

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“Detección de Lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) en hatos mixtos de ovinos y caprinos de Culiacán, Sinaloa”

**Que para obtener el grado de Maestra en
Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

Rebeca Castro Flores

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Efrén Díaz Aparicio

ASESORES:

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

MC. Luis Gómez Núñez

MC. Martha María García Flores

Culiacán Rosales, Sinaloa, México Agosto del 2015

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **REBECA CASTRO FLORES**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CO-DIRECTOR

DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO

ASESORA

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

ASESOR

MC. LUIS GÓMEZ NÚÑEZ

ASESORA

MC. MARTHA MARÍA GARCÍA FLORES

CULIACÁN, SINALOA, A AGOSTO DEL 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 25 de Junio del año 2020, la que suscribe Rebeca Castro Flores, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 06018564, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho y del Dr. Efrén Díaz Aparicio y cede los derechos del trabajo titulado "Detección de Lentivirus en Pequeños Rumiantes en Culiacán, Sinaloa ", a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

Rebeca Castro Flores

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios de maestría.

A todos mis maestros que colaboraron en mi formación profesional Dra. Idalia Enríquez Verdugo, Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho, MC Nohemí Castro del Campo, Dr. Javier Romo Rubio, Dr. José Portillo Loera, Dr. Rubén Barajas Cruz, MVZ Claudia Barraza

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por su apoyo en la realización de este proyecto de investigación.

A INIFAP CENID-MICROBIOLOGÍA por aceptarme durante la estancia en el D.F. así como en la realización del experimento de tesis.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio y a M.C. Luis Gómez Núñez por la asesoría y el apoyo durante mis estudios y estancia en INIFAP CENID-MICROBIOLOGÍA.

A centro médico Siglo XXI, M.C. Martha María García Flores por su apoyo en la realización del experimento de tesis.

A mis compañeros de maestría Melissa, Xitlalic, Cinthia, Cesar.

A CONACYT por su apoyo económico.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	3
1.2. Agente etiológico	3
1.2.1. Ciclo de replicación viral.....	6
1.3. Patogenia	7
1.4. Cuadro clínico	7
1.4.1. Forma pulmonar.....	8
1.4.2. Forma articular.....	9
1.4.3. Forma nerviosa.....	9
1.4.4. Forma mamaria.....	10
1.5. Respuesta inmune	10
1.5.1. Respuesta humoral.....	11
1.5.2. Respuesta celular.....	11
1.6. Transmisión	12
1.6.1. Transmisión vertical.....	12
1.6.2. Transmisión horizontal.....	13
1.7. Diagnóstico	14
1.7.1. ELISA.....	15
1.7.2. IDGA.....	17
1.7.3. Western Blot.....	17
1.7.4. Hibridación in situ.....	18
1.7.5. PCR.....	18
1.8. Diagnóstico diferencial	18
1.9. Medidas de prevención y control	19
1.10. Importancia económica	21
1.11. Lentivirus de pequeños rumiantes en México	21
II. HIPÓTESIS	24

III. OBJETIVOS.....	25
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
VI. CONCLUSIONES.....	30
VII. LITERATURA CITADA.....	31
VIII. ANEXOS.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Frecuencias totales de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en 4 ranchos de Culiacán, Sinaloa	28
2	Frecuencias de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en el rancho A	28
3	Frecuencias de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en el rancho B	28
4	Frecuencias de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en el rancho C	29
5	Frecuencias de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en el rancho D	29
6	Signos clínicos de la infección por LvPR en caprinos y ovinos	41
7	Medidas de prevención y control de LvPR	41
8	Pruebas de diagnóstico comerciales para LvPR	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1.-	Estructura de los LvPR.....	39
2.-	Genes estructurales y reguladores de los LvPR.....	39
3.-	Ciclo de replicación viral.....	40
4.-	Patogenia de los LvPR.....	40

RESUMEN

Detección de Lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) en hatos mixtos de ovinos y caprinos de Culiacán, Sinaloa

Rebeca Castro Flores

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) incluyen al virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) y al virus del Maedi Visna (VMV), causan lesiones inflamatorias crónico degenerativas en diversos órganos: articulaciones, pulmón, cerebro y glándula mamaria de ovinos y caprinos. La transmisión ocurre de manera natural entre ovinos y caprinos cuando se encuentran en condiciones de cohabitación en los LvPR debido a que tienen la capacidad de atravesar la barrera interespecie. El objetivo del presente trabajo fué identificar la presencia de anticuerpos contra LvPR, para ello se analizaron 141 sueros de ovinos (n=70) y caprinos (n=71). El muestreo efectuado incluyó a 4 ranchos donde conviven ovinos y caprinos en el mismo hato, uno de los ranchos con signos clínicos sugerentes a la infección de artritis encefalitis caprina y 3 ranchos sin historial de signos clínicos. La detección de anticuerpos se realizó mediante pruebas de ELISA indirecta utilizando como antígeno dos péptidos sintéticos (126M1 Y 126M2) que detectan anticuerpos para la proteína viral TM45 y ELISA competitiva utilizando el Kit comercial VMRD que detecta anticuerpos contra la proteína viral SUgp135. Los resultados fueron 19 caprinos y 0 ovinos positivos por ELISA competitivo; 19 caprinos y 2 ovinos positivos por ELISA indirecto 126 M1 y 28 caprinos y 14 ovinos positivos por ELISA indirecto 126M2. El presente trabajo demuestra la presencia de la infección por LvPR en los cuatro ranchos muestreados en Culiacán, Sinaloa.

Palabras claves: lentivirus de pequeños rumiantes, ELISA, diagnóstico serológico.

ABSTRACT

Detection of small ruminant lentiviruses (SRLV) in mixed herds of sheep and goats of Culiacan, Sinaloa

Rebeca Castro Flores

Small ruminant lentiviruses (SRLV) include caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) and Maedi Visna virus (VMV), causing chronic degenerative inflammatory lesions in various organs: joints, lung, brain and mammary gland of sheep and goats. Transmission occurs naturally between sheep and goats when in conditions of cohabitation in some genotypes of SRLV as A1 - A4, A6 and B2 because they have the ability to cross the interspecies barrier. In this paper a sampling was done in herds of sheep and goats in Culiacan, Sinaloa, where there has been clinical signs suggestive of infection with SRLV. The objective was to identify the presence of antibodies against SRLV, to do 141 sheep sera (n = 70) and goats (n = 71) were analyzed. Included sampling at 4 flocks where live sheep and goats in the same herd, one of the flocks with suggestive infection arthritis encephalitis and 3 flocks with no history of clinical signs clinical signs. Detection of antibodies was performed by indirect ELISA using two synthetic peptides as antigen (126M1 and 126m2) which detect antibodies to the viral protein TM45 and competitive ELISA using the commercial kit VMRD that detects antibodies against the viral protein SUgp135. The results were 19 goats and 0 sheep by competitive ELISA positive; 19 goats and 2 sheep by indirect ELISA positive 126 M1 and 28 goats and 14 sheep by indirect ELISA positive 126m2. This work demonstrates the presence of infection in the four ranches SRLV sampled in Culiacan, Sinaloa, with more sensitivity and specificity in indirect ELISA 126m2 compared to competitive ELISA VMRD.

Keywords: small ruminant lentiviruses, ELISA, serological diagnosis.

I. INTRODUCCIÓN

Los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) son un grupo de virus altamente heterogéneo que incluyen al virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) y al virus del Maedi Visna (VMV) (Gazarian *et al.*, 2011). Pertenecen a la familia *Retroviridae*, y género *Lentivirus*, causan infecciones crónicas degenerativas en caprinos y ovinos, caracterizadas por caquexia, disnea, encefalitis, artritis y mastitis (Reina *et al.*, 2010).

En un estudio se indica que bajo condiciones de cohabitación entre ovinos y caprinos, aproximadamente el 50% de los animales no expuestos (sanos) pueden infectarse con el virus de LvPR y presentar un resultado positivo por serología en un lapso no mayor a 6 meses, encontrándose el biotipo genético B2 por PCR (Pisoni *et al.*, 2005).

La principal ruta de transmisión ocurre a través de la ingestión de calostro y leche infectada con partículas virales libres o incorporadas a las células somáticas (Greenwood, 1995). Sin embargo, el contacto directo prolongado con secreciones provenientes de animales infectados, representa un factor de riesgo importante para la transmisión de los LvPR (Blacklaws, 2012).

El primer reporte de la infección por LvPR en México se publicó en 1984, donde caprinos de origen importado presentaron una seroprevalencia del 27.1% (Nazara *et al.*, 1985).

Ramírez y colaboradores en el 2011, realizaron un estudio en un hato mixto ubicado en la zona centro del país donde se encontró una seroprevalencia del 80% detectado por una ELISA indirecta (iELISA), derivado de este estudio, se logró la caracterización genética de la cepa viral circulante en el rebaño, el cual fue clasificado dentro del subtipo B1 (Ramírez *et al.*, 2011).

En Culiacán, Sinaloa se ha observado signos clínicos sugerentes a una infección asociada al VAEC en caprinos y en el 2012 se realizó un muestreo en hatos caprinos encontrando una seroprevalencia del 24,3% (Gómez, 2012).

La cohabitación de ovinos y caprinos en condiciones de pastoreo como práctica común, puede representar un factor de riesgo para la transmisión de LvPR, entre estas dos especies. La mayoría de ellos permanecen como portadores sanos, lo que representa un riesgo sanitario en la comercialización de ovinos y caprinos, si no se establece un diagnóstico rutinario y la detección de la

infección en etapas tempranas. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es identificar la presencia de la infección por LVPR en caprinos y ovinos.

1.1 Antecedentes

El virus de Maedi Visna (VMV) fue descrito en Islandia por Sigurdsson et al., 1957. Sin embargo los signos y síntomas de la enfermedad habían sido descubiertos con anterioridad en Sudáfrica en 1915, de lo que se descubrió como un problema respiratorio crónico en ovejas (de la Concha-Bermejillo, 1996; Pepin et al., 1998; Vega, 2006). En México el primer estudio de seroprevalencia del VMV fue en el 1983 a partir de muestras con lesiones en pulmón recolectadas de rastros del Estado de México y el Distrito Federal y que fueron analizadas por inmunodifusión (Ramírez y Trigo, 1983).

El virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) fue aislado por primera vez en el año de 1980 en Estados Unidos, a partir de membrana sinovial de una cabra con artritis (Crawford y Adams, 1981). En México se presentaron evidencias del aislamiento e identificación del virus en el año de 1986 (Gay et al., 1986; Trigo, 1991).

1.2 Agente etiológico

El virus de Maedi Visna y el virus de la artritis encefalitis caprina, designados actualmente como lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR), pertenecen a la familia *Retroviridae*, que se subdivide en 7 géneros: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gamaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Lentivirus y Spumavirus. En el género Lentivirus se encuentran 9 especies que son: Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipos 1 y 2 (VIH), Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS), Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF), Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE), Virus de la Inmunodeficiencia Bovina (VIB), VMV y VAEC (Nieves, 2004; Leroux y Mornex, 2008).

El género Lentivirus presenta diferencias en el tropismo celular y en el desarrollo de la enfermedad, por lo que se pueden dividir en dos grupos: (el primero puede incluir al VIH, VIS y VIF) los cuales se replican en linfocitos y macrófagos causando un síndrome de inmunodeficiencia adquirida y una enfermedad órgano específica de los pulmones, sistema nervioso central (SNC) y tracto gastroentérico; el segundo grupo, éstos se replican predominantemente en macrófagos, no afectan linfocitos (es por ello que no hay inmunosupresión) y causan una enfermedad órgano específica del SNC, pulmón y articulaciones (Bruett et al., 2000).

Los lentivirus están compuestos de aproximadamente 60% proteína, 25% lípidos, 3% carbohidratos y 1% de ARN (Peturson et al., 1992; ICTV, 2009). Tiene la morfología típica de los Retrovirus, el virión tiene un diámetro de entre 80-100 nm, con proyecciones de 8 a 10 nm de longitud en la superficie, las cuales están constituidas por glicoproteínas. En el interior de la nucleocápside se encuentran el genoma, la transcriptasa reversa, la proteasa y la integrasa. Rodeando a la nucleocápside se encuentra la cápside que tiene morfología icosaédrica con cerca de 60 nm de diámetro (Peturson et al., 1992; Murphy et al., 1999) (Figura 1).

Los LvPR se caracterizan por tener 3 genes principales organizados de la siguiente forma: 5' gag-pol-env 3'. El gen gag (antígeno específico de grupo) que tiene un tamaño de 1229 a 1479 bases, el gen pol (polimerasa) de 2934 a 3333 bases y el gen env (de la envoltura) de 2549 a 2999 bases.

El gen gag codifica 3 proteínas: CA (p25), NC (p14) y MA (p17) que estimula una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección (Bertolotti et al., 2011). El gen pol codifica la RT, la enzima dUTPasa, necesaria para la infección en los macrófagos, la IN que facilita la integración del provirus en el genoma de la célula y la PRO, esencial para la infectividad y maduración del virus (Foley, 2000). El gen env codifica las proteínas de envoltura, la TM (gp45) y la SU (gp135) que contiene los epítomos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes y ésta además interviene en la interacción del virus con el receptor de la célula hospedadora (Peturson et al., 1992; Murphy et al., 1999) (Figura 1 y 2).

Los LvPR tienen genes accesorios o reguladores:

1. vif (factor de infectividad viral), es el único gen accesorio conservado en el genoma de los LvPR que induce una respuesta débil inmune *in vivo*. Este gen se requiere para una eficiente replicación y patogenicidad del virus *in vivo* (Ramírez, 2010).
2. vpr-like (antes llamada tat) previene la terminación prematura de la transcripción incrementando la expresión génica viral *in vivo* (Ramírez, 2010).
3. Rev (regulador de la expresión de proteínas del virión) codifica una proteína que está involucrada en los empalmes de los transcriptos de RNA viral. Este gen se localiza en una pequeña región de la extremidad 5' del gen env y una región más grande en la región 3' del mismo gen (Saltarelli et al., 1990;

Peturson et al.,1992; Coffin, 1996; Murphy et al.,1999;Daltabuit, 2006; Ramírez, 2010) (Figura 2).

La región LTR (long terminal repeats) no codifica ninguna proteína, su tamaño oscila entre 358 y 447 bases y se divide en tres zonas: U3, R y U5 (Figura 2). La función de la LTR es la de proporcionar sitios de unión a factores de transcripción celulares, con el fin de activar la transcripción y regular las fases latentes y productivas (Saltarelli et al., 1990; Ramírez, 2010).

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 reciente. De acuerdo con dicha clasificación basada en dos regiones genéticas de los LvPR (genes gag-pol, de 1.8 kilobases (kb) y el 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 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 (Kuhar y Barlic-Maganja, 2012), en el genotipo B se han reconocido B1-B3 (Bertolotti et al., 2011) y en el genotipo E se han reconocido dos subtipos E1 y E2 (Reina et al.,2010).

Los genotipos B, C y D, así como sólo 9 de los 15 genotipos A (A1, A3, A4, A5, A6, A9, A11, A12 y A13) infectan tanto ovinos como caprinos. Los demás subgrupos y grupos genéticos se han descritos solamente en infecciones de una de estas especies: 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 (Pisoni et al., 2010).

1.2.1. Ciclo de replicación viral

Una vez en el hospedero, el ciclo de replicación del virus comienza cuando se une mediante las proteínas de superficie (SU) a un receptor se la célula blanco (células del sistema fagocítico-mononuclear) (Rauddi,2005; Cunha et al.,2001). No se conocen los receptores específicos de los LvPR, sin embargo, Crane et

al., 1991 identificaron receptores de membrana con un peso aproximado de 15kD, 20kD y 30kD y Crespo et al., 2011 establecen la participación de los receptores de mananas en el proceso de infección con LvPR. La unión entre el virus y su receptor activa la fusión de las membranas viral y celular (Figura 3.a), y permite la entrada del conjunto central CA-NC-ARN a la célula (Figura 3.b). una vez dentro de la célula se activa la Transcriptasa reversa (TR) que utiliza genoma de ARN del virus como molde para sintetizar una copia de ADN (ADNc) (Figura 3.c). La transcripción reversa del genoma del virus genera en los extremos del ADNc, regiones no codificantes llamadas repeticiones terminales largas (LTR). Estas secuencias son necesarias para la integración del genoma viral en el genoma celular, y también indican el sitio de inicio y término de la transcripción. El ADNc se importa al núcleo a través de un mecanismo de transporte que requiere energía. Una vez dentro del núcleo, la enzima IN cataliza la integración estable del ADNc al genoma de la célula infectada; al genoma viral integrado en el genoma de la célula se le conoce como provirus (Figura 3.d). El provirus permanece latente hasta que el monocito madura como macrófago, en este momento se empiezan a transcribir los genes codificados en el genoma viral (Figura 3.e). Los ARN mensajeros (ARNm) son traducidos a proteínas (Figura 3.f), que son ensambladas junto con ARN genómico para formar la estructura viral. Estas estructuras son liberadas por gemación a través de la membrana plasmática (Figura 3.g) sin producir lisis celular (virus no citocida). Este modo de replicación del virus asegura la continuidad de la infección. En algunas ocasiones, la acumulación excesiva del complejo genómico Gag en la membrana plasmática de la célula infectada produce viriones inmaduros que se procesan mediante la proteasa viral (PR), la cual induce la reorganización interna de la estructura viral (maduración) (Rauddi, 2005; Cunha et al., 2001).

1.3. Patogenia

Las principales vías de infección en los animales son la ingestión de calostro y/o leche que contienen virus libres o asociados a células y la vía respiratoria en el caso de VMV.

Los LvPR son absorbidos en el intestino del recién nacido en la célula blanco infectada (monocito/macrófago). La maduración de monocito a macrófago, está

relacionada con el aumento de la replicación viral; sin embargo, los monocitos (célula infectada de forma latente) son capaces de diseminar el virus a otros órganos y así eluden la respuesta inmune del huésped, este mecanismo es conocido “Caballo de Troya” (Peluso et al., 1988; Narayan y Clement, 1989). Cuando del animal se infecta se observa una breve viremia, que es cuando el antígeno viral se expone al sistema inmunológico, y da lugar a la síntesis de anticuerpos en el hospedador y se produce la seroconversión. Después de la viremia inicial la infección entra en un etapa de latencia que puede durar desde semanas, e incluso años (Cheevers y McGuire, 1988; Blacklaws et al., 1995). En la etapa de latencia el virus se está replicando continuamente en una cantidad baja, sobre todo en los ganglios linfáticos y es captado por células presentadoras de antígeno y van a ser rodeadas de linfocitos. Esto va a dar origen a los focos de inflamación que se observan en los tejidos blanco y que conducen a la aparición de los signos (Figura 4).

El virus se va a replicar en monocitos y macrófagos de la sangre, pulmón, bazo y médula ósea de animales infectados (Gendelman et al., 1985; Peluso et al., 1988). También se han identificado otras células que soportan la replicación viral e incluyen células dendríticas, células del sistema nervioso, células epiteliales y fibroblastos del plexo coroideo (Brodie et al., 1993).

1.4. Cuadro clínico

Las infecciones que causan los LvPR se caracterizan por ser infecciones lentas, persistentes y progresivas, que comienzan de forma subclínica y terminan con la generación de diferentes órganos llevándolos a la muerte. El periodo de incubación puede variar de días, meses hasta años, aunque el porcentaje de animales infectados puede ser alto en algunos rebaños, el número de animales que manifiestan una o múltiples formas clínicas de LvPR, varía de rebaño en rebaño (de la Concha-Bermejillo, 1999). Algunos animales pueden estar infectados y no presentar signo clínico alguno. En ovinos y caprinos las manifestaciones varían según la especie (Cuadro 5).

1.4.1. Forma pulmonar

En ovinos es la manifestación predominante; el primer signo que se puede apreciar es la pérdida de peso que puede llegar a caquexia. La manifestación clínica más importante es la neumonía crónica con signos de falla respiratoria

progresiva, sin fiebre, que generalmente afecta a ovinos de entre 2-4 años de edad. Sin embargo, es factible que más de una manifestación clínica se observe en un mismo animal. Inicialmente los animales afectados se retrasan cuando se trasladan de una pradera a otra y desarrollan intolerancia al ejercicio (Petursson et al., 1990; Lujan y Bandiola, 2001). Conforme la enfermedad progresa, la respiración se vuelve gradualmente más difícil. Posteriormente presenta esfuerzos respiratorios abdominales con extensión del cuello que son evidentes, acompañada de jadeo, distensión de los ollares, respiración por el hocico. A la auscultación los ruidos respiratorios se acentúan y los estertores se vuelven aparentes. Borregas afectadas frecuentemente paren a corderos pequeños y débiles. Infecciones bacterianas secundarias son comunes durante las fases terminales de la infección y los animales afectados generalmente presentan fiebre, descarga nasal purulenta, tos y depresión. Una vez que la enfermedad se vuelve obvia clínicamente, los animales afectados, mueren dentro de los siguientes 8-12 meses (Watt et al., 1995).

Las lesiones macroscópicas consisten en un aumento de peso y de volumen de los pulmones que no colapsan al realizar la necropsia y pueden contener múltiples focos de 1 a 1.5 mm de diámetro de color gris y bien demarcados (Ramírez, 2010). Microscópicamente hay engrosamiento del septo interalveolar con infiltración de mononucleares, hiperplasia en células del músculo liso y fibrosis (Petursson et al., 1992; Brodie et al., 1998).

1.4.2. Forma articular

La artritis es la manifestación más importante en las cabras adultas. Los animales con una artritis avanzada presentan deformidades en las articulaciones y contracturas cuando se flexionan (Narayan y Clements, 1989). La artritis puede ser de forma unilateral o bilateral, algunos animales afectados pierden peso gradualmente y terminan postrados la mayor parte del tiempo, por lo que desarrollan úlceras en las articulaciones. La articulación más afectada es la del carpo y también las del tarso. La cantidad de líquido sinovial está aumentada, en ocasiones con fibrina, posee un color rojizo o pardusco y un conteo celular que va de 100 hasta 20 mil células/mm³ (valor normal menos de 100 células/mm³), de aquí el 90% son células mononucleares, principalmente

linfocitos y macrófagos (Narayan y Cork, 1990; Trigo, 1991; Petursson et al., 1992).

Microscópicamente, la lesión consiste en una sinovitis proliferativa crónica. Se puede apreciar una hiperplasia de la membrana sinovial con infiltración perivascular de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas. En casos avanzados se observa lesión degenerativa más que inflamatoria (Cheevers y Mcguire, 1988; Trigo, 1991).

1.4.2. Forma nerviosa

En cabritos de 2 a 6 meses de edad se observa principalmente leucoencefalomielitis, se caracteriza por ataxia unilateral o bilateral posterior, también se pueden observar cojeras (Díaz et al., 2005). En las fases iniciales la marcha es en pasos cortos, seguida de debilidad y postración. La afección nerviosa se manifiesta por inclinación de la cabeza, tortícolis y movimientos en círculos, no se presenta fiebre. El cerebro y la médula espinal muestran lesiones inflamatorias con infiltración de células mononucleares, de forma multifocal con gliosis astrocítica y desmielinización con permanencia de axones, así como reblandecimiento del tejido, que se van a manifestar con áreas de color pardo claro. Las meninges y el plexo coroideo a veces se ven afectadas con formación de folículos linfoides (Trigo, 1991; Petursson et al., 1992). La forma clínica nerviosa ha sido diagnosticada en numerosos rebaños de ovejas en el noroeste de España y han causado la pérdida de animales adultos y jóvenes (Benavides et al., 2007; Ramírez et al., 2010). Los síntomas nerviosos en ovinos ocurren en animales mayores de un año, generalmente.

1.4.4. Forma mamaria

La mastitis se presenta de manera insidiosa tanto en ovinos como en caprinos y la ubre se ve aumentada de tamaño, simétrica y dura. Algunos autores señalan que la glándula mamaria es más susceptible al virus que otros órganos, y que puede depender de la raza para que sea el órgano más afectado (Peterhans et al., 2004). La mastitis es indurativa difusa, bilateral crónica, no es dolorosa, los ganglios linfáticos supramamarios se hipertrofian. El signo que más se observa en los rebaños es una disminución en la producción de leche y esto lleva a pérdidas importantes en la explotación. En la glándula mamaria, en las etapas iniciales se observa una infiltración moderada

de células mononucleares e histiocitos en el estroma periductal así como aumento del tejido conectivo (Trigo, 1991). La mastitis por LvPR se caracteriza por una inflamación no supurativa con infiltrado difuso de células mononucleares (Petursson et al., 1992).

1.5. Respuesta inmune

Dentro de los problemas que presenta el sistema inmune para tratar la infección por LvPR, destaca que los anticuerpo contenidos en calostro y leche de animales seropositivos, no tiene un efecto protector para la descendencia, y no evita la infección de los recién nacidos (Martínez, 2003). La infección de los LvPR va a estimular en el hospedador una respuesta inmune mediada por anticuerpos y células que no son capaces de acabar con la infección y que mantienen a los animales infectados de por vida. Tras la infección existe un periodo largo asintomático en el que la carga viral es baja, seguido de un periodo corto sintomático que lo puede llevar a la muerte (Amorena et al., 2001).

Las células blanco principales de los LvPR son las de la línea monocito/macrófago, además de las células dendríticas. Estas células son las encargadas de captar antígenos y presentarlos a los linfocitos para desencadenar una respuesta inmune específica (Ryan et al., 2000).

Los monocitos pueden llevar el genoma viral, pero no permiten la infección productiva hasta que maduran a macrófagos y migran hacia los tejidos; como se mencionó previamente, los monocitos son llamados “caballos de troya” ya que tiene el papel de transportar el virus y no permitir que sea detectado por el sistema inmune (Peluso et al., 1988).

Una vez que la célula se transforma a macrófago, se dispara la expresión del virus. El incremento en la replicación viral conduce a la secreción de una importante producción de interferón- δ (IFN- δ) por los linfocitos T y células asesinas naturales (NK); este incremento, induce la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II, (CMH) con antígenos de la superficie viral, en macrófagos tisulares infectados y finalmente, la producción de citocinas y otros mediadores inflamatorios por el sistema inmune (Petursson et al., 1992).

1.5.1. Respuesta humoral

Los anticuerpos (Ac) presentes en la infección por los LvPR son de tipo precipitantes y neutralizantes, los primeros anticuerpo en aparecer son los anticuerpos precipitantes. Las razones por las que los anticuerpos neutralizantes son ineficientes para eliminar la enfermedad, puede ser por la capacidad de mutación del virus que implica la aparición de variantes antigénicas que estos no van a poder reconocer (Pepin et al., 1998). El tropismo de los LvPR hacia los macrófagos es un importante factor de infección ya que algunos epitopes pueden pasar desapercibidos al sistema inmune del hospedador (Begara et al., 1996).

La respuesta inmune desarrolla contra varias proteínas del virus, en particular a las glicoproteínas de envoltura env y a las codificadas por el gen gag (p14, p15, p17) (Daltabuit, 2006; Ramírez et al., 2010).

1.5.2. Respuesta celular

Se presenta entre la primera y cuarta semana post infección y disminuye de la cuarta a la doceava semana.

La respuesta de las células T desempeñan un papel crucial en controlar infecciones virales agudas y persistentes y se pueden considerar beneficiosa para el huésped. Sin embargo su participación en la protección de los ovinos y caprinos contra LvPR es polémica y aún confusa (Welsh et al., 2004; Klenerman y Hill, 2005; IVIS, 2007).

las células T citotóxicas (CD8) que se encuentran en caprinos y ovinos infectadas con LvPR, se consideran un importante control de la carga viral de los animales que tienen una infección persistente (Blacklaws et al, 1995). En infecciones por LvPR 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 inhibidoras. La producción de quimiotácticos estimula la migración de linfocitos a los órganos blanco provocando las lesiones características de los LvPR, que es una inflamación con infiltración linfocitaria. Así aumenta sobre todo la producción de interleucina 8 (IL-8), que se produce en mayor grado por los macrófagos alveolares de animales infectados, y que es responsable de atraer linfocitos y neutrófilos en casos de alveolitis por VMV. Además se ha observado que en

infecciones por VAEC se incrementa interleucina 16 (IL-16) en células de membrana sinovial y suero (Amorena, 2001; Daltabuit, 2006).

1.6. Transmisión

Los LvPR pueden ser transmitidos naturalmente atravesando la barrera entre especies en ambas direcciones (ovino-caprino) (Shah et al, 2004; Denner, 2007). Principalmente la transmisión ocurre de la madre a su descendencia a través del calostro y la leche, (Houwens et al., 1983; Peterhans et al., 2004; Blacklaws et al., 2004), sin embargo, existen otras rutas de diseminación como son: vía aerógena (que actualmente se considera la más importante para VMV), intrauterina, por loquios postparto de hembras infectadas, secreciones salivales, secreciones vaginales durante el nacimiento, contacto directo, iatrogénica y venérea (Radostits et al., 2000; Berriatua et al., 2003; Blacklaws et al., 2004).

1.6.1 Transmisión vertical

Línea germinal: no existe evidencia de que el genoma de LvPR esté presente en la "línea germinal" (Blacklaws et al., 2004).

Infección intrauterina/transplacentaria: se ha tratado en varios estudios y es la ruta más polémica. Algunos autores proporcionan evidencia a favor de esta ruta, mientras que otros divulgan resultados negativos. Lamara et al 2002 demostraron que las células epiteliales del oviducto de la cabra se pueden infectar in vitro con el virus de AEC, aunque no hay informes de que tales células sean infectadas in vivo (Blacklaws et al., 2004).

Vía calostrada y leche: como se mencionó anteriormente, ésta es la principal vía de infección. La infección se ve favorecida por el reclutamiento de células mononucleares infectadas hacia la glándula mamaria, de este modo, la cría puede ser infectada con su primera toma de calostro, ya que el intestino presenta alta permeabilidad las primeras horas de vida (Peterhans et al., 2004).

1.6.1 Transmisión horizontal

Vía aerógena: la fuente de infección es el fluido pulmonar expulsado al toser, pues va acompañado de monocitos y macrófagos alveolares infectados con el virus. Experimentalmente es posible la infección intranasal e intratraqueal (Torsteinsdottir et al., 2003). La transmisión aerógena es la más asociada al

confinamiento en corrales, sobre todo en invierno y puede aumentar la incidencia tanto con la edad como con el tiempo de exposición.

Vía venérea: se ha detectado la presencia de antígenos virales en las células epiteliales del aparato reproductor de machos caprinos, mediante la técnica de inmunohistoquímica, ELISA y PCR (Martínez, 2003; Ali Ahmad et al., 2008; Peterson et al., 2008; 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 (Ali Al Ahamad et al., 2008; 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 VAEC a través de la inseminación artificial, 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 la inseminación de hembras en este estudio. El semen fue contaminado con la cepa VAEC-Cork, con dos títulos infecciosos desconocidos encontrando hembras positivas por inseminación (De Souza et al., 2013).

Otra posible ruta de transmisión de los LvPR en forma horizontal, pero de forma indirecta, es a través de la transferencia de embriones. Si se tiene en cuenta que en la “transferencia de embriones” estos proceden de rebaños seronegativos, esta vía no parece que pueda crear ningún problema. Aun así, no se debe olvidar que se puede hallar ADN proviral en células del oviducto, por lo que no deja de constituir un riesgo (Nieves, 2004).

Se sabe que las maquinas ordeñadoras o las manos y toallas que contaminen la leche, pueden ser potenciales diseminadoras del virus.

En cuanto a la forma iatrogénica podría transmitirse la infección por agujas o instrumentos contaminados (Narayan et al., 1983).

1.7. Diagnóstico

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), 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), e hibridación in situ (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 (Pérez, 2005).

1.7.1. ELISA

La técnica de ELISA es fácil de realizar en laboratorios con un equipamiento mínimo (espectrofotómetro) y es conveniente para realizar análisis a gran escala en explotaciones con un gran número de animales, ya que es fiable para demostrar anticuerpos a LvPR en ovejas y cabras (OIE, 2004). La prueba presenta una alta sensibilidad, especificidad, rapidez, es automatizable y económica. Actualmente hay ELISAs disponibles de forma comercial en los que se utilizan formatos y diseños diversos; como la ELISA indirecta (ELISAI) y la ELISA competitiva (ELISAc) (de Andrés et al., 2005).

La preparación antigénica para esta prueba debe contener al menos uno de los antígenos principales de los LvPR, es decir la glicoproteína de la superficie (gp 135), la proteína transmembranal (gp 44), y la proteína de cápside (p 25) (Zanoni et al., 1994). La técnica de ELISA puede aplicarse también en la detección de anticuerpos en la leche pero, como los títulos de anticuerpo contra LvPR en la leche son más bajos que en suero, es de esperar una menor sensibilidad (OIE, 2004; Knowles et al., 1994). Ramírez et al., 2009 realizaron estudios con algunos kits de ELISA comerciales y los resultados que obtuvieron indican que pueden aplicarse para la detección de anticuerpos específicos

contra LvPR al líquido seminal, lo cual podría ser una buena elección para el control de la infección en los centros de inseminación artificial.

La especificidad de estos ensayos es generalmente alta, pero la sensibilidad muestra una gran variabilidad debido a la heterogeneidad antigénica de LvPR (Hermann-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 (Ramírez et al., 2013).

Existen ELISAs que utilizan como antígeno virus completo, el cual es obtenido a partir de cultivos virales altamente purificados, y en los que los conjugados son suero policlonales (Houwens 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.

Los ELISAs que utilizan anticuerpos monoclonales y antígenos de gran pureza se obtienen por técnicas de recombinación de ADN en cultivos bacterianos de *E. coli*, mediante el cual se obtienen grandes cantidades de antígeno viral altamente purificado. Entre dichas proteínas se encuentran la p14, p16 y p25, y la gp135 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).

Los ELISAs basados en oligopéptidos sintéticos tienen un mayor valor de pureza estructural debido a que los péptidos son derivados de la envoltura viral y forman parte de epitopos 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.

X. de Andrés y colaboradores en el 2013 probaron una técnica de ELISA indirecta con diferentes péptidos sintéticos como antígeno diseñados a partir de LvPR presente en España y descrito previamente como EV1, revelando que el ELISA basado en el péptido 98M (tipo A ENV-SU5) tiene una sensibilidad del 86%, especificidad de 98%; ELISA basado en el péptido 126M1 (ENV-TM) con

una sensibilidad de 82%; especificidad de 95% y 126M2 (ENV-TM) con una sensibilidad de 68% y especificidad de 88%.

Actualmente hay ELISAs disponibles de forma comercial en los que se utilizan otros diseños, como 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 (Cuadro 7) (Herrmann et al., 2003; Marínez, 2010). El fundamento de la prueba es la adhesión del antígeno (gp135) 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 al conjugado (peroxidasa de rábano); la adición del sustrato en estas condiciones producirán 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 resultará 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 630 nm para obtener el porcentaje de inhibición de la reacción (Franco, 2008).

1.7.2. IDGA

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 antígeno-anticuerpo 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).

1.7.3. Western Blot

El Western Blot (WB) también llamado inmunotransferencia 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 peroxidasa (conjugado) (Amorena et al., 1997). Una muestra se considera positiva si se detecta al menos dos proteínas virales diferentes (Daltabuit, 2006). Diversos autores han considerado al WB como la prueba de 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).

1.7.4. 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 (Saman et al., 1999).

1.7.5. PCR

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) 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 pos 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 et al., 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 se encontró un total de

72.2% de ovejas y el 28.8 de cabras positivas a 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

La forma pulmonar clínica de VMV y VAEC se debe diferenciar de enfermedades respiratorias crónicas como linfadenitis caseosa, neumonía supurativa crónica, neumonía verminosa y adenomatosis pulmonar ovina (Jaagsiekte). La mastitis se debe diferenciar de micoplasmosis crónica, así como de la de forma artrítica de esta agente. En sus estados iniciales, las formas neurológicas de VMV o VAEC se pueden confundir con listeriosis, Scrapie y migraciones parasitarias aberrantes (De Andrés et al., 2005).

1.9. 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 (Lujan-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 la infección.

Además se han descrito varios métodos eficaces para eliminar LvPR de rebaños infectados; la elección de éstos métodos depende de la prevalencia de la infección, del valor genético de los animales del rebaño y de los costos que sea posible asumir (Cuadro 6) (Peterhans et al., 2004).

Las medidas de control de la infección por LvPR con 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 (Cuadro 6) (Reina et al., 2009; Ramírez et al., 2010).

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 definidos, b) la selección e identificación 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 (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 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 induzcan anticuerpos neutralizantes ampliamente eficaces; en cuarto lugar los anticuerpos después de la vacunación pueden disminuir al 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 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).

1.10. Importancia económica

El impacto económico por la infección de LvPR es difícil de determinar. Las pérdidas económicas atribuibles a los LvPR pueden relacionarse con las producidas por efectos directos con la muerte y eliminación precoz de los ovinos y caprinos infectados, el aumento de la tasa de reposición anual y la disminución del crecimiento de ovejas y cabritos afectados, y por efectos indirectos como la propensión a sufrir infecciones secundarias, la disminución del valor en el mercado de los animales de rebaños infectados y la imposibilidad de poder comercializar a estos animales (Peterhans et al., 2004). Quizá en este punto es donde se puede convencer al productor de que tenga en cuenta lo mencionado anteriormente, dándole a detalle la pérdida en ganancias si tiene animales infectados con LvPR.

- Los animales tienen un bajo costo a la venta.
- Hay una prematura reposición por efectos directos con la muerte.
- Se aumentan los costos de reposición.
- Hay pérdida en la calidad y cantidad de la leche (10%, 25-30%).
- Hay aumento de células somáticas en leche.
- Habrá efectos adversos en la explotación (no se puede exportar) por la posible diseminación de la infección de LvPR.

(Martínez, 2007)

1.11. Lentivirus de pequeños rumiantes en México

En 1984 Adams et al realizaron un estudio con 3729 sueros de varios países incluyendo a México, para identificar la infección por el VAEC utilizando la prueba de Inmunodifusión en gel de agar 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, Queretaro 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 IDGA encontraron 47 caprinos seropositivos, lo 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 animales de raza pura.

En el año de 2003 se realizó un estudio serológico en cabras del estado de Yucatán con la técnica de IDAG, la cual detecta anticuerpos contra las proteínas gp 135 y p 28; 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 seropositividad 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 (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 reemplazos 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 VMV 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 VAEC 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 VMV 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%) de VMV en el año 2006 (De la Concha et al., 1999).

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. Esa 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 (Tórtora, 2008).

II. HIPÓTESIS

La infección causada por LvPR está presente en los hatos mixtos de ovinos y caprinos de Culiacán, Sinaloa.

III. OBJETIVOS

Objetivo general: Detectar la presencia de anticuerpos contra LvPR en rebaños mixtos de ovinos y caprinos de Culiacán, Sinaloa.

Objetivo específico: Detectar anticuerpos específicos contra LvPR en ovinos y caprinos con la técnica de ELISA indirecta y ELISA competitiva.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo en cuatro hatos mixtos de ovinos y caprinos del municipio de Culiacán, Sinaloa, en los cuales se ha observado caprinos con signos clínicos sugerentes a la infección por VAEC en uno de los ranchos mientras que en los otros tres no existen historiales ni signos clínicos referentes a la enfermedad. El tamaño de muestra se obtuvo a partir de la fórmula propuesta por Canon y Roe para determinar el tamaño de mínimo de muestra para demostrar la presencia de una enfermedad:

$$n = [1 - (1 - \alpha)^{1-E}] [N - ((E - 1)/2)]$$

Donde:

N = total de individuos en la población.

E = P x N. E es el número probable de individuos afectados y es igual a la prevalencia estimada por el número de individuos de la población.

α = nivel de confianza.

El procesamiento de las muestras se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) CENID-MICROBIOLOGÍA en el laboratorio de virología, el cual se localiza en el km 15.5 de la carretera federal México Toluca Col. Palo Alto México D.F. y en el Centro Médico Siglo XXI en el laboratorio de Inmunología, el cual se localiza en Av. Cuauhtémoc 330, Cuauhtémoc, Doctores, 06720 Ciudad de México, D.F.

Para la obtención de suero se tomó 5 ml de sangre con tubo vacutainer sin anticoagulante, por punción de la vena yugular, se esperó a la formación del coágulo y la separación del suero, los tubos fueron centrifugados a 1,500 rpm durante 10 minutos, y se realizaron alícuotas de 1 ml c/u, las cuales fueron almacenados a -20°C.

Una vez procesados los sueros se llevó a cabo la prueba para el diagnóstico serológico mediante una ELISA competitiva (cELISA) comercial que reconoce la proteína de envoltura gp135 y que presenta una sensibilidad y especificidad del 99% contra subtipos americanos (VMRD No. Cat. 289-5), de acuerdo a las especificaciones del proveedor:

- a) Las muestras y reactivos se dejaron a temperatura ambiente 30 minutos antes de comenzar la prueba.

- b) Se agregaron 50 µl de los controles positivo y negativo por duplicado cada uno.
- c) Se agregaron 50 µl de las muestras en los pozos de la placa sin diluir.
- d) Se deja incubando la placa por una hora a temperatura ambiente.
- e) Se lavaron tres veces los pozos de la placa con 250 µl de solución de lavado.
- f) Se agregaron 50 µl de conjugado en cada pozo.
- g) Se deja incubando la placa por 30 minutos a temperatura ambiente.
- h) Se realizaron tres lavados a los pozos con 250 µl de solución de lavado.
- i) Se agregaron 50 µl de la solución sustrato en cada pozo de la placa.
- j) Se deja incubando la placa por 20 minutos a temperatura ambiente.
- k) Se agregaron 50 µl de la solución de paro a cada pozo de la placa.
- l) Se realizó la lectura de la placa en un espectrofotómetro.

De acuerdo al punto de corte de la prueba, los animales que presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 35%, fueron considerados positivos y las que presentaron menor a 35% se consideraron negativas de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - (\text{Densidad óptima (D.O.) de la muestra} \times 100) / (\text{D.O. de control negativo}).$$

La lectura de densidad óptica (DO) de las microplacas se realizó a 650 nm.

Se realizó en todos los sueros la prueba de ELISA indirecta utilizando dos péptidos sintéticos que detectan anticuerpos IgG contra la proteína viral TM45: el péptido 126 M1 y 126 M2. Se corrigieron las lecturas de DO restando el valor de lectura del pozo sin antígeno al valor obtenido en el testigo positivo con antígeno. Se estableció el valor de D.O. de cada muestra en términos porcentuales contra el valor corregido del testigo positivo (S/P%). Siguiendo las instrucciones del fabricante del paquete, las muestras con valor S/P% igual o menor a 40% fueron consideradas negativas, con S/P% entre 40 y 50% sospechosas, y con valores S/P% iguales o mayores a 50% positivas.

- a) Colocar 100 µl en las posiciones A1, B1 y C1 de control negativo.

- b) Colocar 100 μ l en las posiciones A2, B2 y C2 de control positivo.
- c) Colocar 100 μ l de las muestras a partir de A3, B3 y C3 hasta H10, H11 y H12.
- d) Previamente a su distribución en los pozos diluir 1:20 el suero problema (por ejemplo 40 μ l de suero problema en 760 μ l de solución para diluir anticuerpos).
- e) Cubrir la placa con plástico adhesivo para sellar la parte superior de cada pozo
- f) Incubar una hora a 37°C.
- g) Lavar cinco veces cada pozo de la placa con solución de lavado.
- h) Añadir 100 μ l de conjugado 126M1 y 126M2 respectivamente a cada placa, cubrirla con plástico adhesivo.
- i) Incubar una hora a 37°C.
- j) Lavar cinco veces cada pozo de la placa con solución de lavado.
- k) Añadir 100 μ l de solución de sustrato e incubar durante 20 minutos a 20-25 °C.
- l) Exactamente a los 20 minutos medir la absorbancia de la reacción en los pozos a una longitud de onda de 405nm.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de los 141 sueros se obtuvieron 19 casos positivos de cabras y 0 casos de ovinos en los cuatros ranchos por ELISA competitivo VMRD como se describe en el cuadro 1, obteniendo una frecuencia total del 13.47% de animales positivos a LvPR; 20 casos positivos de los cuales 18 son caprinos y 2 son ovinos por ELISA indirecta 126M1 como se describe el cuadro 1, teniendo una frecuencia total de 14.18% y 42 casos positivos de los cuales 28 son caprinos y 14 son ovinos por ELISA indirecto 126M2 como se describe en el cuadro 1, teniendo una frecuencia total del 29.78%.

Cuadro 1. Frecuencias totales de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en 4 ranchos de Culiacán, Sinaloa

ELISA	Caprinos	Ovinos	Total	Frecuencia
cELISA	19	0	19	13.47%
iELISA 126 M1	18	2	20	14.18%
iELISA 126 M2	28	14	42	29.78%

cELISA: ELISA competitiva; iELISA: ELISA indirecta

En el rancho A se muestrearon un total de 15 caprinos y 15 ovinos de los cuales 3 ovinos y 6 caprinos resultados positivos solamente por la técnica de iELISA 126 M2 con una frecuencia del 30% como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Frecuencias de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en el rancho A

	cELISA	iELISA	
		126M1	126M2
Caprinos	0	0	6
Ovinos	0	0	3
Total	0	0	9
Frecuencia	0%	0%	30%

cELISA: ELISA competitiva; iELISA: ELISA indirecta

En el rancho B se muestrearon un total de 30 caprinos y 21 ovinos de los cuales 17 caprinos y 0 ovinos resultados positivos por cELISA con una frecuencia del 33.33%, así mismo iELISA 126M1 detectó 16 caprinos y 0 ovinos positivos con una frecuencia del 31.37%; iELISA 126M2 detectó 15 caprinos y 2 ovinos positivos con una frecuencia del 33.33% como se muestra en el cuadro 3. Cabe mencionar que 8 caprinos presentaron signos clínicos sugerentes al VAEC (artritis en los carpos) y todos resultaron positivos por ambas ELISAs.

Cuadro 3. Frecuencias de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en el rancho B

	cELISA	iELISA	
		126M1	126M2
Caprinos	17	16	15
Ovinos	0	0	2
Total	17	16	17
Frecuencia	33.33%	31.37%	33.33%

cELISA: ELISA competitiva; iELISA: ELISA indirecta

En el rancho C se muestrearon un total de 14 caprinos y 17 ovinos de los cuales 1 caprino y 0 ovinos resultados por cELISA con una frecuencia del 3.33% como se muestra en el cuadro 4; 1 caprino y 1 ovino positivos por iELISA 126M1 teniendo una frecuencia del 6.66%; 2 caprinos y 2 ovinos positivos por iELISA 126M2 con una frecuencia del 13.33%.

Cuadro 4. Frecuencias de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en el rancho C

	cELISA	iELISA	
		126M1	126M2
Caprinos	1	1	2
Ovinos	0	1	2
Total	1	2	4
Frecuencia	3.33%	6.66%	13.33%

cELISA: ELISA competitiva; iELISA: ELISA indirecta

En el rancho D se muestrearon un total de 12 caprinos y 17 ovinos de los cuales 1 caprino y 0 ovinos resultados por cELISA con una frecuencia del 3.33% como se muestra en el cuadro 5; 1 caprino y 1 ovino positivos por iELISA 126M1 teniendo una frecuencia del 6.66%; 5 caprinos y 7 ovinos positivos por iELISA 126M2 con una frecuencia del 40%.

Cuadro 5. Frecuencias de LvPR en pequeños rumiantes por ELISA en el rancho D

	cELISA	iELISA	
		126M1	126M2
Caprinos	1	1	5
Ovinos	0	1	7
Total	1	2	12
Frecuencia	3.33%	6.66%	40%

cELISA: ELISA competitiva; iELISA: ELISA indirecta

El diagnóstico de las infecciones causadas por LvPR puede hacerse clínicamente, aunque sólo el 30-35% de los animales afectados desarrollan signos clínicos (Pisoni *et al.*, 2005) por lo que el método más rápido y de apoyo para realizar el diagnóstico a la infección de LvPR es a través de la serología.

Las pruebas serológicas constituyen una herramienta fundamental para la detección de la infección en un rebaño y se cuenta con una gran variedad de métodos que incluyen IDAG, ELISA y WB (Brinkhof *et al.*, 2010) de los cuales ELISA es la más recomendada como prueba de referencia (OIE, 2004) ya que permite trabajar con un mayor número de muestras por un menor costo en comparación con otras técnicas (Herrmann, 2010).

Los resultados demostrados en el presente trabajo evidencian que ELISA indirecta 126M2 detecta más ovinos y caprinos con infección a LvPR tanto en animales con signos clínicos como en animales asintomáticos en comparación con ELISA indirecta 126M1 y ELISA competitiva VMRD; éste resultado es diferente a lo obtenido en el trabajo realizado por de Andrés *et al.*, 2013 dónde

encontró que iELISA 126 M1 es la técnica que más detecta ovinos y caprinos infectados con LvPR en comparación con iELISA 126M2 esto puede deberse a que en España predomina el genotipo VMV en pequeños rumiantes y en México predomina el genotipo VAEC.

Arcila et al., 2012 detectó anticuerpos contra LvPR por iELISA en fetos ovinos y caprinos en la ciudad de México obteniendo una frecuencia de 7.5% (n=9) de fetos positivos y 4.2% (n=4) de fetos sospechosos, además de corroborar la infección uterina de madre a cría, se demuestra la presencia de LvPR en México al igual que el trabajo realizado con Martínez et al., 2011 donde se evaluó anticuerpos contra LvPR en semen de ovinos y caprinos procedentes de Querétaro, Coahuila, Estado de México, Guanajuato, Puebla e Hidalgo por la técnica de cELISA.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados demostrados en el presente trabajo evidencian la presencia de la infección por LvPR tanto en ovinos como en caprinos de cuatro hatos mixtos de Culiacán, Sinaloa. iELISA 126M2 detecta más ovinos y caprinos infectados por LvPR en comparación con iELISA 126M1 y cELISA ya que se obtuvo una frecuencia total de 29.78% a la infección de LvPR en cuatro ranchos con 141 sueros analizados.

VII. LITERATURA CITADA

- Sigurdsson, B., Grimsson, H, Palsson, P.A. 1957. Maedi a chronic progressive infection of sheep lungs, J.Inf. Dis. 233-241..
- Pepin, M., Vitu Ch., Russo P., Mornex JF., Peterhans E. 1998. Maedi-Visna virus infections in sheep; a review. Vet Res. 29;341-367.
- De la Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ. 1996. Shedding of ovine lentiviruses in the semen of infected rams. Amer. J. Vet. 57;684-688.
- Vega A.M. 2006. "Estudio epidemiológico y experimental en la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de raza Latxa del País Vasco". Tesis doctoral. Universidad de León. Facultad de Veterinaria. España.
- Ramírez C, Trigo F.J. 1983.Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la neumonía progresiva ovina en México. Reunión de investigación pecuaria en México.
- Crawford, T.B, Adams D.S. 1981.Caprine arthritis-encephalitis; clinical features and presence of antibody in selected goat population. J.Am. Vet. Med. Assoc. 178;713-719.
- Gay, G., Valdivieso, N., Tron, F., Enríquez O. 1986.Informe preliminar del aislamiento viral del virus productor de la artritis encefalitis caprina en México. Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México-SARH, México DF. 215.
- Trigo, THJ. 1991. La Artritis Encefalitis Caprina. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Ciudad Universitaria. México D.F. Ciencias Veterinarias. 5;49-66.

Murphy, FA., Gibbs, EP., Horzinek, MC., Studdert, MJ. 1999. Vet Virol, 3rd edition. Academic Press.

Nieves, PBM. 2004. Seguimiento de la infección por el virus de Maedi-Visna en una explotación de ganado ovino. Tesina de licenciatura. Departamento de salud animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense.

Leroux, C., Mornex, JF. 2008. Retroviral infections in sheep and yhe associated diseases. Small Ruminant Res.76;68-76.

Bruett, L., Barber, SA., Clement, JE. 2000. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. Virol. 271;132-141.

Petursson, G., Andresdóttir, V., Andresson, OS., Georgsson, G., Palsson, PA., Rafnar, B., Torsteinsdóttir, S. 1992.Lentivirus diseases of sheep and goats research: Maedi-Visna and Caprine Arthritis Encephalitis. Progress in sheep and goat research. Oxford: Speedy A. W. 107-129.

International Classification Taxonomy Viruses. (ICTV). 2009.Cite this publication as: ICTV dB Management. 00. 061. 06. Lentivirus. The Universal Virus Database, versión 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

Saltarelli, M., Querat, G., Konings, DA., Vigne, R., Clements, JE. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analylisis of molecular clones of CAEV wich generate infectious virus. Virol. 347-364.

Ramírez, AH. 2010. "Contribución al diagnóstico y a la filogenia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes". Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra, Departamento de Producción Agraria. Instituto de Agrobiotecnología. Pamplona, España.

- Coffin, JM. Retroviridae. 1996. The viruses and their replication, in: Fields. B.N. Knipe, DM, Howley PM (Eds) Lippincot-Raven Publisher Philadelphia. 1767-1835.
- Daltabuit, TME. 2006. "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. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología Animal. Universidad de Zaragoza, España.
- Zanoni, RG., Vogt, HR., Pohl, B., Bottcher, J., Bommeli, W., and Peterhans, E. 1998. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentivirus. J. Vet. Med. B. 41.
- Shah, C., Huder, JB., Boni, J., Schonmam, M., Muhler. J., Lutz, H., Schupbach, J. 2004. Direct evidence for natural transmission of small lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and viceversa. J. Virol. Meth. 118;123-130.
- Ryan,S., Tiley, L., McConnell, L., Blacklaws, B. 2000. Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. J. Virol. 74; 10096-10103.
- Rauidi, ML. 2005. Capacidad de unión al ARN genómico viral de mutantes de la proteína nucleocápside del virus de inmunodeficiencia de felinos (tesina de grado). Universidad de Belgrano, Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Cunha, AKH., Soares, R., Da Silva, MFT. 2001. Lentivirus de pequeños rumiantes (CAEV y Maedi-Visna): revisión y perspectivas. Pesq. Vet. Bras. 21(3):87-97.
- Crane, SE., Buzy, J., Clements, JE. 1981. Identification of cell membrane protein that bind visna virus. J. Virol. 65(11): 6137-6143.

- Peluso, R., Haase, AT., Stowring, L., Edwards, M., Ventura, P. 1988. A Trojan horse mechanism for the spread of visna virus monocytes. *Nucleic Acids Res.* 16; 4116-4173.
- Narayan, O., Clements, JE. 1989. Biology and Pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virology.* 70; 1617-1639.
- Cheevers, WP., McGuire, TC. 1988. The lentiviruses: Maedi-Visna, Caprine Arthritis Encephalitis and Equine Infectious Anemia. *Adv. Virus Res.* (34); 189-215.
- Blacklaws, BA., Bird, P., Allen, D., Roy, DJ., MacLennan, IC., Hopkins, J., Sargan, DR., McConnell, I. 1995. Initial lentivirus-host interactions within lymph nodes: a study of maedi-visna virus infection in sheep. *J. Virol.* 69; 1400-1407.
- Gendelman, HE., Narayan, O., Molineaux, S. 1989. Persistent replication of lentivirus role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc, Natl. Academic. Sci. USA.* 82;7086-7090.
- Brodie, SJ., Pearson, LD., Snowden, GD. 1993. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Arch. Virol.* 130; 413-428.
- Bertolotti, L.; Mazzei, M.; Puggioni, G.; Carrozza, M.L.; Dei Giudici, S.; Muz, D.; Juganaru, M.; Patta, C.; Tolari, F.; Rosati, S. 2011. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. *J. Gen. Virol.*, 92; 1923–1929.
- Foley, B.T. 2000. An Overview of the Molecular Phylogeny of Lentiviruses. In *HIV Sequence Compendium*; Kuiken, C., Foley, B., Freed, E., Hahn, B., Korber, B., Marx, P.A., McCutchan, F., Mellors, J.W., Mullins, J.I., Sodroski, J., Wolinsky, S., Eds.; Theoretical Biology and Biophysics

Group, Los Alamos National Laboratory: Los Alamos, NM, USA; pp. 35–43.

Reina, R.; Bertolotti, L.; Dei Giudici, S.; Puggioni, G.; Ponti, N.; Profiti, M.; Patta, C.; Rosati, S. 2010. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet. Microbiol.*, 144; 24–31.

Kuhar, U.; Barlic-Maganja, D.; Grom, J. 2012. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses detected in Slovenia. *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic..08.024.

Pisoni, G.; Bertoni, G.; Manarolla, G.; Vogt, H.R.; Scaccabarozzi, L.; Locatelli, C.; Moroni, P. 2010. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology*, 407, 91–99.

Benavides, J., García-Pariente, C., Ferreras, MC., Fuertes, M., García-Marín, JF., Pérez, V. 2007. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4 and 6 month old lambs. *J. Vet.* (174);655-658.

Peterhans, E., Greeland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., Eliaszewicz, M., Juste, RA., Krassing, R., Lafont, JP., Lenihan, P., Petursson, G., Pritchard, G., Thorley, J., Vitu, C., Mornex, JF., Pepin, M. 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 35;257-274.

Amorena, B., González, B., Andres, S., de Andrés, D., Vargas, A., Lujan, A. 2001. “Mecanismos patológicos y respuesta inmune” *OVIS*; 27-40.

Begara, I., Luján, L., Collie, DD., Miller, HR., Watt, NJ. 1996. Early pulmonary cell response during experimental Maedi-Visna virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55;115-126.

- Welsh, RM., Selin, LK., Szomolay-Tsuda, E. 2004. Immunological memory to viral infections. *Annu. Rev. Immunol.* 22;714-743.
- Klenerman, P., Hill, A. 2005. T cell and viral persistence lesions from diverse infections. *Nat. Immunol.* 9;873-879.
- Ivis. 2007. In: *Recent Advances in Goats Diseases*. Tempesta. (Ed) International Service, Ithaca, NY. (www.ivis.org). Last updated 24/07/
- Denner, J. 2007. Transspecies transmissions of retroviruses: New cases. *Minireviews. Virol.* 369;229-233.
- Houwers, DJ., Koenig, G., de Boer, GF., Schaake, J. Jr. 1983. Maedi-Visna control in sheep I. Artificial rearing of calostrum-derived lambs. *Vet. Microbiology.* 8;179-185.
- Blacklaws, BA., Beriatua, E., Torteinsdottir, S., Watt, NJ., de Andres, D., Klein, D., Harkhiss, GD. 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiology.* 101;199-208.
- Radostits, OM., Gay, CC., Blood, DC., Hinchcliff, KW. 2000. *Veterinary Medicine*. 9th Edition. WB Saunders Company. Ltd. London.
- Berriatua, E., Alvarez, V., Extramania, B., Gonzalez, L., Daltaubuit, M., Juste, RA. 2003. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna in Basque dairy sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* 60; 265-279.
- Lamara, A., Fieni, F., Mselli-Lakhal, L., Trainturier, D., Chebloune, Y. 2002. Epithelial cells from goats oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Res.* 87;69-77.

- Torsteinsdottir, S., Mattiasdottir, S., Vidarsdottir, N., Svansson, V., Petursson, G. 2003. Intratracheal inoculation as an efficient route of experimental infection with maedi visna virus. *Res. Vet. Sci.* 75;245-247.
- Martínez, RHA. 2003. Diseminación del VAEC a partir de machos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor. Tesis doctoral. FESC UNAM.
- Ali al Ahmad, MZ., Fieni, F., Pellerin, JL., Guiguen, F., Cherel, F., Chatagnon, G., Bouzar, AB., Chebloune, Y. 2008. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and genital tract tissues of male goat. *Theriogenol.* 69;473-480.
- Peterson, K., Bronkhof, J., Houwers, DJ., Colenbrander, B., Gadella, BM. 2008. Presence of prolentivirus DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminant. *Theriogenology.* 69;433-442.
- 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., Grillo, MJ., de Andrés, D., Amorena, B. 2009. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenol.* 72;1085-1096.
- De souza, KC., Pinheiro, RR., Santos, DO., de Brito, RL., Rodrigues, AS., Sider, LH., Paula, NRO., Avila, AA., Cardodo J de FSAA. 2013. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination.
- Díaz, AE., Aguilar, RF., Vázquez, NJ. 2008. Manual para el diagnóstico de enfermedades de ovinos y caprinos en México. Comité de salud y producción ovina y caprina. CONASA. 26-28.

Brinkhof J.M.A., Moll L., Van Maanen, Houwers D.J. 2010. Use of serology and polymerase chain reaction for the rapid eradication of small lentivirus infections from a sheep flock. A case report. *Res. Vet.* 88;41-43.

Pérez S.A. 2005. "Identificación de anticuerpos contra proteínas de Lentivirus en machos ovinos por las técnicas de inmunoelectrotransferencia (Western Blot) y ELISA Indirecta". (Tesis de licenciatura). FESC. UNAM.

D. Andrés D, Klein N.J., Berriatua E. 2005. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses, *Ver. Microbiol.* 10;49-61.

Herrmann-Hoesing, L.M. 2010. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 843–855.

Martínez ...2011

VIII. ANEXOS

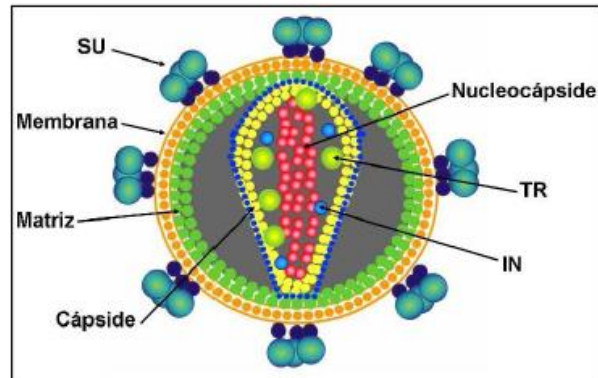


Figura 1. Estructura del LVPR. SU: Proteínas superficiales de la envoltura; TR: Transcriptasa reversa; IN: Integrasa. Tomado de Rauddi, 2005

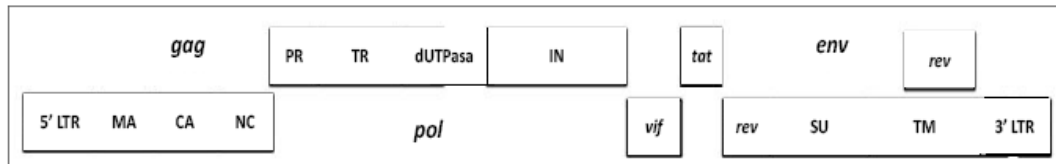


Figura 2. Organización general del genoma de LVPR. Tomado de Reina *et al*, 2009a, modificado por Norma Vázquez. *gag*, *pol* y *env*: genes principales; *vif*, *tat* y *rev*: genes accesorios; LTR: repeticiones terminales largas; MA: secuencia para la proteína MA; CA: secuencia para la proteína CA; NC: secuencia para la proteína NC; PR: secuencia para la proteína PR; TR: secuencia para la proteína TR; dUTPasa: secuencia para la proteína dUTPasa; IN: secuencia para la proteína IN; SU: secuencia para la proteína SU; TM: secuencia para la proteína TM.

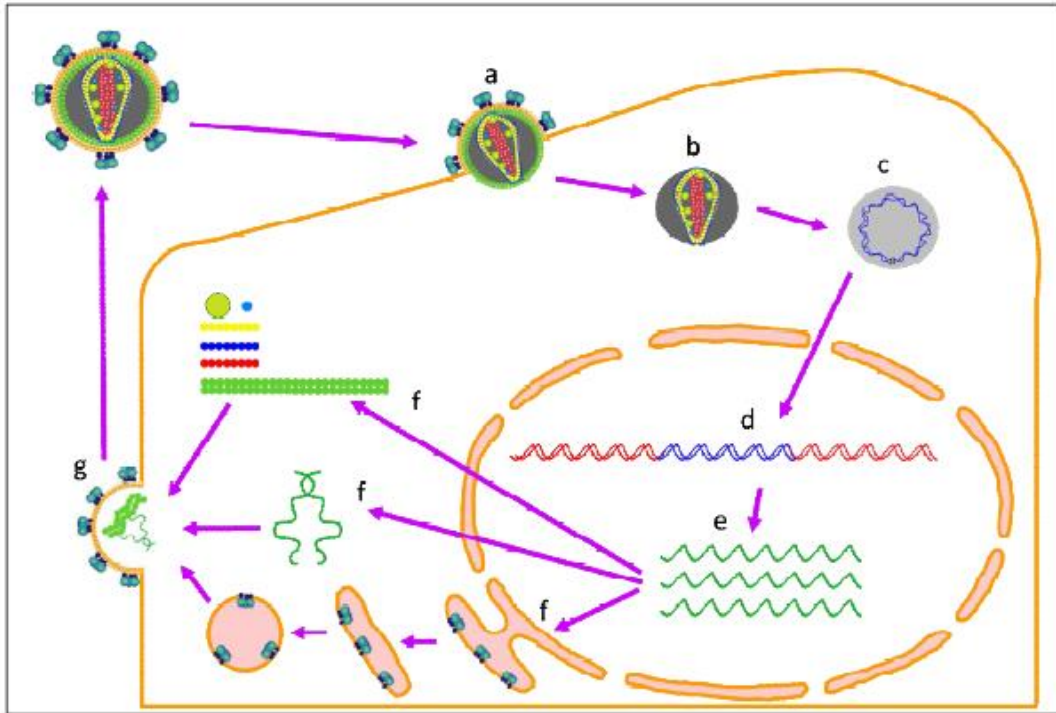
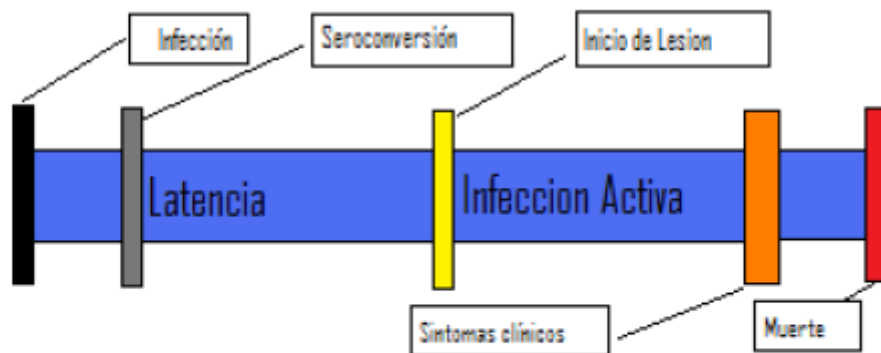


Figura 3. Ciclo de replicación viral. a. Unión a receptores de membrana y fusión con la membrana de la célula huésped. b. Entrada del complejo CA-NC-ARN. c. Síntesis del ADN. d. Integración al ADN de la célula huésped. e. Activación de la transcripción. f. Activación de la traducción. g. Ensamblaje de las partículas virales junto ARN genómico y liberación por gemación de un nuevo virión.

Figura 4. Patogenia de los LvPR



Fuente: Daltauit, 2006, Ramírez 2010

Cuadro 5. Signos clínicos de la infección por LvPR en caprinos y ovinos.

CAPRINOS		OVINOS	
Artritis crónica	++++	Problemas respiratorios crónicos	++++
Problemas respiratorios	+++	Mastitis	+++
Mastitis indurativa aséptica	++	Forma nerviosa	++
(Nerviosa) Leucoencefalomielitis		en Problemas articulares	+
cabritos de 2-6 meses edad	+		

Fuente: de la Concha-Bermejillo, 1999 + menos frecuente, ++ y +++ frecuente, ++++ signo principal

Cuadro 6. Medidas de prevención y control de LvPR

- 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).

Cuadro 7. Pruebas de diagnóstico comerciales para LvPR.

Prueba comercial	Tipo de prueba	Antígeno
Pourquier	AGID	p28
Veterinary Laboratory 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 y glicoproteínas de la cápside
IDEXX	IDEXX CAEV/MVV antibody ELISA test	No especificado por la casa comercial
IDEXX	IDEXX CAEV/MVV p28 antibody screening test	Péptido de proteína transmembranal (TM gen env) y de la proteína recombinante p28 que es componente de la cápside (gen gag)
IDEXX	IDEXX CAEV/MVV p28 antibody verification test	Péptido de proteína transmembranal (TM gen env) y de la proteína recombinante p28 (gen gag)
ELITEST	ELISA CAEV/MVV	Péptido sintético y proteína recombinante de envoltura viral
VMRD Inc	Caprine Arthritis Encephalitis virus Antibody Test Kit Celisa	Contiene anticuerpos monoclonales contra la gp135. ELISA tipo competitiva.