



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN.**

**“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN
SEMENTALES CAPRINOS Y OVINOS A
LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES, EN 7
ESTADOS DEL PAÍS”.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

MIGUEL ANGEL LAZCANO RAFAEL

ASESOR:

DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

COASESOR:

DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. MÉX.

SEPTIEMBRE 2013



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.

Abreviaturas.

Acn	Anticuerpo neutralizante
Acp	Anticuerpo precipitante.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
AEC	Artritis encefalitis caprina.
CA	Cápside.
CDC	Centro de control de enfermedades.
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
ELISAc	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas competitivo.
Env	Envoltura.
Gag	Antígeno específico de grupo.
Gp	Glicoproteína.
IDAG	Inmunodifusión en agar gel.
IN	Integrasa.
LVPR	Lentivirus de pequeños rumiantes.
MA	Matriz.
MV	Maedi Visna.
NC	Nucleocápside.
nm	Nanómetros.
NPO	Neumonía Progresiva Ovina.
OIE	Organización Internacional de Epizootias
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Pol	Polimerasa.
Rev	Regulador de la expresión del virión.
SU	Proteína de superficie.
TM	Proteína transmembranal.
TR	Transcriptasa Reversa.
LTR	Terminal Larga Repetida.
VAEC	Virus de la Artritis Encefalitis Caprina.

Vif	Factor de infectividad viral.
VMV	Virus de Maedi Visna.
WB	Western Blot.

AGRADECIMIENTOS

Gracias mi vida por todo tu apoyo por tu amor, paciencia y dedicación, por estar conmigo y por preocuparte por mi incondicionalmente.

Índice	Página
Resumen	8
1.- Introducción	9
1.1 LVPR en México.	11
1.2 Características del agente etiológico.	13
1.3 Ciclo de replicación viral.	16
1.4 Implicaciones de la replicación viral en la variabilidad de los LVPR.	17
1.5 Respuesta inmune.	18
1.5.1 Respuesta inmune humoral.	19
1.5.2 Respuesta inmune celular.	20
1.6 Cuadro clínico de LVPR.	20
1.6.1 Forma pulmonar.	21
1.6.2 Forma nerviosa.	22
1.6.3 Forma mamaria.	22
1.6.4 Forma articular.	23
1.7 Diagnóstico de laboratorio.	23
1.7.1 Diagnóstico serológico.	24
1.7.1.1 IDAG.	25
1.7.1.2 ELISA.	26
1.7.1.2.1 ELISA de primera generación.	26
1.7.1.2.2 ELISA de segunda generación.	27
1.7.1.2.3 ELISA de tercera generación.	27
1.7.1.2.3.1 Fundamento de la prueba de ELISAc.	29
1.7.1.3 Inmunotransferencia o Western blot (WB).	29
1.7.2 Microscopía electrónica.	30
1.7.3 Hibridación <i>in situ</i> .	30
1.7.4 Cultivo celular.	30
1.7.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	31
1.8 Diagnóstico diferencial.	31
1.9 Formas de transmisión de LVPR.	32

1.9.1 Transmisión aerógena.	32
1.9.2 Transmisión lactógena.	32
1.9.3 Transmisión intrauterina.	33
1.9.4 Transmisión sexual.	33
1.10 Medidas de prevención y control.	34
2. Justificación.	37
3. Objetivo general.	38
3.1 Objetivos particulares.	38
4. Hipótesis.	39
5. Materiales y métodos.	40
5.1 Animales de estudio.	40
5.2 Preparación de pools de sueros.	40
5.2.1 Desarrollo de la prueba de ELISA competitiva (ELISAc).	40
6. Resultados.	42
6.1 Machos agrupados por raza.	43
6.2 Machos agrupados por edad y especie.	44
6.3 ELISA en pools.	45
7. Discusión.	48
8. Conclusiones.	53
9. Bibliografía.	54

Índice de Tablas	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica de los retrovirus.	10
Tabla 2. Descripción de proteínas de LVPR descritas por diferentes autores.	19
Tabla 3. Proceso clínico.	21
Tabla 4. Pruebas de diagnóstico de laboratorio utilizadas para LVPR.	24
Tabla 5. Número de muestras para el diagnóstico de hatos.	25
Tabla 6. Pruebas de diagnóstico comerciales para LVPR.	28
Tabla 7. Medidas de prevención y control.	35

Tabla 8. Sueros por especie y raza.	43
Tabla 9. Razas de caprinos de los animales estudiados.	44
Tabla 10. Razas de ovinos de los animales estudiados.	44
Tabla 11. Edades de la población de estudio.	45
Tabla 12. Evaluación serológica de 675 sementales caprinos (n=488) y ovinos. (n=187) a la infección por lentivirus de pequeños rumiantes.	45
Tabla 13. Resultados positivos de sementales caprinos por raza.	46
Tabla 14. Seropositividad de sementales caprinos por razas.	46
Tabla 15. Resultados positivos y negativos de sementales ovinos por razas.	46
Tabla 16. Machos caprinos seropositivos a la infección de LVPR por edades.	47

Figura	Página
Figura 1. Estructura viral y mapa genómico.	14
Figura 2. Cantidad de sueros por especie.	42
Figura 3. Sueros evaluados por estado.	43
Figura 4. Sueros positivos.	47

Resumen.

Se colectaron 675 sueros de machos ovinos (n= 187) y de machos caprinos (n= 488) de 7 estados del país (Coahuila (n=28), Estado de México (n=12), Guanajuato (n=362), Hidalgo (n=170), Oaxaca (n=71), Querétaro (n= 9) y Puebla (n=23) con el fin de determinar la presencia de anticuerpos anti-glicoproteína de envoltura viral (gp135) de Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) utilizando una prueba comercial de ELISA competitiva, evaluándose en grupos de 5 sueros para posteriormente ser confirmados en forma individual. Los resultados de seropositividad obtenidos fueron 6.95% en ovinos y 14.75% en caprinos, obteniendo los siguientes resultados por estado y especie evaluados: Querétaro con 55.55% en caprinos, Estado de México 41.66% en caprinos, Guanajuato 16.02% en caprinos, Hidalgo 9.15 % en ovinos y 40% en caprinos, Oaxaca 0%, Coahuila 17.85 y Puebla con 4.34% en caprinos.

1. Introducción.

El virus de Maedi Visna y el de Artritis Encefalitis Caprina recientemente se les ha asignado a un solo grupo denominado Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) ya que ambos infectan a ovinos y caprinos. Los LVPR pertenecen a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus* (tabla 1), son retrovirus no-oncogénicos que producen enfermedades en diferentes órganos y se caracterizan por largos períodos de incubación e infecciones persistentes. Además, se ha descrito que las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico del virus de Maedi Visna identifican de igual forma al virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) y viceversa (Juste y De la Concha, 2001; Martínez *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2011). Los LVPR comprenden varios genotipos que se han aislado de diferentes regiones geográficas y se han agrupado en dos grupos filogenéticos, cuyos prototipos son el virus de Maedi Visna y el virus la Artritis Encefalitis Caprina (Ramírez *et al.*, 2011).

El VAEC fue aislado por primera vez en 1980 (Crawford *et al.*, 1980) de una cabra artrítica; la infección por VAEC se caracteriza por afectar varios aparatos o sistemas produciendo lesiones inflamatorias crónicas que incluyen poliartritis proliferativa, neumonía intersticial y mastitis indurativa en animales adultos y una leucoencefalomielitis en cabritos de 2-4 meses de edad (Bruguere- Picoux, 1984; Dawson y Wilesmith, 1985; Kennedy *et al.*, 1985; Ávalos *et al.*, 1992).

La infección por el virus repercute económicamente en los rebaños al infectar de por vida a los pequeños rumiantes por lo que reduce de vida útil de los animales, así como, por la disminución en la producción de leche y anulación de venta de animales reproductores. Por lo que en los últimos años ha cobrado importancia como una costosa enfermedad en las cabras. Tiene una distribución mundial que afecta principalmente a cabras destinadas a la producción de leche en países con sistemas intensivos de crianza (de la Concha- Bermejillo, 1997).

Por otro lado el virus de Maedi-Visna (VMV) causa una enfermedad crónica en los ovinos. El término Maedi se refiere a la enfermedad respiratoria (neumonía intersticial) y Visna a la progresión de la enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (Ramírez *et al.*, 2010). La enfermedad está muy extendida en todo el mundo y fue primeramente

aislado de ovinos por Sigurdardottir y Thormar en 1964 en Islandia, único país que actualmente ha erradicado la infección (Shah *et al.*, 2004).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los retrovirus

FAMILIA	SUBFAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
<i>Retroviridae</i>	<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Alfaretrovirus</i>	
		<i>Betaretrovirus</i>	
		<i>Deltaretrovirus</i>	
		<i>Epsilonretrovirus</i>	
		<i>Gammaretrovirus</i>	
		<i>Lentivirus</i>	Virus de la Inmunodeficiencia Bovina <u>Virus Maedi Visna</u> <u>Virus de la Artritis Encefalitis Caprina</u> Virus de la Anemia Infecciosa Equina Virus de la Inmunodeficiencia Felina Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1y 2 Lentivirus del Puma Virus de la Inmunodeficiencia del Simio.

(ICTV, 2011)

Los análisis filogenéticos realizados en los que se comparan secuencias nucleotídicas han demostrado que se trata de lentivirus muy relacionados y muestran claras evidencias de una transmisión cruzada interespecie entre ovejas y cabras de importancia epidemiológica. (OIE, 2004) Más aún, algunas secuencias de lentivirus de origen ovino están más relacionadas con VAEC que con VMV y viceversa (Narayan *et al.*, 1993). Las investigaciones a este respecto se han incrementado y han permitido demostrar que los LVPR no se deben considerar como específicos de especie (Gjerset *et al.*, 2009). Evidencias de este hecho, son el salto interespecie entre ovejas y cabras domésticas del subtipo A4 de forma natural, siendo más frecuente la transmisión en hatos mezclados (Shah *et al.*, 2004).

Las secuencias nucleotídicas de los LVPR muestran una alta homología en los genes *gag* y *pol* de un 75% a un 78% respectivamente, y parecen ser menos parecidas en lo que respecta al gen *env* (60%) (Daltabuit *et al.*, 2006, ICTV, 2011).

Es importante señalar que aun cuando se están realizando análisis filogenéticos más finos, es difícil establecer diferencias claras entre especies, ya que los aislados pueden agruparse de forma distinta según la región del genoma que se examine. Ese hecho es de especial relevancia en relación con los LVPR, ya que los agrupamientos son frecuentes entre aislados ovinos y caprinos (Davey *et al.*, 2000). La implicación práctica de esta situación es que da pauta para el diseño de programas de control y erradicación en ambas especies. Actuar solo contra una especie puede resultar infructuoso si no se actúa simultáneamente en la otra especie (Juste y de la Concha, 2001).

En un estudio realizado en Jordania se evaluaron sueros ovinos y caprinos utilizando dos kits de diagnóstico comerciales, poniendo de manifiesto una diferencia entre la reactividad de los sueros; en el caso de los sueros ovinos reaccionaron en números casi iguales a la prueba de ELITEST basada en el virus EV1 de origen Británico y a el ELISA basado en aislamientos Italianos It-561 VMV-like y It-PI1 VAEC-like (proteínas P16-P25) respectivamente, mientras que la gran mayoría de los sueros de cabra reaccionaron exclusivamente a los antígenos de los aislamientos italianos. Además, se encontró reactividad con el genotipo específico según de donde derivaron las proteínas P16-P25 (VMV-like o VAEC-like), revelando que ambos VMV y VAEC circulan entre poblaciones de ovejas y cabras en Jordania y que el tipo genético de VMV parece ser el prevalente (Tolari, *et al.*, 2013).

1.1. LVPR en México.

En 1984 Adams *et al* realizaron un estudio con 3729 sueros de varios países incluyendo México, para identificar la infección por el VAEC utilizando la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDAG) con resultados de seropositividad menores al 10%.

En el mismo año, Álvarez utilizó 800 sueros de animales provenientes de los estados de Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Querétaro y Sonora utilizando IDAG como prueba diagnóstica encontrando un 28% de seropositividad. En 1985 Nazara y Trigo analizando 138 muestras del Estado de México con la prueba de IDAG encontraron 47

caprinos seropositivos, lo que representó una seroprevalencia del 34.1%. En 1991 Nazara realizó un trabajo que involucró 2484 sueros de los cuales 857 fueron obtenidos de raza pura y 1627 de raza criolla, dando como resultado un 27% de prevalencia en los animales de raza pura.

En el año 2003 se realizó un estudio serológico en cabras del estado de Yucatán con la técnica de IDAG, la cual detecta anticuerpos contra las proteínas gp135 y p28; resultando en una seropositividad del 3.6% (Torres-Acosta *et al.*, 2003). Otro estudio realizado más recientemente con la prueba de ELISA competitiva en 1211 caprinos residentes en el altiplano central reveló una seroprevalencia de 39.35% (Vázquez *et al.*, 2008).

El primer aislamiento en México de VAEC fue descrito por Daltabuit *et al* en 2009 a partir de 2 cabras seropositivas detectadas por la prueba de IDAG. La identificación en el cultivo de células de membrana sinovial co-cultivadas con células mononucleares de sangre periférica se determinó por la formación de sincitios y se confirmó por PCR en la cual se amplificó un segmento de ADN del gen *gag* del VAEC.

Las infecciones por LVPR son de mayor importancia en sistemas intensivos dedicados a la producción de leche, debido a que afecta negativamente la calidad de la leche y aumenta el número de células somáticas (Ramírez *et al.*, 2011).

La importación y el intercambio de pequeños rumiantes procedentes de países con una alta prevalencia han contribuido a la propagación de la infección de LVPR a diferentes áreas del mundo y en particular para México. La introducción de animales con el objetivo de mejorar la genética en los sistemas de producción ha incrementado la infección dentro de los rebaños nacionales (Trigo, 1991, Novelo., *et al* 2001, Franco, 2008).

Aunque en México predominan las explotaciones caprinas no tecnificadas, el país no está exento de LVPR, ya que la fuente de semen y animales de reemplazo en los programas de mejora genética de nuestros hatos provienen de países más tecnificados con la infección descrita (Salazar *et al.*, 2003).

La infección en ovinos por el virus MV no está considerada en la lista oficial de enfermedades de reporte obligatorio para México, mientras que la situación de la infección en caprinos por el virus de la AEC se considera enzoótica, lo cual limita el comercio nacional e internacional. (OIE, 2004).

Por otra parte, con respecto a los estudios llevados a cabo en ovinos para identificar el VMV, se han realizado estudios patológicos en vísceras decomisadas en el rastro de la ciudad de México, donde se reportaron observaciones macro y micro de lesiones muy sugestivas al VMV (Eguiluz y Aluja, 1981). En 1986 se realizó un estudio serológico en México para detectar anticuerpos contra el VMV obteniendo como resultado un 8.2% de animales positivos (Molina *et al.*, 1986). Pérez en 2005 realizó un estudio con 70 muestras de ovinos obtenidas de rebaños de los estados de Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Estado de México y Zacatecas. Los sueros fueron evaluados con un kit comercial de ELISA indirecto (CHEKIT Bommeli Switzerland) basado en un virus completo de MV que también detecta el VAEC. Los sueros también se evaluaron por Western Blot (WB), utilizando como antígeno viral el obtenido de un cultivo de células de membrana sinovial de feto caprino infectadas con el VAEC. Los resultados con estas pruebas fueron 12 animales positivos, 1 por la prueba de ELISA y 11 por la prueba de WB. De igual forma, en ovinos importados de los Estados Unidos de Norteamérica, se encontraron altos porcentajes de seroprevalencia (26%) del VMV en el año 2006 (De la Concha *et al.*, 1999).

Cabe hacer mención de la situación ocurrida en el año 2007, en la que se exportaron desde México a Colombia 265 ovinos y 17 de ellos resultaron positivos a Maedi Visna, por lo que estos animales fueron sacrificados. Resultando en una pérdida económica de aproximadamente 3 millones de pesos (Urcastegi, 2007).

Aún no hay datos sobre la situación epidemiológica de la infección por LVPR en algunas regiones de México, ya que los estudios realizados hasta ahora han sido aislados e inconstantes. Esta falta de información y la importancia que tienen los pequeños rumiantes en el país hace que sea necesario establecer proyectos que puedan determinar la prevalencia de LVPR en los hatos caprinos y ovinos en México, para entonces implementar mejores medidas de control (Salazar *et al.*, 2003; Tórtora, 2008).

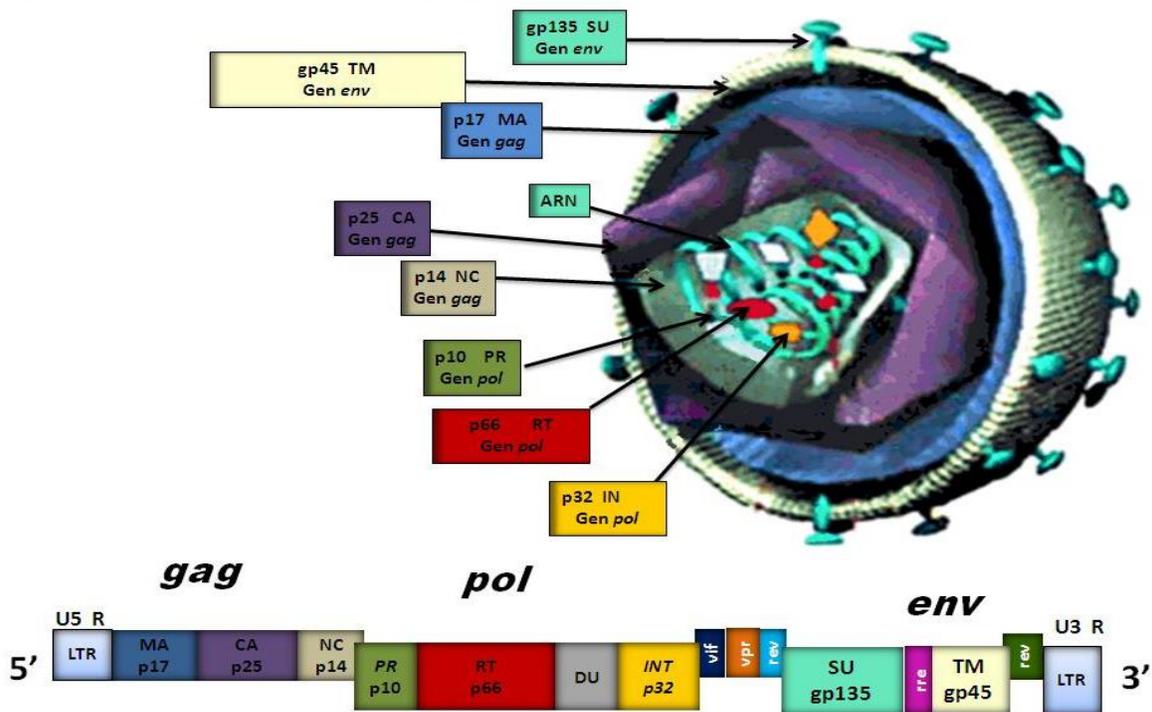
1.2. Características del agente etiológico.

Los LVPR se componen aproximadamente de 60% de proteína, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN (Peturson *et al.*, 1992; ICTV, 2011). Los viriones son envueltos con un diámetro de 80-100 *nm* (ICTV, 2011). El genoma se encuentra en el interior de la nucleocápside (NC) y se esta junto con la transcriptasa inversa (TR), la

proteasa y la integrasa. La cápside (CA) se encuentra rodeada por una capa de proteína de matriz (MA). Además, el virión presenta una envoltura externa compuesta por una bicapa de lípidos que contiene la proteína transmembranal (TM) y la proteína de superficie (SU) (Figura 1) (Peturson *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1999).

El genoma consiste en una cadena de ARN con dos subunidades y contiene tres genes estructurales y cada uno codifica para dos o más proteínas (ver tabla 2).

Figura 1: Estructura viral y mapa genómico.



Estructura viral y mapa genómico. Modificado de ICTV, 2011 y adaptado de Ramírez, 2010. Se observa la estructura viral y los diversos componentes del genoma.

1. El gen *gag* (Antígeno Específico de Grupo) codifica 3 proteínas: La proteína de cápside (CA, p25), la proteína de Nucleocápside (NC, p14) y la proteína de matriz (MA, p17), que estimulan una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección (ICTV, 2011).

2. El gen *pol* (Polimerasa) codifica la transcriptasa reversa (TR, p66-70), la enzima dUTPasa, la Integrasa (IN, p32), esta última facilita la integración del provirus en el genoma de la célula y la proteasa (PR, p12), que es esencial para la infectividad y maduración (Daltabuit *et al* 2003).

3. El gen *env* (Envoltura) codifica las glicoproteínas de la transmembrana (TM, gp44) y la proteína de superficie (SU, gp135) y contiene los epítomos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes y que además sirven para la interacción del virus con el receptor de la célula hospedadora (ICTV 2011).

Presentan tres genes accesorios que son:

1. *vif* (factor de infectividad viral): se requiere para una eficiente replicación y patogenicidad del virus *in vivo*. (Harmache *et al.*, 1995)

2. *vpr*: previene la terminación prematura de la transcripción. (Villet, 2003)

3. *rev* (Regulador de la expresión de proteínas del Virión): se considera esencial para una eficiente replicación viral en cultivo celular (Saltarelli *et al.*, 1990).

La existencia de una gran variabilidad genética en los LVPR ha dado como resultado un gran número de estudios que describen las relaciones filogenéticas entre secuencias procedentes de varios países (Zanoni, 1998). La clasificación en genotipos y subtipos virales propuesta por (Shah *et al.*, 2004) es la más aceptada en la literatura científica reciente. De acuerdo con dicha clasificación basada en dos regiones genéticas de los LVPR (genes *gag-pol*, de 1.8 kilobases (kb) y gen *pol*, de 1.2 kb). Los LVPR se clasifican en 5 genotipos (A-E), que difieren de un 25% a un 37% entre sus secuencias nucleotídicas. Las secuencias nucleotídicas de los grupos A, B y E se distribuyen en diferentes subtipos, que se diferencian entre sí en 15 a 27% de su secuencia.

En el genotipo A hasta ahora se han identificado al menos 15 subtipos, de A1 - A15, en el genotipo B se han reconocido 3 subtipos B1 - B3 y en el genotipo E se han reconocido dos subtipos E1 y E2.

Los genotipos B, C y D, así como sólo 9 de los 15 subtipos del genotipo A (A1, A3, A4, A5, A6, A9, A11, A12 y A13) infectan tanto ovinos como caprinos. Los demás subgrupos y grupos genéticos se han descrito solamente en infecciones de una de estas especies de rumiantes: A2 y A15 en ovinos; y A7, A8, A10, A14, E1 y E2 en caprinos. Sin

embargo, conforme se genera más información de secuencias genéticas de virus de otros países, se reducen las restricciones.

Esta heterogeneidad antigénica de los LVPR complica aún más la situación de campo. Actualmente las pruebas de diagnóstico serológico como ELISA están basadas en la utilización de virus completo, antígenos recombinantes y sintéticos (de Andrés *et al.*, 2005). Estas pruebas se emplean normalmente en ambas especies debido a una reacción cruzada descrita en epítomos de todas las proteínas estructurales (Ramírez *et al.*, 2010).

Sin embargo, la variabilidad antigénica antes mencionada no ha sido aún tomada en cuenta. En un estudio realizado con dos aislamientos de lentivirus de campo en ovinos caracterizados genéticamente como tipo VMV-like (aislamiento-561) y VAEC (It-Pi1), estos genotipos pertenecen a los subtipos A3 y B2, respectivamente. Con el fin de evaluar si las diferencias antigénicas entre estos virus aislados podrían representar un inconveniente en el diagnóstico, dos grupos de ovejas se infectaron experimentalmente con dichas cepas y la seroconversión se detectó usando una proteína homóloga y heteróloga recombinante de las proteínas de matriz /cápside como antígenos utilizando una prueba de ELISA disponible comercialmente. Dicho estudio pone de manifiesto la heterogeneidad antigénica de los LVPR (Lacerenza *et al.*, 2006).

1|.3. Ciclo de replicación viral.

El virus entra en la célula hospedera infectando monocitos/macrófagos y células tipo fibroblásticas principalmente (Zinck *et al.*, 1982; Gorrell *et al.*, 1992; Lechat *et al.*, 2005; Hermann *et al.*, 2010). Por los mecanismos de fusión o endocitosis mediados por los receptores glicoproteicos de la envoltura viral (gp135, SU), que se unen a los receptores específicos presentes en la superficie de la célula hospedera (Mselli-Lakhel *et al.*, 2000). El momento en que el virus penetra en el citoplasma de la célula, se libera de su envoltura, comienza la retro transcripción del ARN viral a una doble cadena de ADN que permanece dentro de la nucleocápside (Saltarelli *et al.*, 1990). Al finalizar la síntesis de la doble cadena de ADN, éste es transportado por las proteínas de la nucleocápside al núcleo de la célula.

Este ADN lineal es integrado en el ADN del hospedero con ayuda de la integrasa viral. Una vez integrado en monocitos la replicación del virus no comenzará hasta que los monocitos

maduren a macrófagos (Narayan *et al.*, 1993). En la fase denominada expresión se generan el ARN genómico y el ARNm necesarios para la síntesis del ARN viral y de las proteínas virales (Cann, 1997). El precursor de la proteína *env* entra a la cisterna del retículo endoplásmico durante la síntesis y es llevada al complejo de Golgi donde es glicosilada tras lo cual es transportada a la membrana plasmática. El precursor de las proteínas Gag y Pol se sintetiza en los poli ribosomas libres del citoplasma celular, sigue la misma ruta glicosilandose, alcanzando la membrana plasmática. Junto con el ARN viral, los precursores de Gag, Pol y Env comienzan el ensamblaje de la nucleocápside en la parte interna de la membrana plasmática. Posteriormente se da la gemación con la unión de la nucleocápside a proteínas Env ya fijadas como peplómeros en la membrana plasmática; los precursores proteínicos son lisados post-transcripcionalmente por una proteasa viral obteniendo así proteínas virales maduras (Murphy *et al.*, 1999).

1.4. Implicaciones de la replicación viral en la variabilidad de los LVPR.

La replicación de los retrovirus se acompaña por una alta frecuencia de mutaciones. Se estima que en cada ciclo de replicación ocurren alrededor de 3×10^{-5} mutaciones lo cual sugiere que la enzima TR ocasiona errores frecuentes, principalmente en el gen pol. Esta variabilidad no es sólo un instrumento del lentivirus para evadir la respuesta inmune del hospedero y facilitar la persistencia de la infección, sino que también podría estar involucrada en la habilidad de estos virus de cruzar la barrera de especie y de mostrar capacidades patogénicas distintas. Este fenómeno tiene obvias implicaciones para el diseño de las pruebas de diagnóstico, desarrollo de vacunas y drogas para el control de la enfermedad (Murphy *et al.*, 1999; Daltabuit *et al.*, 2006).

1.5. Respuesta inmune.

En los rumiantes no existe una transferencia de anticuerpos a través de la placenta por lo que el recién nacido se encuentra desprovisto de una protección inmunológica, debido a ello se hace indispensable la ingesta de calostro, ya que contiene todas las gamainmunoglobulinas que reconocen de forma específica a diferentes agentes infecciosos externos y pueden prevenir su colonización. El tropismo más importante de los LVPR es para los monocitos / macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, las células de otros tejidos también pueden ser infectadas y actuar como reservorios del virus. Estas células incluyen a las células epiteliales en la glándula mamaria, que son una fuente importante de células blanco y virus libre para la transmisión de LVPR de las madres a sus crías. Otras células que se infectan y son importantes en la patogénesis pueden incluir células endoteliales y células de la microglía del sistema nervioso central (SNC), aunque es difícil establecer si la detección del antígeno viral o el ácido nucleico indica una infección (Blacklaws *et al.*, 2007). La infección por retrovirus induce tanto una respuesta humoral como celular. La respuesta humoral induce la producción de anticuerpos específicos como los anti p25 y anti gp46, pero son de baja afinidad y de repuesta tardía (Davey *et al.*, 2000). En animales infectados con LVPR y con signos de la enfermedad presentan anticuerpos de tipo IgG1 (relacionados a una respuesta inmune Th2, humoral) predominantemente como respuesta a los antígenos virales de superficie, mientras que los animales asintomáticos presentan una respuesta de tipo IgG2 (relacionada a una respuesta inmune Th1, celular) (Amorena *et al.*, 2003). Los anticuerpo IgG1 actúan durante la fase preclínica, donde se da la fase inflamatoria involucrando la producción de citocinas, sin embargo, las infecciones retrovirales producen una alteración o desregularización en la producción de citocinas, las cuales están involucradas en la generación, diferenciación y activación de linfocitos T y B que incrementan la producción de inmunoglobulinas anti glicoproteínas de superficie (Amorena *et al.*, 2003), esto puede suprimir la respuesta de los anticuerpos IgG2, lo que sugieren algunos autores, el progreso de enfermedad depende de las respuestas preventivas a la misma, donde las células Th2 juegan un papel importante en la respuesta inmune humoral. Se ha sugerido que una modificación en la proporción de interferón asociado a Th1 y a Th2 puede modificar el progreso de la enfermedad (Amorena *et al.*, 2003, Bertoni *et al.*, 2007). Los linfocitos TCD4+ tienen un papel importante generando estímulos para la

proliferación de LTCD8+ y Linfocitos B, todas las células nucleadas son capaces de presentar péptidos susceptibles a LTCD8+; a nivel de órganos blancos aumentando la concentración de LTCD8+ y disminuyendo la de LTCD4+ (Davey *et al.*, 2000).

La duración de enfermedad es crónica en la mayoría de los casos y se distinguen varias fases. Tras la infección existe un período largo asintomático (período de ventana) en el que la carga viral es baja, seguido de un período sintomático relativamente corto antes de desencadenar la muerte del animal, donde la carga viral es mayor (Amorena *et al.*, 2001).

Tanto el genotipo viral y genético del huésped influyen en la virulencia y la patogenicidad que se observa después de la infección por LVPR (Blacklaws *et al.*, 2007).

1.5.1. Respuesta inmune humoral.

Los anticuerpos presentes en la infección por LVPR son de tipo precipitantes (AcP) y neutralizantes (AcN). Los primeros anticuerpos en aparecer, ya sea por una infección natural o experimental, son los AcP. En estudios experimentales, la detección de estos anticuerpos fue entre 1-8 semanas. Los anticuerpos neutralizantes se detectaron, entre 1 y 5 meses postinfección (De-Boer *et al.*, 1979; Sihvonen, 1981).

La proteína p25 en LVPR siempre es constante y preponderante en estudios con inoculaciones experimentales (Houwens y Nauta, 1989; Ramírez, 2002) (Tabla 2).

La enfermedad en forma crónica, propicia la mutación viral, lo que implica la aparición de variantes antigénicas que no reconocen los Ac iniciales y son por lo tanto ineficaces (Pepin *et al.*, 1998).

Tabla 2. Descripción de proteínas de LVPR descritas por diferentes autores.

Proteínas	Virus	Técnica	Año	Referencia
p15, p28, p40, p130, p25	VAEC	WB	1989	Zanoni y Peterhans 1989
p14, p25, gp135	VAEC	WB	2002	Ramírez, 2002
p25, p51, gp135	VMV	WB	2005	Pérez, 2005

1.5.2. Respuesta inmune celular.

La respuesta producida por el sistema inmune celular se presenta entre 1 y 4 semanas postinfección y disminuye de 4 a 12 semanas después (Griffin *et al.*, 1978).

En infecciones por el VMV se invierte la relación de linfocitos CD4+/CD8+ aumentando el porcentaje de linfocitos T CD8+ que facilitan el control de la carga viral, eliminando células infectadas y produciendo citoquinas inhibitoras. La producción de factores quimiotácticos estimula la migración de linfocitos y neutrófilos a los órganos diana provocando las lesiones características del VMV. Por otro lado, se incrementa la producción de interleucina 8 (IL-8), que se produce en mayor grado por los macrófagos alveolares de animales infectados y que son los responsable de atraer linfocitos y macrófagos al tejido infectado, provocando la alveolitis característica de Maedi Visna. Además, se ha observado que en infecciones por VAEC se incrementa la expresión de interleucina 16 (IL-16) en células de membrana sinovial, fluido sinovial, suero y sobrenadante de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (Daltabuit, 2003).

1.6. Cuadro clínico de LVPR.

Los pequeños rumiantes son infectados de por vida sin presentar signología aparente y la aparición de signos coincide a menudo con infecciones bacterianas secundarias, cambios en la alimentación, estrés fisiológico como la gestación, el parto y la lactación (Sigurdsson *et al.*, 1954; Cutlip *et al.*, 1998).

El diagnóstico clínico es complejo por las características de la infección de los LVPR, ya que tienen un largo periodo de incubación, además de que no todos los animales van a manifestar algún signo clínico o producir anticuerpos, o aun, si generan anticuerpos van a estar aparentemente sanos (Trigo, 1991).

En ovinos la infección por LVPR puede provocar lesiones multisistémicas y las cuatro formas clínicas pueden aparecer de forma individual o mixta (Cutlip *et al.*, 1998). La forma pulmonar (Maedi) es la más común con presencia de neumonía intersticial crónica; La forma nerviosa (Visna) cursa con meningoencefalomielitis y coroiditis no purulenta (Sigurdsson, 1951; Cutlip *et al.*, 1981; Narayan y Cork, 1985), la forma mamaria se presenta como una mastitis intersticial (Martínez *et al.*, 2010). La última manifestación

clínica y menos frecuente es la forma articular que cursa con artritis de carácter crónico no supurativo (Luján *et al.*, 2001). Por otro lado, en caprinos la infección por LVPR tiene como principal signo la artritis, siendo en orden de frecuencia las articulaciones carpianas, seguidas por las metatarsianas y femorotibiorotulianas (Trigo, 1991); posteriormente la mastitis de tipo indurativo (Franco, 2004); la leucoencefalomielitis se presenta en cabritos entre 2 y 4 meses de edad (Trigo, 1999) y de menos importancia, ocasionalmente se encuentra la bronconeumonía intersticial (Travassos *et al.*, 1999) (Tabla 3).

Tabla 3. Proceso clínico.

Caprinos	Ovinos
Emaciación +/-	Emaciación +++++
Más dependiente de la edad	Independiente de la edad
Fase articular en adultos	Menos frecuente
Forma nerviosa cabritos	Forma nerviosa adultos
Mastitis indurativa esporádica	Más frecuente
Forma respiratoria esporádica	Forma respiratoria común

1.6.1. Forma pulmonar.

La forma respiratoria tiene un período de incubación prolongado en ovinos y en caprinos puede durar de meses a varios años, siendo los tres a cuatro años de vida la edad en la que más frecuentemente aparece (Dawson *et al.*, 1980; Cutlip *et al.*, 1998).

El primer signo que se aprecia en ambas especies es una pérdida progresiva de peso que puede conducir finalmente a la caquexia sin que se observe anorexia. El signo más característico es la disnea, con aumento en la frecuencia respiratoria, respiración abdominal, extensión del cuello, dilatación de ollares y jadeo. A consecuencia de la insuficiencia respiratoria, se desarrolla intolerancia al ejercicio que provoca el retraso en la marcha (Luján *et al.*, 2001). En ocasiones, probablemente a causa de infecciones secundarias, se ha descrito la existencia de tos seca con poca o nula descarga nasal (Dawson, 1980; Watt *et al.*, 1990; Luján, 1991). Los animales sólo presentan fiebre si hay infecciones secundarias (Narayan y Cork, 1985). A medida que la enfermedad evoluciona,

permanecen cada vez más tiempo postrados hasta morir a causa de la insuficiencia respiratoria (Dawson, 1980; Luján, 1991).

1.6.2. Forma nerviosa.

Los ovinos y caprinos de menos de 4 meses de vida presentan retraso en la marcha e incapacidad para seguir al rebaño a causa de incoordinación en el movimiento. Esta inestabilidad provoca caídas múltiples, agravándose hasta producir parálisis de las extremidades posteriores y con el tiempo, incluso las anteriores, culminando con la postración del animal. El animal se encuentra alerta, responde ante estímulos externos y no presenta fiebre ni disminuye su consumo de alimento (Dawson, 1980; Narayan y Cork 1985).

1.6.3. Forma mamaria.

En ambas especies si el proceso es únicamente mamario el curso clínico es prolongado ya que no suele causar la muerte del animal (Luján *et al.*, 2001). Algunos autores señalan que la glándula mamaria es más susceptible a la infección por el virus que otros órganos (Smith, 1992).

El signo clínico más evidente es la presencia de una mastitis indurativa difusa, bilateral, crónica, no dolorosa que se acompaña de un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos retromamarios (Luján, 1991). Las lesiones provocan una disminución en la producción de leche (Van der Molen *et al.*, 1985) que puede evolucionar hasta agalaxia (Luján, 1991). Macroscópicamente se observa aumento de tamaño y consistencia en la glándula mamaria. La superficie de corte presenta un aspecto húmedo, liso y con pérdida del aspecto glandular (Van der Molen *et al.*, 1985).

1.6.4. Forma articular.

La manifestación clínica más evidente en caprinos es la cojera y marcha envarada (Oliver *et al.*, 1981; Cutlip *et al.*, 1985; Narayan y Cork, 1985; Luján *et al.*, 2001). A nivel macroscópico las articulaciones más afectadas son carpo, tarso y bolsa atlantal. En estas localizaciones puede apreciarse engrosamiento y congestión de las membranas sinoviales y de la cápsula articular. El cartílago articular puede presentar erosiones en los casos avanzados. La cantidad de líquido sinovial está aumentada, en ocasiones con fibrina. Los tejidos periarticulares pueden verse afectados con fibrosis, hemorragias petequiales, especialmente en tendones, destrucción del hueso articular y mineralización (Cutlip *et al.*, 1985; Georgsson, 1989).

Esta manifestación aparece en un 12% a 40% de cabras infectadas en el resto nunca muestran signos clínicos; el VAEC muestra una infección persistente por lo que las cabras clínicamente normales son una fuente continua de infección. Por lo tanto, se considera necesaria la detección serológica de la infección en cabras, estableciendo programas de erradicación (Knowles *et al.*, 1993; Zink y Johnson, 1994).

El éxito en el control de la propagación de la infección de LVPR depende no sólo de la detección temprana y la eliminación de los animales infectados del rebaño, sino también de la utilización de pruebas de diagnóstico adecuadas (Ramírez *et al.*, 2011).

1.7. Diagnóstico de laboratorio.

Para el diagnóstico de los LVPR se han descrito diversas metodologías, por ejemplo el uso de métodos que identifican al agente causal como la microscopía electrónica y el aislamiento viral utilizando cultivo celular. Otros como las pruebas serológicas que incluyen a la inmunodifusión en agar gel (IDAG), inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoprecipitación (RIPA) y Western blot (WB). Las metodologías que identifican ácidos nucleicos se pueden utilizar para el diagnóstico, como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Souther blotting (SB), e hibridación *in situ* (Cunha *et al.*, 2001; OIE, 2004; de la Concha-Bermejillo, 2005; de Andrés *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2005; Daltabuit, 2006; Vega, 2006; Brinkhof *et al.*, 2010). Otra prueba de laboratorio que pueden

utilizarse en el diagnóstico de LVPR es la detección de la transcriptasa inversa (Tabla 4) (Pérez, 2005).

1.7.1. Diagnóstico serológico.

Es el método más comúnmente utilizado para el diagnóstico de los LVPR en el laboratorio, utilizando técnicas que detectan epítopes comunes para los lentivirus en el suero de animales infectados, dicho diagnóstico tiene varios objetivos, algunos de ellos son diagnóstico "*per se*" de animales que se sospecha que pueden estar infectados, la aplicación en programas de vigilancia serológica (estudios de incidencia y prevalencia, tendencias en razas, función zootécnica etc.) o en programas de investigación clínica, farmacológica, virológica e inmunológica (Ortiz de Lejarazu *et al.*, 1998, De Andrés *et al.*, 2005).

Tabla 4. Pruebas de diagnóstico de laboratorio utilizadas para LVPR.

Prueba	Determinación
Microscopía electrónica	Morfología e identificación viral
Examen de líquido sinovial	Detección de linfocitos y monocitos
Radioinmunoensayo	Detección de antígenos gp135 y p25 utilizando anticuerpos marcados con Iodo
Transcriptasa inversa	Detección de la actividad de la transcriptasa inversa
Hibridación in situ	Detección de ARN o ADN viral por medio de una sonda marcada
Inmunoperoxidasa	Detección de antígeno viral en cultivo celular y o tejidos
Cultivo celular	Detección del virus por efecto citopático, inmunofluorescencia, microscopía electrónica y transcriptasa inversa.

Ref: Stites y Hugh, 1983 ; Coll, 1993; Storset *et al.*, 1996; Pepin *et al.*, 1998; Sanna *et al.*, 1999 y Bruett *et al.*, 2000.

La serología es una herramienta valiosa para determinar el estado de salud de un rebaño, si bien puede ser algo costosa si se realiza al nivel individual. Por ello, surgen nuevas estrategias para la detección de anticuerpos en el rebaño, como el uso de muestras de leche de tanque, detección de anticuerpos a partir de semen y el uso de muestras mezclando las de varios individuos N=5 ("pooling"), procedimientos que en las condiciones adecuadas no parecen disminuir la sensibilidad y especificidad de las pruebas

(Travassos *et al.*, 1999; Ali Al Ahmad *et al.*, 2007; Brinkhof *et al.*, 2008, Peterson *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2009).

Recientemente se ha propuesto que para la reducción de costos de las pruebas diagnósticas, los sueros de cada animal deben ser probados en grupos conformados hasta por sueros de 8 animales, siendo lo óptimo 5. Posteriormente, los grupos positivos se pueden corroborar y comprobar uno por uno, con la ayuda de una prueba complementaria (Tabla 5) (Brinkhof *et al.*, 2007).

Tabla 5. Número de muestras para el diagnóstico de hatos.

Animales	No. Muestras	No. Animales	No. Muestras	Animales	No. Muestras
1-55	Todos	121-140	90	401-500	130
56-60	55	141-160	95	501-700	135
61-65	60	161-180	100	701-900	140
66-70	65	181-200	105	901-1000	145
71-80	70	201-250	110	+ 1000	150
81-90	75	251-300	115		
91-100	80	301-350	120		
101-120	85	351-400	125		

95% de confianza en detectar 2% de prevalencia. (www.sac.co.uk/sghs)

La prueba de IDAG y más recientemente ELISA son las pruebas internacionalmente descritas para el diagnóstico de LVPR (OIE, 2004).

1.7.1.1. IDAG.

Es una prueba ampliamente aplicada en todo el mundo (Celer *et al.*, 1998). Consiste en detectar anticuerpos precipitantes en un medio de agar empleando antígeno viral soluble.

La reacción Ag-Ac genera una línea blanca opaca de precipitado. Esta prueba es poco sensible ya que para tener una reacción positiva se necesita una concentración mínima de 30 mg/ml. (Tizard, 1996).

1.7.1.2. ELISA.

Suelen ser los más sensibles y específicos (detectan una mínima cantidad de 0.0005 mg/ml de anticuerpos en el suero) (VIH y SIDA, 1998). Se ha descrito que es posible obtener una sensibilidad y una especificidad equivalentes cuando se realiza el diagnóstico de la infección de LVPR utilizando dos ELISA que contengan múltiples antígenos y que se basen en diferentes principios de ensayos como lo que se utiliza en el diagnóstico de VIH (Hidalgo e Higuera, 1997).

Esto se hace de manera rutinaria con pruebas serológicas, como el ensayo ELISA que es el más adecuado para estudios a gran escala en explotaciones con un gran número de animales. Para este propósito se han desarrollado diferentes pruebas, la mayoría basadas en antígenos derivados de una sola cepa viral. La especificidad de estos ensayos es generalmente alta, pero la sensibilidad muestra una gran variabilidad debido a la heterogeneidad antigénica de LVPR (Herrmann-Hoesing 2010), que refleja la alta variabilidad genética de este grupo de virus. Los genotipos A y B son los más comunes y ampliamente distribuidos: el genotipo A, que incluye aislamientos de VMV, es muy heterogénea, con 11 subtipos que infectan a los ovinos y caprinos; el genotipo B, que incluye aislamientos de VAEC, se han reconocido tres subtipos descritos hasta ahora (Bertolotti *et al.*, 2011).

1.7.1.2.1. ELISA de primera generación.

También llamados ELISAs de virus completo, el cual es obtenido a partir de los sobrenadantes de cultivos virales altamente purificados, y en los que los conjugados son sueros policlonales (Houwers *et al.*, 1982). Como consecuencia de la presencia de proteínas celulares co-purificadas con las virales, frecuentemente se producían reacciones inespecíficas (Juste *et al.*, 2001). Un ELISA comercial de origen Suizo que tiene este formato es el Chekit de IDEXX.

1.7.1.2.2. ELISA de segunda generación.

Basada en la utilización de anticuerpos monoclonales y antígenos de gran pureza. Esto es posible por técnicas de recombinación de ADN en cultivos bacterianos de *E. coli*, mediante la cual es fácil la obtención de grandes cantidades de antígeno viral altamente purificado. Entre dichas proteínas se encuentran la p14, p16 y p25, y la gp 135 permitiendo una detección más fiel de la infección, ya que en un principio la respuesta inmune se dirige frente a la proteína p25, mientras que en los estadios más avanzados de la enfermedad la respuesta es predominantemente hacia las proteínas transmembranales (Houwens y Nauta 1989).

1.7.1.2.3. ELISA de tercera generación.

Basada en oligopéptidos sintéticos con mayor pureza estructural. Estos oligopéptidos derivados de la envoltura viral forman parte de epítomos inmunodominantes y mejoran considerablemente la especificidad de la prueba, pero reducen su sensibilidad por lo que se asocian a proteínas recombinantes del núcleo viral para mejorar sus resultados. (Saman *et al.*, 1999). La prueba comercial de Elitest de HYPHEN y ELISA Maedi-Visna/CAEV de Pourquier son ejemplos de este tipo de ELISAs.

Actualmente hay ELISAs disponibles de forma comercial en los que se utilizan otros diseños, como el ELISA competitivo (cELISA VAEC de VMRD Inc.), el cual se basa en la competición entre los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos específicos (gp135) y los anticuerpos presentes en un suero problema (Tabla 6) (Harmache *et al.*, 1995; Martínez, 2010).

Tabla 6. Pruebas de diagnóstico comerciales para LVPR.

Prueba comercial	Tipo de prueba	Antígenos
Pourquier	AGID	p28
Veterinary Laboratorios Agency	AGID	gp135 de virus tipo MV
Veterinary Diagnostic Technology	Caprine Arthritis- encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Virus antibody test kit (AGID)	Detecta anticuerpos contra proteínas de la cápside y glicoproteínas
IDEXX	IDEXX CAEV/MVV Antibody ELISA test	No especificado por la casa comercial
IDEXX	IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Screening Test	Péptido de una proteína transmembranal (TM gen <i>env</i>) y de la proteína recombinante p28 que es componente de la cápside viral (gen <i>gag</i>)
IDEXX	IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Verification Test	Péptido inmunogénico de una proteína transmembranal (TM gen <i>env</i>) y de la proteína recombinante p28
ELITEST	ELISA MVV/CAEV	Péptido sintético y una proteína recombinante derivada de la envoltura y de GAG
VMRD. Inc	Caprine Arthritis- Encephalitis Virus Antibody Test Kit cELISA	Contiene anticuerpos monoclonales contra la gp135. ELISA tipo competitiva.

1.7.1.2.3.1. Fundamento de la prueba de ELISAc.

El antígeno (gp135) se encuentra adherido en la superficie interna de los pozos de la placa. La ausencia de anticuerpos contra el antígeno en el pozo no inhibe la unión del antígeno a anticuerpos monoclonales ligados a peróxidasa de rábano (conjugado); la adición del sustrato en estas condiciones producirá un cambio de coloración en la muestra, considerándose como inhibición de la reacción baja o nula. En cambio, en presencia de un suero positivo (anticuerpos contra el antígeno) si inhibe la unión entre el antígeno y el conjugado, por lo que el sustrato no podrá unirse al conjugado lo que resultara en la ausencia de coloración, considerándose como una inhibición de la reacción alta. La cantidad de anticuerpos contra el antígeno que contenga la muestra dará una variedad en la coloración de las muestras evaluadas, por lo que la lectura de la placa (densidad óptica) debe realizarse con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 630nm para obtener el porcentaje de inhibición de la reacción (Franco, 2008).

1.7.1.3. Inmunotransferencia o Western blot (WB).

El WB consiste en someter al antígeno a una interacción específica con anticuerpos marcados directa o indirectamente. Tras separar las proteínas del antígeno mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas se transfieren a una hoja de nitrocelulosa, los lugares de unión no específicos se bloquean, las tiras se incuban con anticuerpo primario y se añaden anticuerpos anti-anticuerpos con peróxidasa (conjugado) (Amorena *et al.*, 1997). Una muestra se considera positiva si se detectan al menos dos proteínas virales diferentes (Brodie *et al.*, 1992; Murphy, 1999; Daltaubuit, 2006). Diversos autores han considerado al WB como la “prueba de oro o referencia” para los ensayos de anticuerpos a LVPR (de Andrés *et al.*, 2005).

La identificación de LVPR requiere de pruebas más sofisticadas que no son utilizadas rutinariamente por la mayoría de laboratorios como métodos de diagnóstico. El WB, debido a su complejidad y costo solo se utiliza como prueba confirmatoria (Ramírez, 2010).

1.7.2. Microscopía electrónica.

En la identificación de la estructura viral, la microscopía de transmisión de electrones es la técnica de elección, al realizar estudios en cultivos celulares infectados así como en tejidos animales infectados con LVPR, se puede observar en el microscopio electrónico la presencia de la estructura viral, la cual ronda entre 90 y 100nm de diámetro (Can, 1997).

1.7.3. Hibridación *in situ*.

La hibridación *in situ* es una técnica utilizada para la detección de ADN o ARN viral en células infectadas, o para estudiar la expresión de una proteína en una célula, utilizando secuencias complementarias (sondas) de ADN para detectar la molécula de interés con una sustancia radioactiva (Amorena *et al.*, 1997). La sonda es incubada con la célula para luego ser detectada y visualizada por microscopía. La hibridación *in situ*, tiene buena sensibilidad y especificidad. En las últimas décadas se ha utilizado esta técnica en el diagnóstico de los LVPR (Sanna *et al.*, 1999).

1.7.4. Cultivo celular.

El cultivo celular para LVPR se ha llevado a cabo en cultivos primarios en los que se añaden células (co-cultivos) de la línea monocito/macrófago obtenidos de la sangre periférica de animales sospechosos, o también de los lavados bronquiales o macerados de tejidos; y si hay infección, las células muestran efecto citopático tras 2 a 3 semanas de incubación. El efecto citopático consiste en la formación de células gigantes (sincitios), aunque en algunos casos puede no observarse si la cepa viral no induce este efecto, o bien, por que el virus permanece latente (Sihvonen *et al.*, 1980; Ellis, 1990). Los cultivos celulares más utilizados son la membrana sinovial de cabras y fibroblastos de plexo coroidal de corderos o fetos ovinos. Otro tipo de células que se han utilizado son las de córnea de cordero (Trigo, 1991; Juste *et al.*, 1998). Aunque el aislamiento del virus permite dar el diagnóstico definitivo, este procedimiento es caro y necesita de un periodo largo para su realización (Sihvonen *et al.*, 1980).

1.7.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR al inicio, se consideró que sería exitosa para el diagnóstico de LVPR, gracias a su capacidad para detectar directamente el ADN proviral, en la célula infectada o generando ADN del ARN de las partículas virales por transcripción reversa (Leroux *et al.*, 1997). Sin embargo, la eficiencia va a depender de la especificidad de los cebadores diseñados y por consecuencia de una adecuada elección de la región viral a amplificar, además, del nivel de detección de moléculas de ADN viral que es lo que determina la sensibilidad de la prueba (Ramírez, 2010).

En un estudio realizado en Grecia, se demostró que la utilización de una técnica de PCR más una prueba de ELISA resulta en un mayor número de animales identificados como positivos dentro de una explotación, lo cual es algo recomendable en las explotaciones de pequeños rumiantes para un mejor diagnóstico. Usando una combinación de ELISA y PCR encontraron un total de 72.2 % de ovejas y el 28.8 % de cabras positivas para LVPR (Karanikolaou *et al.*, 2005).

En la actualidad se exige una atención prioritaria a las acciones preventivas y de control de enfermedades. Para ello es necesario contar con instrumentos eficaces para el diagnóstico, de modo que sea posible prevenir la entrada de animales infectados en países, zonas o rebaños libres, o bien poner en marcha planes de control y erradicación (Corrales *et al.*, 2003).

1.8. Diagnóstico diferencial

Algunas enfermedades con las que hay que realizar un diagnóstico diferencial son: artritis traumática, artritis infecciosa causada por bacterias, en algunos casos con paresia progresiva, ataxia enzoótica, nematodiasis cerebroespinal, traumatismos o abscesos en la médula espinal, anomalías congénitas de la médula espinal. Con síntomas característicos de infección nerviosa, debe incluirse la polioencefalomalacia, listeriosis y rabia. La forma pulmonar en cabras adultas puede asemejarse a la forma pulmonar de linfadenitis caseosa. (Bath y Wet, 2000).

En ovinos, las formas clínicas más frecuentemente encontradas han sido hasta hace pocos años la mamaria, la pulmonar o ambas, esta última relacionada con la afección conocida como Maedi. Más recientemente se han descrito dos brotes con formas clínicas diferentes de la enfermedad. Una de ellas, afectando a un elevado número de ovinos que presentaron la forma nerviosa o Visna (Benavides *et al.*, 2006) poco frecuente en Europa y que de forma esporádica se ha detectado en ovinos jóvenes infectados por LVPR. El segundo brote, se restringió a animales de raza Aragonesa (Luján *et al.*, 2001) con una afección articular que es más frecuente en ganado caprino.

1.9. Formas de transmisión de LVPR.

Los ovinos y caprinos se infectan fundamentalmente después del nacimiento por consumo de calostro y leche de madres infectadas y por contacto horizontal con animales infectados que excretan virus en sus secreciones pulmonares (Berriatua *et al.*, 2003), a través de fómites y máquinas de ordeño (Crawford y Adams 1981; Lerondelle *et al.*, 1999).

1.9.1. Transmisión aerógena.

LVPR infectan principalmente monocitos y se replican en macrófagos pulmonares. Houwers *et al* 1990 sugieren que este órgano es una fuente de gran cantidad de virus libre e integrado. La transmisión horizontal se relaciona fuertemente con el sistema de producción ovino, el clima y la mala ventilación (Houwers, 1990).

1.9.2. Transmisión lactógena.

De Boer *et al* en 1979 aislaron lentivirus ovinos a partir de leche de hembras seropositivas, dos a tres meses después de la lactancia y detectaron anticuerpos específicos en los corderos que fueron amamantados con leche infectada, así mismo, otros autores han demostrado también la presencia de LVPR en calostro y leche y la posibilidad de infectar corderos y cabritos tras la ingestión de calostro (Schipper *et al.*, 1983; Lerondelle *et al.*, 1995).

Generalmente la infección se atribuye a macrófagos infectados presentes en calostro y leche, sin embargo, se ha identificado virus en la glándula mamaria, en especial en cultivos de células epiteliales mamarias de cabras infectadas, detectando la presencia de proteínas *gag* y *env* en los sobrenadantes, lo que sugiere que las células producen partículas virales de forma activa (Mselli-Lakhal *et al.*, 1999).

1.9.3. Transmisión intrauterina.

La opinión generalizada es que la transmisión congénita del VMV es muy poco frecuente; Brodie *et al.*, 1994 amplificaron VMV mediante PCR en 10% de fetos de madres de un rebaño infectado, los autores sugieren que un título viral alto en la madre puede llegar a ser un factor importante en la transmisión uterina. Tejidos del aparato reproductor de hembras se han identificado como susceptibles a la infección por VAEC como lo describió Lamara *et al.*, 2002 en donde mencionan la replicación *in vitro* del VAEC en células de la granulosa y del oviducto de cabra.

1.9.4. Transmisión sexual.

Se ha detectado la presencia de antígenos virales en las células epiteliales del aparato reproductor de machos caprino, mediante la técnica de Inmunohistoquímica, ELISA y PCR (Martínez, 2003; Ali Al Ahmad *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2009; Travassos *et al.*, 1998; 1999; Ramírez *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha descrito la presencia de LVPR en células epiteliales de glándulas accesorias, líquido seminal y tejidos del tracto genital en sementales ovinos y caprinos, lo que sugiere la posibilidad de transmisión venérea, ya sea de forma natural o por inseminación artificial. Estudios realizados demuestran además de la presencia de provirus en el eyaculado macrófagos y monocitos infectados en sangre (Peterson *et al.*, 2008). Recientemente, se ha sugerido de manera preliminar que el uso de semen PCR-negativo en inseminación artificial procedente de animales seropositivos no representa un riesgo de infección real ni para las hembras ni para la descendencia. El riesgo de transmisión de LVPR por transferencia de embriones se considera poco relevante o por vía intrauterina se estima que es muy limitada (Travassos *et al.*, 1998-1999; Ali Al Ahmad

et al., 2007; Peterson *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2009). Cabe mencionar que en Brasil, De Souza realizó un trabajo con la finalidad de evaluar la capacidad de transmisión del virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) a través de la inseminación artificial (IA), y para evaluar la influencia de la carga viral en esta probable transmisión. También se pretendía comprobar si el proceso inflamatorio, causado por el uso de esponjas intravaginales, facilitaría la entrada del virus en el tracto reproductivo femenino. Para este fin, se utilizaron 30 cabras de raza no definidas, todas serológicamente negativas para VAEC. Un macho Anglo-Nubia, también seronegativo, se utilizó para inseminación artificial de hembras en este estudio. El semen fue contaminado con la Cepa VAEC-Cork, con dos títulos infecciosos distintos encontrando hembras positivas post inseminación (De Souza *et al.*, 2013). Por lo tanto es importante retomar la investigación enfocada a los sementales como diseminadores de los LVPR.

1.10. Medidas de prevención y control.

Hasta la fecha, no hay tratamientos comerciales eficaces contra los retrovirus animales y los programas de control de LVPR van dirigidos a la erradicación del agente infeccioso (Houwens *et al.*, 1990; Luján-Badiola 2001).

Los islandeses demostraron que es posible la erradicación de LVPR mediante el sacrificio de rebaños completos afectados por la enfermedad, seguido de un periodo de vaciado sanitario y reemplazo con animales de otros rebaños libres de infección (Palsson *et al.*, 1978; Houwers *et al.*, 1990; Luján-Badiola *et al.*, 2001).

Además, se han descrito varios métodos eficaces para eliminar LVPR de rebaños infectados; la elección de estos métodos depende de la prevalencia de la infección, del valor genético de los animales del rebaño y de los costos que sea posible asumir (Tabla 7) (Houwens, 1990; Peterhans *et al.*, 2004).

Las medidas de control de la infección por LVPR son necesarias para disminuir la prevalencia y alcanzar un estatus de “libre de LVPR” en los rebaños. Los rebaños así certificados obtienen un triple beneficio, evitan pérdidas económicas asociadas a la infección por LVPR, presentan un valor añadido en la venta para programas de reposición y evitan propagar la infección en el comercio local e internacional. Por todo ello, se han propuesto distintas estrategias de control para eliminar los LVPR de los rebaños infectados

así limitar las pérdidas económicas por la infección (Tabla 7) (Martínez *et al.*, 2003; Reina 2009; Ramírez *et al.*, 2010).

Tabla 7. Medidas de prevención y control.

-
- 1.- Realizar un diagnóstico oportuno y hacer el seguimiento serológico cada 6 meses.
 - 2.- Separar al rebaño en dos grupos (seropositivos-seronegativos). Aislamiento de la reposición seronegativa.
 - 3.- Reemplazo total o eliminación gradual de animales reemplazando a los seropositivos, con animales libres de LVPR o sacrificio de los seropositivos.
 - 4.- Aislamiento de los recién nacidos.
 - 5.- Encalostamiento seguro (calostro artificial, calostro de bovino, calostro congelado procedente de cabras seronegativas; el tratamiento térmico a 56°C durante 60 min. disminuye la presencia de VAEC hasta niveles inferiores(Adams *et al.*, 1983).
 - 6.- Utilización de machos seronegativos para realizar las montas.
 - 7.- Ordeñar primero a las cabras seronegativas y posteriormente a las seropositivas.
 - 8.- Utilizar semen seronegativo a LVPR.
-

Estas medidas son altamente recomendables, para controlar y/o erradicar la enfermedad (Contreras y Corrales 2003, Reina 2008).

En los rebaños donde existe la infección, la mejor recomendación es eliminar a los animales infectados gradualmente e iniciar un rebaño libre a LVPR.

Con el fin de controlar la diseminación de la enfermedad en las granjas es necesario una serie de medidas en hembras, machos y recién nacidos; como son un manejo adecuado del calostro, eliminación de animales positivos, manejos de secreciones y manejo de las ordeñadoras (Rowe y East, 1997).

Desde el desarrollo de las pruebas serológicas para la detección de LVPR, estas infecciones se pueden controlar por medio de la identificación y eliminación de animales infectados. Debido a que en la mayoría de los casos transcurre un tiempo entre la infección y la seroconversión, por lo que es necesario hacer las pruebas cada seis meses, o anuales (de la Concha-Bermejillo, 1999).

En la actualidad no existe una vacuna eficaz para LVPR por varias razones: a) los mecanismos de inmunidad frente al virus no están bien definidos, b) la selección e

dentificación de los antígenos protectores se encuentran en vías de estudio, c) la ruta y el vehículo de vacunación óptimo, y el adyuvante idóneo no se han establecido y d) la variación genética y antigénica del virus es elevada (Shah *et al.*, 2004; Amorena *et al.*, 2008).

Las vacunas experimentales están basadas en virus completo, virus atenuados y vacunas de subunidades en diversas formas (proteínas, plásmidos de expresión, virus recombinantes) y acompañadas con una variedad de moléculas co-estimuladoras. Son muchos los factores que impiden que una vacuna sea adecuada hasta el momento como el hecho de que la infección es a través de una superficie mucosa, por lo que sería necesario inducir y mantener altos niveles de anticuerpos específicos de virus y células T en la mucosa, lo que aún es difícil; en segundo lugar, hay infección restringida y latente de las células diana y es por ello que es difícil para el sistema inmune reconocer y eliminar las células infectadas; en tercer lugar, la estructura *env*, su patrón de glicosilación y el cambio en su conformación al unirse a la superficie celular, hace que no se induzca anticuerpos neutralizantes ampliamente eficaces; en cuarto lugar, los anticuerpos después de la vacunación pueden disminuir el umbral de infección y aumentar los cambios patológicos; en quinto lugar, los virus son capaces de mutar resultando en múltiples variantes que circulan dentro de la población principal en el huésped y por lo tanto, genera dificultades para proporcionar inmunidad heteróloga contra todas las cepas y en sexto lugar, la presencia de una respuesta inmune activa puede conducir a la mutación y la selección de nuevas variantes que pueden ser más patógenas. Finalmente, la presencia de una respuesta inmune preexistente puede disminuir el umbral para la infección de un huésped vacunado, así como acelerar el desarrollo de la patología (Blacklaws *et al.*, 2012).

2. Justificación.

Debido a la importancia reproductiva y productiva que tienen los machos dentro de un rebaño de pequeños rumiantes, es de gran importancia establecer el estado serológico de estos, con la finalidad de disminuir la posible transmisión de enfermedades de tipo sexual y de forma particular disminuir el riesgo de infección por LVPR. Un semental se utiliza para servir al menos 20 hembras, ya sea por monta directa y/o por inseminación artificial, esta última podría incrementar el número de hembras servidas. Si tomamos en cuenta que las hembras infectadas transmiten la enfermedad de forma directa a las crías a través del calostro y leche y que dichas hembras deben ser eliminadas del hato, las pérdidas económicas por la transmisión de LVPR de machos a hembras puede ser considerable (Novelo *et al* 2001).

3. Objetivo general.

Detectar anticuerpos a Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) en sementales (caprinos y ovinos) de diferentes regiones del país, mediante la prueba comercial de ELISA competitiva.

3.1.Objetivos particulares.

- a) Obtener sueros de machos caprinos y ovinos de los estados de Coahuila, Estado de México, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Oaxaca y Puebla.
- b) Identificar animales infectados de diferentes explotaciones, utilizando una prueba comercial basada en un ELISA competitiva.
- c) Generar información de la seroprevalencia de LVPR en machos de algunas zonas del país.

4. Hipótesis.

Debido al intercambio de animales infectados entre los rebaños es posible encontrar seropositivos en cada una de las regiones.

5. Materiales y Métodos

5.1. Animales de estudio.

Se obtuvieron 675 muestras de sangre por venipunción de la vena yugular en tubos sin anticoagulante de machos de pequeños rumiantes provenientes de los estados de Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Coahuila, Oaxaca y Estado de México. Las edades de los animales muestreado van de menos de un año hasta animales mayores de 4 años. Dichas muestras correspondieron de un total de 488 caprinos y de 187 ovinos (tabla 8). Las razas de caprinos de las que se tiene información fueron *Saanen*, *Murciana Granadina*, *Toggenburg*, *Alpino francesa* y *Nubia*. Por otro lado las razas de ovinos fueron *Kathadin*, *Suffolk*, *Charolais*, *Dorset*, *Dorper*, *Romanov*, *Pelibuey*, *Dorper-Texel*, *Hampshire* y *Suffolk-Romanov*, en ambas especies hay muestras sin determinar la raza. La sangre fue centrifugada a 2500 rpm durante 15 minutos y el suero (sobrenadante) se recolectó y conservó en viales estériles en congelación a -20° hasta su uso.

5.2.Preparación de pools de sueros.

Para el presente trabajo se utilizó la metodología sugerida por Brinkhof *et al.*, 2007 modificada, que consiste en realizar pools con el suero de 5 animales, a razón de 20µl de cada uno, para llegar a un volumen total de 100µl. Para posteriormente evaluar los grupos seropositivos en forma individual.

5.2.1. Desarrollo de la prueba de ELISA competitiva (ELISAc).

Para el presente trabajo se utilizó una prueba comercial de ELISA competitiva para la detección en anticuerpos específicos contra LVPR. *VMRD, Inc. Caprine Arthritis Encephalitis Virus Antibody test kit, cELISA*, basada en la detección de anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína 135 de LVPR.

El procedimiento se inició agregando 20 µl de cada suero, de 5 muestras distintas en un tubo eppendorf estéril para llegar a un volumen total de 100 µl. Se colocaron 50 µl de la muestra en pool en cada pozo y de los controles positivo y negativo incluidos en el

sistema, las muestras fueron evaluadas por duplicado para corroborar los resultados. Se realizó la primera incubación de la placa a 25°C durante una hora. Durante este lapso, se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante: a) la solución de lavado diluyendo (para una placa) 18 ml de la solución de lavado concentrada 10X en 162 ml de agua destilada y se almacenó a temperatura ambiente en un matraz Erlenmeyer hasta su utilización; b) el conjugado se preparó diluyendo 60 µl del anticuerpo peroxidado 100X en 5.94ml de la solución amortiguadora para diluir.

Después de la primera incubación, se desechó el contenido de la placa y ésta fue lavada 3 veces con la solución de lavado, en cada ocasión los pozos se llenaron con 150 µl de la solución de lavado; el contenido se desechó en una sola intención después de agitarse ligeramente, por último, la placa fue colocada hacia abajo y secada sobre una toalla de papel absorbente.

Se agregaron 50 µl del conjugado ya preparado en todos los pozos de la placa y se realizó una segunda incubación a 25°C durante 30 minutos. Después de la segunda incubación, se desechó el contenido de la placa y se realizó un segundo lavado, siguiendo el procedimiento anterior.

Se agregaron 50 µl de la solución de paro para detener la reacción en todos los pozos de la placa, la lectura se realizó inmediatamente después, con un lector de placas por adsorbancia a una longitud de onda de 630 nm.

Para la validación de la prueba, la media de los resultados de densidad óptica de los sueros control negativo debió ser mayor o igual a 0.300; para los sueros control positivo se calculó el porcentaje de inhibición a través de la siguiente fórmula, según las especificaciones del fabricante:

Para la interpretación de resultados se tiene que calcular el porcentaje de inhibición (%I) de cada suero problema mediante la siguiente fórmula:

$$\%I = 100 - [(Media\ de\ la\ Densidad\ Óptica\ del\ suero\ problema) \times (100) / (Media\ de\ la\ Densidad\ Óptica\ del\ Control\ Negativo)]$$

Si una muestra produce un %I > 35, se considera positiva a AEC.

Si una muestra produce un %I ≤ 35 se considera negativo a AEC

6. Resultados.

Las 675 muestras de sueros obtenidas de machos para este estudio se distribuyeron de la siguiente forma: según la especie (ovinos o caprinos) (Figura 2), el estado de procedencia, de donde 362 muestras provenían de Guanajuato, 12 del Estado de México, 170 de Hidalgo, 71 de Oaxaca, 23 de Puebla, 9 de Querétaro y 28 muestras de Coahuila. (Figura 3)

Figura 2. Porcentaje de machos por especie.

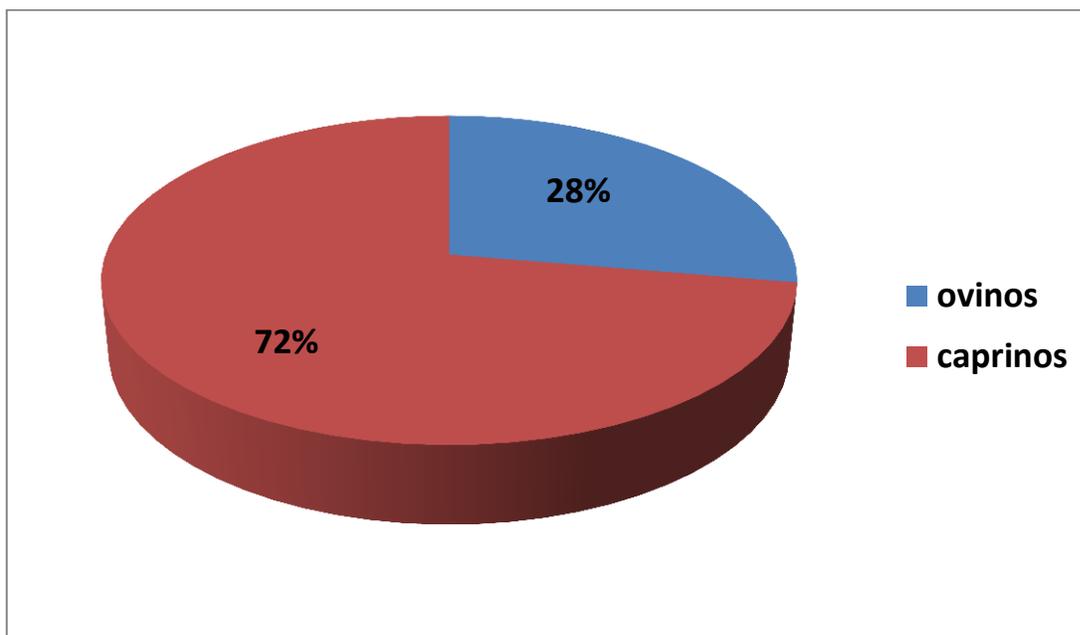
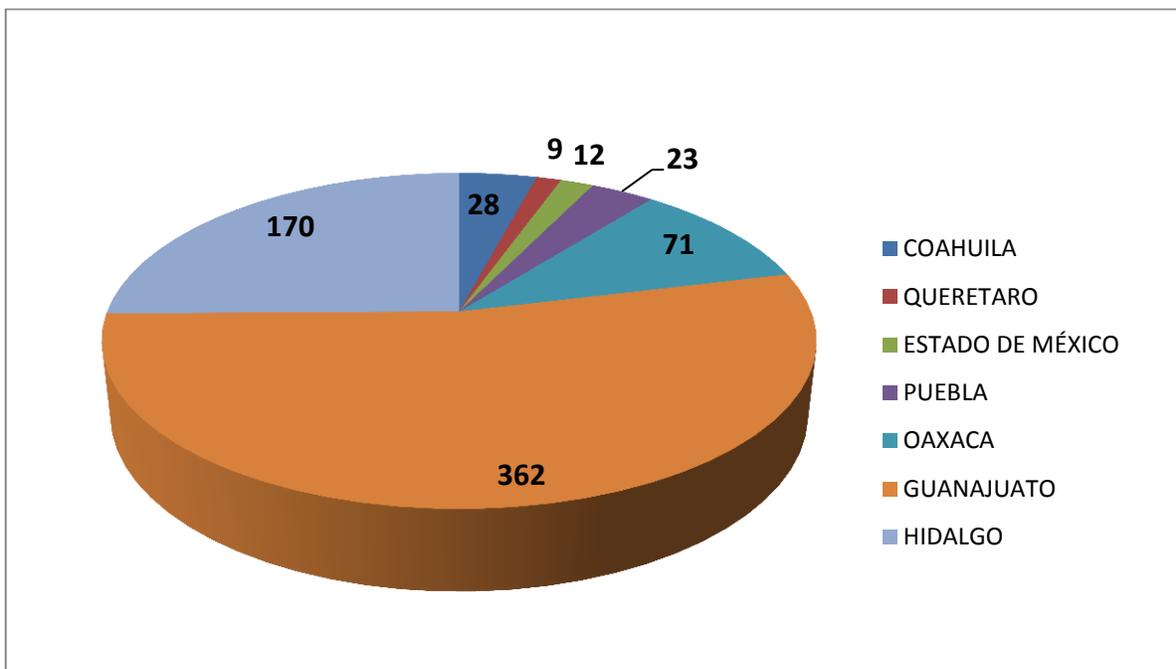


Figura 3. Número de sueros evaluados por estado.



6.1 Machos agrupados por raza.

El análisis de la población de machos muestreados considerando la raza mostró que de solo 212 animales se contó con información de la raza a la que pertenecían, mientras que para 463 de estos no se tuvo disponible esta información. Tabla 8, 9 y 10.

Tabla 8. Sueros por especie y raza.

Especie	No. de animales con raza	No. de animales No Determinados	Total
Ovinos	68	119	187
Caprinos	144	344	488

El grupo de animales con asignación de alguna raza fue de 212 machos los cuales se subdividieron por especie en ovinos o caprinos y se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Razas de caprinos de los animales estudiados.

Raza	No. de animales
<i>Murciana Granadina</i>	1
<i>Saanen</i>	75
<i>Toggenburg</i>	23
<i>Anglo Nubia</i>	6
<i>Alpino Francesa</i>	39
<i>No determinado</i>	344

Tabla 10. Razas de ovinos de los animales estudiados.

Raza	No. de animales
<i>Kathadin</i>	11
<i>Sufolk</i>	13
<i>Charolais</i>	16
<i>Dorset</i>	11
<i>Dorper</i>	4
<i>Romanov</i>	6
<i>Pelibuey</i>	4
<i>Dorper-Texel</i>	1
<i>Hampshire</i>	1
<i>Sufolk-Romanov</i>	1
No determinado	119
Total	187

6.2 Machos agrupados por edad y especie.

La población de animales muestreados de 675 sementales se agruparon por edad, los cuales se subdividieron en ovinos y caprinos. Del total de sueros ovinos y 352 caprinos no se contó con la información sobre la edad (Tabla 13).

Tabla 11. Edades de la población de estudio.

Especie	Edades					Total
	0-12M	13-24M	25-36M	37-48M	+ 48M	
Caprinos	41	41	11	13	30	136
Ovinos	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	---

M= meses

N/D= no determinado

6.3. ELISA en pools.

Utilizando esta metodología se pudieron evaluar 100 muestras realizando únicamente 20 pools, lo cual se reflejó en un menor número de pruebas realizadas por placa de ELISA competitiva. Los pools positivos se evaluaron de forma individual posteriormente. (Tablas 12, 13, 14, 15 y 16)

Tabla 12. Evaluación serológica de 675 sementales caprinos (n= 488) y ovinos (n=187) a la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes.

Estado	Caprinos		% seropositivos	Ovinos		% seropositivos	Total
	+	-		+	-		
Coahuila	5	23	17.9	0	0	0	28
Guanajuato	50	312	13.8	0	0	0	362
Hidalgo	6	9	40	13	142	8.4	170
Oaxaca	0	39	0	0	32	0	71
Puebla	1	22	4.3	0	0	0	23
Edo. de México	5	7	41.7	0	0	0	12
Querétaro	5	4	55.6	0	0	0	9

Tabla 13. Resultados positivos de sementales caprinos por razas.

Raza	No. de machos	Positivos
<i>Murciana Granadina</i>	1	0
<i>Saanen</i>	75	14
<i>Toggenburg</i>	23	3
<i>Anglo Nubia</i>	6	0
<i>Alpino Francesa</i>	39	7
No determinado	344	48
Total	488	72

Se obtuvieron 24 animales seropositivos de los que se contaba con la información de la raza (144) y 48 animales seropositivos del grupo de caprinos donde no se tuvo disponible la raza (344).

Tabla 14. Seropositividad de sementales caprinos por razas.

Raza	Positivos	Seropositividad%
<i>Murciana Granadina</i>	0	0
<i>Saanen</i>	14	2.86
<i>Toggenburg</i>	3	0.61
<i>Nubia</i>	0	0
<i>Alpino Francesa</i>	7	1.43
No determinado	48	9.83
Total	72	14.73

Tabla 15. Resultados positivos y negativos de sementales ovinos por razas.

Raza	No. de animales	Positivos	Negativos
<i>Kathadin</i>	11	1	10
<i>Sufolk</i>	13	0	13
<i>Charolais</i>	16	0	16
<i>Dorset</i>	11	0	11
<i>Dorper</i>	4	0	4
<i>Romanov</i>	6	0	6
<i>Pelibuey</i>	4	0	4
<i>Dorper-Texel</i>	1	0	1
<i>Hampshire</i>	1	0	1
<i>Sufolk-Romanov</i>	1	0	1
No determinado	119	12	107
Total	187	13	174

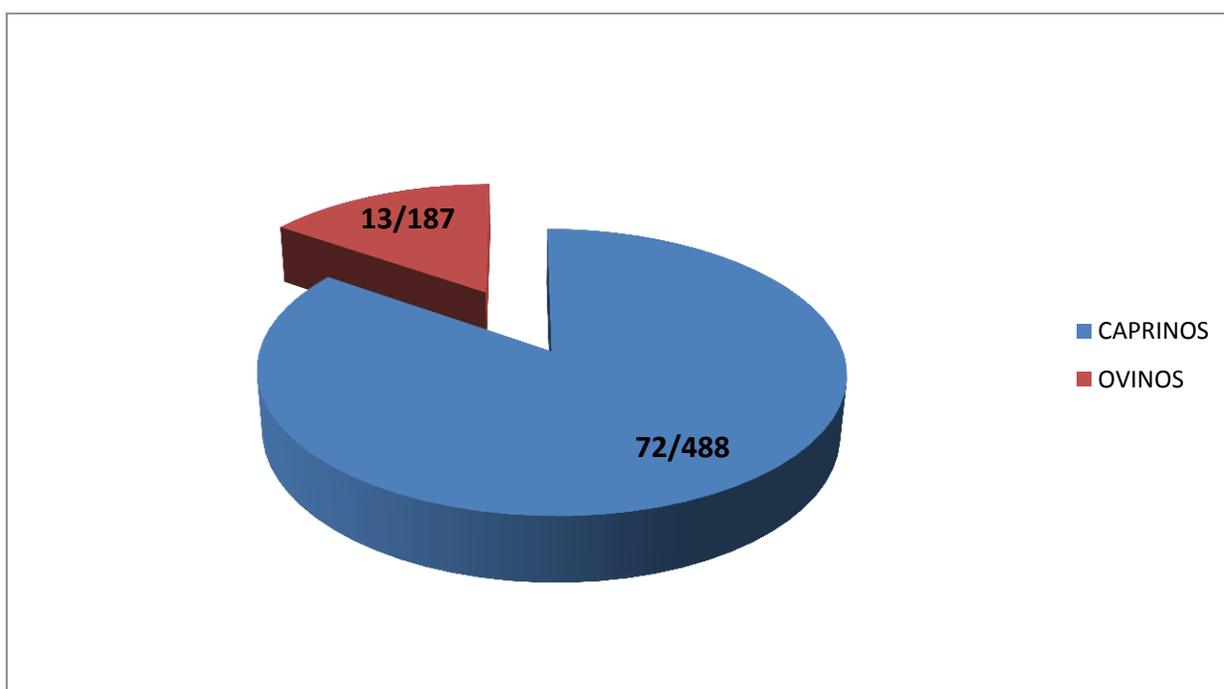
Se obtuvo 1 animal seropositivo de los que se contaba con la información de la raza (68) y 12 animales seropositivos del grupo de ovinos donde no se tuvo disponible la raza (119).

Tabla 16. Machos caprinos seropositivos a la infección de LVPR por edades.

Edad	Número de caprinos	Seropositivos	Seropositividad %
0-12 M	41	1	0.73
13-24 M	41	3	2.20
25-36 M	11	4	2.94
37-48 M	13	4	2.94
+48 M	30	6	4.41
No determinado	352	54	15.34
Total	488	72	28.56

La tabla no presenta datos sobre edad de los ovinos debido a que no se cuenta con información sobre ellos.

Figura 4. Sueros positivos.



7. Discusión.

En el presente trabajo se identificó la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes en rebaños ovinos y caprinos de diferentes estados de la república, utilizando una prueba comercial de ELISA competitiva. Los porcentajes de seropositividad encontrados fueron de 14.75% en caprinos, de los cuales el estado de Guanajuato con el mayor número de cabras infectadas (50/362, 13.81%). El porcentaje de infección por LVPR de caprinos en los diferentes estados de la república fue: Querétaro (5/9, 55.55%), Estado de México (5/12, 41.66%), Hidalgo (6/15, 40%), Coahuila (5/28, 17.85 %), Guanajuato (50/362, 13.81%), Puebla (1/23, 4.34%) y Oaxaca (0/32, 0%). Mientras que el estado de Hidalgo fue el único estado de donde obtuvimos muestras positivas de ovinos infectados (13/142, 9.15%).

El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la raza *Saanen* fue la que presentó mayor seropositividad (18.66%) para el caso de caprinos y la raza *Katadhin* para el caso de los ovinos presentando un caso positivo. De igual forma se identificó que en los animales mayores de 48 meses de edad un mayor porcentaje de seropositividad. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Nazara *et al.*, 1990 y Franco, 2008, los cuales mencionan, que en los animales de raza pura y adultos es más frecuente identificar la infección por LVPR.

Los resultados de seroprevalencia encontrados en este trabajo en general fueron altos comparados con los estudios iniciales realizados en el país. Los estados de Querétaro, Estado de México e Hidalgo presentan seroprevalencias del 55.55%, 41.66% y 40% respectivamente, estas seroprevalencias son altas comparadas con los datos descritos por Álvarez, 1984; Nazara 1984; Trigo, 1991 y Franco, 2008 con porcentajes que oscilan entre 27-39.55%. Sin embargo, en estos estudios el número de animales muestreados fue mayor (más de 800) que en el presente trabajo. Sin embargo, en este estudio se muestrearon exclusivamente machos y en los estudios anteriores las muestras pertenecen a hembras y machos.

Otros estudios han descrito seroprevalencias bajas en caprinos como en el caso de Yucatán con un 2.3% (Torres- Acosta *et al.*, 2003), lo cual fue cercano a lo que se encontró en este trabajo para el estado de Puebla que fue de un 4.34%. en hembras y machos.

Los hospederos principales del VAEC son los caprinos de cualquier edad, sin predisposición de raza. Se ha demostrado experimentalmente que los ovinos son susceptibles a la infección por el virus. Trabajos recientes han demostrado que los lentivirus cruzan la barrera interespecie. El hecho de que algunos subtipos hayan sido aislados de ambas especies, indica que en algún momento ocurrió la transmisión interespecie, al menos una vez en cada uno de los subtipos aun que la frecuencia y dirección de tal infección permanece desconocida (Zanoni *et al.*, 1998; Ravazzolo *et al.*, 2001). Los trabajos realizados en su mayoría son realizados en hembras y principalmete en cabras por las repercusiones económicas en esta raza, por lo tanto no se debe olvidar que existen infecciones cruzadas entre los LVPR.

En los últimos años los animales de reemplazo y semen para la mejora genética de los pequeños rumiantes en rebaños nacionales, eran provenientes de países como Francia y EE.UU, los cuales tienen reportes de una alta incidencia de la enfermedad, lo que representa un gran riesgo para las explotaciones del país (Ramírez *et al.*, 2011). Aunque los resultados obtenidos en este trabajo identificaron un número relativamente bajo de animales seropositivos. Es importante mencionar que el uso de pruebas de ELISAs comerciales no asegura la detección de todos los genotipos virales que infectan a los pequeños rumiantes. (Ramírez *et al.*, 2011), por lo que es posible que la prueba de ELISAc subestime el número de animales infectados.

A pesar de que se han realizado estudios de la infección por LVPR en machos ovinos y caprinos (Martínez, 2005; Ramírez, 2009), al macho no se le ha reconocido su verdadero potencial e importancia en la diseminación de los LVPR vía semen (Martínez *et al.*, 2005). Los estudios llevados a cabo de forma experimental y natural no habían sido concluyentes para demostrar la transmisión del virus de machos a hembras en forma directa durante el apareamiento o por el uso de la inseminación artificial (Travassos *et al.*, 1998; Travassos *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2008; Ortiz, 2011). Diversos trabajos han descrito la presencia de virus en semen, en tejidos asociados al aparato reproductor y la presencia de anticuerpos específicos indicativos de infección, lo que refuerza la posibilidad de que el virus pudiera transmitirse por esta vía, sin embargo, existían controversias al respecto (Blacklaws *et al.*,

2004; Ramírez *et al.*, 2009). Recientemente fue confirmada la transmisión vía semen con el trabajo realizado en Brasil por De Souza *et al.*, 2013, los cuales utilizaron semen de un macho seronegativo. El semen fue infectado con un LVPR y se utilizó para inseminar hembras seronegativas, los resultados que obtuvieron fue un 60% de hembras seropositivas a los 30 días posteriores de la inseminación. Esto revela la importancia de los sementales como diseminadores de la enfermedad por LVPR.

Los LVPR se han identificado en glándulas accesorias de machos caprinos y en especial en la vesícula seminal y glándulas bulbouretrales (Martínez *et al.*, 2005) sin aparente daño patológico. Por otro lado, en ovinos co-infectados con *Brucella ovis* y LVPR fue posible encontrar epididimitis con leucocitospermia (De la Concha *et al.*, 1996).

Es importante mencionar que en el presente estudio se evaluaron serológicamente machos ovinos y caprinos sin manifestaciones clínicas aparentes relacionadas con la infección por lentivirus y libres de brucelosis.

El diagnóstico rutinario de la infección de lentivirus en México, principalmente en caprinos se ha basado en el uso de pruebas serológicas como la IDAG, ELISA y últimamente en el Western Blot y PCR como pruebas de diagnóstico confirmatorias en trabajos de investigación. Sin embargo, los trabajos más recientes demuestran que la utilización combinada de dos pruebas como IDAG-ELISA (OIE 2004), ELISA-PCR (Barquero, 2012), Western Blot-PCR, ELISA-Western Blot (De Andrés *et al.*, 2005) mejoran el diagnóstico de los LVPR, en el presente estudio no fue factible llevar a cabo una detección con pruebas combinadas. En el presente trabajo se realizaron pools de 5 muestras de sueros y se evaluaron con un kit comercial de ELISA competitivo, siendo posible encontrar grupos de muestras en los que se identificó la presencia de anticuerpos específicos, confirmando la infección por LVPR. La estrategia de formar pools disminuyó el costo del diagnóstico por animal, posteriormente, solo los pools con resultados positivos se evaluaron, ahora sí de forma individual para confirmar los animal infectados. Esta estrategia de evaluaciones en pools ha demostrado que no pierde sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA, además de que es factible detectar un mínimo del 2% de seroprevalencia con esta metodología en cualquier rebaño (Brinkhof *et al.*, 2008). Como ya se mencionó los métodos de diagnóstico para detectar la infección por LVPR son muy

diversos, no obstante, aunque hay técnicas para detectar antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos, a partir de tejidos, semen y suero, no todas ellas se realizan de forma rutinaria en el país o solo se llevan a cabo en laboratorios de investigación.

La detección de anticuerpos a la infección por LVPR no siempre es exitosa ya que puede pasar varios meses en que el virus no se expone al sistema inmune y permanece en estado de latencia, sin estimular la producción de anticuerpos (Rimstad *et al.*, 1993). En el presente estudio la prueba de ELISAc comercial utilizada está basada en el uso de la proteína Gp135 (proteína expresada fuertemente en estadios crónicos) la cual es una fracción antigénica de la envoltura viral y considerada dentro de los antígenos más importantes de los LVPR, que cruzan entre los diferentes virus encontrados en ovinos y caprinos; es por ello que dicho kit permite identificar infección en ambas especies.

Es necesario realizar estudios que comparen las técnicas que se usan en el país para establecer la más adecuada, tomando en cuenta los genotipos que infectan los rebaños ovinos y caprinos en México. Por otro lado hubiera sido interesante complementarla el estudio con una prueba de PCR para reconfirmar los resultados encontrados con la prueba de ELISA, o animales infectados que escaparon a la detección de la prueba comercial. No obstante, es importante mencionar que existen comercialmente otros formatos para las pruebas de ELISA, en los que se utilizan péptidos sintéticos o proteínas recombinantes y que han sido validadas en diferentes estudios (Kwang *et al.*, 1994; Clavijo *et al.*, 1995; Boschhoff *et al.*, 1997; Saman *et al.*, 1999).

Actualmente, en México no existe una base de datos exacta sobre la frecuencia y prevalencia de la infección de LVPR. Los reportes han sido esporádicos en los foros y congresos del área, esto puede verse reflejado en la base de datos del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), donde solo se mencionan 15 casos en 1997, 12 casos en 1999 y 10 casos en 2002 (Franco, 2008). Es por este motivo que cobra importancia la evaluación de los animales para la identificación de la infección por LVPR, logrando por un lado aumentar la confianza de los productores de pie de cría para exportar animales libres de infección y por lado los animales seronegativos cuentan con un valor agregado cuando son vendidos como pie de cría, coadyuvando en el control de la infección de LVPR y disminuyendo la difusión del virus en los rebaños nacionales.

La situación encontrada en el presente estudio no necesariamente es el reflejo de lo que sucede para todo el país. Con base en lo anterior es necesario realizar estudios en México más estratificados y en todas las regiones importantes en el número de cabezas de ganado ovino y caprino, para determinar con mayor precisión la situación real que guardan los LVPR en el país.

8. Conclusiones.

Existe la presencia en México de sementales ovinos y caprino seropositivos a lentivirus de pequeños rumiantes.

En el estado de Guanajuato se encontró el mayor número de machos caprinos seropositivos a LVPR y el estado de Hidalgo fue el único en el que identificaron ovinos infectados.

La estrategia de generar pools en las muestras de suero ayuda a evaluar explotaciones con un gran número de individuos reduciendo los costos del diagnóstico.

9. Bibliografía.

Adams DSP, Oliver RE, Ameghino E, De Martini JC, Verwoerd D, Whouwers DJ, Waghela S, Gorman JR, Hyllset B, Dawson, Trigo FC, Mc Guire TC. Serological evidence of caprine arthritis encephalitis infection in eleven of fourteen countries tested. *Vet. Rec.* 1984; 115: 493-495.

Ali al Ahmad MZ, Fieni F, Pellerin JL, Guiguen F, Cherel Y, Chatagnon G, Bouzar AB, Chebloune Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and genital tract tissues of male goat. *Theriogenol.* 69;473-480.2008

Álvarez VJL. Seroprevalencia de la artritis encefalitis caprina en algunos estados de la republica. UNAM. 1984.

Álvarez MV. Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de raza latxa del País Vasco; Tesis Doctoral. Gobierno Vasco, 2006.

Amorena B, Monleón E, Pacheco C, Pérez M, Monzón M, García E, Rota C. Tendencias actuales en los métodos de diagnóstico de interés epidemiológico. *Med Vet.* 14; 305-318.1997

Amorena B, González B, Andres S, De Andrés D, Vargas AA, Luján A. Mecanismos patológicos y respuesta inmune, *Revista OVIS.* Madrid. 2001, 27-40.

Amorena B, Reina R, de Andrés X, Glaria I, Crespo H, Ramírez H, Jáuregui P, San Roman. B, Grilló MJ, de Andres D. Maedi- Visna. Experiencias de control de la enfermedad mediante la aplicación de vacunas. *X foro de Aranda. Tierras.* 147;32-39.2008

Avalos R, Ramírez R, García. J, Zapata P, Cervantes R, Lehmkuhl H. Seroprevalencia del virus de artritis encefalitis caprina en el estado de Nuevo León. IX Congreso Nacional Caprino. Monterrey, N.L; México. Facultad de Agronomía U.A.N.L 1992: 11-14.

Bath G, Wet J. Sheep and goat diseases. Tafelberg. EU. 2000.

Bertolotti. Small ruminant lentivirus genotype B and E interaction: Evidences on the role of Roccaverano strain on reducing proviral load of the challenging CAEV strain. 2011.

Bertoni G, Hertig C, Zanho ML, Vogt HR, Dufour S, Cordano P. B-cell epitopes of envelope glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus and antibody virus response in infected goats. J. Gen. Virol. 2000.

Boschoff CH, Dungu B, Williams J, Vorster JD, Conradie JD, Verwoerd DW, York DF. Detection of Maedi Visna virus antibodies using a single fusion transmembrane-core p 25 recombinant protein ELISA and a modified receiver-operating characteristic analysis to determine cut-off values. J Virol Methods 1997. 63: 47-56.

Blacklaws BA. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. 2012.

Blacklaws BA, Beriatua E, Torteinsdottir S, Watt NJ, de Andres D, Klein D, Harkhiss GD. Transmission of small ruminant lentiviruses. Vet. Microbiology. 101; 199-208.2004.

Brinkhof JMA, Houwers DJ, Maanen CV. Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA. Small Ruminant Research 70. 2007a. 194–199.

Brinkhof JMA, Moll L, van Maanen C, Houwers DJ. Use of serology and polymerase chain reaction for the rapid eradication of small ruminant lentivirus infections from a sheep flock: A case report. 2010

Brinkhof JMA, Houwers DJ, Moll L, Dercksen D, van Maanen C. Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. 2010

Brodie SJ, Snowden GD, Demartini JC. Ovine progressive pneumonia advances and prospect for control. *Sheep. J. RES.* 8; 116-126. 1992.

Brodie SJ, De la Concha BA, Koeing G, Snowden GD, De Martini JC. Maternal factors associated with prenatal transmission of Ovine Lentivirus», *J Inf Dis.* 169. 1994. 653-657.

Bruet L, Barber SA, Clements J. Characterization of a membrane associated protein implicated in Visna virus binding and infection. *Virology* 271. 2000:132-141

Bruguere-Picoux J. Le complex Arthrite- Encephalite- Caprine (C.A. E. C.). *Recueil de Medicine Veterinaire.* 160(1984): 319-327.

Cann A. *Molecular Virology*; 2ed Academic Press San, Diego. 1997. 5 . 128-260.

Castillo VYC, Hernández FS. Prevalencia serológica del virus de artritis encefalitis caprina en los municipios del Rosal y Subachoque (Cundinamarca) mediante la técnica de Inmunodifusión en agar gel. 2004. Tesis, Universidad Lasalle, Facultad de Medicina Veterinaria . Colombia

Celer VJ, Celer V, Nemcova H, Zanoni RG, Peterhans E. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test, *Zentralbl Veterinarmed.* 45 (1998) 183-188.

Clavijo A, Thorsen J. Serologic diagnosis of caprine arthritis-encephalitis by ELISA with two recombinant proteins in a parallel testing format, *J Immunoassay* 16. 1995. 419-436.

Crawford TB, Adams DS, Cheevers WD, Cork LC. Chronic arthritis in goat caused by a retrovirus. *Science*. 207; 997-999.1980.

Crawford TB, Adams PS. Caprine Arthritis encephalitis: Clinical features and Presence of antibody in selected goat populations. *Journal of America Veterinary Medical Association*, 1981; 17 713-719.

Cork LC, Hadlow WJ, Crawford TB, Gorham TR, Piper, RC. Infectious Leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Inf. Dis.* 1974.

Coll, J. Técnicas de Diagnóstico en Virología. Madrid: Díaz de Santos, 1993.

Corrales JC, Sánchez A, Contreras A. Diagnóstico de la artritis encefalitis caprina. Monografía Artritis encefalitis caprina II. *Rev. Ovis*.2003. 88, Madrid. 30-46

Cunha CAK, Soares CR, Silva TMF. Lentivírus e vírus de pequenos ruminantes (CAEV, AEV e Maedi-visna):revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 2001. 21(3):87-97

Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Schmerr MJF, Brogden KA, Ovine progressive pneumonia (Maedi/Visna) in sheep, *Vet Microbiol.* 17 (1988) 237-250.

Daltabuit TM, Concha-Bermejillo A, Espinosa LEL, Rubio LE, Setién AA. Isolation of caprine arthritis encephalitis from goats in Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 1999 63, 212–215.

Daltabuit T M E. Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el estudio de la transmisión calostrual y horizontal del virus Maedi-Visna (VMV) en

ovino. Tesis doctoral – 1a ed. – Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. 2006

Davey RT J, Murphy RL, Graciano FM, Boswell SL, Pavia AT, Cancio M, Nadler JP, Chaitt DG, Dejar R L, Sahner DK, Duliege AM, Capra WB, Leong WP, Giedling MA, Lane H C, Kahn J O. Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial. 2000. J Amer Med Assn 284:183-189.

Dawson M. Maedi/Visna, a review, Vet Rec. 106 (1980) 212-216.

Dawson M, Wilesmith W. Serological survey of lentivirus (Maedi Visna-/ Caprine Arthritis Encephalitis) Infection in British goat herds. Veterinary Record, 117(1985):86-89.

De Andrés D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir SBA, Blacklaws, Harkiss GD. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. Vet. Microbiol 2005. 107:49–62

De-Boer GF, Houwers DJ. Epizootiology of Maedi/Visna in sheep. D.A.J. Tyrrell. Aspects of slow and persistent virus infections, D.A.J Tyrrel, Brussels-Luxembourg 1979. 198-220.

De la concha –Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ. Shedding of ovine lentiviruses in the semen of infected rams. Amer. J. Vet. 57;684-688.1996.

De la concha –Bermejillo A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. Veterinary Clinics of America; Food Animal Practice. 13. 1997.

De la concha –Bermejillo A. Retrovirus en ovinos y caprinos: Maedi y Artritis Encefalitis Caprina. Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M Universiti, College Station, Texas 7784; and Texas Agricultural Experiment Station, San Angelo, Texas 76901 USA. 1999.

De la concha –Bermejillo A. Sheep and goat. Research Journal. Hair sheep Workshop. Other Research. 2005.

De Souza KC, Pinheiro RR, Santos DO, de Brito RL, Rodrigues A de S, Sider LH, Paula NRO, Avila AA, Cardoso J de FSAA. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. 2013.

Diaz AE, Aguilar RF, Vázquez N J. Manual para el diagnóstico de enfermedades de ovinos y caprinos en México, Comité de salud y producción ovina y caprina. CONASA. 26-28. 2005.

Eguiluz C, De Aluja AS. Neumonía Intersticial progresiva (Maedi) y adenomatosis pulmonar en vísceras de ovidos decomisadas. Nota Informativa. Veterinaria Mex 1981.12.

Ellis TM. Blood leucocyte infection rates in caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. Aust. Vet J.8;302-303.1990.

Franco NC. Estudio sobre la prevalencia de la artitis encefalitis caprina en sistemas lecheros intensivos en la región del altiplano mexicano. 2008

Georgsson G. Maedi-Visna. Pathology and pathogenesis, in: Development in Veterinary Virology Series. Yachiel Becker (Ed) Klower Academic Publ. Boston. (1989) 19-53.

Gjerset B, Rimstad E, Teige J, Soetaert K, Monceyron JC. Impact of natural sheep–goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections Veterinary Microbiology 135 . 2009. 231–238

Gogolewsky RP, Adams DS, McGuire TC, Banks KL, Cheevers WP. Antigenic Cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna y progressive pneumonia viruses involves all virion-associated protein and glycoproteins. J Gen Virol. 66 1985.

Gorrell MD, Brandon MR, Sheffer D, Adams RJ, Narayan O. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes, *J Virol.* 66. 1992. 2679-2688.

Griffin DE, Narayan O, Adams RJ. Early immune responses in Visna, a slow viral disease of sheep. *J Infect Dis.* 138. 1978. 340-350.

Harmache A, Vitu C, Russo P, Bouyac M, Hieblot C, Peveri P, Suzan M. The caprine arthritis encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo, *J Virol.* 69. 1995. 5445-5454

Hermann-Hoesing LMG, Palmer HG, Knowles PD. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. *Virology* 2007.

Hermann-Hoesing LM. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J Vet Diang Invest* 2010.

Hidalgo H, Higuera F. Comparación de eficacia y seguridad de una prueba rápida para la detección del VIH tipo 1 y 2 por detección de Ac IgG en saliva vs Western Blot. VI Congreso Nacional Sobre SIDA. 1997

Houwens DJ. Economic importance, epidemiology and control in: Maedi Visna and related diseases, Academic Press, Massachussets, 6. 1990. 83-117.

Houwens DJ, König CD, Bakker J, De Boer MJ, Pekelder JJ, Sol J, Vellema P, De Vries G. Maedi-Visna control in sheep III: results and evaluation of a voluntary control program in the Netherlands over a period of four years. *Vet Q*, 9, 1987. 29s-36s.

Houwens DJ, Gielkens ALJ, Schaake J. An indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Maedi Visna virus. *Vet Microbiol* 1982. 7: 209-219.

ICTV http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20110374

Juste RA, De La Concha A. Monografía Maedi Visna Etiología del maedi visna., Editorial Luzan. *Rev.Ovis* 72. Madrid 2001. 9-23.

Juste R, Wang J, De la Concha BA. Dynamics of cell-associated viremia and antibody response during the early phase of lentivirus infection in sheep. *Am J Vet Res*, 59, 1998. 563-568.

Karanikolaou K, Angelopoulou K, Papanastasopoulou M, Koumpati-Artopiou M. Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. 2005.

Kennedy S, Narayan O, Strandberg J. The Mammary Gland as a Target Organ For Infection with Caprine Arthritis encephalitis virus. *Journal of comparative pathology*, 95 (1985): 609-617.

Knowles DP, Evermann JF, Shropshire C, Vanderschalie J, Bradway D, Gezon HM, Cheevers WP. Evaluation of Agar Gel Immunodiffusion Serology Using Caprine and Ovine Lentiviral Antigens for Detection of Antibody to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 32, No. 1. 1993. p. 243-245.

Kwang J, Keen J, Cutlip RC, Kim HS, De la concha BA. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Rumin. Res* 1995. 16. 161-167.

Kwang J, Keen J, Cutlip RC, Littlelike E.T. Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein», *J Vet Diagn Invest.* 5. 1993. 189-193.

Lacerenza D, Giammarioli M, Grego E, Marini C, Profiti M, Rutili D, Rosati S. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 2006.

Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Tainturier D, Chebloune Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells», *Virus Res.* 79. 2001. 165-172.

Lechat E, Milhau N, Brun P, Bellatob C, Greenland T, Mornex JF, Le Jan C. Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis encephalitis virus infected leucocytes. *Veterinary Immunol and Immunopathology* 104. 2005. 257-263.

Lerondelle C, Godet MT, Mornex JF. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet Res* 1999. 30,467-474.

Lerondelle C, Greenland T, Jane M, Mornex JF. Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus», *J Dairy Sci.* 78. 1995. 850-855.

Leroux C, Lerondelle C, Chanstang J, Mornex JF. RT-PCR detection of lentivirus in milk or mammary secretions in sheep or goat from infect flocks. *Vet. Res.* 28; 115-121. 1997.

Luján LL, Badiola J. Monografía Maedi Visna. Editorial Luzan. *Rev.Ovis* 72. Madrid 2001. 7-8.

Luján L, Gómez N, Bolea R, García MJF, Varea R, Vargas A, Badiola JJ. Cuadro Clínico y lesional. Editorial Luzan. *Rev.Ovis* 72. Madrid 2001. pp 41-57.

Martínez RHA. Diseminación del VAEC a partir de machos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor. Tesis doctoral. FESC UNAM 2003.

Martínez FO. Evaluación serológica a Lentivirus de Pequeños Rumiantes en una explotación. UNAM. 2010

Molina MR, Trigo TJF, Cutlip RC. Estudio serológico de la neumonía progresiva ovina en México. *Vet Mex* 17. 1986.

Mselli-Lakhal L, Favier C, Leung K, Guiguen F, Grezel D, Miossec P, Mornex JF, Narayan O, Querat G, Chebloune Y. Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *J Virol.* 74. 2000. 8343-8348.

Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, Du J, Favier J, Durand J, Grezel D, Balleydier S, Mornes JF, Chebloune Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology* 259. 1999. 67-73.

Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary virology*, 3ed, Academic Press, San Diego. 1999. 363-389.

Narayan O, Zink M, Gorrell MC, Crane S, Huso D, Jolly P, Saltarielli M, Adams RJ, Clements JE. The lentiviruses of sheep and goats. *The Retroviridae* 2. 1993: 229-255.

Narayan O, Cork LC. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis, *Rev Infect Dis.* 7 (1985) 89-98.

Nazara CS, De Trigo J, Suberbie FJ, Madrigal EV. Estudio clínico-patológico de la artritis encefalitis caprina en México. *Veterinaria México.* 1985. 16, 91-100.

Novelo BR. Muestreo serológico para la determinación de anticuerpos contra el virus de la Artritis Encefalitis Caprina en machos caprinos con y sin artritis clínica. UNAM. 2001.

OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004.

Oliver RE, Gorham JR, Perryman LE, Spencer GR. Ovine progressive pneumonia: experimental intrathoracic, intracerebral, and intra-articular infections, *Am J Vet Res.* 42 (1981) 1560-1564.

Ortiz de Lejarazu LR, Cisterna CR, González LAM, Maroto MC, Pumarola ST, Viñas RJ. Diagnóstico Microbiológico de la Infección por VIH. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1998.

Palsson PA. Maedi/Visna, a slow virus disease, *Bull Off Int Epiz.* 89 (1978) 465-475.

Pepin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review, *Vet Res.* 29 .1998.

Pepin M, Vitu Ch, Russo P, Mornex JF, Peterhans E. Maedi-Visna virus infections in sheep: a review. *Vet Res.* 29; 341-367.1998.

Pérez SA. Identificación de anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos ovinos por las técnicas de inmunoelectrotransferencia (Western Blot) y Elisa indirecta. Tesis Licenciatura . Edo de México 2005.

Peterhans ER, Zanoni, Bertoni G. How to succeed as a virus: strategies for dealing with the immune system. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999.

Peterhans E, Greenland T, Badiola JJ, Harkiss G, Bertoni G, Amorena B, Eliaszewicz M, Juste R, KraBing R, Lefont JP, Lenihan P, Peturson G, Thorely J, Vitu C, Mornex JF, Pepin M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes, *Vet Res.* 35. 2004. 1-38.

Peterson K, Bronkhof J, Houwers DJ, Colenbrander B, Gadella BM. Presence of pro-lentivirus DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminant. *Theriogenology*. 69; 433-442. 2008.

Pétursson G, Andrésdóttir V, Andrésón O, Georgsson G, Pálson P, Rafnar B, Torsteinsdóttir S. Lentivirus diseases of sheep and goat: Maedi-Visna and Caprine Arthritis Encephalitis. IN *progress in sheep and goat research*. Oxford:Speedy. 1992.

Ramírez AH. Evaluación in Vitro de proteínas antigénicas de un virus de artritis encefalitis caprina (AEC) aislado en México, usando las técnicas de ELISA y WESTERN BLOTT. Tesis Maestria. México 2002

Ramírez AH, San Román B, Glaria I, Reina R, Hernández MM, de Andres X, Crespo H, Hichou B, Cianca S, Goñi C, Grandas A, Garcia-Pastor L, Vijil LE, Quintin F, Grilló MJ, de Andrés D, Amorena B. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenol*. 72; 1085-1096. 2009.

Ramírez AH. Contribución al diagnóstico y a La filogenia de lós Lentivirus de Pequeños Rumiantes. Universidad Publica de Navarra. Departamento de Producción Agraria. Instituto de Agrobiotecnología. Pamplona. 2010.

Ramírez H, Glaria I, de Andrés X, Martínez HA, Hernández MM, Reina R, Iráizoz E, Crespo H, Berriatua E, Vázquez J, Amorena B, de Andrés D. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. 2011

Ravazzolo AP, Reischak D, Peterhans E, Zanoni R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Res*. 2001; 117-123.

Reina R; Berriatua E; Luján L; Juste R; Sanchez A; De Andrés D; Amorena B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *The Veterinary Journal*. 2008.

Rimstad E, East N, Derock E, Higgins J, Pedersen NC. Detection of antibodies to caprine arthritis/encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, 1994. 134, 345–356.

Rowe JD, East N. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Clinics of North.* 13; 35-53. 1997.

Salazar OL, Rangel C, Flores N, López RR. La Artritis- Encefalitis Caprina: Amenaza de la Caprinocultura Potosina. Colaboración del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. 2003. http://www.ipicyt.edu.mx/eipicyt/eventosnoticias/pulso_diciembre_03.pdf

Saltarelli M, Querat G, Konings DAM, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus, *Virology* 179 .1990. 347-364.

Saman E; Geertrui VE, Lujan L, Extramiana B, Harkiss G, Tolari F, González L, Amorena B, Watt N, Badiola J. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus Infections in small ruminants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 1999.

Sanna E, Sanna MP, Vitali GP, Renzoni G, Sanna L, Spano S, Rossi G, Leoni A. Proviral DNA in the brain of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *J Comp Path* 121. 1999. 271-273 .

Schipper IA, Misek A, Ludeman L, Light MR, Limesand W. Ovine progressive pneumonia infection via the oral route, *Agripractice* (1983) 415-417.

Shah C, Huder JB, Boni J, Schonmam M, Muhler J, Lutz H, Schupbach J. Direct evidence for natural transmission of small ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and viceversa. *J. Virol. Meth.* 118: 2004. 123-130.

Sigurdsson B. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootological and a pathological study, *Br Vet J.* 110 (1954) 255-270.

Sigurdson B, Grimsson H, Palsson PA. Maedi, a chronic progressive infection of sheep's lungs. *L infect. Dis.* 90: 1951. 233-241.

Sihvonen L. Early immune responses in experimental Maedi, *Res Vet Sci.* 30 (1981) 217-222.

Sihvonen L, Estola T, Tuomi J. Experimental maedi infection in sheep. I. Detección of virus, clinical course, histopatology. *Acta. Vet. Scand.* 21; 113-123. 1980.

Smith C. Ovine lentivirus: a real or imagined threat, *J Am Vet Med Assoc.* 200 (1992) 139-143.

Stites DP, Hug Hf. *Inmunología básica y clínica.* 4a edición. El manual moderno. Mexico 1983.

Storset AK, Teig A, Rimstad E. Detección of caprine arthritis- encephalitis virus RNA in macrophages by in situ hybridization using fluorescein labelled single- stranded RNA probes. *Vet Microbiol* 52 (1-2): 25-35 (1996).

Tizard R. Ian. *Inmunología Veterinaria.* Quinta edición. Mc Graw Hill.1996.USA.

Tolari F, Al-Ramadned W, Mazzei M, Carroza ML, Forzan M, Bandecchi P, Grego E, Rosati S. Small ruminant lentiviruses in Jordan: evaluation of sheep and goat serological response using recombinant and peptide antigens. 2013.

Torres AJ. Serological survey of caprine arthritis encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatán Mexico. *Small ruminant research* Volume 49. Edición 2. Agosto 2003. Pages 207-211.

Tórtora PJJ. Acontecer ovino caprino; Maedi Visna ; la situación de México. Vol VIII No 37. Noviembre 2007-Enero 2008.

Travassos C, Beenoit C, Valas S, da Silva A, Perrin G. Deteccion du virus de l arthrite encéphalite caprine dans le serme de boucs infectés expérimentalment. Vet Res. 29; 578-584. 1998.

Travassos C, Beenoit C, Valas S, da Silva A, Perrin G. Caprine arthritis encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. Small Runinant Research. 32; 101-106. 1999.

Trigo TF. La artritis encefalitis caprina. Ciencia Veterinaria 5. 1991.

Urcastegi RHA. Ovinos mexicanos sacrificados en Colombia. Acontecer ovinos caprino. Vol VIII 2007. No. 35.

Van der Molen EJ, Vecht U, Houwers DJ. A chronic indurative mastitis in sheep, associated with Maedi-Visna Virus infection. Vet Quart. 7 (1985) 112-119.

Vazquez FN, Soberón MA, Trujillo GA, Segundo ZC, Ducoing WAE. Caprine arthritis encephalitis seroprevalence in dairy goat intensive systems of the Mexican high plateau. Memorias de la 9a conferencia Internacional sobre caprinos. Queretaro Mexico 2008. 262.

Vega AM. Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de la raza Latxa del país Vasco. Universidad de León. Facultad de Veterinaria. 2006.

Villet S, Bouzar BA, Morin T, Verdier G, Legras C, Chebloune Y. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. J Virol 2003.

Villet S. Lack of trans-activation function for Maedi Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus Tat proteins. *Virology*. 2003.

Watt NJ, Roy DJ, Mc-Connell I, King TJ. «A case of visna in the United Kingdom», *Vet Rec*. 126 (1990) 600-601.

Zanoni RK, Rieg A, Peterhans E. Detection of Antibodies to caprine Arthritis- Encephalitis Virus By protein GEnzyme- Linked Immunosorbent Assay and Immunoblotting. *Journal of clinical Microbiology* 1989. p 580-582.

Zanoni RG, Vogt HR, 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. 1998.

Zink MC, Johnson LK.. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Res*. 32. 1994. 139–154.

Zink MC, Narayan O, Kennedy PGE, Clements JE. Pathogenesis of Visna/Maedi and Caprine arthritis encephalitis new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol. Immunopathol*. 1982.15:167-180.