

116 23



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Diseminación del virus de artritis encefalitis caprina
(AEC) a partir de machos caprinos infectados
experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS**

PRESENTA

HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ

TUTOR:

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

COMITE TUTORAL:

DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA

DR. ALVARO AGUILAR SETIEN

DR. JORGE GERMINAL CANTO ALARCON

DR. JORGE LUIS TORTORA PEREZ



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

OFICIO/FES-C/CGPMYDCPySA/ST/CGEP/892/X/2002

ASUNTO: Designación de Jurado.

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN DE POSGRADO
DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente.

El Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal autoriza al alumno **HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**, registrado con el número de cuenta **7114590-3** y con el número de expediente **38266**, para presentar su examen de grado de **Doctor en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**, con la tesis titulada **"Diseminación del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) a partir de machos caprinos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor"** a quien se le ha designado el siguiente jurado:

Presidente:	DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA
Primer Vocal:	DR. ÁLVARO AGUILAR SETIÉN
Segundo Vocal:	DR. GERMINAL JORGE CANTO ALARCÓN
Tercer Vocal:	DR. JORGE TORTORA PÉREZ
Secretario:	DR. GILBERTO CHÁVEZ GRIS
Primer Suplente:	DR. ANTONIO MORILLA GONZÁLEZ
Segundo Suplente:	DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 18 de octubre del 2002.

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
COORDINADOR GENERAL

C.c.p. Exp. de alumno
C.c.p. Archivo
FSG/HRA/mrc

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Av. 1º de mayo S/N, Campo 1, Edificio de Estudios de Posgrado,
Apartado Postal 25, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54700
Tel.: 5623-2018, Fax: 5868 2489



Dedicatoria

**A todas aquellas personas que apoyaron de cualquier forma el presente
trabajo de investigación**

Mil gracias.

Con agradecimiento

A la DEGAPA por el financiamiento al proyecto PAPIIT No. IN201798

**Al CONACYT por el financiamiento al proyecto No. 34964-B y por la beca
proporcionada No. 125047. Así mismo a la Cátedra:**

Estudio de las enfermedades infecciosas producidas por retrovirus. CLAVE 5.10.

FES-C-UNAM.

RESUMEN

Con el fin de determinar el efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor, se mantuvieron durante 10 meses 14 machos caprinos divididos en 4 grupos. Grupo I control negativo (n=3), grupo II infectados con una cepa mexicana (n=3), grupo III machos naturalmente infectados (n=5), y grupo IV infectados con la cepa de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC) (n=3). Los animales no presentaron diferencias significativas en el diámetro escrotal ni en el pH, motilidad, color, volumen o malformaciones microscópicas del semen. Al estudio patológico macroscópico los grupos I, III y IV no presentaron alteraciones. En el grupo II, un animal presentó un absceso en la cabeza del epidídimo derecho, con un contenido cremoso y amarillento, y en el grupo III, dos animales presentaron éstasis espermática, uno con hidrocele que contenía líquido seroso y otro con edema en la cabeza del epidídimo derecho. Todos fueron evaluados a inmunodifusión, ELISA, inmunotransferencia y PCR. En el líquido seminal y suero se detectó la presencia de anticuerpos que reconocieron proteínas virales con pesos de 14, 16, 19, 25, 27, 71, 90 y 135 kilodaltones. La presencia viral se detectó con la inoculación de líquido seminal en cultivo celular y posterior análisis por PCR, reconociéndose fragmentos característicos de 287 pares de bases específicos correspondientes al gen *gag*. El análisis histopatológico no demostró daño o alteración del aparato reproductor significativo en ningún grupo, con excepción de uno de los animales infectados naturalmente, que presentó formación de sincicios en la vesícula seminal, característico de la infección viral en cultivos celulares. En la mayoría de los animales infectados como en los no infectados se encontró ligera infiltración de células mononucleares, macrófagos activados englobando espermatozoides y formando células gigantes en el epidídimo, vesícula seminal, ampulla y glándulas bulbouretrales. A la histoquímica en la mayoría de los animales infectados se observaron evidencias de presencia viral en las células epiteliales de las glándulas anexas. Es posible concluir que el virus no produce alteraciones patológicas macroscópicas o microscópicas, sin embargo esta es presente en el tejido epitelial con la posibilidad de diseminarse por vía seminal.

Palabras claves: artritis encefalitis caprina, aparato-reproductor, líquido seminal.

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of the Caprine arthritis encephalitis virus in the reproductive apparatus. Fourteen male goats were divided into 4 groups during 10 months. a) Group I (Negative control n=3), b) Group II (Infected with a native strain n= 3) c) Group III (naturally infected n=5) , d) Group IV (Infected with ATCC strain n= 3). All of the animals did not present any significant differences in the scrotal diameter, pH, mobility, color, volume, nor macroscopic alterations in the semen. The macroscopic pathological study showed that groups I, III, y IV kept stable, but from group II, one male presented a creamy yellowish abscess on the right epididymis head. In the group III, 2 animals presented spermatic stasis, one presented a hydrocele with serose liquid inside, and the second one: an oedema on the right epididymis head. All of them were evaluated by immunodiffusion, ELISA, Western Blot and PCR. In the seminal liquid and sperm, antibodies against viral proteins with 14, 16, 19, 25, 27, 71, 90 and 135 kDa were detected. The viral presence in seminal liquid was found in cellular culture and the fragments of 287 pairs of bases specific of the gen gag were detected by PCR. No damage was found in any male at the histopathological analyses, but one in the group of the naturally infected presented syncytia in the seminal vesicle. Most of the infected and non infected animals showed slightly infiltration of mononuclear cells as well as activated macrophages with spermatozoa inside. On the other hand, giant cells were found in the epididymis, seminal vesicle ampulla and bulbourethral glands. Viral presence was demonstrated in epithelial cells of seminal vesicle, ampulla and prostate by histochemical methods. So, it is possible to say that the virus does not produce neither macroscopic nor microscopic pathological alterations, although, it is possible to disseminate the virus by the seminal route.

Contenido

1. Introducción.....	7
1.2. Clasificación taxonómica.....	9
1.2.1. Morfología.....	10
1.2.2. Propiedades físicas y fisicoquímicas.....	11
1.2.3. Ácido Nucleico.....	11
1.2.4. Proteínas.....	11
1.2.5. Organización genómica.....	12
1.2.6. Receptores de retrovirus.....	15
1.3. Características clínicas.....	16
1.4. Patogenia.....	18
1.5. Inmunidad.....	21
1.6. Transmisión.....	24
1.7. Diagnóstico.....	26
1.8. Prevención y control.....	28
1.9. Epidemiología.....	31
2.0. Hipotesis.....	34
3.0. Objetivo general.....	34
3.1. Objetivos particulares.....	34
4.0. Material y Métodos.....	35
4.1. Identificación de animales seropositivos al virus de AEC.....	35
4.2. Aislamiento e identificación del virus de AEC por medio del cultivo en membrana sinovial.....	35
4.3. Producción del inóculo viral del virus de AEC aislado en México.....	36
4.4. Animales experimentales.....	37
4.5. Obtención de suero y semen.....	37
4.6. Pruebas serológicas de selección.....	38
4.7. Inmunoelectrotransferencia.....	38
4.8. Reacción en cadena de la polimerasa.....	39
4.9. Muestras de tejido reproductor.....	40
4.10. Procesamiento de las muestras para la inmunocitoquímica.....	41
5.0. Resultados.....	43
5.1. Características clínicas genitales y seminales.....	43
5.2. Serología: inmunodifusión y ELISA.....	43
5.3. Inmunotransferencia de sueros.....	44
5.4. Inmunotransferencia de líquido seminal.....	47
5.5. Evaluación en cultivo celular.....	50
5.6. Reacción en cadena de la polimerasa.....	51
5.7. Patología.....	51
5.8. Histopatología.....	52
5.9. Inmunocitoquímica.....	56
6.0. Discusión.....	59
7.0. Conclusiones.....	69

8.0 Cuadros	
Cuadro 1. Lentivirus y sus células huésped.....	10
Cuadro 2. Principales genes auxiliares de los retrovirus.....	14
Cuadro 3. Receptores de retrovirus en linfocitos.....	16
Cuadro 4. Seroconversión de machos infectados con virus de AEC.....	44
Cuadro 5. Proteínas del virus de AEC identificadas por suero de los diferentes grupos por Inmunotransferencia.....	47
Cuadro 6. Proteínas del virus de AEC identificadas por anticuerpos en fluido seminal	50
Cuadro 7. Histopatología del aparato reproductor de machos caprinos infectados con AEC.....	54
Cuadro 8. Inmunocitoquímica de animales por grupo y órgano que presentaron respuesta positiva al virus de AEC.....	57
9. Figuras.	
Figura 1. Organización Genómica del virus de AEC.....	13
Figura 2. Proteínas virales identificadas en suero de animales infectados con AEC por wester blot... ..	46
Figura 3. Inmunotransferencia de líquido seminal de machos infectados con virus de AEC.....	49
Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa de CMSFC inoculadas con líquido seminal de machos Caprinos infectados con virus de AEC.....	51
Figura 5. Histopatología de animales infectados con la cepa FES-C con virus de AEC.....	55
Figura 6. Vesícula seminal de machos infectados con cepa FES-C.UNAM y epidídimo de naturalmente Infectados.....	55
Figura 7. Ámpula y vesícula seminal de machos naturalmente infectados e inoculados con ATCC de EC..	56
Figura 8.- Inmunocitoquímica de animales inoculados con virus de AEC.....	58
10. Apéndice.....	70
11. Referencias.....	77

1. Introducción

La artritis encefalitis caprina (AEC) es una enfermedad que fue reconocida en los Estados Unidos por Cork *et al.*, (1974) quienes describieron un síndrome de encefalomiелitis en cabritos de 2-4 meses de edad, y no fue sino hasta 1979 cuando se aisló el virus de los mismos rebaños con artritis y encefalomiелitis denominándose virus de la artritis encefalitis caprina (Crawford *et al.*, 1980; Adams y Crawford 1980), la enfermedad repercute económicamente en los rebaños por su presentación clínica con una reducción de la vida útil de los animales disminución de la producción de leche y anulación de venta de reproductores (Peretz *et al.*, 1993), ha emergido como una importante y costosa enfermedad en las cabras (Smith y Sherman 1994).

La AEC es una enfermedad con distribución mundial, que afecta principalmente a cabras productoras de leche en los países industrializados, Francia, USA, Canadá y Australia entre otros, con prevalencias de un 65% a 81% (East *et al.*, 1987 Crawford y Adams 1981., Adams 1984); otros países, como Noruega, tienen un 42%, mientras que países como Kenya y México presentan prevalencias de un 4-5%, en animales de producción semi-intensiva (Adams *et al.*, 1984., Nord *et al.*, 1998 ., Baba *et al.* 2000).

La AEC se reportó serológicamente por primera vez México en 1983 (Nazara *et al.*, 1983: a y b), y la caracterización de la enfermedad fue hecha por los mismos autores (Nazara *et al.*, 1985: c). Los estudios serológicos se realizaron en la zona norte, centro y sur de México y reportaron un 27.1% de prevalencia, en

animales de importación y mientras las cabras criollas resultaban negativas (Nazara, *et al.*, 1985). Gay *et al.*, 1986, reportan el primer aislamiento del virus en México. Posteriormente se identificó la presencia del virus de AEC, por medio de estudios serológicos, histopatológicos, inmunocitoquímicos y ultraestructurales (Leyva *et al.*, 1988), y recientemente su aislamiento en células de membrana sinovial y su identificación por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (Daltabuit *et al.*, 1999). Actualmente la AEC se encuentra enlistada en el Grupo 3 de enfermedades, plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos (Diario Oficial, 5 Marzo de 1999).

Esta enfermedad se caracteriza por ser afebril y poliartrítica en adultos, con mastitis e induración de la ubre, problemas neumónicos y menos frecuentemente encefalomiелitis en cabritos, (Rowe y East 1997). El diagnóstico serológico de la enfermedad se realiza a partir de suero, leche y calostro y el aislamiento viral a partir del DNA de las células blanco, monocitos-macrófagos, donde se le identifica en forma de provirus (East, 1993). La principal vía de diseminación es por calostro y leche, algunos investigadores sugieren que el virus de AEC puede eliminarse por el fluido seminal (Whinney 1997). Por lo tanto no se descarta la transmisión venérea tal como lo reporto Travassos *et al.*, (1998a., 1999b) y como sucede con otros retrovirus como el de la inmunodeficiencia humana (Vorhis *et al.*, 1991), inmunodeficiencia bovina (Nash *et al.*, 1995), el Maedi-Visna (De la Concha *et al.*, 1996) y la leucemia felina (Jordan *et al.*, 1999). Tampoco se ha documentado el efecto viral en tejido reproductor del macho, sin embargo,

estudios realizados por Grewal *et al.*, 1986, reportan una seroprevalencia mayor en machos que en hembras. Por otro lado, Ali, 1987 reporta un posible efecto del virus de AEC en el útero de cabras seropositivas, evidenciando una hiperplasia de folículos linfoides, con infiltrado de linfocitos. Recientemente, Lamara, 2001 confirma por estudios *in vivo e in vitro* una eficiente replicación del virus de artritis encefalitis caprina en células de la granulosa, sugiriendo que dichas células pueden servir como reservorios del virus.

1.2. Clasificación Taxonómica

La artritis encefalitis caprina es una enfermedad viral, el virus infecta a vertebrados perteneciente a las especies caprinas y ovinos, pertenece al genero Lentivirus, familia retroviridae (Murphy *et al.*, 1999; ICTV, 1999).

La Familia de los retrovirus tiene 7 géneros: *Alfaretrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gamaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* y *Spumavirus*.

En el género de los lentivirus se encuentran: el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2, virus de la inmunodeficiencia de primates: mono verde africano, sooty mangabey, rhesus, chimpancé, mandriles y el virus de inmunodeficiencia felina. En todos estos la célula blanco es el linfocitos T. En tanto el virus de la inmunodeficiencia bovina, virus de anemia infecciosa equina, virus de maedi-visna en ovinos y el virus de artritis encefalitis caprina, tienen como célula hospedadora la serie monocito-macrófagos, sin evidencias de

inducir inmunosupresión como sucede con otros retrovirus (Robinson y Ellis 1986; Murphy 1999; Peterhans 1999; Chebloune *et al.*, 2000). (Cuadro 1)

Cuadro 1
Lentivirus y sus células huésped.

ENFERMEDAD	HUESPED NATURAL	PRINCIPAL CELULA BLANCO	MANIFESTACIÓN CLINICA
Maedi-visna	Ovino	Monocito/macrófago	Neumonía, encefalitis, mastitis, artritis
Artritis encefalitis caprina	Cabra	Monocito/macrófago	Artritis, Neumonía, mastitis, encefalitis
Anemia infecciosa equina	Equino	Monocito/macrófago	Fiebre, anemia, asintomáticos
Inmunodeficiencia humana	Humano	Linfocito CD4+ Monocitos/macrófagos	Deficiencia inmune
Inmunodeficiencia felina	Gatos	CD4+ y CD8+, linfocitos Linf. B, monocito/macrófago	Deficiencia inmune
Inmunodeficiencia del simio	Monos	Linfocito Monocito/macrófago	Deficiencia inmune
Inmunodeficiencia bovina	Bovinos	Linfocitos T y B Cel. T Gama- Delta Monocitos-macrófagos	Infección subclínica Deficiencia inmune

Fuente: Pepin *et al.*, 1998.

1.2.1 Morfología

El virus de AEC se presenta como viriones envueltos, ligeramente pleomórficos, esféricos de 80-100 nm de diámetro, con superficie de apariencia rugosa, con pequeñas proyecciones, de aproximadamente 8 nm, dispersas regularmente en toda la superficie. Nucleocapside isométrica, nucleoide concéntrico en forma de bastón o forma de cono truncado. (Robinson y Ellis 1986; Murphy 1999., ICTV, 1999).

1.2.2 Propiedades físicas y fisicoquímicas

Densidad buoyante de 1.16-1.18 g cm³ en sucrosa; el virión es sensible al calor, detergentes y formaldehído. La infectividad no es afectada por las radiaciones. El virión contiene 35% de lípidos y 3% de carbohidratos (ICTV.,1999).

1.2.3 Ácido nucleico.

El virión que contiene 2% de ácido nucleico. El genoma es diploide, consistente en dos moléculas lineales de ARN de sentido positivo de 7-11 kp. La longitud total del genoma es la de un monómero de 9189 nucleótidos. Ácido nucleico encapsidado con dos copias empaquetadas por partícula en forma de dímero, unido por puentes de hidrógeno (ICTV 1999).

1.2.4 Proteínas

El virión contiene 60% de proteína. Las proteínas estructurales del virión son 6 principales, la gp135 y la gp de 120 kilodaltons (kd) proteínas glicosiladas de envoltura presentes en la superficie, codificadas por el gen viral *env*. La Gp 41, es una proteína transmembranal de envoltura glicosidada, también codificada por el gen *env*. P24 es una proteína de cápside, no glicosilada. La P17 es una proteína de matriz no glicosilada. La P11 es una proteína de cápside no glicosilada. Proteína específica de grupo, del gen *gag*. Además de 4 proteínas no estructurales, una P66 kd, transcriptasa reversa (RT) codificada por el gen *pol*; P32 integrasa (IN) que ayuda a la integración del provirus, codificada por el gen

pol; P14 proteasa (PT) esencial para la maduración e infectividad, codificada por el gen *pol*. La dUPTasa, enzima codificada por el gen *pol*, importante en la replicación, invasión y patogénesis del virus de AEC. Además de una Rnasa H, enzima necesaria para la replicación genómica (Turelli *et al.*,1996; Millar *et al.*,2000).(Figura 1)

1.2.5 Organización genómica

El virus se caracteriza por tener 3 genes codificados en el siguiente orden.

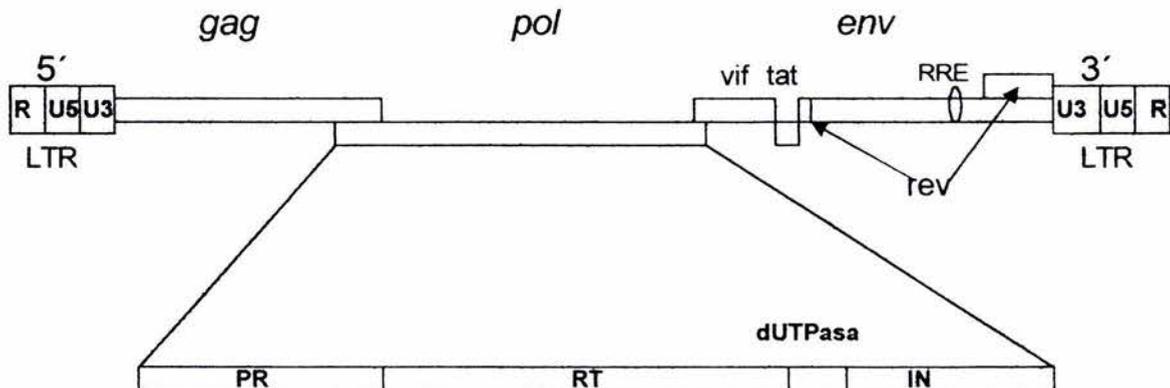
5'gag - pol - env 3'. *gag* (antígeno específico de grupo), *pol* precursor de la transcriptasa reversa , integrasa , proteasa Rnasa H y dUTPasa y *env* precursor de antígenos de envoltura con glicoproteínas de superficie y matriz respectivamente (Gp135, Gp120, Gp41). Además de los genes auxiliares *tat* de 10 kd promotor de la transcripción localizado dentro de la porción 5' LTR, *vif* de 29 kd (antes gen Q, el cual es requerido para una eficiente producción viral) , *rev* de 19 kd importante en el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma, RRE elemento de respuesta que lleva ARN al sitio de unión del mismo, localizado en el gen *env*. Las proteínas del gen *gag* y *pol* son más conservadas , no así las del gen *env* y genes reguladores (Robinson y Ellis 1986; Saltarelli *et al.*,1990; Harmache *et al.*, 1995; Turelli y *et al.*,1996; Pepin *et al.*,1998) (Figura 1)

La parte final 5' del genoma tiene un *cap* con secuencia de tipo $1m7G5ppp5'GmpNp$. La parte final 3' de cada monómero contiene una poliadenina. La parte 3'-terminal tiene estructuras parecidas al ARNt. El genoma

tiene duplicaciones terminales largas (LTR de 449 bases de longitud) en 3 regiones: U3, R, y U5 de 287,85 y 78 bp respectivamente. La región U3 tiene elementos promotores necesarios responsables de la transcripción del provirus, la región R contiene sitios de iniciación de la transcripción y la región U5 es la primera parte del genoma que puede ser transcrita en forma inversa (Pepin *et al.*, 1998., Saltarelli *et al.*, 1990; ICTV 2000) (figura 1). Así mismo el genoma del virus de AEC tiene pequeños marcos de lectura abiertos, denominados ORF (marcos abiertos de lectura) entre el gen *pol* y *env* (Saltarelli *et al.*, 1990).

Figura 1

Organización genómica del virus de AEC



Los genes auxiliares no los presentan todos los retrovirus, además tienen genes reguladores adicionales, que codifican para las llamadas proteínas accesorias, sin embargo, los que se han identificado, se relacionan con

replicación viral temprana y/o tardía, transcripción viral y producción viral (Emerman y Malim 1998). Una de las características por las que se distinguen los lentivirus de otros retrovirus, es la marcada complejidad en su genoma viral ya que no todos tiene los genes accesorios con propiedades biológicas y de patogenicidad (Chebloune *et al.*, 2000) (cuadro 2).

Cuadro 2. Principales Genes auxiliares de los retrovirus

Virus	Rev	tat	vif	vpr	vpr/vpx	vpu	nef	ORF
LM (MURINO)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HIV-1(HUMANO)	+	+	+	+	NO	+	+	NO
HIV2 (HUMANO)	÷	+	+	NO	+	NO	+	NO
IS (MACACO)	+	+	+	NO	+	NO	+	NO
IF (FELINO)	+	NO	+	NO	NO	NO	NO	A
AIE (EQUINO)	+	+	NO	NO	NO	NO	NO	S2
AEC (CAPRINO)	+	+	+	NO	NO	NO	NO	+
M/V (OVINO)	+	+	+	NO	NO	NO	NO	NO
IB (BOVINO)	+	+	+	NO	NO	NO	NO	NO

LM=leucemia-murina; HIV-1=Inmunodeficiencia-humana-tipo1; HIV2=Inmunodeficiencia-humana-tipo2; IS=Inmunodeficiencia del simio; IF=inmunodeficiencia felina; AIE=Anemia infecciosa equina; AEC=artritis encefalitis caprina; M/V=Maedi/Visna y IB=Inmunodeficiencia bovina
Fuente: Saltarelli *et al.*, 1990., Millar *et al.*,(2000)

1.2.6 Receptores de retrovirus

El virus de AEC produce en cultivos celulares un efecto citopático, caracterizado por la formación de sincicios, generados por la fusión de células infectadas con células susceptibles, presumiblemente debido a la interacción de la envoltura glicoprotéica viral con receptores celulares glicosilados. En el caso del virus de AEC se sugiere que el ligando de la glicoproteína de envoltura (gp135) del virus tiene una interacción específica con un receptor complejo o un receptor de superficie en células de membrana sinovial (Hullinger 1993). Sin embargo, el tropismo del virus de AEC por receptores en otros tejidos no se tiene claro. La glicoproteína de superficie gp135 parece ser análoga a la gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana en linfocitos, monocitos-macrófagos, que interacciona con CD4, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, por lo que el supuesto receptor del virus de AEC, también podría pertenecer a esta superfamilia, sin embargo, la infección de linfocitos no ha sido reportada en AEC (Moore 1993; Hullinger *et al.*, 1993). Estudios realizados con el virus de Maedi-Visna de pequeños rumiantes sugieren que el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II es su receptor. Sin embargo los receptores de AEC parecen utilizar receptores celulares diferentes (Jolly y Narayan 1989). Por otro lado la entrada del virus de AEC en macrófagos pudiera estar dada por un fenómeno de macropinocitosis, como sucede en caso del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, ó con la ayuda de la subunidad transmembranal

de la envoltura viral, involucrada en la entrada del virus a través de la fusión membranal (Bénil *et al.*, 2001, Maréchal *et al.*,2001). (cuadro 3)

Cuadro 3
Receptores de retrovirus en Linfocitos

	CD4	CCR5	CXCR4
INMUNODEFICIENCIA HUMANA 1	+	+	+
INMUNODEFICIENCIA HUMANA 2	+	+	+
INMUNODEFICIENCIA DEL SIMIO	+	+	NO
INMUNODEFICIENCIA FELINA	NO	NO	+
MAEDI/VISNA	NO	?	?
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	NO	?	?
ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA	NO	NO	NO

Fuente: Pepin *et al.*, 1998., Sommerfelt,1999; Weiss,2000. Millar *et al.*, 2000.

1.3 Características Clínicas

La artritis encefalitis caprina (AEC) es una infección que produce una enfermedad persistente, que no siempre produce las típicas manifestaciones clínicas, dando lugar a animales aparentemente sanos, solo el 35 % de los

caprinos infectados muestran la signología característica del padecimiento (Dawson y Wilesmith, 1985; Smith y Randall, 1988; Rowe y East, 1997).

La AEC se caracteriza por afectar diferentes tejidos y ser afebril; en cabritos se puede observar una parálisis ascendente, acompañada de ataxia del tren posterior que progresa rápidamente a una parálisis irreversible consecuencia de una leucoencefalomielitis (Adams *et al.*, 1984; Murphy *et al.*, 1999). La forma clínica más constante ocurre en animales adultos de 2-9 años de edad, que presentan una artritis crónica unilateral o bilateral de carácter prolongado y progresivo, con afección de tejidos periarticulares principalmente de articulaciones carpales, mientras que la alteración en las articulaciones metacarpo-falangiana, escápulo-humeral, coxofemoral y atlanta-occipital es menos frecuente. Se observa un incremento de volumen de la articulación en la fase inicial, de consistencia blanda, dolorosa y caliente al tacto, pero al transcurrir la enfermedad el tejido periarticular se endurece y en casos avanzados llega a deformarse (Heckert, 1992., Peretz, 1993 Petturson *et al.*, 1990).

La presentación neumónica puede presentarse como neumonía intersticial crónica, que se establece en los lóbulos caudales y craneoventrales, situación que se acompaña por disnea y emaciación, es afebril y persiste el estado de alerta (Dawson, 1987).

Otra manifestación clínica de la AEC es la mastitis intersticial, la cual produce una induración de la glándula mamaria (ubre de madera) a nivel de la cisterna de la leche (Peretz *et al.*, 1993), provocando a su vez atrofia, sin edema, pero

con inflamación, que afecta la producción de calostro y leche (Robinson y Ellis 1993). Esta afección se presenta principalmente en los primeros tres días posparto; sin embargo también puede presentarse una mastitis subclínica, con hipertrofia de nodos linfoides retromamarios (Dawson 1987; Petturson *et al.*, 1990; Heckert *et al.*, 1992).

La afección reproductiva reportada clínicamente ha sido la metritis y/o endometritis, caracterizada por no ser pirogénica y mantener al animal con buen apetito y con actitud alerta (Dintel y Morein, 1990).

1.4. Patogenia

El virus de la AEC es absorbido en el intestino en la célula blanco infectada, monocito que contiene el genoma viral en forma de provirus; cuando el monocito se convierte en macrófago, se induce la transcripción del ARN proviral, provocando la replicación y excreción de partículas virales (Narayan y Clement 1989). Así el virus puede migrar en células infectadas, como en un “caballo de Troya”, hacia el sistema nervioso central del cabrito, donde produce una visible malacia focal en la sustancia blanca, con focos de células mononucleares inflamatorias y desmielinización. (Hasse, 1986; Peterhans, 1999; Murphy 1999). La primera infección ocurre mayoritariamente por el paso de macrófagos infectados, presentes en el calostro, la leche, la sangre, o de otras secreciones, que ya en el sistema permiten que el virus se disemine en el organismo y alcance pulmones, articulaciones, glándula mamaria y aparato reproductor, donde permanece

latente, hasta que los procesos hormonales o inflamatorios propicien la multiplicación del provirus y la producción de partículas virales en 1 a 3 meses en los animales jóvenes (Peretz, 1993; Saunders, 1998).

Las lesiones en articulaciones son el resultado de una fuerte respuesta inmune con infiltrado de células inflamatorias, que provoca hipertrofia e hiperplasia de las vellosidades de la membrana sinovial con formación de folículos linfoides (Narayan *et al.*, 1992; Perry *et al.*, 1995); conforme progresa la enfermedad la membrana sinovial y el tejido conectivo periarticular presentan fibrosis, necrosis y mineralización; en casos avanzados la destrucción del cartílago se da por la acción de condrocitos que elaboran factores de degradación muy parecidos a los que se producen en la artritis reumatoide (Haase, 1986; Trigo, 1991., Leyva *et al.*, 1988).

En el pulmón: el gran infiltrado de linfocitos y monocitos en la pared alveolar interfiere con el intercambio gaseoso, provocando una neumonía intersticial (Russo *et al.*, 1993).

La glándula mamaria es otro órgano blanco del virus de artritis encefalitis caprina, ya que la continua presencia de monocitos-macrófagos con genoma viral en la zona, por procesos inflamatorios relacionados con mastitis permite que el monocito al convertirse en macrófago realice la transcripción viral del genoma y por consiguiente la replicación activa (Kennedy- Stoskopf *et al.*, 1985., Lerondelle *et al.*, 1989., Narayan y Clement 1989).

La transcriptasa viral se puede encontrar en tejidos que presentan inflamación como el cerebro, cordón espinal, pulmón, articulación y glándula mamaria, sin embargo, el ARN viral también se puede encontrar en áreas sin inflamación como endotelios de vasos que irrigan cerebro, zonas perifoliculares del bazo y en células localizadas en las criptas epiteliales del intestino delgado, tubulos renales y glándula mamaria (Zink *et al.*, 1990).

En el tracto genital de la hembra Ali en 1987, describe una hiperplasia linfoide folicular en el utero de cabras con serología positiva, atribuyendo la lesión a la posible presencia del virus. La AEC es una infección multisistémica compleja, que puede tener diferentes grados de patogenicidad, dependiendo de la cepa viral (Cheeveers,1988., Blondi *et al.*,1989); Perrin en 1997 reporta al menos 7 variantes del virus identificadas en Francia.

Algunos lentivirus han mostrado capacidad de replicarse en células epiteliales de diferentes orígenes incluyendo el tracto reproductor, intestino y colon de pequeños rumiantes, sugiriéndose que la infección no solo ocurre en monocitos sino también en células epiteliales de la glándula mamaria de la cabra, aun en ausencia de efecto citopático (Carpenter y Chesebro, 1989; Yahi *et al.*, 1992 Zhang y *et al.*, 1997., Jan *et al.*,2000., Mselli-Lakhal *et al.*, 2001).

El tropismo del virus pareciera estar dado por la migración de monocitos/macrófagos infectados a zonas de inflamación, sin embargo, se ha reportado la presencia del virus de AEC en células de la granulosa, las cuales

pueden servir durante la fase subclínica de la infección como reservorios del virus (Lamara, 2001).

El aparato reproductor del macho caprino con presencia normal de células inflamatorias que aumentan en situaciones de origen traumático o por otras infecciones, puede incrementar el riesgo de replicación y diseminación viral, ya que se incrementa el aporte de sangre a la zona y la migración de macrófagos (Rowe y East 1997).

1.5. Inmunidad

La infección por el virus de artritis encefalitis caprina se identifica por la presencia de anticuerpos séricos específicos. Las inmunoglobulinas aparecen de 3 a 6 meses o más, de la infección neonatal y persisten variablemente después de cada reactivación viral, así mismo la tasa de anticuerpos anti-AEC varía con el estado hormonal del animal (Peretz *et al.*, 1993., Souriou, 1998).

La transmisión pasiva de anticuerpos por medio del calostro, leche, o suero no protege contra la infección. Cabras experimentalmente infectadas con virus de AEC producen una respuesta humoral detectable por ELISA 40 a 60 días posinfección, alcanzando un título máximo entre el día 49 -77, decreciendo a partir de este momento, pero siendo aún detectable a los 9 meses posinfección (Robinson y Ellis 1986). Si se presenta una reactivación viral se lleva a cabo una seroconversión sérica en un periodo de 1-2 meses (Rimstand *et al.*, 1993).

Por otro lado la inmunidad celular dada por los linfocitos en calostro o leche de madres infectadas y excretoras del virus tampoco tiene un papel protector (Peretz *et al.*, 1993., Leroux y *et al.*, 1997). A diferencia de otros retrovirus la replicación del virus de AEC no afecta la respuesta inmune, sin embargo participa en el desarrollo de lesiones y en el incremento de transformación de monocitos a macrófagos, propiciando la replicación viral y amplificando el fenómeno, con una fuerte respuesta de anticuerpos precipitantes, principalmente contra glicoproteínas de superficie, pero con ausencia de anticuerpos neutralizantes. Esto permite la persistencia del virus aun en presencia de respuesta inmune (Robinson y Ellis 1987., Clements *et al.*, 1988., Kemp *et al.*, 2000).

Uno de los factores que permite evadir la respuesta inmune es la variación antigénica, que puede contribuir al progreso de la enfermedad, o a la diseminación viral a otros órganos o tejidos del organismo en forma de provirus dentro de macrófago infectados Blondin *et al.*, 1989., Knowles *et al.*, 1991., Valas *et al.*, 2000).

Una de las respuestas inmunes más estudiadas, ha sido la lesión articular, la cual provoca una continua activación de células plasmáticas en el espacio subsinovial, con gran aumento de IgG1, incremento de células mononucleares, con disminución de fluido articular, acúmulo de focos linfoides, con células tipo, CD4, CD8, linfocitos gama delta ($\gamma\Delta$) y macrófagos que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, con producción de interferon alfa. El cuadro es muy semejante a la de artritis reumatoide en humanos. (Zink *et al.*, 1987., Zink

y Narayan 1989., Wilkerson *et al.*, 1995). Por otro lado predomina la respuesta inmune humoral (tipo II), con niveles bajos de linfocitos CD4, aspecto que puede contribuir a la patogénesis de la AEC (Perry *et al.*, 1995., Von Bodungen *et al.*, 1998).

Los animales infectados pueden presentar seroconversión y conforme avanza la infección la enfermedad se hace persistente, con o sin presentación de cuadro clínico. Este comportamiento viral puede ser ocasionado por variantes del virus o por características genéticas del huésped (Narayan 1989).

Sin embargo no tiene la característica de una enfermedad inmunosupresora o con deficiencias marcadas del sistema inmune (Robinson y Ellis 1986., Peterhans 1999., Chebloune *et al.*, 2000). Estudios sobre poblaciones de linfocitos circulantes en cabras infectadas con virus de artritis encefalitis caprina, indican que éstas no se ven afectadas o no se encuentran diferencias significativas con respecto a las cabras sanas (Mérida *et al.*, 1995., Grezel *et al.*, 1997., Jolly *et al.*, 1997). Lo que si se ha encontrado en animales infectados con AEC es una baja en la actividad de células asesinas naturales (NK), factor que podría contribuir al establecimiento de una infección persistente (Mdurvwa *et al.*, 1994). Los macrófagos infectados expresan el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH II) con la ayuda del llamado interferon lentiviral que estimula la producción de prostaglandinas(PGE2), que a su vez dan lugar a una replicación viral restringida, por la inhibición de la proliferación de monocitos infectados. Cuando se incrementa la activación viral, aumenta la expresión de CMH II, estimulando a

su vez linfocitos CD4, y consecuentemente producen más citocinas y proliferación de linfocitos T, hasta dar una respuesta linfocitaria proliferativa (Zink *et al.*,1987., Zink y Narayan1989). Se ha observado que animales artríticos, crónicamente infectados, con caquexia y pérdida de pelo presentan una elevada producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa). Por otro lado existen estudios que reportan que el virus de AEC puede modular las funciones accesorias de macrófagos infectados *in vivo e in vitro* y producir una desregulación de las citocinas producidas durante el curso de la enfermedad. (Mdurvwa 1994., Werling *et al.*,1994., Adeyemo *et al.*,1997., Lechner *et al.*,1997).

1.6 Transmisión

La AEC se transmite principalmente en forma vertical a través del calostro y la leche (Adams *et al.*, 1983., Ellis 1983., Ellis *et al.*, 1986., Gasking 1990). No obstante, existen potencialmente otras rutas de diseminación como son: la perinatal, intrauterina, por secreciones vaginales durante el nacimiento, loquios de cabras infectadas posparto, secreciones salivales y respiratorias de la madre al cabrito, por contacto íntimo entre las cabras a través de secreciones infectadas. (Ali 1987., Rowe y East 1997., Rowe 1999). Se sabe que las máquinas ordeñadoras o las manos y toallas que contaminen la leche, pueden ser potenciales diseminadoras del virus, además de las células epiteliales de glándula mamaria contenidas en la leche, (Crawford y Adams 1981., East *et al.*,

1993., Lerondele1989., Mselli-Lakhal *et al.*, 1999). Se reconoce el papel que pueden jugar vectores mecánicos como jeringas, tatuadores, instrumentos o equipos de descorne contaminados con pequeñas cantidades de sangre, que pueden vehiculizar monocitos infectados, (Narayan *et al.*, 1983., Gendelman *et al.*, 1985).

La transmisión venérea vía semen es factible, como ocurre con el síndrome de inmunodeficiencia humana, el virus de la inmunodeficiencia bovina, la leucosis bovina, el Maedi-Visna, el virus de leucemia felina (Nash *et al.*, 1995., Ali 1987., De la Concha 1996., Rowe y East 1997 ; Travassos *et al.*, 1998 a y 1999 b). La presencia de células inflamatorias en el semen o prepucio incrementa el riesgo de transmisión. La convivencia de machos infectados en época de celo incrementa el riesgo por la monta entre ellos, además del riesgo que implican sus secreciones respiratorias, orina y saliva (East *et al.*, 1992). Rowe y East (1997) reportan la presencia de virus en células de moco estral y lavados prepuciales. La transferencia de embriones de animales positivos a negativos se utilizó como un alternativa para el control de la enfermedad, sin embargo estudios recientes demuestran que el virus de AEC puede mantenerse en células de la granulosa *in vivo e in vitro* y éstas pueden servir como reservorios del virus durante su fase subclínica (Lamara *et al.*, 2001).

Experimentalmente la AEC puede reproducirse por infección vía la glándula mamaria, oral, intrarticular, intracerebral, intraperitoneal e intravenosa con dosis de $2 \times 10^{6-7}$ TCDI₅₀. La seroconversion es variable y la vía más rápida para

conseguirla es la intravenosa (4 semanas) (East *et al.*, 1992., Rowe y East 1997).

Por otro lado, la transmisión ínter-especie de ovino a cabra y viceversa, ha sido demostrada experimentalmente sin presentación de signos clásicos de la enfermedad, con excepción de borregos mouflon donde se demostró la infección *in vivo e in vitro*. Este tipo de infección inter-especie puede resultar en una nueva adaptación del virus al hospedero y generar una nueva cepa viral, con diferente grado de patogenicidad y/o un amplio margen de tropismo para otras especies. (Sundquist *et al.*, 1981., Chebloune *et al.*, 1999., Guiguen *et al.*, 2000 Rolland *et al.*, 2000).

1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de la AEC esta basado principalmente en la detección de anticuerpos antivirales en suero, calostro o leche por una variedad de métodos , incluyendo la inmunodifusión en agar gel (AGID), las pruebas inmunoenzimáticas(ELISA) e inmunotransferencia (W B). La AGID tiene excelente especificidad pero insuficiente sensibilidad. Las ELISAs basadas en antígenos preparados de células infectadas o antígenos recombinantes, compuestos principalmente de antígenos específicos de grupo (capside, glicoproteínas transmembramales) y de glicoproteínas de envoltura viral, tienen buena especificidad siempre y cuando la muestra a evaluar se diluya, para evitar resultados falsos positivos. El WB es usado en forma muy similar a como se

emplea para el diagnóstico del síndrome de inmunodeficiencia humana, donde se requiere evaluar sueros con resultados indeterminados y no es usado rutinariamente para el diagnóstico de la enfermedad (Dahlberg *et al.*, 1981., Houwers y Schaake 1987., Guiguen *et al.*, 1990., Whetstone 1991., Hockett *et al.*, 1992., Zanoni *et al.*, 1994., Belov y Whalley 1988., Peterhans., 1999., Nord 1998., Kwang 1995., Clavijo 1995., Davis *et al.*, 1997., Knowles 1997., Rowe y East 1997., Souriou 1998., Baba 2000) . Por otro lado la identificación del virus requiere de pruebas más sofisticadas que no son utilizadas rutinariamente por la mayoría de laboratorios como métodos de diagnóstico, sino como apoyo a proyectos de investigación como: Inmunoprecipitación donde el antígeno viral es marcado radioactivamente; reacción en cadena de la polimerasa con sus diferentes variantes (PCR, RT-PCR Nester-PCR, hibridización *in situ*), quimioluminiscencia e inmunocitoquímica. (Zink *et al.*, 1990., Gopal *et al.*, 1993., Clavijo y Thorsen 1994., Leroux *et al.*, 1997., Storset., 1997., Mselli-Lakhal *et al.*, 1999., Guiguen 2000., Lamara *et al.*, 2001).

Hay una serie de aspectos que se tienen que tomar en cuenta para considerar una "prueba de oro" como método de diagnóstico de la artritis encefalitis caprina. Entre ellos los antígenos del virus de Maedi Visna (p25. p27 gp135) que se usan en algunas pruebas, la sensibilidad (falsos negativos) y especificidad (falsos positivos) de la prueba, la variación antigénica de algunas cepas, la pureza del antígeno utilizado, la medición de anticuerpos calostrales de la madre infectada en el cabrito, la seroconversión poco definida en los animales infectados, el

aislamiento viral de portadores sanos con títulos bajos de anticuerpos, la identificación de provirus en células de calostro y leche, la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad por algunas razas, los diagnósticos para pruebas de segregación en hatos o los diagnósticos confirmativos de la enfermedad en casos procedentes de áreas libres de la misma por hallazgos clínicos, histopatológicos y/o inmunohistoquímicos. Aunado a esto el costo y la estandarización de las pruebas utilizadas entre los diferentes laboratorios, puede ser frustrante para clínicos, ganaderos y personal de laboratorio (Kirkl y Batty., 1987., Gopal *et al.*, 1993., Reddy *et al.*, 1993., Zink *et al.*, 1993., Dolf y Ruff 1994., Clavijo y Thorsen 1995., Storset 1996., Knowles 1997., Rosati *et al.*, 1999).

1.8 Prevención y control

Con el fin de evitar la alta prevalencia de la enfermedad en los hatos caprinos, se requiere realizar una serie de medidas en cabritos, hembras (ovocitos) y machos (semen), en el manejo y tratamiento del calostro, uso de calostro de hembras libres de artritis, segregación de animales positivos por estudios serológicos a diferentes intervalos, dependiendo de la incidencia en el rebaño y cuidado en el manejo de biosecreciones de los animales infectados (Balha, 1995; Rowe y East 1997; Saunders, 1998; Martínez *et al.*, 2000). Solo el 35% de los animales infectados presentan cuadro clínico de AEC y el resto actúa como reservorio y difusor de la enfermedad (East *et al.*, 1987).

El evitar una alta densidad de animales infectados y cabras susceptibles disminuye la transmisión horizontal (Rowe *et al.*, 1992), sin embargo esto no es fácil de conseguir en explotaciones intensivas. Por otro lado, el uso de inmunógenos experimentales contra esta enfermedad no permite controlar la enfermedad, ya que exacervan los casos de artritis (Knowles *et al.*, 1990; Vitu *et al.*, 1993., Russo *et al.*, 1993.) y no previene adecuadamente contra los desafíos. Sin embargo, Beyer *et al.*, (2001) al inmunizar intradermicamente con un ADN plasmídico que expresa proteínas del gen de envoltura, lograron inducir una respuesta sérica de tipo TH2, en la cual predomina la IgG2, el anticuerpo con mayor eficiencia en los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mecanismos que podrían controlar mejor al agente viral (MacConellan *et al.*, 2000., Beyer *et al.*, 2001). Aunque, como ya se dijo, no existe una vacuna comercial contra la enfermedad, la respuesta inmune a este virus se da principalmente de dos formas. La primera, que consiste en un bajo título de anticuerpos hacia antígenos de superficie (SU- gp135) y transmembranales (TM- gp 41), con una producción de IgG2 contra antígenos TM y una fuerte respuesta de linfocitos T subclase CD4, caracterizada por la producción de interferón gama, con una baja carga viral. La segunda respuesta, característica de animales artríticos, asociada con elevada carga viral y un aumento de anticuerpos contra gp135 en suero y líquido sinovial de tipo IgG1 principalmente y un aumento de linfocitos T productores de IL-4 (Kemp *et al.*, 2000; Beyer *et al.*, 2001). Es importante resaltar que el virus no produce inmunosupresión en los macrófagos,

pero si una desregulación en la producción de citocinas, como es el caso de un elevada producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF), que clínicamente se manifiesta con caquexia en los animales infectados. El encontrar anticuerpos contra este virus sin afectarse la respuesta humoral es un indicio de infección (Robinson y Ellis, 1986 ; Lechner *et al.*,1997), por lo que las actividades encaminadas a erradicar la enfermedad se apoyan en programas de acreditación oficial y voluntaria como los realizados en Australia, Nueva Zelanda, y Suiza, con la ayuda de pruebas serológicas a intervalos iniciales de 6-12 meses y posteriormente en forma anual, eliminando constantemente los reactores positivos hasta limpiar el rebaño (Robinson y Ellis., 1985.,Vogt *et al.*,1999).

Se han sugerido las siguientes medidas para controlar y prevenir la AEC :

- a) Prevenir la transmisión perinatal, removiendo al cabrito al nacimiento sin que entre en contacto con secreciones de la madre, en particular evitar que ingieran calostro o leche
- b) Prevenir la transmisión por calostro o leche, para lo cual hay que calentar el calostro y leche a 56°C por una hora.
- c) Programa de vigilancia serológica a diferentes intervalos, dependiendo de la incidencia de la enfermedad en cada explotación, pero se puede hacer cada seis meses.
- d) Ordeñar primeramente animales seronegativos.
- e) Segregación completa de animales seropositivos.

- f) Evitar el riesgo potencial de transmisión iatrogénicas con agujas o instrumental quirúrgico, tatuadores y aretadores.
- g) No utilizar semen de machos seropositivos, mucho menos con balanopostitis o inflamaciones genitales.
- h) No mezclar comederos o bebederos de animales infectados con los de cabras libres de AEC.
- i) No realizar transferencia de embriones de hembras seropositivas.
- j) Desinfección con cloro al 2%.

Es pertinente evaluar a la cría, reproductores y semen antes de introducirlos en hatos libres y realizarles monitoreos a diferentes intervalos, dependiendo la incidencia de la enfermedad con el fin de confirmar su estatus serológico.

(Peretz, 1993; Balha, 1995; Rowe, 1999).

1.9. Epidemiología

Aunque la enfermedad esta ampliamente distribuida a nivel mundial, prevalece en países de producción intensiva de leche (Adams *et al.*, 1984; East *et al.*,1987). En México se ha descrito la AEC, sin embargo no se conoce el impacto y distribución real de la enfermedad en el ganado. A nivel mundial se desconoce el impacto que juegan los sementales en la transmisión de la enfermedad; así como, los cambios o alteraciones sobre su aparato reproductor (Nazara *et al.*,1985; Gay *et al.*,1986; Nazara 1991; Avalos 1992; Leyva *et al.*,1998; Dean y Nancy 1977; Daltabuit *et al.*,1999). Aunque el virus de la AEC infecta

principalmente células de la línea monocito-macrófago, puede replicarse en el sinovio, glándula mamaria, sistema nervioso y pulmón. La edad es un factor de riesgo a la infección, ya que la ingesta de calostro de hembras contaminadas que contiene células portadoras del virus, puede infectar al cabrito por vía digestiva durante las primeras horas de vida; otro factor que favorece la contaminación de cabritos, es mezclar el calostro de todas las hembras, incluyendo las seropositivas. El hacinamiento parece jugar un papel importante en la diseminación (Peretz *et al.*, 1993). El largo período de presentación clínica de la enfermedad, favorece la convivencia en los hatos de animales susceptibles con cabras infectadas (Rowe *et al.*, 1992).

Existen informes de posible transmisión en útero y por secreciones vaginales al nacimiento (Rowe y East, 1997). Se puede decir que las fuentes de contaminación por orden de importancia son: calostro, leche, sangre (tatuaje, jeringas con restos sanguíneos y descorne), secreciones y excreciones. Así también, las malas prácticas higiénicas de ordeño propician el contagio. Otro aspecto relevante en la posible difusión de la enfermedad por vía venérea, se ha demostrado que las células prepuciales del macho y semen pueden albergar al virus, así la presencia de células inflamatorias en semen o prepucio pueden favorecer la distribución de la enfermedad; además la convivencia continua de machos con en actividad sexual, puede ser un mecanismo potencial de difusión del virus (Rowe y East 1997). Travassos *et al.*, (1998a, 1999b) describen la eliminación del virus en forma natural y experimentalmente en el semen de

machos infectados. En la transmisión horizontal las hembras juegan un papel importante en la diseminación de la enfermedad, el virus se puede encontrar en el moco estral y los loquios (East *et al.*,1993). Asi mismo, Lamara *et al.* (2001) confirman que el virus puede replicarse en células de la granulosa, con la consecuente probabilidad de diseminación vía ovocitos o embriones. Por otro lado, se conoce que el virus puede producir un desequilibrio precoz de la glándula mamaria en primíparas, disminuyendo su producción láctea debido a la induración de la misma (Saunders, 1998). Sin embargo, algunos autores reportan que los parámetros productivos en cabras lecheras no son afectados por el virus (Smith y Cutlip 1988; Greenwood *et al.*,1995).

2. HIPOTESIS

El macho caprino tiene un papel relevante en la epidemiología de la AEC. El virus de la artritis encefalitis caprina es capaz de provocar alteraciones en el aparato reproductor de machos caprinos y ser eliminado por el semen.

3. OBJETIVO GENERAL.

Establecer el efecto del virus de la artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos y documentar la importancia del macho en la posible transmisión de la enfermedad por vía seminal.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

a) Aislar e identificar al virus de la artritis encefalitis caprina de un aislado en México, en cultivo de membrana sinovial, confirmando su presencia por inmunodifusión, ELISA, inmunotransferencia y reacción en cadena de la polimerasa.

b) Describir el efecto del virus de la AEC, en el aparato reproductor de machos infectados natural y experimentalmente, por estudios clínicos, histopatológicos e inmunocitoquímicos.

c) Detectar la presencia del virus y de anticuerpos específicos de AEC en el semen de machos infectados natural y experimentalmente .

4.0 Material y métodos.

4.1. Identificación de animales seropositivos al virus de la AEC.

Con la finalidad de obtener animales infectados por el virus de la artritis encefalitis caprina, se buscaron animales (machos y/o hembras) seropositivos al mismo en explotaciones caprinas del país (Querétaro, Estado de México e Hidalgo) con signos clínicos característicos del síndrome artrítico, utilizando para ello la prueba de inmunodifusión y ELISA indirecta (Zanoni *et al.*, 1994) (ver apéndice).

De estos animales se seleccionaron 2 hembras del Estado de México, confirmándose su seropositividad por una segunda evaluación serológica y clínica, además de placas radiográficas de la articulación afectada, posteriormente fueron trasladadas a la FES-C UNAM, para el aislamiento del virus e identificación posterior con ayuda de las pruebas de inmunotransferencia y reacción en cadena de la polimerasa.

4.2. Aislamiento e identificación del virus de la artritis encefalitis caprina por medio del cultivo en membrana sinovial.

Se tomaron 20 ml de sangre con EDTA (20mg/ml) semanalmente de los animales seropositivos, con el fin de obtener el paquete de células mononucleares en una suspensión de 2×10^6 /ml por medio de un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque $d=1.78$ g/ml (SIGMA), previa centrifugación a 1500 g por 40 minutos a 4° C, el

paquete celular se depositó en botellas Falcon por 2 horas a 37°C, con la finalidad de separar células adherentes (monocitos-macrófagos) y poder eliminar las no fijadas. Las células retenidas se mantuvieron en incubación por un periodo de 7 días con medio Dulbecco sin sales de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ en un medio con 10% de suero fetal bovino y se incubaron con un 3-5 % de CO₂. Posteriormente se adicionaron a un monoestrato primario de membrana sinovial de feto caprino, obtenido por el método de explante (según la metodología de Crawford *et al.*, 1998; Grewal *et al.*, 1986), cambiando la mitad del medio de cultivo 2 veces por semana, para luego observar la formación de sincicios en un mes.

4.3. Producción del inóculo viral del virus de AEC aislado en México

De los cultivos identificados como positivos, se colectó el sobrenadante así como las que se desprendieron, Las células removidas fueron sometidas a 3 ciclos de congelación y descongelación previa congelación y descongelación; estas se centrifugaron inmediatamente a 1500g por 15 minutos a 4⁰C, para luego ser concentrado por ultrafiltración con membranas de retención de PM de 10.000 y 100 000. La identificación del virus se confirmó con inmunotransferencia utilizando un suero monoespecífico contra el virus de AEC y la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando para ello primers que amplificaron una región de 287 pb del gen *gag* (Kirland y Batty 1987, Belov y Whalley 1988) (ver apéndice).

4.4. Animales experimentales

Se obtuvieron 14 machos caprinos con edades de 7 a 12 meses, que fueron evaluados para conocer su condición con respecto al virus de AEC, siendo negativos mediante las pruebas de inmunodifusión, ELISA, inmunotransferencia y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tanto en sangre como en cultivo de macrófagos, se distribuyeron de la siguiente manera: Grupo I) control no infectado tres animales de raza indefinida desprovistos de anticuerpos contra AEC (criollos), Grupo II), tres animales seronegativos infectados experimentalmente con la cepa de AEC aislada en México de raza indefinida (criollos), Grupo III), cinco animales no positivos naturalmente infectados, tres de raza Toggerburg y dos Alpinos, Grupo IV) tres animales infectados con la cepa de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC VR905 10^6 UFS /ml) de raza indefinida (criollos). Los animales infectados experimentalmente recibieron una dosis de 10^6 unidades formadoras de sincicios (UFS) x mililitro por la vena yugular.

4.5. Obtención de suero y semen.

De cada grupo se colectó sangre mensualmente de la vena yugular con la ayuda de vacutainer, la cual fue centrifugada a 800g para obtener el suero y conservarlo a -20° C hasta su uso. Con la ayuda de un electroeyaculador con salida de 1 Amper y 10-14 volts, se colectó semen de cada uno de los animales mensualmente, evaluándose al mismo tiempo el diámetro escrotal. Se registró en el semen el porcentaje de viabilidad, volumen, color y pH, para luego centrifugar a

600g por 20 minutos y separar la interfase de células espermáticas del líquido seminal para este último a -70°C para evaluaciones en cultivo celular y western blott.

4.6. Pruebas serológicas de selección.

Todos los animales fueron evaluados serológicamente por inmunodifusión utilizando un "kit" comercial (immunodifusion CAEV/MMV Veterinary Diagnostics Technology, USA) y por ELISA, utilizando un "kit" comercial (Chekit CAEV/MMV Bommeli, Bern, Switzerland; Behring Diagnostic) de acuerdo al instructivo del fabricante. (Apéndice 1)

4.7. Inmunoelectrotransferencia (W B)

El suero y el líquido seminal de los machos en experimentación, se evaluaron, al inicio y al final del experimento, por la prueba de WB utilizando un antígeno viral obtenido a partir de células de membrana sinovial de feto caprino (CMSFC) infectadas con el virus de AEC aislado en México (Clavijo A.& Thorsen, 1995). Brevemente, medio Eagle DULBECCO con 10% suero fetal bovino, 1% de glucosa, sales de Earle 25mM penicilina 100UI por mililitro, 100 μ de estreptomycin y 100 μ g nistatina por mililitro, se inocularon 100 μ l del virus con 10^6 Unidades formadoras de sincitios y se incubó con 5% de CO_2 en cámara húmeda a 37°C por 15 días; el medio fue clarificado por centrifugación a 1500 g durante 20 minutos y filtrado con membranas de 0,45 micras. El virus se purificó después de 15 días de incubación mediante un colchon de sacarosa al 20% y ultracentrifugación a 51,000g por 2 horas. La cepa de referencia de la ATCC, fue

procesada de la misma manera. La electroforesis fue realizada en geles de poliacrilamida al 12% (Laemmli, 1970) y las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa en forma pasiva, para luego bloquear con albúmina al 3%, y colocar el primer anticuerpo en un volumen de 100 μ l de suero o líquido seminal diluido 1/50 e incubado 2 hrs. a 37°C. Posteriormente se agregó un anticuerpo Anti-IgG-Fc de cabra peroxidado para todos los grupos fue de esta última forma, (Calbiochem-novabiochem corporation) (1/1000) por 2 horas, revelando finalmente con diaminobencidina (Sigma immunochemical company) y peróxido de hidrógeno (0.25%). Los corrimientos de suero o líquido seminal se hicieron con el virus aislado en México y con la cepa ATCC.

4.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilizando la técnica de PCR, se identificó la presencia del genoma viral (provirus), en el ADN de células de membrana sinovial infectadas con líquido seminal. Esta prueba también se realizó a todos los machos, a partir de las células blancas sanguíneas (monocitos macrófagos) obtenidas antes y después de la infección, con el fin de clasificarlos en los cuatro grupos y cocultivadas con células de membrana sinovial (Clavijo A. y Thorsen, 1995). La extracción de ADN fue desarrollada usando un procedimiento comercial (Qiagen, Quiamp DNA Blood) de acuerdo a su protocolo (Ver apéndice). El ADN purificado fue analizado con la ayuda de un espectrofotómetro a 260/280 de absorbancia, con lecturas de 1.7-2.1 y con concentraciones de 50-100 ng por microlitro. La amplificación del

provirus en el ADN, se realizó con la ayuda de una prueba diagnóstica (PCR.SUPERMIX. Life Technology) (ver apéndice), utilizando para ello 20 µl de DNA purificado más 5 µl de cada iniciador, con las siguientes características: Iniciadores de una región conservada del gen **gag** oligo superior 5'CCAGGGAATCCAATGCTAGTAAAGC 3' (de 1355-1379 pb) y oligo inferior 3'CCTGGCCTTAATGCTTGTGCTAACAA5' (1518 a 1642 pb), amplificando un fragmento de 287 pares de bases, con las siguientes constantes: ciclos: 1.- 94°C/3 min. 2.- 94°C/1 min. 3.- 55°C/1minuto. 4.-72°C/2 minutos, 5.-repetición del paso 2, 34 veces, 6.- 72°C/5 minutos,7.-4^{0c}. (Termociclador PCT-100 MJ.research.Inc.), hasta la realización de la electrofóresis con 90-92 Volts por 45 minutos, en agarosa al 3% en agua destilada con 2µl de bromuro de etidio, con10µl de DNA y utilizando como buffer de corrida TAE 1X (Gibco.BRL) .

4.9. Muestras de Tejido reproductor

Todos los machos fueron sacrificados a intervalos de 7 días tiempo durante el mismo mes, para un mejor control de muestras de cada grupo. Iniciando con el grupo III infectado naturalmente, seguido del grupo II infectado con cepa aislada en México, luego el grupo IV infectado con al cepa ATCC y finalmente el grupo de los controles no inoculados. Se tomaron muestras de: testículo, epidídimo (cabeza y cola), vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y ámpula seminal, que se fijaron en solución de Bouin, para los estudios histopatológicos y análisis inmunicitoquímicos, los tejidos se incluyeron en parafina, con el fin de realizarles

cortes de aproximadamente 4μ de espesor utilizando un criostato y colectándose en portaobjetos previamente desengrasados e impregnados con una película de agar, para una mejor adherencia del tejido, y se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

4.10. Procesamiento de las muestras para la inmunocitoquímica

Los cortes incluidos en parafina se desparafinaron en baño María de $70-90^{\circ}$ C durante $15'$, posteriormente fueron lavados con PBS. En ambas muestras se procedió a eliminar la peroxidasa endógena, cubriendo el corte con peróxido de hidrógeno al 3% por una hora en cámara húmeda, lavando nuevamente con PBS y bloqueando con albúmina sérica bovina al 2% e incubando nuevamente una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente y lavando nuevamente con PBS. A cada portaobjetos se agregaron 200μ l de suero policlonal a AEC 1/50 (previamente evaluado a inmunotransferencia de una hembra positiva a la enfermedad) y se incubó nuevamente en cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS 2 veces. A continuación se agregó un anticuerpo monoclonal comercial anti-anticuerpo de cabra peroxidado (anti-goat IgG-Fc Calbiochem Novabiochem Corporation) y se incubó de 60 a 90 minutos en cámara húmeda. La reacción se reveló con 5 mg de diaminobencidina (Dab Sigma Chemical) en 10 ml de solución reguladora Tris HCl 0.1 M, pH 7.6 y añadiendo 0.1 ml de H_2O_2 al 3%. Esta solución se depositó sobre los portaobjetos e incubó de 7 a 10 minutos, para luego lavar con agua

destilada de 3-5 veces. Se observó la formación de un complejo Ag-Ac de coloración café, lavando inmediatamente los frotis con agua destilada durante cinco minutos y contrateñiendo con hematoxilina de Harris, entre treinta a sesenta segundos. Finalmente se lavaron con agua destilada durante cinco minutos para luego deshidratar con alcohol etílico de 80%, 90%, 96%, y 100%, y se aclararon con xilol por 2 veces. Utilizando como control positivo el suero de los animales identificados por inmunodifusión, ELISA inmunotransferencia y PCR, y como suero negativo de los animales controles negativos evaluados por las pruebas ya mencionadas. Como paso final se montaron las laminillas con resina sintética para su observación. (Anderson *et al.*, 1994., Ellis *et al.*, 1988 Storset *et al.*, 1997., Gendelman, 1997).

5.0 RESULTADOS

Se produjo un inóculo viral en membrana sinovial de feto caprino de un aislado en el país, así como de la cepa de referencia ATCC a una concentración de 1×10^6 UFS/ml para reproducir la enfermedad inoculándolo por vía intravenosa en 3 machos caprinos de 7-8 meses de edad, seronegativos a la AEC.

5.1. Características clínicas genitales y seminales

Los datos encontrados en las evaluaciones testiculares y de semen no demostraron variaciones significativas entre los diferentes grupos durante el experimento, encontrándose una media del diámetro testicular 24-31 cm, volumen de eyaculado 0.5 a 1 ml, color cremoso, motilidad de 80-90% y de pH de 6.8-7.0.

5.2 Serología: inmunodifusión y ELISA

El *grupo I de machos negativos no inoculados* permaneció así durante todo el tiempo de estudio. Los animales del *grupo II infectados con la cepa FES-C*, seroconvirtieron a los 7 meses postinoculación a inmunodifusión y ELISA. El *grupo III* formado por machos *naturalmente infectados*, permanecieron positivos durante todo el estudio y finalmente el *grupo IV infectado con la cepa de referencia de ATCC*, seroconvirtieron a los 3 meses, a las pruebas de inmunodifusión, ELISA e inmunotransferencia. (Ver cuadro 4).

Cuadro 4

SEROCONVERSION DE MACHOS INFECTADOS CON VIRUS DE
ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA

MESES

GRUPOS	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IV	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Grupo I: Controles negativos.

Grupo II: Infectados con cepa FES-C.

Grupo III: Infectados naturalmente.

Grupo IV: Infectados con cepa ATCC

5.3 Inmunotransferencia de Sueros.

Los sueros evaluados de todos los grupos a excepción del grupo I control negativo, reconocieron las principales proteínas expresadas por el virus como es la p27 y gp 135 que se han descrito en pruebas serológicas (Cutlip 1977) (cuadro 5). Sin embargo, un animal del grupo I de los negativos reconoció la proteína, p19, y todos la proteína p25. De los animales inoculados con la cepa aislada en el país (grupo II), dos reconocieron la proteína p25 y los tres la glicoproteína de envoltura gp135. Por otro lado, de los animales naturalmente infectados (grupo III), ninguno reconoció la proteína p90, sin embargo todos reconocieron la proteína p16, p19, p25 y la gp135 con excepción de uno que varió según la proteína. Los animales inoculados con la cepa de referencia ATCC (grupo IV), todos reconocieron la p16, p25 y p71 y solo 2 animales respondieron a la p90 y gp 135. En forma general la respuesta a la proteína p25 se observó en todos los

grupos de animales, además se detectó en la mayoría de los animales anticuerpos contra proteínas p25, p71 y gp135, esto es proteínas del gen ***gag*** ***pol*** y ***env***. (cuadro 5). Es importante mencionar que el total de proteínas reconocidas en el suero por todos los grupos fue de 52. Los animales infectados tanto en forma natural como experimental detectaron por lo menos tres proteínas, lo que permite confirmar su condición de seropositivos al virus de artritis encefalitis caprina (figura 2). Los anticuerpos encontrados en el suero, contra los distintos componentes virales fueron diferentes en cada grupo, sin embargo predominó la p25 y los animales infectados reconocieron, por lo menos 3 proteínas diferentes, predominando la p16, p19, p25, p71, p90 y gp135 (cuadro 4).

Cuadro 5
**PROTEINAS DEL VIRUS DE ARTRITIS
 ENCEFALITIS CAPRINA IDENTIFICADAS POR LOS SUEROS DE LOS
 DIFERENTES GRUPOS DE MACHOS POR INMUNOTRANSFERENCIA**

Animales	Grupos	P16	P19	P25	P27	P71	P90	GP135	N° Proteínas
No Infect.	I (1)	-	+	+	-	-	-	-	2
	I (2)	-	-	+	-	-	-	-	1
	I (3)	-	-	+	-	-	-	-	1
C. FES-C	II (4)	+	+	+	-	+	-	+	5
	II (5)	+	+	+	-	+	-	+	5
	II (6)	+	+	-	-	-	-	+	1
Nat. Infec.	III (7)	-	+	+	-	+	-	+	4
	III (8)	+	-	+	-	-	-	-	2
	III (9)	+	+	+	-	+	-	+	5
	III (10)	+	+	+	-	+	-	+	5
	III (11)	+	+	+	-	+	-	+	5
C. ATCC	IV (12)	+	+	+	-	+	+	+	5
	IV (13)	+	+	+	-	+	+	+	6
	IV (14)	+	+	+	-	+	-	-	5
Reactividad total		10	10	14	0	9	2	9	52

Proteínas codificadas por el gen *gag*: 16, 19, 25.

Proteína codificada por el gen *pol*: 71.

Proteína codificada por el gen *env*: 90, 135.

5.4 Inmunotransferencia de líquido seminal

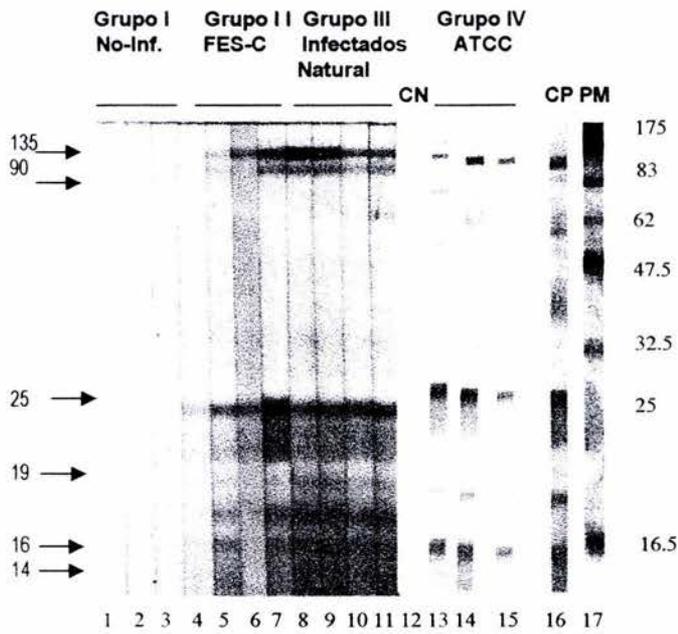
Los anticuerpos encontrados en líquido seminal reconocieron principalmente las proteínas virales p14, p16, p19, p25 p27, p71, p90 y gp135 (cuadro 6). En el grupo III de animales infectados naturalmente, (ver figura 3) se lograron identificar anticuerpos contra las proteínas del gen *gag* (p25 y p27) *pol* (p71) y *env* (p90 gp135). Sin embargo un animal del grupo infectado con la cepa aislada en el país, solo presentó respuesta a proteínas de los genes *gag* (p16 y p19 p27) y *env*

(p90 y gp135) (cuadro 6). Es importante mencionar que los animales inoculados con la cepa ATCC (grupo IV) produjeron anticuerpos hacia p19 y p25, pero uno de ellos no reconoció a p90. Sin embargo los animales inoculados con la cepa de referencia detectaron entre 4 y 5 proteínas virales de los tres genes. El grupo II de la cepa autóctona reconoció entre 3 y 6 proteínas. El grupo III de animales infectados naturalmente reconoció 7 proteínas en la inmunotransferencia. Finalmente, como se puede ver cuadro 6, el total de proteínas detectadas en el líquido seminal fue mayor que las encontradas en suero, siendo un total de 63, indicando que con la metodología empleada es factible identificar animales positivos usando el semen como muestra de diagnóstico (cuadro 5 y 6).

En las evaluaciones de líquido seminal se observó que los grupos natural y experimentalmente infectados reconocieron diferentes proteínas, por lo menos un mínimo de 3 proteínas, no siendo este el caso en el grupo I control negativo (cuadro 5 y 6).

Figura 3

INMUNOTRANSFERENCIA DE LÍQUIDO SEMINAL DE MACHOS INFECTADOS CON VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA



Líneas 1-3: grupo I no infectados
 Líneas 4-6: group II animals inoculados con cepa FES-C
 Líneas 7-11: group III animales infectados naturalmente
 Líneas 12-14: grupo IV animales inoculados con cepa ATCC
 CN: suero control negativo
 CP: suero control positivo
 PM: marcador de pesos moleculares

Cuadro 6

PROTEINAS DEL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA IDENTIFICADAS POR ANTICUERPOS EN EL FLUIDO SEMINAL

Animales	Grupo	N°							Proteínas
		P16	P19	P25	P27	P71	P90	GP135	
		<i>gag</i>			<i>pol</i>		<i>env</i>		
No Infect.	I (1)	-	+	-	-	-	-	-	1
	I (2)	-	-	-	-	-	-	-	0
	I (3)	-	-	-	-	-	-	-	0
C. FES-C	II (4)	+	-	+	+	-	-	-	3
	II (5)	+	+	+	+	-	+	+	6
	II (6)	-	-	+	+	-	-	+	3
Infect. Natural	III (7)	+	+	+	+	-	+	+	6
	III (8)	+	+	+	+	+	+	+	7
C. ATCC	III (9)	+	+	+	+	+	+	+	7
	III (10)	+	+	+	+	+	+	+	7
	III (11)	+	+	+	+	+	+	+	7
	IV (12)	+	+	+	+	+	+	+	6
	IV (13)	+	+	+	+	+	+	+	5
	IV (14)	+	+	+	+	+	+	+	5
Reactividad total		10	10	8	11	7	9	8	63

Proteínas codificadas por el gen *gag*: 16, 19, 25.

Proteínas codificadas por el gen *pol*: 71.

Proteínas codificadas por el gen *env*: 90, 135.

5.5 Evaluación en cultivo celular

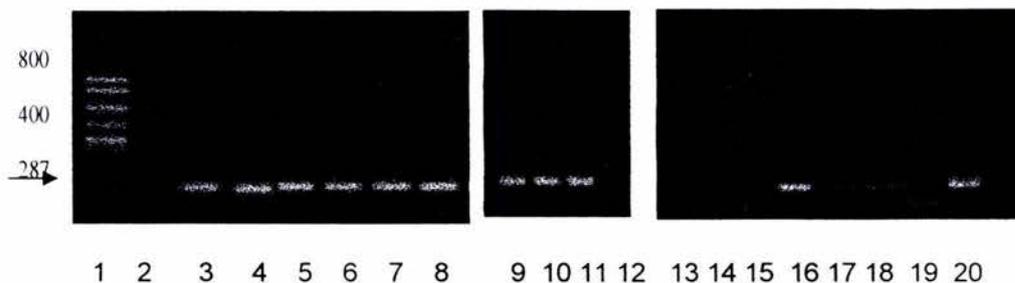
La inoculación de líquido seminal del último muestreo al cultivo de CMSF produjo sincicios, con excepción de uno de los animales infectados naturalmente; este se sacrificó a los 7 meses debido a su condición física, encontrándose un infiltrado purulento en articulaciones y médula de miembros anteriores; sin

embargo se evaluó el semen obtenido en el sexto mes, tanto en el cultivo celular como en la inmunotransferencia. El efecto citopático se evidenció (sincicios) entre la octava y décima semana, en todos los animales infectados con el virus de AEC

5.6 Reacción en cadena de la polimerasa

Los resultados encontrados con la prueba de reacción en cadena del polimerasa permitieron confirmar la presencia de un producto amplificado, de aproximadamente 287 pares de bases, que confirmó la presencia viral, en forma de provirus, en las células infectadas con líquido seminal del los grupos II, III y IV en el 10° mes de muestreo (figura 4).

Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa de CMSFC inoculadas con líquido seminal de machos infectados con virus de artritis encefalitis caprina



1: Marcadores de pares de bases; 2: control negativo; 3-7: infectados naturalmente; Cepas de referencia ATCC 8 y 20; 9-11: infectados con cepa de referencia ATCC; 12 control negativo; 13,15: machos controles negativos; 16-18; infectados con la cepa FE-C.UNAM; 19: Control de células de membrana sinovial fetal sin infecta; 20: control positivo ATCC.

5.7 Patología:

Uno de los animales del grupo 3, infectado naturalmente, fue sacrificado debido a problemas locomotores, ya que no se podía levantar y pasaba la mayor parte del tiempo postrado, encontrándose un exudado purulento en huesos de la

articulación femorotibio-rotuliana de ambos miembros, identificándose como agente causal al *Staphylococcus epidermidis*.

En la necropsia del grupo 1 (control no inoculado negativo) no se presentaron cambios patológicos macroscópicos aparentes. En el grupo 2 (infectados con la cepa FESC-UNAM), un animal presentó un absceso en la cabeza del epidídimo derecho, con contenido cremoso-amarillento, identificándose un *Staphylococcus epidermidis*. En los animales del grupo 3 (naturalmente infectados), 2 de ellos presentaron éstasis espermática, uno con hidrocele que contenía líquido seroso y otro con edema en la cabeza del epidídimo derecho. En el grupo 4 (infectados con virus de la cepa ATCC) no se presentaron hallazgos patológicos de tipo macroscópicos ni en testículos ni en glándulas anexas.

5.8 Histopatología:

Los hallazgos en los animales infectados por el virus de AEC fueron poco consistentes y escasos. En el grupo I (control negativo no infectado) en un epidídimo se observó empaquetamiento de espermatozoides sugestivo de situaciones obstructivas y sin cambios patológicos en glándulas anexas (figura 5a); en otro animal control se presentó infiltrado peritubular de mononucleares con secuestros de epitelio germinal, mitosis aberrantes, y calcificación en testículo y en el animal restante secuestro de espermatozoides en testículo e infiltrado de linfocitos, en dos de tres animales (2/3), vesícula seminal en tres animales de tres (3/3) ámpula dos animales de tres (2/3) y bulbouretrales (3/3) (cuadro 7). En el grupo 2 (infectados con la cepa FESC-UNAM), en el ámpula

del conducto deferente de un animal se observaron espermatozoides empaquetados en los acinos con presencia de macrófagos (figura 5b) y en otro, células mononucleares y material seminal en la luz de los acinos (figura 6a), además de infiltrado de mononucleares en el epidídimo (1/3), vesícula seminal (3/3) y ámpula (2/3) (cuadro 7).

En el grupo 3 (naturalmente infectados), se observaron células gigantes de tipo cuerpo extraño asociadas a un túbulo en degeneración en el epidídimo y en vesícula seminal sugestivo de infección viral por el virus de AEC (figura 6a y b); el ámpula deferente de un macho presentó macrófagos con material seminal en la luz del acini, con presencia de células multinucleadas que habían fagocitado espermatozoides (figura 7a), así como infiltrado de mononucleares en testículo (1/5), epidídimo (1/5), vesícula seminal (3/5), ámpula (3/5) y bulbouretrales (1/5) (cuadro 7). Grupo 4 (infectados la cepa viral ATCC), un animal presentó mononucleares en la luz del acini y células descamadas, además de infiltrado de mononucleares en vesícula seminal (3/3), con infiltrado de mononucleares en la luz y células descamadas y ligera hemorragia (figura 7b); las glándulas bulbouretrales se encontraron sin cambio patológico aparente, pero en un animal se observaron mononucleares en tubulos de secreción y en el otro en conductos. (2/3) (cuadro 7),

Cuadro 7

HISTOPATOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS CAPRINOS INFECTADOS CON

AEC

TEJIDO	(I)	(II)	(III)	(IV)	TOTAL
	CONTROL. NEGATIVOS	CEPA FES-C	INFECCIÓN NATURAL	CEPA ATCC	
	a/b	a/b	a/b	a/b	
Testículo	2/3	0/3	1/5	0/3	3
(alteraciones del epitelio germinal)					
Epidídimo	0/3	1/3	1/5	0/3	2
(dgeneración de epitelios)					
Vesícula seminal	3/3	3/3	3/5	3/3	12
(descamación de epitelio)					
Ámpula	2/3	2/3	3/5	0/3	7
(secuestro de semen)					
G.Bulbouretrales	3/3	0/3	1/5	2/3	6
(descamación celular)					
TOTAL	9	6	5	10	

a/ : número de animales afectados con infiltrado de mononucleares o macrófagos

/b : total de animales del grupo.

Testículo: A; alteración del epitelio germinal reducción del espesor y pérdida de continuidad, vacuolas intracitoplasmáticas, núcleos picnóticos y bordes plasmáticos indistintos.

B; sin cambio patológico aparente

C; "

D; Túbulos en degeneración, secuestro de lentos en el epitelio germinal y mitosis aberrantes.

Epidídimo: A; epitelio delgado en degeneración e hiperplasia con arreglo irregular de lamina basal

B; células multinucleadas, defectos en epitelio y espermatocitos en túbulos

Vesícula seminal: A; descamación de epitelio, hemorragias y vasculitis.

B; descamación epitelial.

C; descamación epitelial.

D; descamación epitelial.

Ámpula: ;A; secuestro de material seminal

B; sin cambio patológico aparente

C; "

D; "

G.Bulbouretrales: A ;sin cambio patológico aparente

B ; "

C; descamación celular

D; sin cambio patológico aparente

Figura 5

Histopatología de animales infectados con cepa FES-C.UNAM con virus de AEC

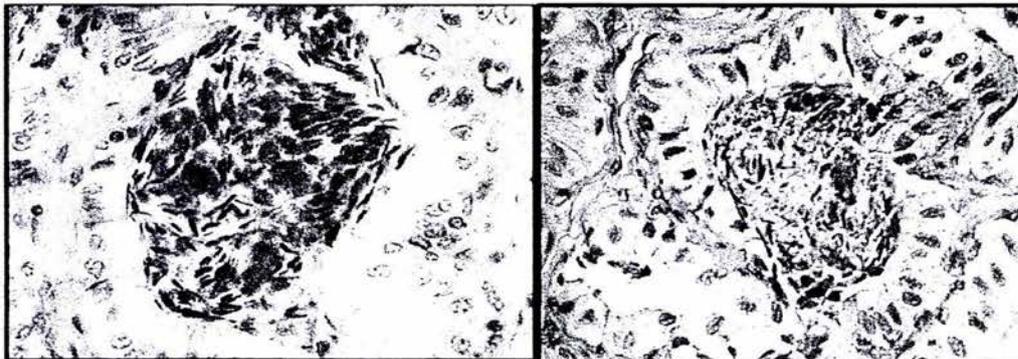


Figura 5a

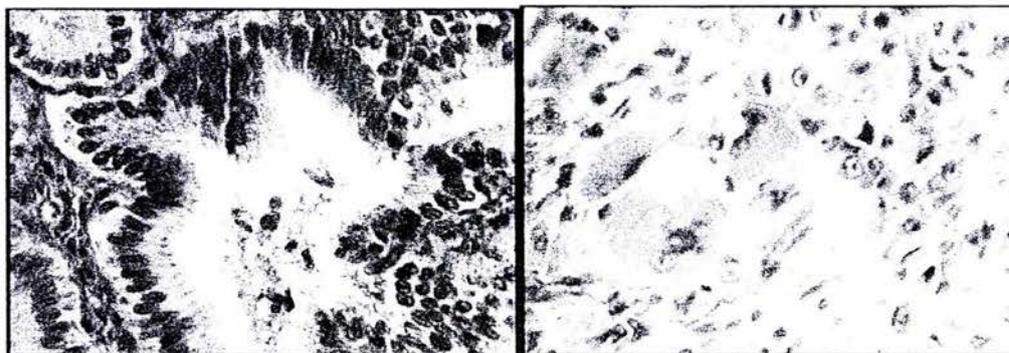
Figura 5b

5a) , Epidídimo de macho Negativo; empaquetamiento de espermatozoides, sugestivo de situación destructiva (140X)

5b) Ámpula deferente, animal Inoculado con cepa FES.C, espermatozoides empaquetados en los acines con algunos macrófagos (140x)

Figura 6

Vesícula seminal de machos infectados con cepa FES-C.UNAM y epidídimo de naturalmente infectados con virus de AEC



6a

6b

6a) Vesícula seminal, de macho inoculado con cepa FE-S-C, con Células mononucleares y material seminal en la luz del acin glándular (140X HE)

6b) Epidídimo de un animal naturalmente infectado, Células gigantes de tipo cuerpo extraño, túbulo en degeneración (140X HE).

Figura 7

Ámpula y vesícula seminal de macho naturalmente infectado e inoculado con cepa ATCC de AEC

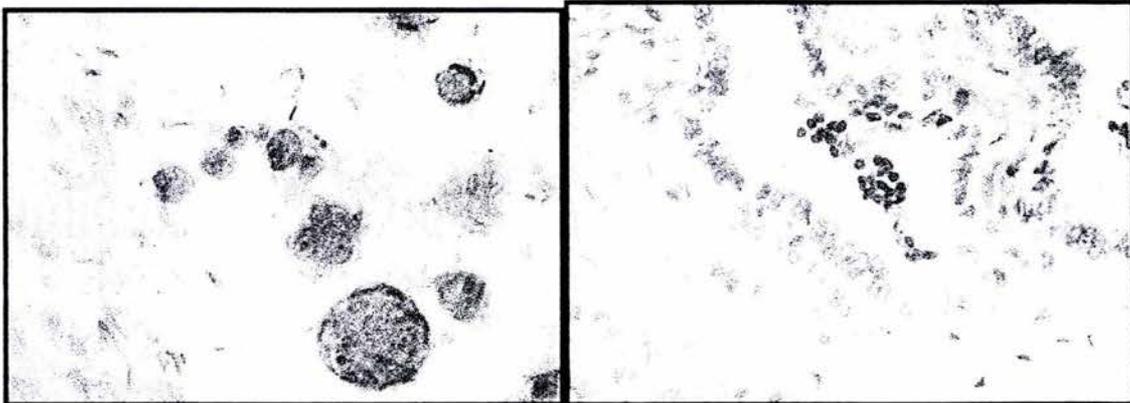


Figura 7a

Figura 7b

7a) Ámpula deferente de macho naturalmente infectado, con macrófagos con material seminal en la luz del acini, con presencia de células multinucleadas que fagocitan espermatozoides (140x)

7b) Vesícula seminal de macho Inoculado con cepa ATCC; células mononucleares en la luz y células descamadas, con hemorragia (140x).

5.9 Inmunocitoquímica

La reacción antígeno anticuerpo evidenció la presencia de antígeno viral, en vesícula seminal, de los *machos infectados naturalmente (grupo III)*, con la *cepa FESC-UNAM (grupo II)* y con al *cepa de referencia de ATCC (IV)*, el *grupo I control resultó negativo* (figura 8).

Las respuestas positivas en vesícula seminal se observaron en 3/5 de los *animales infectados naturalmente* (grupo III) seguido de los infectados con la *cepa FES-C (3/3)* (grupo II) y de la *cepa viral ATCC (3/3)* (grupo IV) (cuadro 8). Además se pudo observar respuesta positiva en glándulas bulbouretrales de los *machos naturalmente infectados (3/5)* (grupo III) y en los infectados con la *cepa viral ATCC 3/3* (grupo IV). (Figura a,b,c,d)

Cuadro 8

INMUNOCITOQUÍMICA DE ANIMALES POR GRUPO Y ÓRGANO QUE PRESENTARON

RESPUESTA POSITIVA AL VIRUS DE AEC

	CONTROL NEGATIVOS	CEPA FES-C	INFECCIÓN NATURAL	CEPA ATCC
	a/b	a/b	a/b	a/b
Testículo	0/3	0/3	0/5	0/3
Epidídimo	0/3	0/3	0/5	0/3
Vesícula seminal	0/3	3/3	3/5	0/3
Ámpula	0/3	2/3	3/5	0/3
G.Bulbouretrales	0/3	3/3	5/5	0/3
Total	11	8	6	0

a/ : número de animales positivos a la reacción de inmunocitoquímica

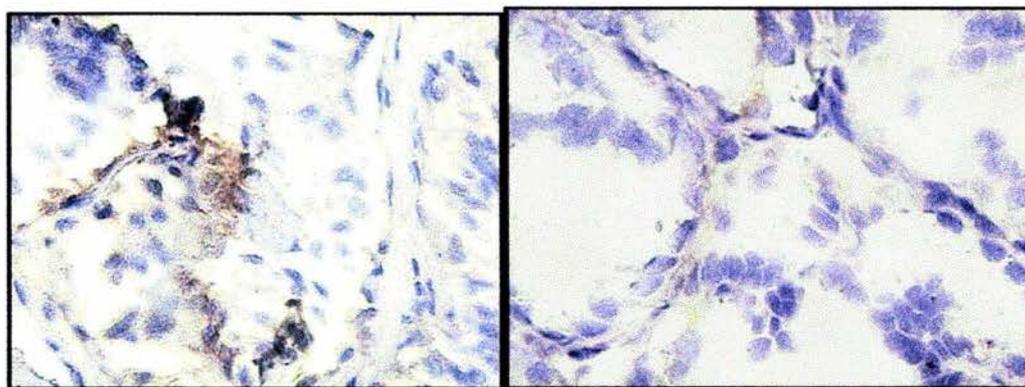
/b : total de animales del grupo

Figura 8

Inmunocitoquímica de animales infectados con virus de AEC



a) Vesícula seminal, negativo (140X HE) b) Infectado naturalmente. vesícula seminal (100X HE)
mononucleares en intersticio



c) Cepa FES-C, Vesícula seminal (140X HE) d) Cepa ATCC, Vesícula seminal (140X HE)
mononucleares en la luz del acino respuesta positiva en epitelio acinar

6. Discusión.

El control de la artritis encefalitis caprina (AEC) se basa como en otras enfermedades en poder detectar animales portadores y eliminarlos de la explotación, con miras a erradicar la enfermedad (Vogt *et al.*, 2000). Existen diferentes formas de diagnosticar la enfermedad: demostración clínica, serología, patología, aislamiento viral y pruebas de biología molecular (Nazara *et al.*, 1985, Perrin, 1991., Gopal *et al.*, 1993 Mselli-Lakhal *et al.*, 2000) Varias de ellas se utilizaron en este trabajo, con el fin de integrar y valorar las pruebas en el diagnóstico de la enfermedad. Aunque la artritis encefalitis caprina presenta un síndrome característico, no es patognomónicos de la enfermedad. El control se enfoca principalmente a las hembras, dejando en segundo término a los sementales. No obstante, esta comprobado que el virus esta presente en los machos y pueden actuar como portadores y ser importantes en la transmisión (Travassos *et al.*, 1998a 1999b., Kiessling *et al.*, 1987, Van *et al.*, 1991; De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1996; Nash *et al.*, 1995; Jordan *et al.*, 1999).

El diagnostico serológico en machos no siempre resulta positivo, dada la patogenia de la enfermedad, además se realiza a diferentes intervalos dependiendo del estatus serológico de la explotación y en algunas ocasiones hay que evaluar nuevamente a los animales. Por lo que evaluarlos con una prueba

más sensible y específica como la inmunotransferencia, es factible y válido, con el fin de detectar animales positivos con títulos bajos (Issel *et al.*, 1988., Novelo *et al.*, 2000). En el presente estudio la inmunotransferencia realizada a los sueros caprinos permitió reconsiderar la forma de interpretar a los animales positivos. Además se realizó esta prueba en líquido seminal, que nunca se había reportado en artritis encefalitis caprina (AEC).

Como es sabido, una de las formas de introducir la AEC a un país es por la importación de animales clínicamente sanos, pero infectados; aparentemente esta ha sido una de las formas de introducción de la enfermedad a lugares donde no existía. De igual manera existe el riesgo si se importa semen de países con alta incidencia de la enfermedad, (Cutlip *et al.*, 1992., Saunders 1998).

Simard *et al.*, 2001, reportan una alta sensibilidad (99.4%) y especificidad (100 %) en la prueba de ELISA, utilizando como antígeno viral la partícula completa. En estas condiciones no se puede determinar que proteínas virales son la más antigénicas o cuales están siendo reconocidas por el suero, lo que si se pudo determinar en la presente investigación al realizarle inmunotransferencia al suero y el líquido seminal de los animales inoculados. En el presente trabajo las pruebas de precipitación en agar y ELISA, utilizadas para seleccionar los animales fueron empleadas como pruebas tamiz y complementarias, tal como lo reportan Knowles *et al.*, (1994) Motha y Ralston (1994).

Ensayos con proteína recombinante en pruebas de ELISA, solo detectan algunos de los antígenos virales, tal como lo reporta Baba *et al.*, (2000) y por lo tanto no

pueden identificarse otras proteínas que pudieran predominar, dada la variación antigénica que presenta este virus. Así puede no estarse identificando proteínas de alguna otra parte de la estructura viral, además de que no siempre existen los anticuerpos suficientes para reconocer todas las proteínas estructurales, de grupo y enzimáticas del virus. No es una práctica común evaluar el semen con fines diagnósticos en AEC, objetivo importante en el presente estudio. El encontrar anticuerpos en el líquido seminal contra proteínas codificadas por los genes gag, pol y env del virus de AEC, es una prueba clara, de que los animales han estado en contacto con el virus, aunque no se observe cuadro clínico. Al comparar los resultados en suero y líquido seminal de los machos infectados, con la cepa autóctona FES-C y los inoculados con la cepa de referencia (ATCC), se encontraron diferencias en el reconocimiento de algunas proteínas del virus, como el caso de no reconocer a la p27 los sueros, pero si se detectó en líquido seminal (cuadro 5). Esto pudiera deberse a una posible variación antigénica del virus en el huésped como lo reportaron Narayan *et al.*, (1984) y Ellis *et al.*, (1998) en animales infectados de forma natural y experimentalmente, donde encontraron variaciones de respuesta inmune al evaluarlos serológicamente por pruebas de seroneutralización, así también Valas *et al.*, 2000, reportan una variabilidad e inmunogenicidad del virus de AEC, también pudiera pensarse en que la respuesta humoral en el tracto reproductor incorpora elementos locales, que propicien mayor concentración de anticuerpos en la zona, o la expresión de

nuevos epítopes, ya que el virus parece tener mayor replicación en células epiteliales (*Mselli-Lakhal et al., 1999*)

El presente estudio permitió identificar que tipo de proteínas virales están reconociendo los anticuerpos en suero y en el líquido seminal, esto es importante ya que el reconocimiento de un mayor número de proteínas permite una mayor certeza en el criterio de positividad. Esto se observó mejor en el grupo de animales infectados naturalmente, notando que conforme persiste la enfermedad es factible detectar un mayor número de proteínas reconocidas. Esto se puede relacionar con lo reportado por Ellis *et al.*, (1987^a, 1987^b y 1988), donde se comparó la respuesta inmune en una infección persistente evaluada por inmunotransferencia contra tres cepas del virus de AEC aisladas de casos clínicos, encontrándose diferentes patrones de reconocimiento, algo parecido a lo encontrado en el presente estudio, comparando la cepa ATCC con el grupo de animales infectados naturalmente.

En la evaluación serológica se pudo identificar la aparición de los anticuerpos en los diferentes grupos infectados experimentalmente, destacando que los animales infectados con la cepa aislada en México seroconvirtieron hasta los 7 meses, comparado con la cepa de referencia ATCC en la que ocurrió a los 3 meses; esto sugiere que la cepa autóctona se comportó, biológicamente en forma diferente, comparada con la cepa viral de referencia y mejor adaptada a cultivo celular, ya que ambas cepas se inocularon por la misma vía intravenosa, misma dosis 10^6 UFS y mismo volumen 0.5 ml. La diferencia puede deberse a las variaciones

que pueden ocurrir en el virus (Ellis *et al.*,1987), diferente susceptibilidad de los animales utilizados, por efecto racial (Adams *et al.*,1983), o por la diferencia en la patogenicidad de las cepas (Cheveers *et al.*,1988), que pueden modificar de alguna manera la respuesta del huésped, ya sea por la expresión de citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa o la interleucina 6 (Lechner *et al.*,1997., Adeyemo *et al.*,1997) , o por la interacción con retrovirus endógenos caprinos que pueden modificar genéticamente el comportamiento de la cepa infectante provocando con ello eventos de recombinación (York *et al.*, 1992., Benit *et al.*,2001).

La presencia en líquido seminal de anticuerpos contra componentes proteínicos del virus, demostrado por inmunotransferencia, permite identificar la presencia viral en machos infectados. Los anticuerpos reconocieron diferentes proteínas, sin embargo, predominó el reconocimiento de la p25 en la mayoría de los animales infectados, que contrasta con lo indicado por Belov y Whalley (1988) en estudios de inmunotransferencia en suero sanguíneo que detectaron principalmente las proteínas p24 y p14 . El identificar anticuerpos en suero o líquido seminal, que reconocen a tres o más proteínas pertenecientes a diferentes fragmentos genómicos del virus, es un indicador de que los animales han estado en contacto con el virus y que son potenciales diseminadores del mismo. La demostración de anticuerpos en el semen permite emplear la prueba en la

evaluación del mismo y detectar el material potencialmente peligroso en la diseminación de la enfermedad.

Adicionalmente, en este trabajo se demostró la presencia del virus de AEC en el semen de los animales natural y experimentalmente infectados, mediante la inoculación del mismo en cultivos celulares y la ratificación de la presencia viral por PCR. Esto confirma lo reportado por Travassos *et al.*, 1998a y 1998b).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa ha sido utilizada como una técnica para detectar la presencia de microorganismos en el semen directamente, o por la variante de RT-PCR (Van Voorhis *et al.*, 1991., Christopher *et al.*, 1995 Clavijo y Thorsen 1996). En este trabajo la técnica de PCR se utilizó para identificar al virus en células de la membrana sinovial inoculadas con el semen de los machos en estudio, en forma muy parecida a lo realizado por Daltabuit *et al.*, (1999).

La eliminación seminal de retrovirus ya ha sido descrita en algunas enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana, leucemia viral bovina, virus de la inmunodeficiencia bovina y el virus de maedi-visna en ovinos (Van Boris., 1991., Meas *et al.*, 2002). En ésta última se ha encontrado asociada con epididimitis y leucocitoespermia, lo que incrementa el riesgo de diseminación e implica reconsiderar al macho en la epidemiología y control de la enfermedad (De la Concha *et al.*, 1996).

La presencia de células mononucleares y macrófagos en los acinis de las glándulas anexas al tracto reproductor (ámpula, vesícula seminal y bulbouretral),

incluso en los machos controles, podría ser el vehículo de eliminación viral por el semen. En el caso particular del virus de AEC es considerada como infección única; sin embargo otros retrovirus como la leucemia felina y el virus de la inmunodeficiencia viral felina deben estar asociados para que ocurra la enfermedad (Pedersen *et al.*, 1990), En el síndrome de inmunodeficiencia adquirida en humanos, deben ocurrir cofactores primarios o secundarios para que se desarrolle la enfermedad (Gelmenn *et al.*,1987).

El detectar anticuerpos seminales permitió identificar animales positivos al virus de AEC, en forma parecida a lo que ocurre en la inmunodeficiencia humana, donde el Western Blot tiene valor confirmatorio cuando se detectan por lo menos una proteína, codificada por cada uno de los genes gag, pol y env (Sells,1996).

En el presente trabajo también se encontraron resultados no reportados sobre el efecto y/o la presencia del virus del virus de AEC en aparato reproductor de los machos caprinos. Pese a que no se vieron afectados los parámetros reproductivos como diámetro testicular, volumen seminal y viabilidad de espermatozoides y no se demostraron lesiones características atribuibles al virus, este estaba presente como se demostró por pruebas de inmunocitoquímica e inoculación en cultivos celulares.Un semental puede encontrarse clínicamente sano y a la vez infectado y por lo tanto actuar como diseminador de la enfermedad (Foot, 1989., Rowe *et al.*,(1997).

No se presentaron cambios que pudieran alterar el aparato reproductor de los machos caprinos, como la espermatogénesis que eventualmente produjera

infertilidad, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos a la necropsia o en el estudio histopatológico, lo que se tradujo en que todos los animales, infectados o no, mostraron material seminal normal. La presencia de macrófagos en el tracto reproductor, en particular en la luz acinar de las glándulas ámpula, vesícula seminal y bulbouretral, permite presuponer que podrían permitir la presencia viral, ya que los macrófagos son las células blancas que transportan al virus en forma de provirus (Perrin 1991) y podrían ser fuente de infección para el rebaño. Rowe y East (1997), mencionan que la migración de macrófagos infectados al tejido reproductor se puede dar por traumatismos o lesiones en el área. En este estudio se encontraron infiltrados de macrófagos y mononucleares en la luz de los acinos glandulares, principalmente en vesícula seminal, que indica la migración de estas células al material seminal, sin observarse lesiones en el aparato reproductor. Se sabe que la vesícula seminal aporta del 50-70 % del volumen del eyaculado, seguido de próstata con un 20-30%, bulbouretrales y ámpula con un 10 % aproximadamente (Kashuba *et al.*, 1999). Este es un factor agravante en el presente estudio, ya que la mayoría de las células fagocitarias se encontraron en las vesículas seminales de los animales infectados, sugiriendo que la vesícula seminal juega un papel importante en la captación de macrófagos que pueden estar infectados con el virus de AEC. Un estudio realizado en monos infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio, se reportó un incremento de células multinucleadas en el epidídimo, de un animal, otro con moderado incremento de mononucleares en vesícula seminal y

finalmente un tercer animal con cambios en el epitelio, consistentes en degeneración e hiperplasia, (Miller *et al.*, 1994) estos hallazgos reportados no fueron homogéneos en todos los animales. En el presente estudio también se observaron infiltrados mononucleares y macrófagos principalmente en vesícula seminal, y células gigantes en los animales infectados naturalmente, aunque este grupo permaneció más tiempo con la infección, es posible que estas células sean consecuencia de otras patologías, incluso de defectos de desarrollo, su presencia, sin embargo, indica complejas interacciones de células de la respuesta inmune en el aparato reproductor, posibilitando la presencia de mononucleares en el semen. Pudiera sugerirse que conforme progresa la enfermedad es más factible encontrar un mayor número de células blanco portadoras del virus y más aun en animales que presentan la enfermedad en forma crónica. Estudios realizados en retrovirus murinos, (Kiesling *et al.*, 1987), describen una epididimitis marcada, cosa que no se pudo apreciar en los machos infectados en este trabajo, quizá porque solo se mantuvieron en observación por 10 meses, ya que la presente enfermedad es de carácter progresiva, evidenciándose lesiones o complicaciones después de varios años de padecer la enfermedad. La relación de lesión macroscópica y microscópica únicamente se encontró en el animal con el absceso, donde microscópicamente se apreció la formación de granulomas en la vesícula seminal de los animales pertenecientes al grupo II infectados con la cepa aislada en México, sin embargo el granuloma no sugiere ser provocado por el virus puesto que al ensayo

inmunocitoquímico no se evidenció la presencia de AEC. Y solo en un animal del grupo III infectados naturalmente existió un relación del acúmulo de células gigantes histopatológicamente y la presencia de complejos Ag-Ac, al estudio inmunocitoquímico, observándose formación de sincicios en el intersticio de la vesícula seminal.

Los hallazgos inmunohistoquímicos en el grupo de animales infectados naturalmente, indican la presencia de antígenos del virus, principalmente asociado al epitelio de la vesícula seminal, sin presentar daño patológico. Sin embargo Mselli-Lakhal *et al.*, (1999) reportan que el virus de la artritis encefalitis caprina, es capaz de replicarse en células epiteliales, tal como las de la glándula mamaria en mayor cantidad y sin presentar un efecto citopático. Por lo que no se descartan otros tejidos que permiten la replicación viral sin producir daño evidente como cuando se replica en endotelios vasculares (Greenland *et al.*, 2000) y células de la granulosa en la hembra (Lamara *et al.*, 2001), sugiriendo que éstas últimas células pueden servir como reservorios del virus durante la fase subclínica de la infección. Así también Howell *et al.*, (1997) demostraron la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana en células epiteliales, en forma parecida a lo que sucede con el virus de la leucemia de células T humanas, que afecta epitelios del aparato reproductor (Zacharopoulos y Phillips, 1997). Se ha observado azospermia con infiltrado de linfocitos y macrófagos en intersticios en individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana,

aunque no en todos los individuos evaluados (Pudney y Anderson 1991). Lo observado en este estudio sugiere que los epitelios del tracto reproductor de machos caprinos, en especial el de las vesículas seminales, pueden servir como multiplicadores del virus de la AEC, propiciando su diseminación por el semen, aún con niveles elevados de anticuerpos circulantes que no pueden neutralizar las partículas virales desnudas intracelularmente, (Haziza *et al.*, 2001), o por la variación evolutiva de antígenos de envoltura, propiciada por los eventos de recombinación entre los virus endógenos y los retrovirus conocidos actualmente (Cork *et al.*, 1992., Benit *et al.*, 2001., Palmarini *et al.*, 2001).

7. Conclusiones

Se reprodujo la infección en machos cabríos, con una cepa aislada e identificada en el país, así como con una cepa de referencia. De igual manera fue posible detectar anticuerpos a diferentes componentes estructurales del virus de AEC en el semen caprino. Esto permite detectar semen peligroso de origen foráneo u reducir el riesgo de usarlo en programas de inseminación artificial

Así mismo fue posible identificar la presencia del virus en tejido reproductor, principalmente en vesículas seminales, así como la identificación de células potencialmente portadoras del virus en su genoma.

Todo ello apoya la hipótesis de que los machos cabríos tienen importancia en la diseminación de la artritis encefalitis caprina.

11. APÉNDICE

DESARROLLO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN

(caprine arthritis-encephalitis/ovine progressive pneumonia antibody test kit)

- 1.- Se Preparó una solución de agarosa al 1% en solución buffer salina fosfatada (PBS- Na_2HPO_4 1.17 grs, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0.22 grs y NaCl 8.50 grs disolviendolo en un litro de agua destilada) ajustando el pH a 7.4.
- 2.- Adicionando 6.0 g de cloruro de sodio por cada 100 ml de PBS, agregando a la vez la agarosa y calentando lo suficiente hasta que el agar este completamente disuelto.
- 3.- Servir la solución de agarosa adicionando 6 ml. en cajas de petri de 60 x 15 mm. y esperar a que solidifique.
- 4.- Perforar los pozos con un sacabocados obteniendo un pozo central y 6 perifericos.
- 5.- Colocar en el pozo central 50 μl de antígeno del virus de Maedi-Visna que viene en el kit.
- 6.- Adicionar en tres pozos perifericos 50 μl de cada uno de los controles del kit (positivo, positivo debil y negativo).
- 7.- Poner en los tres pozos restantes 50 μl de cada suero problema a evaluar.
- 8.- Identificar adecuadamente las cajas de petri e incubarlas en camara humeda a 4°C por una semana.
- 9.- Realizar lectura.

DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA

(CHEKIT CAE/MVV. BOMMELI.A.G.)

1.- Primeramente se estabilizaron los reactivos a temperatura ambiente consistentes en : Solución de dilución, solución de lavado, conjugado, solución reveladora y solución de paro.

2.- Al mismo tiempo se equilibraron a temperatura ambiente las microplacas conteniendo el antígeno viral e inmediatamente se cubrieron para evitar deshidratación de las misma.

3.- Acto seguido se preparó el volumen necesario de la solución de dilución y lavado a partir de un volumen 10x : para lo cual se agregan 9 volúmenes de agua destilada a la dilución madre.

4.- Posteriormente se realizó la dilución, distribución e incubación de las muestras y controles.

Distibuyendo 180 μ l de solución de dilución en cada pozo, para añadir posteriormente 20 μ l de suero y 20 μ l de los controles positivos y negativos, quedando una dilución de 1:100.

5.- Posteriormente se agitaron las placas con el fin de homogenizar las soluciones, cubriendolas y dejando incubar en cámara húmeda durante 90 minutos a temperatura ambiente (18-30°C).

6.- Posteriormente se decantaron la microplacas con el fin de realizarles los siguientes pasos.

7.- Lavado de microplacas.

Las microplacas se remplazaron con 300 μ l de solución de lavado, repitiendolo 2 veces más. (desechando la solución de lavado).

8.- Posteriormente se realizó la dilución, distribución e incubación del conjugado marcado con peroxidasa, diluido 1:200 (anticuerpos monoclonales anti-IgG-Rumiantes), con la solución de dilución. Distribuyendo 100 μ l en cada muestra y cubriendo las microplacas y dejandor incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 90 minutos.

10.- Posteriormente se realizaron otros tres lavados como los mencionados anteriormente. Para luego adicionar el cromógeno (ABTS).

Distribuyendo 100 μ l de la solución del cromógeno preequilibrado entre 20-25°C a temperatura ambiente aproximadamente durante una hora.

11.- Finalmente se cubre la microplaca y se incuba a temperatura ambiente (25°C aproximadamente).

12.- Para la realizar la lectura después de 5- 30 minutos aproximadamente, cuando la la diferencia en densidad óptica entre el positivo y el negativo, fuera de \leq a 0.3. , previamente agitando la microplaca para homogenizar la coloración, en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 492 nanómetros. Inmediatamente serealizó el paro de la reacción adicionando 50 μ l de dicha

solución por muestra, distribuyendo esta solución de paro, en el mismo orden y con la misma rapidez, que fue distribuido el cromógeno.

Interpretación de los resultados de la la siguiente manera

$$\% \text{ muestra} = \frac{\text{Densidad óptica}_{\text{muestra}} - \text{Densidad óptica}_{\text{negativo}}}{\text{Densidad óptica}_{\text{positivo}} - \text{Densidad óptica}_{\text{negativo}}} \times 100$$

Interpretación

Negativos	Dudoso	Positivo
< 30%	30%-40	> 40%

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA POR MINIGRADIENTES DE FICOLL

1. Se colectó sangre completa con EDTA en tubos vacutainer de 7 ml.
2. Centrifugó a 2000 rpm a Temperatura ambiente.
3. Se rotularon 4 tubos eppendorf con: 2 tubos con 500 μ l cada uno de ficoll y otros 2 con PBS cada uno con 300 μ l a temperatura ambiente.
4. Al terminar la centrifugación se separó el plasma y se deshecho, se colectó la capa blanca en total de 600 μ l y se mezcló en los tubos con 300 μ l de PBS.
5. Se transfirió todo a los tubos con Ficoll-Hypaque pipeteando sobre el borde de los tubos y con cuidado.
6. Centrifugando nuevamente a 2000 rpm por 4 min.
7. Se observaron cuatro capas de abajo hacia arriba: eritrocitos, Ficoll-Hypaque, células blancas y PBS/plasma. Se colectó la capa blanca observándose como un anillo opaco sobre el FicollHypaque.
8. Se transfirió a otro tubo eppendorf estéril y se añadieron 500 μ l de PBS.
9. Centrifugando nuevamente a 2000 rpm por 4 min.
10. Decantando y añadiendo 500 μ l de PBS.
11. Resuspendiendo con vortex y lavandose nuevamente dos veces más.
12. Finalmente se adicionaron a una botella Falcón com medio de cultivo celular sin sales de Ca y Mg, e incubandose en estufa de CO₂ a 37⁰ C durante 3-7 días.

**EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES O
MONOCITOS-MACRÓFAGOS
(QIAamp DNA Minikit)**

Equilibrar las muestras a cuarto de temperatura

Equilibrar **Buffers AE** , **Buffer AL** a temperatura del laboratorio

Restituir los **Buffer AW1** y **Buffer AW2** y **Proteinasa QIAGEN**

Todas las centrifugaciones se realizaron fuera del área de trabajo

Material :

Columnas Quiamp.

Tubos para colección de 2ml

A partir de este momento se procedió a realizar lo siguientes pasos

- 1.- Primeramente se desprendieron las células con un escalpelo (rubber policeman), con mínimo de 5×10^6 células con evidencias de sincitios
- 2.- Transferidas a tubos eppendorf de 1.5 ml y centrifugados por 5 minutos a 300g
- 3.- Se removió el sobrenadante sin alterar el pellet.
- 4.- Se resuspendió el pellet de células en PBS pH 7.4 a un volumen final de 200 μ l.

A partir de este punto se Adicionaron 200 μ l de las muestra a evaluar (monocitos-macrofagos previamente cultivados, pellet de células de membrana sinovial cocultivadas con macrófagos infectados o líquido seminal inoculado en cultivo de células de membrana sinovial)

5.- Adicionando 20 μ l. **Proteinasa QUIAGEN**.

6.- Adición de 200 μ l. de **Buffer AL** a la muestra y mezclar con vortex por 15 segundos.

7.- Incubar a 56 $^{\circ}$ C por 10 minutos.

8.- Centrifugó brevemente en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml, para remover gotas de las paredes de la tapa del tubo.

9.- Adicionar 200 μ l **etanol** (96-100%) a la muestra, mezclando con vortex por 15 segundos. Después de mezclar centrifugar brevemente en tubos de 1.5 ml para remover gotas de la tapa y de las paredes.

10.- Cuidadosamente se aplica la muestra con **etanol** en un tubo con columna de colección QIAamp sin dejar gotas en la tapa y centrifugar a 600g por un minuto. Colocando previamente la columna Quiamp en un tubo de colección de 2.0 ml y descartando el filtrado contenido en el tubo.

11.- Cuidadosamente se destapa la columna QIAamp y se adicionan 500 μ l de **Buffer AW1** sin mojar las paredes, se cierra la tapa y se centrifuga a 600g por un minuto Colocando previamente la columna QIAamp en un tubo de colección de 2.0 ml y descartando el filtrado contenido en el tubo.

12.- Cuidadosamente se destapa la columna QIAamp y se adicionan 500µl de **Buffer AW2** sin mojar las paredes, se cierra y centrifuga a 20.000 g por 3 minutos, descartando el filtrado contenido en el tubo

13.- Finalmente se coloca la columna QIamp en tubo limpio de 1.5 ml de centrifuga, se destapa y se adicionan 200µl de **Buffer AE o Agua destilada**, incubando a temperatura de laboratorio por un minuto y entonces centrifugado a 6000g por un minuto.

14.- La solución eluida se almacena -20⁰ C, hasta su uso ^{deoxiribonucleotidos trifosfato}

SUPER MIX (Contenido)

Tris-HCl (pH 8.4)	22	mM
KCl	55	mM
MgCl ₂	1.65	mM
dGTP	220	µM
dATP	220	µM
dTTP	220	µM
dCTP	220	µM
Taq recombinante (DNA Polimerasa)	22U	

TE

Tris-HCl, pH8.0	10	mM
EDTA, pH 8.0	1	mM

Marcador DNA de 50 bp DNA .(GIBCO.BR .LIIFE.TECHNOLOGIES

REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA INMUNOTRANSFERENCIA

Sacarosa 20%

20 grs. de sacarosa en 100 ml. de agua destilada (D).

Disolver y filtrar con una membrana de 0.45 µm.

Almacenar a 4° C

Azul tripano

0.4 grs. en 100 ml. de PBS (0.4%)
se filtra y se conserva a temperatura ambiente

PBS cultivo celular

NaCl 8 grs.
KCl 0.2 grs.
Na₂ HPO₄ 1.44 grs.
KH₂ PO₄ 0.24 grs.
Disolver todo en 800 ml. de agua destilada.
Ajustar el pH a 7.4 con HCl
Aforar a un litro y esterilizar.

Reactivos de electroforesis

Gel separador (12%)

1 GEL	
H ₂ O Destilada (D)	3.35 ml.
Tris -HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml.
SDS stock 10%	100 µl
Acrilamida-Bis (stock 30%)	4 ml.
Desgasificar	15 minutos
Persulfato de amonio 10% (100 mg/ml.)	50 µl
Temed	5 µ
Total	10ml.

Gel concentrador (4%)

H ₂ O D	1.5 ml.
Tris -HCl 0.5 M pH 6.8	.625 ml.
SDS stock 10%	25 µl
Acrilamida-Bis (stock 30%)	.325 ml.
Desgasificar	15 minutos
Persulfato de amonio 10% (100 mg/ml.)	12.5 µl
Temed	2.5 µl
Total	2.5 ml.

Acrilamida/Bis (30%)

29.2 grs. Acrilamida
0.8 grs. Bis
Colocar en 100 ml de agua bidestilada, regular pH 7.0.
Guardar a 4° C en obscuridad por no mas de 30 dias.

Tris Base 1.5M pH 8.8

18.15 grs. en 100 ml. de agua bidestilada, guardar a 4° C.

Tris HCl 0.5 M pH 6.8

7.8 grs. en 100 ml. de agua bidestilada, guardar a 4° C.

SDS 10% pH 7.2

10 grs. en 100 ml. de agua bidestilada, conservar a temperatura ambiente.

Buffer de corrida 5x pH 8.3

Tris base 15 grs/litro

Glicina 72 grs/litro

SDS 5 grs/ litro

Agua bidestilada aforar a un litro, conservar a temperatura ambiente.

Usar a 1x

PBS 10X pH 7.0

Solución A Na₂H PO₄ 14.2 grs. (0.1 M)

NaCl 87.6 grs. (0.15 M)

H₂O Destilada aforar 100 ml.

Solución B Na H₂ PO₄.H₂O 13.8 grs. (0.1 M)

NaCl 87.6 grs. (0.15 M)

H₂O Destilada aforar a 100 ml.

100 ml. de la solución A 10X se afora a 1000 ml. con agua destilada y con la solución B se ajusta el pH a 7.0

11. REFERENCIAS

- Ahmad, N. And Noakes, D.E. Season variation in the semen quality of young British goats. *Brit. Vet. J* 1996;152: 225-236.
- Adams, D.S. and Crawford, T.B. CAE: a viral arthritis encephalitis syndrome in goats. *Int. Goats and Sheep Reseach*. 1980;1:168-172.
- Adams, D.S., Oliver, R.E., Ameghino, E., DeMartini, J.C., Verwoerd, D., Whouwers, D.J., Waghela, S., Gorman, J.R., Hyllset, B., Dawson, M., Trigo, F.C., McGuire, T.C. Serological evidence of caprine arthritis-encephalitis infection in eleven of fourteen countries tested. *Vet.Rec.*1984; 115:493-495.
- Adams, D.S., Klevjer-Anderson, P., Carlson, J.L., McGuire, T.C., and Gorman, J.R. Transsmission and control of caprine arthritis encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44:1670-1675.
- Adeyemo, O., Gao, R.J., Lan, H.C. Cytoquine production in vitro by macrophages of goats with caprine arthritis encephalitis. *Cell Moll Biol*, 1997;43(7):1031-7.
- Ali, O.A. Caprine artritis-encephalitis related changes in the uterus of goats. *Vet Rec*, 1987:121-131.
- Avalos, R.R. Diagnóstico y control del virus de la artritis encefalitis caprina (AEC). Memorias del Seminario Nacional sobre la Producción y Comercialización del ganado caprino. *Universidad Autónoma de Nuevo León*.1993:84-86.
- Anderson, A.A., Harkiss, G.D. And Watt, N.J. Quantitative analysis of immunohistological changes in the sinovial membrane of sheep infected with Maedi-Visna virus. *Clin. Immun. and Immunopath* 1994;72:11-19.
- Baba, S.S., Fontabe, A.I., Baba, M.M. and Rimstard, E. Preliminary survey for antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) using recombinant GAG proteins: studies among small ruminant population in nort-eastern Nigeria. *Small Rum Res*.2000; 37:137-140.
- Belov, B and Whalley, M. Virus-specific polipeptides of caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to virión proteins p24 and p14. *J. Gen Virol*.1988;69:1097-1013.
- Bénit, L., Dessen, P., and Heidmann, T. Identification, phylogeny and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J. Virol*.2001;75, 23.11709-11719.
- Beyer, J.C., Chebloune, Y., Lakhel-Mselli, L., Hötzel, I., Mcwhirter-Kumpula, N., Cheevers, W.P. Immunization with plasmid DNA expressing the caprine arthritis -encephalitis virus envelope gene. Quantitative and qualitative aspects of antibodies response to viral surface glycoprotein. *Vaccine*. 2001;19: 1643-1651..
- Blondin, I., Grillet, C., Thiogane, Y. Syncytia formation in culture and analysis of the protein composition of various strains of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). *J. Ann. Rech. Vet.*1989; 20,2:153-158..

- Carpenter, S., Chesebro, B. Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1989; 63:2492-2496,
- Cheevers, W.P., Knowles, D.P., McGuire, T.C., Cunningham, D.R., Adams, D.S., Gorham, J.R. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis encephalitis lentivirus. *Lab. Invest.* 1988;58:510-517,
- Chebloune, Y. Cross species infection of small ruminant lentiviruses. CD-ROM *Word Vet. Congress.* Lyon. France. 1999. Sep: 23-26.
- Chebloune, Y., Bouzar, B., Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C. Balleydier, S., Durand, M., Favier. Properties of CAEV recombinant genomes expressing SIV accessory genes. *International conference and Workshop on animal retroviruses. 3-6 Sep. Cambridge. UK. 2000 :60.*
- Clavijo, A and Thorsen, J. Chemiluminiscent detection of caprine arthritis encephalitis virus with a PCR-generated single stranded nonradiolabelle probe. *Vet. Microbiol.* 1995;43:295-305.
- Clavijo, A and Thorsen, J. Bacterial expression of the caprine arthritis-encephalitis virus gag and env protein and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Am.J.Vet.Res.* 1995;56.7:841-845.
- Clavijo, A and Thorsen, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Rum Res.* 1996;22:69-77.
- Clement, J.E., Gdovin, S.L., Montelaro, R.C., and Narayan, O. Antigenic variation in lentiviral disease. *Ann.Rev.Immunol.*1988; 6:135-159.
- Cork, L.C., Hadlow, W.J., Crawford, T.B., Gorham, T.R. and Piper, R.C. Infectious Leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Inf. Dis.* 1974;129.134-141.
- Crawford, T.B., Adams, D.S., Cheevers, W.D. and Cork, L.C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science.* 1980;207: 997-999.
- Crawford, T.B.,and Adams, D.S. Caprine arthritis encephalitis: Clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1981;178: 713-719.
- Christopher, J.H., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Hines, R.J., Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Katz, J.B., Yaeger, M.J., Chase, C.C.I and Benfield, D.A.. Detecction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin Microbiol.* 1995; July.163:1730-1734.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Sacks, J.M., and Weaver, A.L. Prevalence of antibodies to caprine arthritis encephalitis virus in goats in the United States. *J.Am. Vet. med. Assoc.* 1992;200:802-805.
- Cutlip, R.C., Jackson, T.A. and Laird, G.A. Immunodiffusion Test for Ovine Progressive Pneumonia. *Amm.J. Vet. Res.* 1977: 38.7: 1081-1084.
- Daltabuit, M.T.A., De la Concha-Bermejillo, A., Espinoza, L.R.E and Aguilar, S.A. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can.J. Vet. Res.*1999;93:212-215.
- Dahlberg, J.E., Gasking, J.M. and Perk, K. Morfological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia virus. *J. Virol.*1981:914-919.

De la Concha, B.A., Corral, S.M., Brodie, S.J., De Martini, J.C. Venereal Shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am. J. Vet. Res.* 1996;57:284-688.

Davies, J.M., Robinson, W.F., Carnegie, P.R. Antibody reactivity to the transmembrane protein of the caprine arthritis encephalitis virus correlates with severity of arthritis. No evidence for the involvement of epitope mimicry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997; 60:131-147.

Daltabuit, M.T., De la Concha-Bermejillo, L.E.L., Loza, R.E.E and Aguilar, S.A. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can. J. Vet. Res.* 1999; 3, 212-215.

Diario oficial de la Federación de la Federación México. 1999.

Dinter, Z and Morein, B. Virus Infection of ruminants. Netherlands. *Elseviers Science Publisher*, B.V. 1990.

Dolf, G and Ruff, G. A DNA fingerprinting band associated with the susceptibility to CAE virus-induced arthritis in goats. *Br. Vet. J.* 1994;150: 349-353.

Duke, R.C., Ojcius, D.M., Young, D.E. Cell Suicide in Health and Disease. *Scientific American.* 1996; 57:48-54.

East, N.E., Rowe, J.D. and Madewell, B.R. 1987. Serological prevalence of caprine arthritis encephalitis viruses in goats on California dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 190:182-186.

East, E.N., Rowew, J.D., Dahlberg, J.E., Theilen, G.H and Pedersen, N.C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Rum Res.* 1993;10:251-261.

Ellis, T.M., Robinson, W and Wilcox, G. Effect of colostrums deprivation of goats kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Aust. Vet. J.* 1983;60:326-329.

Ellis, T.M., Robinson, W.F., Wilcox, G.E., The effect of colostrums-derived antibody on neonatal transmission of caprine arthritis encephalitis virus infection. *Aust. Vet. J.* 1986; 63.8.:242-245.

Ellis, T.M., Wilcox, G.E. and Robinson, W.F. Antigenic variation of caprine Arthritis Encephalitis virus during persistent infection of goats. *J. Gen. Virol.* 1987a;68, 3145-3152.

Ellis, T.M., Wilcox, G.E. and Robinson, W.F. Comparison of caprine arthritis encephalitis viruses from goats with arthritis and goats with chronic interstitial pneumonia. *Aust Vet J.* 1987b. ;65.8:254-257.

Ellis, T.M., Robinson, W.F. and Wilcox, G.E. The pathology and etiology of lungs lesions in goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *Aust. Vet. J* 1988;65:69-75.

Emerman, M and Malim, M. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science.* 1998.280:1880-1884.

Foote, R.H. Value of testicular and sperm profiles in optimizing reproductive success: Lessons learned from selective breeding programs of domestic and laboratory animals. Sperm measures and Reproductive Success. *Institute for Health Policy analysis Forum on Science, Health and environmental Risk assessment.* 1989:107-126.

- Gasking, J.M. Testing for caprine arthritis encephalitis (CAE). *Dairy Goat J.* 1990; 68.4:231-237.
- Gay, G., Valdivieso, N., Tron, F., Enriquez, O. Informe preliminar del aislamiento del virus productor de la artritis encefalitis caprina en México. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México-SARH. México D.F.1986:215.
- Grezel, D., Foriester, J., Guigen, F., Mornex, J-F. T-Lymphocyte population in blood of caprine arthritis encephalitis virus infected goats. *Vet. Immunol Immunopathol.* 1999; 57:99-104.
- Gendelman, H.E., Narayan, O., Molineaux, S. Show persisten replication of lentiviruses: Role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*1985; 82:70-86.
- Gelmenn, E.P., Popovic, M., Blayney, D., Masur, H., Sidhu, G., Stahl, R., Gallo, R.C. Proviral DNA of a retrovirus, humans T-cell leucemia virus, in two patients with AIDS. *Science.* 1983; 220: 862-865.
- Grewal, A., Greenwood, P.E., Burton, R.W., Smith, J.E., Batty, E.M, and North, R..Caprine retrovirus infection in NewSouth Wales:Virus Isolation, clinical and histopatological finding and prevalence of antibodies. *Aust. Vet. J.* 1986; 63:245-248.
- Guiguen, F., Lerondelle, C., Favier, C. Réponses du chevreau à des monocytes infectés in vitro par le virus de Lárthrite et de l'encéphalite de la chevrè. *Ann Rech Vet.* 1990;21:179-185.
- Gopal, P.R., Walter, J.S and Walid, H. Detection of caprine arthritis encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*1993; 3042-3043.
- Greenwood, P.L. Effect of caprine arthritis encephalitis virus on productivity and healt of dairy goats in Nen South Wales, Australia. *Preventive Veterinary Medicine.* 1995.22,71-78.
- Harmache, A., Bouyac, M., Audoly, G., Hieblot, C., Peveri, P., Vigne, R., and Suzan, M. The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goats synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J. Virol.*1995; 69:3247-3257.
- Hare, W.C.D. Enfermedades transmisibles por semen y las técnicas de transferencia de embriones. *Officine International Des Epizooties (OIE).* 1985; 4:5-30.
- Haase, A.T., Pathogenesis of lentivirus infections. Review. *Nature.* 1986; 322:1 30-136.
- Haziza, B., Chauvin, Jean-Paul, Gluschankof, P., Suzan, M. Caprine Arthritis encephalitis virus : Evidence for a B/D-type assembly pathway in a C-type lentivirus replication. *Virology.* 2001: 286,2: 434-445.
- Heckert, R.A., McNab, W.B., Richardson, S.M., Briscoe, M.R. Evaluations of an Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Can. Vet. Res.* 1992; 56:237-241.
- Houwer, D.J. and Shaake, J. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentivirus, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J. Immun. method.* 1987; 98.:151-154.

Hullinger, G.A., Knowles, D.P., McGuire, T.C. and Cheevers, W.P. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology*. 1993;192:328-331.

Issel, C.J., Rwambo, P.M., and Montelaro, R. C. Evolution of equine infectious Anemia diagnostic tests: Recognition of a need for detection of anti-EIAV glycoprotein antibodies. Equine infectious disease. V *Proceeding of the International Conference. University Press of Kentucky*. EUA. 1988:199-200

Internacional clasification taxonomy viruses (ICTV).1999. The seventh Report. Caprine Arthritis encephalitis .URL:www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/61064001.htm.

Jan, C.L., Greenland, T., Gounerl, F., Balleydier, S., Momex, J.F. Activation of small ruminant aortic endothelial cell after in vitro infection by caprine arthritis encephalitis virus. *Res. Vet. Sci* .2000.69 (3):225-231.

Jolly, P.E., Narayan, O. Evidence for interference, coinfections, and intertypic virus enhancement of infection by ovine-caprine lentiviruses. *J. Virology*. 1989; 63,11:4682-4688.

Jordan, H.L., Liang, Y., Hudson, L.C., and Tompkins, W.A. Shedding of feline immunodeficiency virus in semen of domestic cats during acute infection. *Am. J. Vet. Res.* 1999;60:211-215.

Kashuba, A.D.M., Dyer, J.R., Kramer, L.M., Raasch, R.H., Eron, J.J., and Cohens, M.S. Antiretroviral-Drugs concentration in semen: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43:1817-1826.

Kemp, R.K., Knowles, D.P., Perry, L.L. McGuire, T.C., Besser, T.E., Cheevers, W.P. Crossreactive neutralizing antibodies induced by immunization with caprine arthritis encephalitis virus surface glycoprotein. *Vaccine*. 2000;18: 1282-1287.

Kennedy-Stoskopf, S., Narayan, O., Strandberg, J.D. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis encephalitis. *J. Comp.Pathol.* 1985; 95:609-617.

Kiessling, A.A., Crowell, R.C., and Connell, R.S. Sperm-associated retrovirus in the mouse epididymis. *Proc. Nat. acad. Sci. USA*. 1987;84:8667-8671.

Kirkland, P.D. and Batty, E.M. Caprine arthritis encephalitis virus: an efficient method for the large scale production of serological antigens. *J. Virol. Method*. 1987;16:323-326.

Knowles, D.P., Cheevers, W., McGuire, T., Brassfield, A.L., Harwood, W.G., and Stem, T.A. Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis encephalitis lentivirus. *J. Virol*. 1991; 65,11:5744-5750.

Knowles, D.P., Cheevers, W., McGuire, T., Steam, T., Gorham, J. Severity of arthritis is predicted by antibody response to GP 135 in Chronic infection with caprine arthritis encephalitis virus. *J. Virol*.1990:2396-2398.

Knowles, D.P. Laboratory diagnostic test for retrovirus infection of small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food animal Practice*. 1997;13:1-11.

Knowles, D.P., Everman, J.F., Shropshire, C., Chalie, J.V., Bradway, D., Gezon, H.M., Cheevers, W.P. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens

- for detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus. *J.Clin Microbiol.* 1994;32. 1:243-245.
- Krieger, J.N., Coombs, R.W., Collier, A.N., Ross, S.O., Chaloupka, D., Cummings, D.K., Murphy, V.L. and Corey Lawrence. Recovery of human immunodeficiency virus type 1 from semen: minimal impact of stage of infection and current antiviral chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 1991; 163: 386-388.
- Kwang, J., Keen, J., Cutlip, R.C., Kim, H.S. de la Concha-Bermejillo. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Rum Res.* 1995;16:171-177.
- Laemmli, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 :680-685.
- Lamara, A., Fieni, F., Mselli-Lakhal, L., Tainturier, D., Chebloune, Yahia. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goats granulosa cells. *Vir. Res.* 2001;79:165-172.
- Lechner, F., Machado, J, Bertoni, G., Seow, H.F ; Dobbelaere, D.A and Peterhans E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J. Virol.* 1997; 71:7488-7497.
- Lerondelle, C., Fleury, C., Vialard, J. La glande mammaire : organe cible de l'infection par le virus de l'arthritis et de encéphalite caprine. *Ann.Rech.Vet.* 1989 ;20 :57-64.
- Leroux, C., Lerondelle, C., Chastang, J., Mornex, J.F. RT-PCR. Detection of lentivirus in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet.Res.* 1997;28; 115-121.
- Leyva, G.V.H., Martínez, R.H.A., González, R.M.G., Cornejo, C.M.A., Garrido, F.G., Rojas, M.M.L., González, P.S y Montaraz, C.J.A. Rosales, M.E., Identificación del virus de la artritis encefalitis caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México. *Rev.Lat.Amer.Microbiol.* 1998; Vol.40.Nos.1 y 2:1-19.
- Meas, S., Usui, T., Ohashi, K., Sugimoto, Ch., Onuma, M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Vet.Micro.* 2002; 84:275-282.
- Miller, C.J., Vogel, P., Alexander, N.J., Dandekar, A.S., Hendrickx, A.G. and Marx, P.A. Pathology and Localization of simian immunodeficiency virus in the reproductive tract of Chronically Infected Male Rhesus Macaques. *Lab Inves.* 1994;70: 255-262.
- Mérida, M.J.A. Determinación de linfocitos T y B en sangre periférica de cabras seropositivas al virus de artritis encefalitis caprina (AEC) (tesis de licenciatura) Estado de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 1995.
- McConnell, I. The role of ovine IgG2 in ADCC against maedi-visna virus infected cells. International Conference Workshop on Animal Retroviruses. 3-6 Sep. Cambridge. UK. 2000:38.
- Maréchal, V., Prevos, TM-C., Petit, C., Perret, E., Heard, J-M and Schwartz., Human Immunodeficiency virus type 1 Entry in Macrophages Mediated by Macropinocytosis. *J.Virol.* 2001;75:11166-11177.
- Mdurvwa, E.G., Ogunbiyi, P.O., Gakou, H.S., and Reddy, P.G. Pathogenic mechanisms of caprine arthritis encephalitis virus. *Vet.Res.Comm.* 1994, 18:483-490.

Miller, R.G., Cairns, J.S., Bridges, S and Sarver Nava. Human Immunodeficiency virus and AIDS: Insights from Animal Lentiviruses. *J. Virol*, 2000.Vol.74.No.16:7187-7195.

Moore, J.P., Jameson, J.A., Weiss, R.A and Sattentau, Q.J. The HIV -Cell fusion reaction In *Viral Fusion Mechanism*,. Edited by J.Bentz.Boca Raton, Fla.CRC Press.1993:233-289.

Motha, M.J., and Ralston, C.J. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet.Microbio*.1994; 38:359-367.

Mselli-Lakkhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Jian, D., Favier, C., Durand, J. Grezel, D., Balleydier, S., Mornex, J.F. Chebloune, Y. Goats milk epithelial cells are highly permissive to CAE infection in vitro. *Virology*. 1999; 259: 67-73.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C.and Studdert., M.J. *Veterinary.Virology. Third Edition*.1999. Academic Press.USA.

Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Sheffer, D., Griffin, D.E., Clements, J.E . 1983.

Narayan, O. Immunopathology of lentiviral infections in ungulated animals. *Curr.Opin.Immunol*. 1989:399-402.

Narayan, O., Clemente, J.E. Biology and patogénesis of lentiviruses. *J.Gen.Virol*. 1989;70:1617-1639.

Narayan, O.,Zink,M.C., Borrel,M., Mc Entee,M., Sharma,D., Adams,R. Lentivirus induced arthritis in animals. *J.Rheumatol*. 1992;19:25-32.

Nazara. S., Trigo, F.J., Suberbie, E., Madrigal, V.(a) 1983. Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la artritis-encefalitis-caprina en México.Memorias de la *Reunión de Investigación Pecuaria en México*.Centro Médico Nacional.México.D.F.1983:550.

Nazara, C.S., Trigo, F.J., Suberbie, E., Madrigal, V.(b) Estudio serológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Téc.Pec.Mex.* ,1985; 48:98-101.

Nazara, C.S., Trigo, F.J., Suberbie, E., Madrigal, V. (c). Estudio clínico-patológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Veterinaria Mex*. 1985;16: 91-96.

Nazara, C.S., F.J., Suberbie, E., Madrigal, V. Estudio de la artritis encefalitis caprina en México (*tesis de maestría*). México D.F.FMVZ.UNAM.1991.

Nash, J.W., Hanson, L.A. ,Coats, K.St.C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. *Am.J.Vet.Res*.1995;56:760-763.

Nord, K., Rimstad, E., Storset, K., Løken. Prevalence of antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus in goats herds in Norway. *Small Rum Res*.1988; 28:115-121.

Novelo, B.P., Martínez, R.H.A., Tórtora P.J., Ramírez, A.H. *International Conference of goats: Round Table*. Detection and prevention of CAE. Proceeding. Tome II. Tours. France. 2000: 819.

Palmarini, M., Gray, A., Carpenter, K., Fan, H., Bazer, F.W., Spencer, T.E. 2001 .Expresion of endogenous Betaretrovirus in Ovine Uterus: Effects of neonatal age, estrous cycle, pregnancy and progesterone. *J. Vir*.75,11319-11327.

- Pedersen, N.C., Torten, M., Rideout, B., Sparger, E., Tonachini, T., Luciw, P.A., Ackley, C., Levy, N., Yamamoto, J. Feline leukemia virus infection as a potentiating cofactor for the primary and secondary stage of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 1990 ;64:598-606.
- Pepin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J-F and Peterhans, E. Maedi-Visna Infection in sheep: a *Rev. Vet. Res.* 1998 ;29:341-347.
- Perrin, G, G. L'arthrits encéphalitis caprine. *Point Veterinarie.* 1991;23:713-718.
- Perrin, G. Le virus de L'AEC. 1997. <http://www.world-goat-centre.com.fr>
- Peretz, G., Asso, J., et Devillechaise.. Le C.A.E.V. Revue des Connaissances actuelles et conséquences pratiques. *Revue Med. Vet.* 1993;144,93-98.
- Peterhans, H .Lentivirus of small ruminants: CAE and Maedi-Visna virus.CD-ROM *Word Vet Congress Vet.* Lyon. France, Sep. 1999, 23-26.
- Perry, L.L., Wilkerson, M.J., Hullinger, G.A., Cheevers, W.P. Depressed CD4+T lymphocyte proliferative response and enhanced antibodies response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis. *J.Infect.dis.* 1995;171:328-334.
- Petturson, G., Georgsson, G., Palsson, P.A. Maedi-Visna and related disease. Vol 3 In: Virus infections of ruminants New York.USA.Elsevier Amsterdam:431-440,1990.
- Pudney J. And Anderson, D. Orchtis and human immunodeficiency virus type 1 infected cells in Reproductive tissues from men with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Pathol.* 1991;139:149-161.
- Reddy, G.P., Sapp, W.J., Heneine, W. Detection of caprine arthritis encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J.Clin. Microbiol.* 1993; 31:3041.
- Rimstad, E., East, N., Torten, M., Higgins, J., DeRock, E., Pedersen, N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis encephalitis virus infection in goats. *Am.J.Vet.Res.* 1993; 54.11:1858-1852.
- Rimstand, E., East, N., DeRock, E., Pedersen, N.C. Detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis virus using recombinant GAG proteins. *Arch. Virol.* 1994;134:345-356.
- Rolland, M., Valas, S., Perrin and Mamoun, R. *International Conference and Workshop on animal retroviruses.* 3-6 Sep. Cambridge. UK. 2000: 51.
- Rosati, S., Mannelli, A., Merlo, T., Ponti,N. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Vir. Res.* 1999;61.2: 177-183.
- Rowe, J.D and East, N. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 1997;13: 35-53,
- Rowe, J.D. 1999. Epidemiology of the CAE: Horizontal transmission of the virus.CD-ROM *Word Vet. Congress Lyon. France.Sep. 1999.:23-26.,*

- Russo, P., Vitu, C., Fontaine, J.J. et Vignoni, M. Arthrite- encéphalite caprine : essai d'une préparation vaccinale adjuvée. I Étude clinique et virologique. *Com. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 1993;16:131-136.
- Robinson, W.R. and Ellis, T.M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. *Aust. Vet. J.* 1986 ;63 (8).237-241.
- Sanna, E., Sanna, M.P., Vitali, C.G., Renzoni, G., Sanna, L., Spano, S., Rossi, G. and Leoni, A. proviral DNA in the Brain of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *J. Comp. Path.* 1999;121 :271-276,
- Saltarelli, M., Querat, G., Koning, D.A., Vigne, R. and Clement, J.E. Nucleotide Sequence and transcription analysis of molecular clones of CAE wich generate infectious virus. *Virology.* 1990.179:347-364.
- Saunders, M. Arthrite encéphalite caprine á virus: aspects épidémiologiques et importance en production caprine. *Point. Vet.* 1998 ;29,(194):829-837.
- Smit, M.C. and Cutlip, R. Effect of de infection with caprine arthritis encephalitis virus on milk production in goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1988.193: 67-68.
- Simard, C., Kibenge, M.T., Singh, P., Dixon, P. Simple and rapid method for production of Whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis encephalitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin .Diagn lab. immunol.* 2001;.8. 2:352-356.
- Sommerfelt, M.A. Retrovirus receptors. *Rev. J. Gen Virol,* 1999. 80:3049-3064,
- Souriou, L. Diagnostic serologiques de l'ainfection par le CAEV chez les chevrettes comparaison de trois techniques : immuno-diffusion en gelosa, Elisa et Western-Blot. These de Doctorat Veterinaire, Ecole Nationale Veterinaire. Lyon. France. 1998.
- Storset, A.K., Eversen, ϕ ; and Rimstad E. Immunohistochemical identification of caprine Arthritis-Encephalitis virus in Parafinn-embedded specimens from Naturally Infected Goats. *Vet. Pathol.* 1997;34:180-188.
- Sundquist, B., Jonson, L., and Jacobsson, S.O. Visna virus meningo-encephalomyelitis in gotas. *Acta. Vet. Scan.* 1981. 22: 315.
- Trigo, J.F. La arthrits encephalitis caprina. *Ciencia Veterinaria.* 1991; 5: 49-66
- Turelli, P., Petursson, G., Guiguen, F., Mornex, J.F., Vigne, R., Quérat, G. dUtPase-minus caprine arthritis encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *J. Virol.* 1996;71:4: 522- 530.
- Travassos, C.E., Benoit, C., Valas, S., Da Sila, A.G., and Perrin, G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum Res.* 1999; 32 :101-106.
- Travassos, C., Benoit, C., Valas, S., Da Silva, A. And Perrin G. Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperma de boucs infectés expérimentalement. *Vet. Res.* 1998;29:579-578.

Valas, S., Benoit, C., Baudry, C., Perrin, G., and Mamoun, R.Z. Variability and immunogenicity of caprine arthritis encephalitis virus surface Glycoprotein. *J. Virol.* 74,13.2000: 6178-6185.

Van-Voorhis, B.J., Martinez A., Mayer K and Anderson D.J. Detection of Human immunodeficiency virus type 1 in semen from seropositive men using culture and polimerasa chain reaction deoxyribonucleic acid amplification techniques. *Fertility and esterility.* 1991;55:3:588-594.

Vitu, C., Russo, and P., Vignoni, M. Arthrite Encephalite Caprine: Essai D'une preparati6n vaccinale adjuvee-II. Etude de la reponse anticorps. *Comp. Imm. Microbiol. Infect. Dis.* 1993 ;16,2 :137-144

Vogt, H.T., Cordano, P., Guionaud, G., Bertoni, G., Zanoni, R., and Peterhans, E. Eradication of caprine arthritis encephalitis in Switzeland: A success story with some open question. 7 *International Conference on Goats. Proceeding. Tome 1. Tour. France.* 1999:821.

Von Bodungen, U., Lechner, F., Pfister, H., Vogt, H.R., Cheevers, E.P., Bertoni, G. Jungi, T.W., Peterhans, E. Clinical Immunohistology of the early course of lentivirus-induced arthritis. *Exp. Immunol.* 1998;111,2:384-390.

Weiss, A.R. Ruminating on lentivirus patog6nesis. International conference and *Workshop on animal retroviruses.* 3-6 Sep. Cambridge. UK. 2000.:29.

Wilkerson, M.J., Davis, W.C. Cheevers, W.P. Peripheral blood and synovial fluid mononuclear cell phenotypes in lentivirus induced arthritis. *J. Rheumatol.* 1995;22,1:8-15.

Werling, D., Langhans, W., Geary, N. Caprine arthritis encephalitis virus infection changes caprine blood monocyte responsivness to lipopolysacharide stimulation in vitro. *Vet. Immunol .Immunopathol.* 1994; 43.:401-411.

Whetstone, C.A., VanDerMaaten, M.J. and Miller, J.M. A Western blot assay for the detection of antibodies to bovine immunodeficiency-like virus in experimental inoculated cattle, sheep, and goats. *Arch Virol.* 1991;116.119-131.

Yahi, N., Baghdiguan, S., Moreau, H., and Fantini, J. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 *Cell. J. Virol.* 1992; 66:4848-4854.

York, D.F., Vigne, R., Verwoerd, D.W., and Querat, G.. Nucleotide sequence of jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. *J. Virol.* 1992; 66.(8):4930-4939.

Zacharopoulos, V.R. and Phillips, D.M.. Cell-mediated HTLV-I infection of a cervix-derived epithelial cell line. *Microb patho.* 1997;23:225-233.

Zanoni, R.G., Vogt, H.R., Pohl, B., Bottcher, J., Bommeli, W. and Peterhans. E. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminat lentivirus. *J. Vet. Med. B.* 41.1994:662-669.

Zhang, S., Troyer, D.L., Kapil, S., Zheng, L., Kennedy, G., Weiss, M., Xue., X., Wood, C., Minocha, H.C. Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR in situ hybridization . 1997;236:249-257.

Zink, M.C., Yager, A.J., Myer, D.J. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus: Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am. J. Path.* 1990;136:843-854,

Zink, M.C., and Narayan, O. Lentivirus induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocites and restricts replications of caprine arthritis encephalitis virus. *J. Vir.*1989:2578-2584.

Zink, M.C., Narayan, O., Kennedy, P.C.E. Pathogenesis of visna maedi and caprine arthritis encephalitis : new on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol.* 1990:2394-2398.

•