitis proliferativa de las articulaciones, tendones y bolsa sinovial; hiperplasia de membrana sinovial, hipertrofia de vellosidades que, a su vez, se encuentran recubiertas por células sinoviales hiperplásicas y una fuerte infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas tanto en

membrana sinovial como en vellosidades; el tejido colágeno en las cápsulas articulares, áreas periarticulares, tendones, vainas de los tendones, ligamentos y bolsas de las cabras que desarrollan la enfermedad de forma más severa, contienen áreas multifocales variables de necrosis "fibrinoide" que sufre mineralización subsecuente (Nazara, 1991), siendo prominentes los acúmulos de linfocitos y células plasmáticas alrededor de los vasos sanguíneos y áreas adyacentes de necrosis. En casos muy activos, el infiltrado linfoide tiende a la formación de nódulos. Algunas veces están presentes células gigantes multinucleadas, con núcleos periféricos dentro del infiltrado inflamatorio alrededor del tejido necrótico (Crawford y Adams, 1981).

Las características del líquido sinovial dependen de la etapa de la enfermedad. Durante los períodos de inflamación activa asociada con cojeras agudas, el líquido sinovial de las articulaciones afectadas puede ser de coloración café a rojo, variando en volumen y anormalmente bajo en viscosidad (Robinson y Ellis, 1986). Se aprecia un aumento en el número de células en el líquido sinovial desde 1 000 hasta 20 000 o más por milímetro cúbico, de las cuales el 90% son células mononucleares. En las articulaciones que no están inflamadas de forma aguda, el líquido sinovial es claro, con volumen normal y un número de células que fluctúan entre 100 y 500 por milímetro (Crawford y Adams, 1981).

La forma encefalítica de la infección con el virus AEC ocurre más frecuentemente en cabras de 2 a 4 meses de edad (Robinson y Ellis, 1986). En algunos casos se presenta fiebre que va de moderada a severa (38.9 a 41.3° C), y puede ser transitoria a recurrente (Nazara, 1991). La manifestación de encefalitis más dramática y frecuente es la paresia del tren posterior que conduce a la recumbencia, durante la cual las cabras se mantienen en un estado afebril, alertas y con buen apetito (Dawson, 1987). Los signos más severos incluyen respuesta a amenazas

externas, nistagmos anormales, ladeo o inclinación de la cabeza, vueltas en círculo, disfagia, ceguera, tremor, opistótonos, torticollis, ataxia, hipertonia, movimientos de remadura de las patas, reflejo patelar hiperactivo o depresión a la sensación de dolor en uno o más miembros (Castro y Heuschele, 1992). Se sugiere que la depresión o ausencia del reflejo patelar, e hipotonía en uno o más miembros, indicaría un daño a la materia gris o a la neurona motora baja de la médula espinal (Perrini, 1991). Los casos generalmente progresan hasta la postración en un periodo de días a semanas, requiriendo muchas veces de eutanasia; sin embargo, existen antecedentes de recuperación que raramente ocurren (Dawson, 1987). Los signos pocas veces son regresivos debido a que el daño en el sistema nervioso central es irreversible, los cabritos afectados pueden tener una pleocitosis. De manera general, las lesiones en cerebro y médula espinal son visibles ocasionalmente como áreas de reblandecimiento de color café; sin embargo, las lesiones son generalmente detectables sólo de forma microscópica (Castro y Heuschele, 1992).

La glándula mamaria también es un órgano blanco. La mayoría de los casos ocurre dentro de los primeros 3 días post-parto (Robinson y Ellis, 1986). La mastitis causada por el virus de AEC es clínicamente reconocida como una inflamación difusa de la glándula mamaria (Castro y Heuschele, 1992), donde la ubre se presenta de firme a dura con ligera secreción láctea de la teta (Robinson y Ellis, 1986). Los cambios indurativos, difusos o nodulares, inicialmente tienden a desarrollarse profundamente en el tejido de la ubre y gradualmente se extienden (Dawson, 1987). En algunos casos existe una marcada inflamación aguda de la glándula mamaria que disminuye con el tiempo; sin embargo, ésta nunca regresa a su tamaño o consistencia original (Castro y Heuschele, 1992). En otros casos se ha observado sólo una caída gradual de la producción láctea sin cambios aparentes en la leche (Dawson, 1987).

En hatos experimentalmente infectados se ha observado que la ubre de hembras no preñadas es susceptible a presentar las lesiones, como en la artritis causada por AEC donde existe una gran variación en la evaluación clínica de la severidad de la mastitis (Castro y Heuschele, 1992).

Las lesiones de una neumonía intersticial que se presenta en animales infectados con el virus de AEC, son similares a las presentes en la enfermedad de "maedi-visna" de los ovinos. Estas lesiones han sido descritas en cabras de todas las edades, en las cuales la evidencia clínica principal puede ser artritis o encefalitis (Dawson, 1987). La neumonía se observa en rebaños de cabras con una elevada prevalencia de anticuerpos contra el virus de AEC, presentándose en cabras que tienen una historia de pérdida gradual de peso y disturbios respiratorios. Los pulmones afectados están inflamados, firmes a la palpación y con focos grisáceos de 1 a 2 mm en la superficie de corte (Castro y Heuschele, 1992). El primer signo clínico es insidioso, comenzando con una respiración rápida, seguido de un ligero esfuerzo y progresando hasta una disnea severa (Robinson y Ellis, 1986).

Patogénesis

El virus presenta tropismo por los monocitos y macrófagos (Zink y col., 1990), prevaleciendo en forma latente en los monocitos, y no es sino hasta la transformación del monocito en macrófago que se da la transcripción del ARN, dando así la multiplicación y la salida extracelular de nuevas partículas virales que estimulan la respuesta inmunitaria del huésped (Nazara, 1991), esto induce la aparición de lesiones sobre los mismos sitios de multiplicación del virus, lo que provoca la transformación de nuevos monocitos en macrófagos y por lo tanto continúa la multiplicación del virus, lo que a su vez contribuye no sólo a mantener

sino a ampliar el fenómeno (Clements y col., 1988). Esto se explica por la naturaleza de la respuesta inmunitaria humoral, que se caracteriza por la fuerte producción de anticuerpos precipitantes y por la producción casi inexistente de anticuerpos neutralizantes (Ellis y col., 1987). Se sabe que este agente presenta una variación antigénica durante infecciones persistentes de AEC que permite al virus evadir la respuesta inmune, ya que se ha demostrado variabilidad genética de algunas cepas, además de variación estructural que provoca cambios en la envoltura glicoprotéica (Knowles y col., 1991).

Parece que todo órgano o tejido en el cual se desarrolle un proceso inflamatorio se convierte en el asiento potencial de una multiplicación viral y de una reacción inmunitaria que, conjuntamente, van a desarrollar una lesión. Al parecer, todos estos mecanismos serían dependientes de cierto número de otros factores, tales como la virulencia del agente, la producción de interferón, la receptividad del huésped, y el complejo mayor de histocompatibilidad (Perrin, 1991).

Las alteraciones en la permeabilidad de los vasos sinoviales, se consideran un cambio anatómico-funcional que resulta en una artritis crónica; estas alteraciones donde se ve incrementada la permeabilidad pueden ser por un número de mecanismos inmunológicos y no inmunológicos, y son observadas una semana después de la infección experimental de cabras con el virus de AEC; dichas alteraciones son pequeños acúmulos de células mononucleares perivasculares y edema del tejido subcutáneo cercano a la cápsula articular; y 20 días después de la infección, los vasos sanguíneos están rodeados por un fuerte infiltrado de células inflamatorias y la hipertrofia de las células endoteliales parece invadir el lumen vascular (Nazara, 1991). En

cabras con lesiones espontáneas de la enfermedad, los capilares sinoviales, las arterias y otros vasos sanguíneos tienen muchos de los cambios descritos en la artritis reumatoide (Stites y col., 1983). El incremento de la permeabilidad permite la exudación del plasma sanguíneo, incluyendo fibrinógeno, dentro de las cavidades sinoviales o de la bolsa (Nazara, 1991). Los productos inflamatorios, tales como la fibrina, conducen a la hipertrofia e hiperplasia de las células de recubrimiento sinovial y son un factor importante que contribuye a la formación de vellosidades sinoviales (Pétursson y Hoff- Jorgensen, 1990). Debido al movimiento de las articulaciones, la fibrina exudada se presiona dentro de lo más recóndito de la articulación (Nazara, 1990). Las células mesenquimales emigran dentro de las masas de fibrina y los fibroblastos sintetizan colágeno, estas masas pueden incrementar su tamaño por subsecuentes depósitos de fibrina: la masa hialina parcialmente estabilizada se vuelve más organizada y presenta una invasión vascular, estas masas debidamente agregadas pueden liberarse y situarse libres en cavidad articular; estas estructuras son comúnmente denominadas "cuerpos de arroz" debido a su apariencia macroscópica (Nazara, 1991).

La mayoría de las vellosidades sinoviales son hipocelulares, de apariencia hialina y no están recubiertas por células sinoviales. Las características histoquímicas de la matriz de las vellosidades son similares a las de la fibrina, comprobando por medio de una reacción positiva a la prueba histoquímica de rosa indol que muestra una intensa coloración, que la mayoría de las vellosidades están compuestas por diversas proteínas plasmáticas, incluyendo fibrina (Nazara, 1991).

En el cartílago articular también se desarrollan alteraciones debido al daño vascular, como la inflamación que produce alteración en la composición del líquido sinovial (Adams y col.,

1980). La nutrición del cartilago articular permite que en un proceso inflamatorio penetre una exudación inflamatoria dentro de la cavidad articular e incremente la viscosidad del liquido articular, disminuyendo así la difusión dentro del cartilago articular. Este exudado también altera el contenido enzimático del líquido sinovial, y la superficie de mucopolisacáridos de la lámina lustrosa se disuelve descubriéndose los paquetes de colágeno, los cuales se pueden fracturar por movimiento mecánico, produciendo una fisura profunda que ocurre en la superficie articular (Tizard, 1992).

La organización de fibrina en la cavidad articular conduce a la formación de tejido de granulación, el cual se convierte en un panus fibrótico que cubre gradualmente al cartilago erosionado y también penetra a las fisuras de la superficie articular, permitiendo que el tejido de granulación que prolifera promueva la destrucción local del hueso esponjoso y altere la circulación normal, dando lugar a la destrucción del hueso subcondral, lo cual conduce a una anquilosis ósea (Nazara, 1991).

El número de linfocitos y macrófagos y el nivel de inmunoglobulinas en el fluido sinovial se incrementan por encima de los niveles normales en los primeros meses subsecuentes a la infección. Una porción significativa de la inmunoglobulina G presente en el fluido sinovial, es directamente contra el antígeno viral (Robinson y Ellis, 1986).

Esto sugiere que los macrófagos juegan un papel central en la patogénesis de esta compleja enfermedad producida por la infección del virus de AEC. Además es apreciable que sólo algunos macrófagos de tejidos tales como pulmón, sinovia y glándula mamaria, son

afectados por la replicación de este virus (Narayan y Cork, 1990). "In vivo", sólo 1 de 5 000 monocitos de sangre periférica son afectados. pero en cultivos "in vitro" estos monocitos son capaces de soportar la replicación viral (Robinson, 1986).

Inmunología

Durante la infección de macrófagos por parte de lentivirus tales como Maedi-Visna y Artritis Encefalitis Caprina, el interferón es producido por la infección de macrófagos y linfocitos. El fluido contenido en el líquido articular tiene actividad de interferón, teniendo un número de actividades biológicas relacionadas a la restricción de la replicación, teniendo un efecto inhibitorio directo sobre la expresión del gen viral en la maduración de macrófagos; así mismo, el interferón inhibe la maduración de monocito a macrófago causando una desregularización de la replicación viral. Algunos factores específicos del tejido juegan un papel importante en la restricción del ciclo de infección viral, ya que el ARN viral se encuentra abundantemente en líquido sinovial, bazo, alveolos y células de la glía (Zink y Narayan, 1989; Kurstak y col., 1990).

La variación antigénica de los epitopes del lentivirus sensibles de neutralizar, es un mecanismo potencial que puede contribuir a la sobrevivencia del virus en presencia de la respuesta inmune (Cheevers y col., 1991).

Cabras infectadas experimentalmente con el virus de AEC producen una respuesta inmune humoral, usualmente detectada en los primeros 40 a 60 días usando la prueba de ELISA. aunque se presentan algunas respuestas tempranas a los 21 días alcanzando un título máximo a los 49 a

77 días con una disminución progresiva, pero quedando presente por lo menos 9 meses (Cheevers, 1988). Es probable que las cabras una vez infectadas presenten constantemente anticuerpos (Narayan y Cork, 1990). Sin embargo, no siempre se presenta la neutralización por anticuerpos, que es una respuesta inmune tanto a la proteína interna del virión como a la glicoproteína de superficie del virión, detectables ambas en el suero y fluido sinovial (Cheevers y col., 1991). Sin embargo, los anticuerpos que aparecen no eliminan la infección (Robinson, 1986).

Diagnóstico de laboratorio

Las técnicas utilizadas para determinar la presencia del virus de AEC se basan en detectar anticuerpos, antígenos o ácido nucléico viral, teniendo además un uso particular cada una de estas:

La prueba de ELISA es utilizada para aclarar dudas en la identificación de casos sospechosos o casos individuales de AEC, detectando antígenos de membrana o internos por medio de anticuerpos monoclonales (Hecker y col., 1991)

La prueba de radioinmunoensayo es una prueba con fines de detección de anticuerpos y antígenos de membrana o internos (Weinshenker y col., 1990).

La prueba de Hibridación es usada con el fin de identificar y diferenciar las cepas virales (Zink y col., 1990).

La microscopía electrónica es una prueba utilizada con el fin de identificar la morfología viral a partir de tejidos afectados, tales como membrana sinovial, pulmón, glándula mamaria, cerebro y ganglios linfáticos (Perk, 1990).

En pruebas de cultivos celulares se utilizan diferentes células para la identificación de diferentes cepas virales, y su efecto en algunos cultivos primarios y/o líneas celulares (Blondin y col., 1989). Además de utilizarse para el aislamiento y producción viral "in vitro" (Piper y col., 1988).

La prueba de actividad de la transcriptasa inversa es usada con el objeto de identificar la presencia de un retrovirus en casos sospechosos (Zink y col., 1990).

La prueba de reacción en cadena de polimerasa, la cual es una técnica recientemente evaluada para identificar la presencia viral de los animales experimentalmente infectados, detectándose animales positivos al primer día postinoculación, además de ser muy sensible y específica (Zanoni y col., 1990).

La prueba de inmunodifusión utilizada para estudios epidemiológicos con el fin de detectar anticuerpos contra antígenos internos y externos, es un método más simple y directo que tiene como finalidad identificar la reacción antígeno-anticuerpo mediante una reacción de precipitación. Aunque la reacción de Ag-Ac es en un medio semisólido y el agar depende de electrolitos amortiguadores, pH y temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de los reactantes, la precipitación máxima se forma en la zona de equivalencia con cantidades decrecientes en las zonas de exceso del antígeno o del anticuerpo: por lo tanto, la formación de líneas de precipitación en la prueba de inmunodifusión es altamente dependiente de las concentraciones relativas de antígeno y de anticuerpo. Esta prueba tiene una sensibilidad aproximada por cada 100 ml de < 1 (Stites y Hugh, 1983).

En la prueba bacteriológica se busca la presencia de bacterias involucradas con AEC o la ausencia de crecimiento bacteriano de clamidias y micoplasmas, que causan lesiones articulares sugestivas a AEC.

Otras técnicas de diagnóstico son las enzimoimmunohistoquímicas, las cuales utilizan anticuerpos marcados con enzimas para localizar los constituyentes presentes en los tejidos o en las células, o alternativamente para demostrar los anticuerpos presentes en los sueros y tejidos de ciertos pacientes. Los principios básicos de estos procedimientos son los mismos que rigen las técnicas de inmunofluorescencia, pero la detección de la coloración histoquímica específica de la enzima utilizada como marcador reemplaza la detección de la fluorescencia. Estos métodos emplean un procedimiento directo y, en este caso, el anticuerpo utilizado para detectar un antígeno está acoplado a la enzima, o un proceso indirecto en cuyo caso el anticuerpo no está marcado, pero su fijación sobre el tejido se señala por medio de un segundo anticuerpo dirigido contra las inmunoglobulinas de la especie que ha proporcionado el primer anticuerpo acoplado a la enzima. Este método es el más utilizado porque necesita el acoplamiento de un solo tipo de anticuerpo. La utilización de sustratos de diferentes colores permite emplear estos métodos para realizar una doble coloración con los conjugados preparados mediante dos enzimas diferentes. Además, estos métodos (sobre todo los que utilizan anticuerpos marcados con peroxidasa) pueden ser aplicados a estudios en microscopía electrónica (Ternynck y Avrameas, 1991).

El desarrollo de las técnicas histoimmunoenzimáticas se inicia a mediados de la década de los sesenta, con la introducción de las enzimas como marcadores de la localización de las uniones antígeno-anticuerpo. Dichas enzimas, al actuar sobre un sustrato definido, conducen a la formación de un precipitado local coloreado, visible al microscopio óptico.

Estas técnicas tienen la posibilidad de la realización de estudios retrospectivos, la ventaja de observación directa al microscopio óptico y la posibilidad de guardar indefinidamente las preparaciones.

Las condiciones idóneas para la selección de las enzimas marcadoras son: fácil obtención, reacción histoquímica simple, para su detección conjugación con la molécula de anticuerpo sin producir alteraciones importantes, ser estable a pH neutro lo mismo que sus conjugados, tamaño de la molécula lo más pequeño posible, no debe hallarse presente en el tejido en estudio y debe tener alta actividad específica (pureza). La enzima que más se ajusta a los criterios antes mencionados es la peroxidasa del rábano. Caben dos posibilidades de introducir la peroxidasa dentro de los anticuerpos: la unión covalente a un anticuerpo y la unión de tipo inmunológico en la que la peroxidasa actúa como antígeno (método peroxidasa-antiperoxidasa, PAP).

Algunas estructuras tisulares muestran actividad peroxidásica, por lo que hay que hacer un tratamiento previo de los cortes para bloquear esta actividad. Para bloquear la peroxidasa endógena pueden tratarse los tejidos con alcohol metílico al +3% H_2O_2 durante 30 minutos, o bien con agua destilada +3% H_2O_2 durante 30 minutos. Este tratamiento se puede realizar tras la aplicación del primer anticuerpo específico, con el fin de evitar una posible alteración de la reactividad antigénica.

El revelado de la peroxidasa se lleva a cabo mediante la producción de un precipitado soluble local, por acción de dicha enzima con el sustrato H_2O_2 para formar un complejo, el cual reacciona sobre un cromógeno, originándose una molécula coloreada, que es el precipitado observado al microscopio óptico. Como cromógenos se pueden utilizar diferentes sustancias, pero la más utilizada para la peroxidasa es la 3,3' Diaminobenzidina (DAB). Este producto (posible cancerígeno) puede adquirirse en pastillas prepesadas (10 mg/pastilla) por ejemplo en SIGMA. El pH de la solución es de 7.6, pero la reacción coloreada es más intensa de realizarse a un pH 5-6, que es el óptimo de la peroxidasa. Como tinciones de contraste pueden utilizarse hematoxilina, verde metilo, azul metileno, etc. (Coll. 1993).

Con las enzimas conjugadas a inmunoglobulinas o a antiglobulinas también se identifican antígenos específicos en cortes de tejido. Las pruebas se realizan de un modo similar al de la inmunofluorescencia. Así, en la prueba de inmunoperoxidasa directa, los cortes de tejido se tratan con el anticuerpo marcado con enzimas. Después de lavar, el tejido se incuba con el sustrato adecuado para la enzima. El anticuerpo marcado presenta un depósito de color café en el lugar de la unión del anticuerpo. En la prueba indirecta, el anticuerpo unido se detecta por medio de una antiglobulina marcada. Esta técnica ofrece ventajas sobre las de inmunofluorescencia, ya que el tejido puede examinarse en el microscopio de luz convencional, y teñirse de tal manera que sea más fácil ver las relaciones estructurales (Tizard, 1989).

Diagnóstico diferencial

Debido a la manifestación clínica que presenta la AEC, es importante considerar otras enfermedades con signos clínicos similares. Es básico hacer un diagnóstico diferencial de la artritis producida por el virus de AEC, ya que existen diferentes etiologías causantes de procesos artríticos (Nazara, 1991). La artritis bacteriana producida por agentes tales como Chlamydia, Corynebacterium, Streptococcus y, en ocasiones, Erysipelothrix insidiosa (Arbiza, 1986), frecuentemente es una secuela de onfaloflebitis en cabritos (Castro y Heuschele, 1992). En cabras adultas se ha observado que los micoplasmas son los agentes infecciosos que han sido aislados a partir de articulaciones afectadas y que intervienen con mayor grado de importancia en la presentación de artritis (Arbiza, 1986). Clínicamente, las artritis bacterianas y las causadas por micoplasmas se reportan como poliartritis supurativas, agudas y febriles en cabritos; aunque la artritis producida por clamidias ha sido descrita con detalle en borregos, la evidencia para una artritis de este tipo en cabras es menos abundante (Castro y Heuschele, 1992).

Dentro del diagnóstico diferencial neurológico, se debe considerar la enterotoxemia, la listeriosis y los traumatismos craneocefálicos severos, que podrían causar cuadros similares a los que se manifiestan durante la encefalitis por AEC (Cork, 1976).

Prevención y control

Para llevar a cabo este punto, deben considerarse diferentes factores:

- a) El virus de la AEC permanece en el hospedador durante toda la vida de éste.
- b) Las vías de transmisión más frecuentes en cabritos son el calostro y la leche materna.
- c) Está comprobado que la transmisión del virus puede ocurrir por contacto directo entre adultos, esto puede marcar una variación de tiempo entre la detección de individuos enfermos y serológicamente positivos (Castro y Heuschele, 1992).

Para prevenir y reducir la prevalencia de AEC en el rebaño, es necesario separar a todos los cabritos de las madres infectadas inmediatamente después del nacimiento, evitando así el contacto del recién nacido con las secreciones de la madre (calostro y leche) (Adams y col., 1983). El aislamiento debe ser en un ambiente bien ventilado (Robinson y Ellis, 1986); a los cabritos se les debe proveer de fuentes de inmunidad pasiva, tales como calostro de cabras libres de AEC o calostro de cabras infectadas, previamente calentado a 56 °C durante una hora, además de darles leche de cabras libres de la infección, leche pasteurizada de vaca o leche pasteurizada de cabras infectadas (Castro y Heuschele, 1992). Con intervalos de seis meses, realizar pruebas serológicas a los adultos y a los cabritos para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de AEC, separando los animales seropositivos de los libres de infección (Nazara, 1991; Pérez, 1992).

OBJETIVO GENERAL: Establecer las bases para un método de diagnóstico sencillo, eficiente, sensible y sobretodo, confiable para la identificación de la Artritis Encefalitis Caprina.

OBJETIVO ESPECÍFICO: Estandarizar la técnica de Inmunoperoxidasa para el diagnóstico de la Artritis Encefalitis Caprina.

OBJETIVO ACADÉMICO: Poner en práctica los conocimientos obtenidos en las diferentes asignaturas cursadas a lo largo de la carrera, tales como Virología, Inmunología, Clínica Ovina y Caprina. Histología y Patología.

OBJETIVO SOCIAL: Proporcionar a clínicos e investigadores las herramientas necesarias para confirmar el diagnóstico de la Artritis Encefalitis Caprina y a la vez, su presencia en los diferentes hatos caprinos del país.

DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA

SEPTIEMBRE: Recopilación de información bibliográfica y hemerográfica acerca de la Artritis Encefalitis Caprina y de la técnica de inmunoperoxidasa en el diagnóstico de enfermedades virales; selección de animales sospechosos en base a signos clínicos (claudicación, dolor e inflamación de articulaciones).

OCTUBRE: Detección de animales seropositivos mediante la prueba de inmunodifusión doble; selección de un macho y una hembra seropositivos al virus de AEC; sacrificio de los animales seropositivos seleccionados para obtención de muestras de tejido de glándula mamaria, membrana sinovial, riñón y pulmón; inclusión de las muestras en bloques de parafina.

NOVIEMBRE: Procesamiento de muestras para histopatología, realizando cortes de 4 μm de espesor; preparación de laminillas para la prueba de inmunoperoxidasa (IP); obtención del material para la prueba de IP.

DICIEMBRE: Titulación del suero y del conjugado que se utilizarán en la técnica de IP; preparación de sustancias y reactivos necesarios para la técnica de IP.

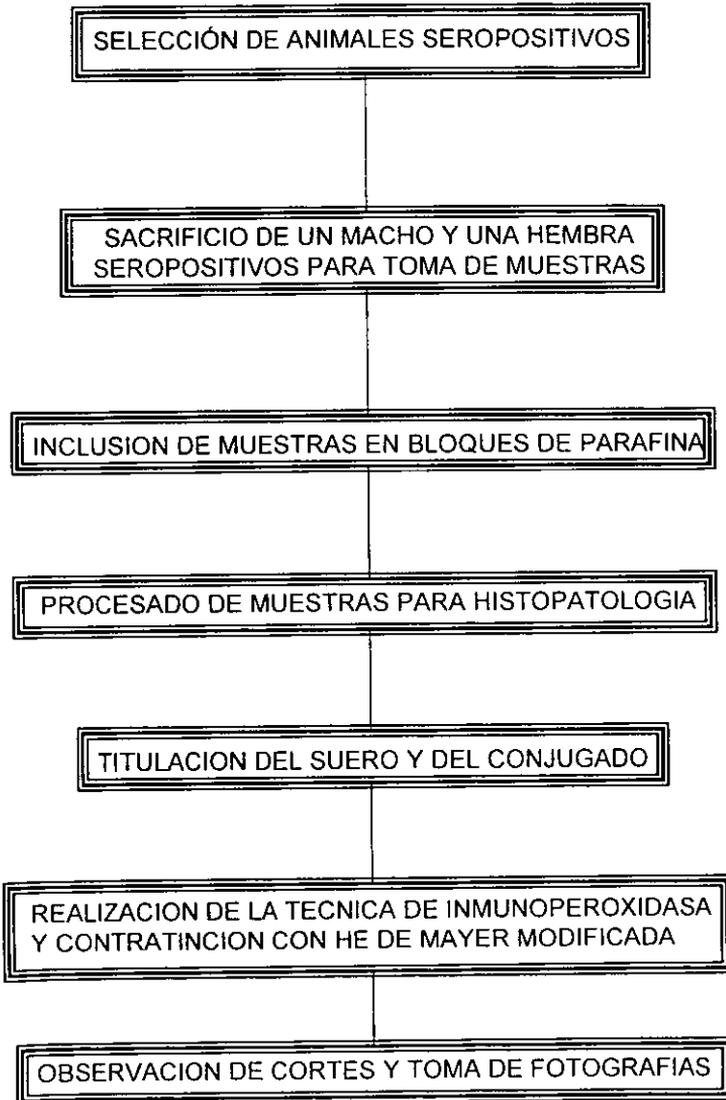
ENERO: Procesamiento de laminillas con la técnica de inmunoperoxidasa.

FEBRERO: Contraste de laminillas mediante la modificación de la tinción de Hematoxilina de Mayer; observación de laminillas y toma de fotografías de resultados positivos.

MARZO: Análisis de resultados; revisión bibliográfica; elaboración del informe de actividades.

CUADRO METODOLOGICO

IDENTIFICACION DEL VIRUS DE AEC POR INMUNOPEROXIDASA



METODOLOGÍA

Se seleccionó un hato caprino para el diagnóstico de Artritis Encefalitis Caprina (AEC) por medio de la prueba de inmunodifusión doble utilizando un antígeno comercial, el cual detecta la glicoproteína externa 135 (Gp 135) y la proteína interna 28 (P 28); posteriormente se seleccionaron dos animales seropositivos, una hembra y un macho adultos, para realizarles estudios Histopatológicos y Ultraestructurales, utilizando los siguientes tejidos: glándula mamaria, membrana sinovial, riñón y pulmón, los cuales se fijaron en formol bufferado y se incluyeron en bloques de parafina (Tizard, 1989).

Se realizaron cortes de 4 μm de espesor para fijarlos en portaobjetos y posteriormente **desparafinarlos** con calor húmedo a 56-60° C durante 25 minutos, adicionándoles xilol absoluto y posteriormente deshidratándolos en alcoholes graduales (99.8% a 60%) para llevar a cabo la técnica de inmunoperoxidasa con la finalidad de detectar antígeno viral en el tejido, utilizando para ello un suero hiperinmune específico contra las Gp 135 y P 28 del virus de AEC. La presencia del virus se evidenció posteriormente mediante la utilización de un **conjugado Anti-cabra peroxidado** empleando para ello como sustrato el **tetracloruro de diaminobencidina (DAB)** (Tizard, 1989).

Previamente a su utilización, el conjugado Anti-cabra peroxidado se tituló mediante el siguiente procedimiento:

Titulación del conjugado Anti-cabra peroxidado:

En una placa de cristal se colocaron 38 discos de papel filtro No. 1 Tipo Whatman de aproximadamente 0.5 cm de diámetro; se agregaron 2 μ l de suero caprino a cada disco, procurando que el suero no rebasara la superficie del mismo, y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secos se colocaron en una microplaca de fondo plano, la cual estaba numerada horizontalmente del 1 al 12, y designada verticalmente de la letra A a la H. Los discos se distribuyeron en la microplaca de manera que se utilizaron 32 pozos para titulación, y 6 pozos para los controles positivos y negativos. Una vez distribuidos los discos, se bloquearon con leche descremada para cubrir los sitios inespecíficos de unión y evitar así falsos resultados (Ternynck y Avrameas, 1991).

BLOQUEO.

Se prepararon 4 ml de leche descremada al 5% y se agregaron a la microplaca, cuidando que la leche cubriera totalmente los discos de papel filtro. Se incubó la microplaca en agitación durante una hora, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los discos se lavaron siete veces con solución PBS TWEEN 20, procurando no dejar grumos de leche en los discos para eliminar resultados falsos.

Una vez lavados los discos, se trasladaron a una segunda microplaca en la que se realizaron diluciones dobles utilizando el conjugado Anti-cabra peroxidado. Es importante señalar que en el control positivo se utilizó un conjugado Anti-cerdo y en el negativo no se utilizó ningún conjugado (Ternynck y Avrameas, 1991).

Se procedió a titular el suero hiperinmune con la misma técnica empleada para titular el conjugado, agregándolo en los discos como primer paso.

Después de haber llevado a cabo estos últimos procedimientos, se determinó que la concentración adecuada del conjugado Anti-cabra para su utilización en la prueba de inmunoperoxidasa fue de 1:200, y la del suero hiperinmune fue de 1:1600.

Con el fin de evitar resultados falsos debido a la presencia normal de peroxidasa de tipo endógena en los tejidos, se procedió a eliminarla de los cortes mediante la siguiente técnica:

Eliminación de la Peroxidasa Endógena.

Posterior a la desparafinación de las laminillas, fue llevado a cabo este procedimiento: en una probeta con capacidad de 100 ml se agregaron 93.3 ml de PBS pH 7.2 y 6.7 ml de peróxido de hidrógeno reactivo al 30%, agitando perfectamente la mezcla (Ternynck y Avrameas).

Se colocaron las laminillas en una cámara húmeda y se les agregó la solución preparada en el paso anterior, procurando cubrir totalmente la muestra de tejido de cada laminilla. Se incubaron durante una hora a temperatura ambiente (Ternynck y Avrameas, 1991).

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se enjuagaron las laminillas con PBS de una pizeta (Mod. de SIGMA, 1996).

Una vez eliminada la peroxidasa endógena, las muestras se sometieron a incubación con el suero hiperinmune mediante el siguiente procedimiento:

Incubación con el suero hiperinmune.

En cada corte de tejido se agregaron 200 μ l del suero hiperinmune diluido (1:1600) y se incubaron las laminillas en cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente (Ternynck y

Avrameas, 1991). Después de incubar, se lavaron las laminillas con PBS y se dejaron secar (Mod. de SIGMA, 1996).

Posteriormente los portaobjetos se incubaron con el conjugado Anti-cabra peroxidado, de la siguiente manera:

Incubación con el Conjugado Anti-cabra Peroxidado.

A cada portaobjetos se agregaron 200 μ l del conjugado diluido (1:200) y se incubaron en cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las laminillas con PBS de una pizeta y se dejaron secar.

Inmediatamente después de secar los portaobjetos se realizó la detección de la peroxidasa en el microscopio de campo claro, la cual indica la presencia del complejo Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) mediante una coloración café (ver fotografías 1 y 2).

Para detectar la peroxidasa se llevaron a cabo los pasos que a continuación se mencionan:

Utilización del Tetracloruro de Diaminobencidina (DAB).

Se disolvió una tableta de 10 mg de DAB en 15 ml de solución reguladora Tris-HCl 0.1M, pH 7.6, ajustando con hidróxido de sodio 1 N.

Se filtró la solución anterior utilizando papel filtro tipo Laurent o Whatman No.1, agregándola en un matraz forrado de papel aluminio para protegerla de la luz.

Se añadieron 12 μ l de peróxido de hidrógeno reactivo al 30% y se agregaron 400 μ l de esta solución a los portaobjetos, cubriendo perfectamente todo el tejido de los mismos.

Las laminillas se incubaron durante siete minutos a temperatura ambiente y posteriormente se enjuagaron con agua destilada corriente.

Las muestras se mantuvieron protegidas de la luz directa durante el tiempo previo a su observación, ya que la luz altera la coloración de la DAB provocando que ésta disminuya e incluso llegue a desaparecer del tejido (Mod. de Ternynck, 1991).

Para observar con mayor claridad la morfología de las células con presencia del complejo Ag-Ac, las laminillas fueron contrastadas mediante la modificación a la técnica de hematoxilina de Mayer para preparaciones de inmunohistoquímica, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

Modificación de la Tinción de hematoxilina de Mayer para Contraste en

Preparaciones Inmunohistoquímicas.

Se rehidrataron las laminillas sumergiéndolas en agua destilada durante cinco minutos.

Después de rehidratar, se colocaron en una caja de vidrio para tinción conteniendo el colorante hematoxilina, durante treinta a sesenta segundos.

Se lavaron nuevamente los portaobjetos con agua destilada durante cinco minutos.

Posteriormente se sumergieron en carbonato de litio durante treinta segundos.

Se realizó otro lavado con agua destilada por cinco minutos.

Después de lavar se rehidrataron utilizando alcoholes graduales y xilol (70%, 80%, 90%, 96%, 100% dos veces y xilol también dos veces).

Como paso final se montaron las laminillas con resina sintética para su observación.

(Mod. de SIGMA, 1996).

RESULTADOS, EVALUACIÓN Y/O ANÁLISIS

Una vez procesadas las laminillas se observaron en el microscopio de campo claro, detectándose un depósito de gránulos de color café-dorado (reacción positiva) dentro del citoplasma de los macrófagos localizados en el tejido afectado. Es importante señalar que las muestras de membrana sinovial presentaron de manera más significativa la reacción positiva. (ver fotografías 1 y 2).

El hallazgo de un depósito de color café-dorado dentro del citoplasma de los macrófagos indica la presencia de partículas virales que, en este caso, corresponden a partículas virales de AEC. puesto que se utilizó suero de cabra con anticuerpos específicos contra las proteínas internas y externas del virus (Gp-135 y p-28) de esta enfermedad.

A continuación se ilustran los resultados obtenidos en las muestras de membrana sinovial utilizadas en el presente trabajo.

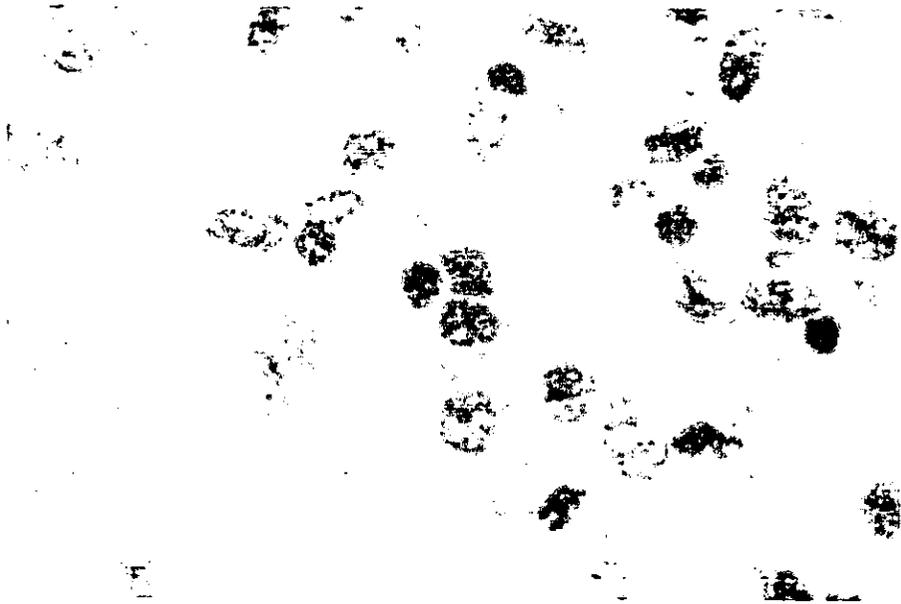


Figura 1. Membrana sinovial de cabra sana (100x, HE).



Figura 2. Membrana sinovial de cabra afectada con AEC (100x, HE). A la técnica de inmunoperoxidasa revelada con diaminobencidina (DAB), se observan depósitos color café dorado dentro del citoplasma de los macrófagos infectados con el virus de AEC (flechas).

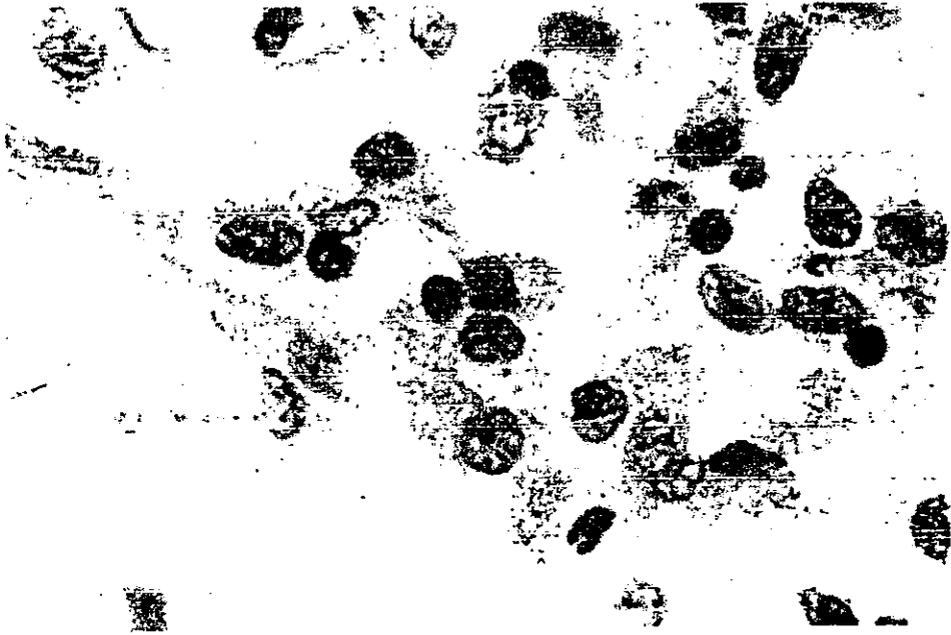


Figura 1. Membrana sinovial de cabra sana (100x, HE).

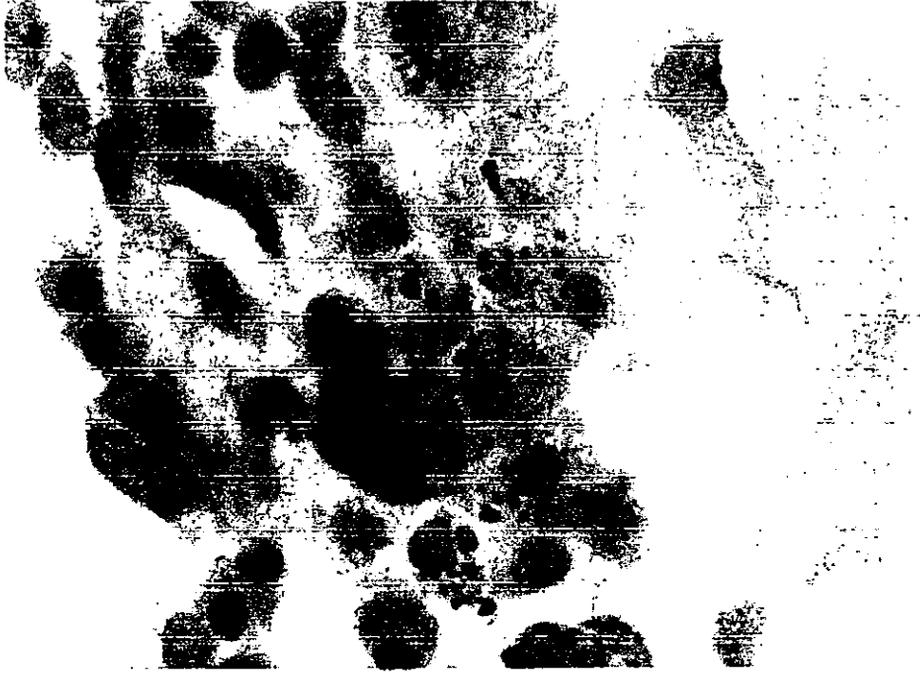


Figura 2. Membrana sinovial de cabra afectada con AEC (100x, HE). A la técnica de inmunoperoxidasa revelada con diaminobencidina (DAB), se observan depósitos color café dorado dentro del citoplasma de los macrófagos infectados con el virus de AEC (flechas).

APÉNDICE I
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES NECESARIAS PARA LA TÉCNICA DE
INMUNOPEROXIDASA

I. SOLUCIÓN DE PBS pH 7.2

- 1.- Agregar un litro de agua destilada a un matraz de Erlenmeyer.
- 2.- Colocar el matraz sobre un agitador magnético y encenderlo a velocidad moderada.
- 3.- Agregar 8g. de cloruro de sodio, 1.21g. de fosfato de potasio dibásico y 0.34g. de fosfato de potasio monobásico.
- 4.- Introducir el electrodo de un potenciómetro para verificar el pH.
- 5.- De ser necesario, ajustar el pH a 7.2 agregando ácido clorhídrico y/o sosa cáustica gota a gota.

II. SOLUCIÓN DE PBS TWEEN 20 AL 0.05%

A un litro de PBS pH 7.2 se le agregan 0.5g. de TWEEN 20 y se agita.

III. SOLUCIÓN REGULADORA TRIS-HCl IM, pH 7.6

- 1.- En 100 ml de PBS pH 7.2 agregar 1.57g de TRIS-HCl*.
- 2.- Colocar en agitador introduciendo el electrodo de un potenciómetro para verificar el pH y, de ser necesario, ajustarlo a 7.6 con ácido clorhídrico y/o sosa cáustica.

*El peso molecular del TRIS-HCl es 157.6.

(Mod. de SIGMA, 1996).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llevaron a cabo diferentes actividades encaminadas a dar apoyo a la CÁTEDRA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS CAPRINOS: INMUNOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO, tomando mayormente en cuenta el aspecto de diagnóstico de la Artritis Encefalitis Caprina, y la utilización de una técnica rápida, eficiente, segura, confiable y sobretodo práctica para la oportuna detección de dicha enfermedad y, por lo tanto, su adecuado control dentro de los diferentes hatos caprinos del país.

La técnica de inmunoperoxidasa resulta una herramienta valiosa para complementar otras pruebas de diagnóstico, tales como las serológicas (que detectan solamente anticuerpos), o las histológicas (que únicamente revelan grado de lesión en el tejido); esta prueba, al utilizar anticuerpos específicos, indica con muy poco margen de error la presencia del organismo para el que está elaborada. Probablemente lo ideal sería emplear una prueba serológica simultáneamente con una histoquímica, que en este caso sería la inmunoperoxidasa.

Los resultados obtenidos coincidieron con los que se reportan en la técnica de inmunoperoxidasa consultada en la literatura.

Esta prueba es muy sensible y, una vez estandarizada, puede ser llevada a cabo a un bajo costo e incluso podría implementarse en forma de "batería" para procesar al mismo tiempo diferentes muestras y diferentes enfermedades.

Es necesario que esta técnica se divulgue de forma más amplia para que llegue a ser de uso práctico y común dentro de los laboratorios que procesen muestras de ganaderías caprinas que alberguen esta enfermedad que, de no ser controlada a tiempo, puede llegar a ser un factor determinante en la merma de la producción y, por lo tanto, repercutir en las ganancias de los productores de ganado caprino.

Este trabajo permitió profundizar más en los conocimientos obtenidos a lo largo de la licenciatura, además de entrar en contacto con material y conocimientos que difícilmente se llegan a conocer durante un curso normal de Virología o de Inmunología. La ayuda de los asesores y co-asesores resultó invaluable y, por lo tanto, es importante aprovecharla para el mejor desempeño de las futuras actividades como profesionalista.

SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

Este trabajo es sólo una pequeña parte dentro de todo un proyecto encaminado a la investigación de la Artritis Encefalitis Caprina. Proporciona las bases para la estandarización de una técnica de diagnóstico que brinde a clínicos e investigadores la oportunidad de detectar una enfermedad por demás lacerante en la ganadería caprina, y que dicha detección sirva para que poco a poco se logre la erradicación de la AEC, puesto que este debe ser el fin que persiga un programa de investigación sobre el diagnóstico de cualquier enfermedad, independientemente de lograr los objetivos académicos y/o sociales del mismo.

Es importante que como alumnos valoremos el material y apoyo con que contamos al pertenecer a una institución de Enseñanza Superior de la calidad de la FES-C, y que ello nos sirva para que en un futuro nos desarrollemos satisfactoriamente como profesionistas capacitados dentro de nuestra área.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS D.S., CRAWFORD T.B. and KLEVJER-ANDERSON P. A pathogenetic study of the early connective tissue lesions of viral Caprine Arthritis-Encephalitis. American Journal Parhol. Vol. 99, p.p. 257-278, 1980.

ALVAREZ del V.J.L. Seroprevalencia de la Artritis Encefalitis Caprina en algunos estados de la República. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. F.E.S.C. Cuautitlán Izcalli, 1984.

ANDERSON A. A., HARKISS G. D. And WATT N. J.: Quantitative Analysis of Immunohistological Changes in the Synovial Membrane of Sheep Infected with Maedi-Visna Virus.

ARBIZA S. I. Producción de Caprinos. AGT. Editor. p.p. 2-18; México, 1986.

BEL KAHLA A., TAINTURIER D. and ZIEM B. (Appearance of the Arthritis-Encephalitis Syndrome in a herd of goats in Tunisia). Apparition du Syndrome Arthrite Encéphalite dans un troupeau de chèvres en Tunisie. Revue de MédecineVétérinaire. Vol.142 No.2, p.p. 11-113, 1991.

BLONDIN I., GRILLET C. and THIOGANE Y. Formation de cynsytia en culture et analyse de la composition proteique de plusieurs souches de virus de l'Arthrite et de l'Encephalite de la Chevre (CAE). Ann. Rech. Veterinary. Vol. 20, p.p. 153-158, 1989.

CARRERA M. C. La cabra: uno de los animales más eficientes ecológicamente. Productividad caprina. U.N.A.M. F.M.V.Z. p.p. 52-54. México, 1984.

CASTRO A.E. and HEUSCHELE W.R. Caprine Arthritis-Encephalitis. Ed. Veterinary Diagnostic Virology. p.p. 202-204, 1992.

CHEEVERS W.P., KNOWLES D.P., McGUIRE T.C., CUNNINGHAM D.R., ADAMS D.S. and GORHAM J.R. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the Caprine Arthritis-Encephalitis lentivirus. Laboratory investigation. Vol. 58, No. 5; p.p. 510-517, 1988.

CLEMENTS J.E., GDOVIN S.L., MONTELARO R.C. and NARAYAN O. Antigenic variation in lentiviral disease. Ann. Rev. Immunology. Vol. 6, p.p. 139-159, 1988.

CORK L.C. Differential diagnosis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. Journal American Veterinary M. A. Vol. 169, p.p. 1303-1306, 1976.

COLL M.J. Técnicas de Diagnóstico en Virología. Ediciones Díaz de Santos, S.A. p.p. 227-231; España, 1993.

CRAWFORD T.B., ADAMS D.S., SANDE R.D., GORHAM J.R. and HENSON J.B. The connective tissue component of the Caprine Arthritis-Encephalitis syndrome. American Journal Pathology. Vol. 100, p.p. 443-450, 1980.

CRAWFORD T. B. and ADAMS D. S. Caprine Arthritis-Encephalitis: clinical features and presence of antibodies in select goats population. Journal American Veterinary Medical Association. Vol. 78; p.p. 713-719, 1981.

DAWSON M. Caprine Arthritis-Encephalitis. Farm Practice. p.p. 8-11, 1987.

DEL AMO G. J. Y GARCÍA J. S. Manual sobre cabras. De. Ediciones, Mundi-Prensa. España, 1988.

ELLIS T. M., CARMAN H., ROBINSON W. F. and WILCOX G. E. The effect of colostrum-derived antibody on neo-natal transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis virus infection. Australian Veterinary Journal. Vol. 63. No.8; p.p. 242-245, 1986.

ELLIS T.M., WILCOX G.E. and ROBINSON W.F. Antigenic variation of Caprine Arthritis- Encephalitis virus during persistent infection of goats. Journal Gen. Virology. Vol. 68, p.p. 3145-3152, 1987.

GALINA M. y GUERRERO C. M. Productividad Caprina. U.N.A.M. F.M.V.Z. División de Estudios de Posgrado. p.p. 84-96; México, 1984.

GASKIN J. M. Testing for Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE). Dairy Goat Journal, Vol. 68, No.4; p.p. 27-32, 1990.

HECKERT R.A. . BRUCE W.M., RICHARDSON S.M. and BRISCOE M.R. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to Caprine Arthritis- Encephalitis virus in goat serum. Journal Veterinary Research. Vol. 56, p.p. 237-241, 1991.

KENNEDY S.S., NARAYAN O. and STRANDBERG J.D. The mammary gland as a target organ for infection with Caprine Arthritis-Encephalitis virus. Journal Comp. Pathology. Vol.95, p.p. 605-609, 1985.

KURSTAK E., MARUSYK R.G., MURPHY F.A. and VAN R.M. Virus variability, epidemiology and control Vol. 2. Ed. Plenum Medical Book. USA, 1990.

LEYVA V. H., MARTÍNEZ H. A., CORNEJO M. A., MONTARAZ J. A., ROJAS L. L., GARRIDO G. Artritis Encefalitis Caprina: Estudio Clínico y Patológico; UNAM, FESC; p.p. 70; Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias; Acapulco, México; octubre de 1994.

NAKAME P. K. y KAWAOI J. A. Peroxidase labelled antibody: a new method of conjugation. Journal Histochemistry Cytochemistry. Vol. 22, p.p. 1084-1091, 1974.

NARAYAN O. and CORK L.C. Caprine Arthritis-Encephalitis virus. Virus infections of ruminants. Vol. 3 ,third edition. Ed Elsevier. Amsterdam, 1990.

NAZARA C. S. Estudio de la Artritis Encefalitis Caprina en México. Tesis. Maestría en Ciencias Veterinarias, U.N.A.M. F.M.V.Z. p.p. 1-20; México, 1991.

NERMUT M.V. and STEVEN A.C. Perspectives in medical virology. Vol. 3. Ed. Elsevier, USA, 1987.

OLVERA ARGÜELLO M. A. Revisión Bibliográfica sobre la enfermedad Artritis Encefalitis Caprina de 1980 a 1982. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. F.E.S.C.; Cuautitlán Izcalli, Edo. De México, 1994.

PERK K. Presence of virus particles in neural cells of goats with Caprine Arthritis-Encephalitis. Research in Veterinary Science. Vol. 49, p.p. 367-369, 1990.

PERRIN G.G. L'arthrite encephalite caprine. Point Veterinaire. Vol. 23, No. 139, p.p. 713-718, 1991.

PETURSSON G. and HOFF-JORGENSEN R. Maedi-Visna and related disease. Third edition. Ed. Kluwer Academic Publishers. USA, 1990.

PYPER J.M., SHEFFER D., CLEMENTS J.E., NARAYAN O. and ROTT R. Hyaluronidase enhances cell fusion and synthesis of viral DNA during infection with Caprine Arthritis- Encephalitis virus. Microbial Pathogenesis. Vol. 5, p.p. 399-346, 1988.

ROBINSON W.F. and ELLIS T.M. Caprine Arthritis-Encephalitis virus infection. Australian Veterinary Journal. Vol. 63, p.p. 237-241, 1986.

ROBLES S. F. La selección de caprinos con base en características de importancia económica. Productividad Caprina, U.N.A.M. F.M.V.Z. p.p. 3-9; México 1984.

SIGMA Bio-Sciences. Immunochemicals 1996 Catalog: p.p.192, 194, 376, 398-400. St. Louis, MO, USA.

SMITH J.H. and MYERS F.I.:CAE antibody test kit commercially available. Dairy Goat Journal. Vol. 69, No. 4, p.p. 42-43, 1991.

STITES D.P. y HUGH H.F. Inmunología básica y clínica. Cuarta edición. Ed. El Manual Moderno. México, 1983.

SURMAN P. G., DANIELS E. and DIXON B. R. Caprine Arthritis-Encephalitis virus infection of goats in South Australia. Australian Veterinary Journal. Vol. 64, No.9; p.p. 266-271, 1987.

TERNYNCK TH. y AVRAMEAS S. Técnicas Inmuno-Enzimáticas. Grupo Editorial Iberoamérica. p.p. 53-63. México D.F., 1991.

TIZARD I. Inmunología Veterinaria, 3a. edición; Ed. Interamericana McGraw-Hill. México D. F., 1989.

WEINSHENKER B.G., DEKABAN G. and RICE G.P.A. Retrovirus and multiple sclerosis. I. Analysis of seroreactivity by Western blot and radioimmune assay. Neurology. Vol. 40, p.p. 1251-1253, 1990.

ZANONI R., PAULI V. and PETERHANS E. Detection of Caprine Arthritis-Encephalitis and Maedi Visna viruses using the polimerasa chain reaction. Experientia. Vol. 46, No. 3, p.p. 316-319, 1990.

ZINK M.C. and NARAYAN O. Lentivirus-induced interferon inhibits and proliferation of monocytes and restricts the replication of Caprine Arthritis-Encephalitis virus. Journal of Virology. Vol. 66, No. 6, p.p. 2578-2584.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA