

ARTRITIS/ENCEFALITIS CAPRINA Y MAEDI-VISNA

RESUMEN

La enfermedad de Maedi-visna (MV) y la artritis/encefalitis caprina (AEC) son infecciones persistentes causadas por lentivirus de ovejas y cabras que se suelen agrupar como lentivirus de los pequeños rumiantes (LVPR). Maedi-Visna también se la conoce como neumonía progresiva ovina (NPO). Los análisis filogenéticos por comparación de las secuencias nucleotídicas del virus de MV (VMV) y del virus de la AEC (VAEC) han demostrado que se trata de lentivirus muy relacionados. Una fuente de transmisión del VAEC y del VMV es a través del calostro o por la leche. Se desconoce la fuente de transmisión horizontal en ausencia de lactancia; sin embargo se sabe que las heces y los fluidos pulmonares contienen virus infecciosos. Se han identificado lentivirus ovinos en la mayoría de los países que crían ovejas, con la notable excepción de Australia y Nueva Zelanda. La distribución del VAEC es mayor en países industrializados y parece coincidir con el movimiento internacional de razas europeas de cabras lecheras. Las formas clínicas y subclínicas de MV y de AEC se asocian con lesiones inflamatorias progresivas por células mononucleares en los pulmones, articulaciones, ubres y sistema nervioso central. La mamitis con induración es común en ambas especies hospedadoras y es posible que se subestime su importancia económica. La característica principal en ovejas infectadas es una respiración dificultosa asociada con emaciación causada por una neumonitis progresiva, mientras que en cabras el principal síntoma es una poliartritis. Sin embargo, la mayoría de las ovejas y cabras infectadas por lentivirus son asintomáticas, aunque permanecen como portadores persistentes del virus y son capaces de transmitir la infección por el calostro, la leche y las secreciones respiratorias. El sistema más práctico y fiable de confirmar un diagnóstico de MV o de AEC es una combinación de serología con examen clínico. Aunque la serología representa el método más económico para diagnosticar la infección en animales con infección persistente y clínicamente normales, hay que tener en cuenta que pueden tener lugar errores en las pruebas. La frecuencia de error depende de varios factores, incluyendo, pero no limitándose a: 1) el formato del ensayo, 2) la homología entre la cepa del virus usado en la prueba y las cepas de virus presentes en la población analizada, y 3) el antígeno usado en la prueba.

Identificación del agente: Se puede intentar el aislamiento de virus de casos clínicos o subclínicos vivos co-cultivando leucocitos de sangre periférica o de leche con cultivos celulares ovinos o caprinos adecuados, como células del plexo coroideo (VMV) o de la membrana sinovial (VAEC). El aislamiento del virus es muy específico pero tiene una sensibilidad variable. En necropsias, el aislamiento de virus es de realización más fácil mediante cultivos de los tejidos afectados, como pulmón, plexo coroideo, membrana sinovial o ubres. Además se pueden obtener post mórtem macrófagos alveolares del pulmón y co-cultivarlos con células susceptibles. Los efectos citopáticos son característicos y consisten en la aparición de células estrelladas refráctiles y sincitios. La presencia de VMV o de VAEC se puede confirmar mediante métodos de inmunomarcaje y por microscopía electrónica.

Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos: Se han descrito muchas pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tipo estándar y unas cuantas cuantitativas para detectar el provirus de MV y de AEC que se usan en la actualidad en muchos laboratorios para la detección rápida, cuantificación e identificación de las cepas de lentivirus de los pequeños rumiantes. La clonación y/o la secuenciación de los productos de la PCR es el método más directo para conformar la especificidad de los resultados de la PCR.

Pruebas serológicas: La mayoría de las ovejas y cabras infectadas poseen anticuerpos específicos detectables por varias pruebas serológicas diferentes. Las dos más utilizadas son la prueba de inmunodifusión en medio sólido y el enzoinmunoanálisis (ELISA). También se llevan a cabo técnicas de inmunoelectrotransferencia de tipo Western y de radioinmunoprecipitación, pero solo en laboratorios especializados. Para poblaciones de cabras lecheras puede ser apropiada una prueba de anticuerpos en leche. El tiempo requerido para la seroconversión después de la infección puede ser relativamente prolongado e impredecible, suponiendo meses más que semanas. Sin embargo, después de la seroconversión, la respuesta de anticuerpos persiste generalmente y las ovejas y cabras que son positivas para anticuerpo se consideran portadoras de virus.

Requisitos para las vacunas: No se dispone de vacunas.

A. INTRODUCCIÓN

El Maedi-visna (MV) de las ovejas y la artritis/encefalitis caprina (AEC) de las cabras son infecciones víricas persistentes causadas por lentivirus estrechamente relacionados (Minguijón *et al.*, 2015; Peterhans *et al.*, 2004). Maedi-visna también se conoce como neumonía progresiva ovina (NPO). Las ovejas se pueden infectar experimentalmente con AEC y las cabras con MV. Además, los análisis filogenéticos por comparación de las secuencias nucleotídicas del virus de MV (VMV) y de la AEC (VAEC) muestran claras indicaciones de una transmisión cruzada interespecífica entre ovejas y cabras de importancia epidemiológica, sin demostrar qué virus ha surgido del otro (Shah *et al.*, 2004a; 2004b). Las enfermedades MV y AEC se caracterizan por la persistencia duradera del agente causal en los monocitos y macrófagos del hospedador, y por un tiempo variable entre la infección y la inducción de una respuesta de anticuerpos antivíricos serológicamente detectable. La mayoría de las ovejas y cabras infectadas no manifiestan enfermedad clínica, pero permanecen persistentemente infectadas y son capaces de transmitir virus (Adams *et al.*, 1983; Crawford *et al.*, 1980).

Maedi-visna es un nombre islandés que describe dos de los síndromes clínicos reconocidos en ovejas infectadas por el virus de MV (VMV). “Maedi” significa “respiración dificultosa” y describe la enfermedad asociada a una neumonitis intersticial progresiva, y “visna” significa “contracción” o “deterioro”, que son signos asociados con una meningoencefalitis paralizante. Mientras la principal manifestación de la infección por VMV es una enfermedad pulmonar progresiva, el principal síntoma clínico de la infección por VAEC es una poliartritis crónica con sinovitis y bursitis. La encefalitis ocurre fundamentalmente por la infección de VAEC en cabritos de 2 a 6 meses de edad pero se necesita hacer un diagnóstico diferencial cuidadoso para desechar otros síndromes o infecciones en los cabritos. En ambos síndromes se presenta mamitis con induración. Los pulmones de las ovejas afectadas de MV no colapsan cuando se extraen del tórax y a menudo retienen la marca de las costillas. Los pulmones y los ganglios linfáticos aumentan de peso (hasta 2–3 veces su peso normal). Las lesiones se distribuyen por los pulmones, que se presentan uniformemente decolorados o moteados de color gris-marrón y con una textura firme. El diagnóstico de la enfermedad respiratoria causada por VAEC y del VMV se revisa en Chakraborty *et al.* (2014). Las ubres afectadas por MV presentan induración difusa y los ganglios linfáticos asociados pueden agrandarse.

Cuando se sospecha un caso clínico de MV o AEC, se puede obtener la confirmación del diagnóstico combinando la evaluación clínica, la detección y la identificación de los virus, o bien mediante serología y, cuando resulte necesario, el examen histológico de tejidos adecuados recogidos en las necropsias. Los tejidos importantes para examen son los pulmones para la neumonitis intersticial progresiva, el cerebro y la médula espinal para la meningoencefalitis, las ubres para la mamitis con induración, las articulaciones afectadas y el líquido sinovial para la artritis y los riñones para la vasculitis (Crawford & Adams, 1981). La naturaleza de la reacción inflamatoria es similar en cada sitio y consiste en una reacción intersticial de células mononucleares, en ocasiones con grandes agregados de células linfoides y formación de folículo.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de los virus de la artritis/encefalitis caprina y de Maedi-visna y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
Aislamiento del virus	–	–	–	+	–	–
Detección de antígeno	–	–	–	+	–	–
PCR	+	+	++	++	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
AGID	+	+++	++	+++	+++	+
CF	–	–	–	–	–	–
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	+
VN	–	–	–	–	–	+++
IFA	–	+	–	–	+	–

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; AGID = inmunodifusión en gel de agar; CF = fijación del complemento; LFD:

ELISA= enzimoimmunoanálisis; VN = neutralización vírica; IFA = inmunofluorescencia indirecta.

1. Identificación del antígeno

Normalmente no se intenta el aislamiento y la caracterización del VMV o del VAEC en el diagnóstico rutinario. Debido a la naturaleza persistente de estas infecciones, el establecimiento de un estado positivo respecto a anticuerpos es suficiente para identificar los portadores de virus. Sin embargo, debido a la lenta seroconversión después de la infección, en animales infectados recientemente la serología puede ser negativa.

Existen dos enfoques para aislar el VMV y el VAEC: uno se utiliza con el animal vivo, y el segundo con tejidos de necropsias.

1.1. Aislamiento a partir del animal vivo

1.1.1. Virus Maedi-visna

El ADN del provirus de MV se transporta por los monocitos circulantes y los macrófagos tisulares. Por tanto el aislamiento del virus a partir del animal vivo requiere disponer, con precauciones asépticas, de preparaciones de leucocitos derivados de la sangre periférica o de la leche durante la lactancia, y cultivarlos junto con células indicadoras. Con este fin se suelen utilizar células del plexo coroideo (SCP) de ovejas. Estas células indicadoras se pueden preparar como cultivos de explantes primarios de corderos fetales o recién nacidos que estén libres de virus y multiplicar su número después de tres o cuatro pases antes de guardarlas en nitrógeno líquido. Las células SCP son adecuadas para co-cultivo hasta 10 o 15 pases. Aunque

las células continúan creciendo bien posteriormente, su susceptibilidad al VMV puede resultar reducida.

Las preparaciones de leucocitos se pueden obtener de sangre periférica como capas leucocitarias por centrifugación durante 15 minutos a 1.000 **g** de muestras tratadas con heparina, ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA) o citrato. Se aspiran las células, se suspenden en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y se purifican más mediante centrifugación a 400 **g** durante 40 minutos en un medio con la densidad adecuada. Las células que se sitúan en la interfase se lavan mediante centrifugación una o dos veces con HBSS a 100 **g** durante 10 minutos, y el precipitado celular final se resuspende en medio a una concentración aproximada de 10⁶ células/ml; normalmente, las células se cultivan durante 10–12 días en bolsas de Teflon y después se añaden a una monocapa lavada de células SCP ligeramente subconfluentes en un recipiente de 25 cm² de área.

De modo similar, se pueden obtener los leucocitos de la leche, lavarlos por centrifugación, resuspenderlos y finalmente añadirlos a cultivos de SCP en monocapa.

Estos cultivos se mantienen a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, cambiando el medio y realizando pases cuando sea necesario. Se examinan para evidenciar efecto citopático (ECP), que se caracteriza por la aparición de células refráctiles estrelladas con procesos dendríticos y formación de sincitios. Los cultivos deben mantenerse durante varias semanas antes de desecharlos como no infectados. Una vez que se sospecha ECP deben prepararse cultivos en cubres. Estos se fijan y se observa el antígeno vírico por inmunomarcaje, por lo general mediante inmunofluorescencia indirecta o por métodos con inmunoperoxidasa. Además, las células de cualquier monocapa que resulte sospechosa se depositan por centrifugación y se realizan preparaciones para identificar partículas características de lentivirus por microscopía electrónica de transmisión. La presencia en el sobrenadante del cultivo celular de transcriptasa inversa es una indicación de la presencia de retrovirus.

1.1.2. Virus de la artritis/encefalitis caprina

Los mismos principios que se aplican en el aislamiento de VMV son aplicables al aislamiento de VAEC. El VAEC se aisló originalmente mediante explante de la membrana sinovial de una cabra artrítica (Crawford & Adams, 1981). Las muestras más adecuadas de las que obtener preparaciones de leucocitos de cabras vivas infectadas por VAEC son la sangre periférica, la leche y posiblemente el líquido aspirado de las articulaciones. Las células de la membrana sinovial de la cabra (GSM) son células indicadoras adecuadas. Si se sospecha ECP, se realizan pruebas para la detección del antígeno vírico, como se describe arriba.

1.2. Aislamiento a partir de tejidos de necropsias

1.2.1. Virus de la artritis/encefalitis caprina y virus Maedi-visna

Las muestras de los tejidos sospechosos tales como pulmón, membranas sinoviales, ubres, etc., se recogen de modo aséptico y tan frescas como sea posible en HBSS estéril o en medio de cultivo celular. Se trocean muy finamente en una placa Petri utilizando escalpelos y se recogen con una pipeta Pasteur fragmentos individuales que se transfieren a recipientes de 25 cm², colocando cuidadosamente en cada recipiente unos 20–30 fragmentos y una gota de medio de crecimiento sobre cada uno de ellos. A continuación los recipientes se incuban a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y se deja durante unos días para que los explantes individuales se adhieran al plástico. Se puede añadir con cuidado medio fresco y de los fragmentos empezarán a crecer células. Cuando exista suficiente crecimiento, los cultivos se dispersan con tripsina para permitir el desarrollo de monocapas. Estas se examinan para observar ECP y cualquier sospecha de crecimiento vírico se confirma del mismo modo que en los co-cultivos.

Los cultivos de macrófagos adherentes son fáciles de establecer con material de lavados pulmonares (lavado broncoalveolar post mórtem) y pueden probarse para producción vírica por pruebas serológicas, microscopía electrónica o por ensayo de la transcriptasa inversa en 1–2 semanas. Los aislamientos víricos se pueden llevar a cabo por co-cultivo de macrófagos con células SCP o GSM como se describe arriba para los leucocitos.

1.3. Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

Se pueden llevar a cabo métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos para la detección, cuantificación e identificación del ADN de los provirus de VMV y VAEC usando la reacción estándar en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de transferencia tipo Southern, hibridación *in situ* o clonación y secuenciación de los productos de la PCR (Alvarez *et al.*, 2006; Herrmann-Hoesing *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 1992). Las técnicas de PCR estándar para la detección del ADN del provirus VMV o VAEC en células y tejidos son de uso rutinario en muchos laboratorios y se emplean generalmente como pruebas suplementarias para determinar el estado de infección en animales que no pueden diagnosticarse definitivamente mediante serología (Deandres *et al.*, 2005). Se utilizan las técnicas de PCR en tiempo real o cuantitativas en unos cuantos laboratorios y estas pruebas, además de determinar el estado de la infección, también cuantifica la cantidad de provirus de MV o AEC en un animal (Alvarez *et al.*, 2006; De Regge & Cay, 2013; Herrmann-Hoesing *et al.*, 2007). Además, las técnicas moleculares de PCR, clonación y secuenciación también permiten conocer las cepas específicas de un país o región, lo que puede influenciar qué tipo de prueba serológica y antígeno se debe usar. Los análisis filogenéticos del ADN de los provirus de MV y AEC de cepas de LVPR de todo el mundo han sugerido que en algunas áreas el MV puede haber infectado naturalmente a cabras y AEC puede haber infectado naturalmente a ovejas (Shah *et al.*, 2004a; 2004b). Recientemente, se ha aplicado la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) a la detección de provirus de la AEC (Balbin *et al.*, 2014). En la LAMP se utilizan 4–6 cebadores que amplifican 6–8 regiones del gen diana (Notomi *et al.*, 2000). En el futuro, las pruebas moleculares de diagnóstico junto con los análisis filogenéticos de los provirus de MV y de AEC puede que sean usadas para rastrear la transmisión.

Una importante cuestión sobre el uso de la PCR es su especificidad. Debido a la posibilidad de amplificar secuencias del ADN genómico del hospedador (falsos positivos), el producto amplificado debe comprobarse por hibridación, patrones de digestión con endonucleasas de restricción o mediante secuenciación. La secuenciación es la mejor prueba de la especificidad en la validación de pruebas basadas en PCR y es recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). La sensibilidad de las pruebas de PCR puede mejorarse con la utilización de PCR anidada, pero la especificidad de las pruebas con PCR anidada debe comprobarse por hibridación, análisis con endonucleasas de restricción o secuenciación.

2. Pruebas serológicas

Las infecciones por lentivirus ovinos y caprinos suelen ser persistentes, de modo que la detección de anticuerpos es un instrumento serológico útil para identificar a los portadores de virus. La estrecha relación antigénica entre el VMV y el VAEC no se extiende a la detección de anticuerpos heterólogos en algunas pruebas serológicas (Knowles *et al.*, 1994).

Los ensayos de uso más común para el diagnóstico serológico de la presencia de infección por un lentivirus de pequeños rumiantes son la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y el enzimoimmunoanálisis (ELISA). La AGID se desarrolló y se describió por primera vez en 1973 (Terpstra & De Boer, 1973) y el ELISA en 1982 (Houwers *et al.*, 1982). La AGID es específica, reproducible y fácil de realizar, pero se requiere experiencia para interpretar los resultados. El ELISA es económico, cuantitativo y se puede automatizar, lo que hace posible el análisis de gran número de sueros. La sensibilidad y especificidad de la AGID y del ELISA depende de la cepa de virus usada en la prueba, de la preparación del antígeno vírico y de la prueba estándar de comparación. Los análisis de inmunotransferencia tipo Western y/o la radio-inmunoprecipitación son los estándares de comparación para establecer la sensibilidad y especificidad de las nuevas pruebas AGID y ELISA.

2.1. Inmunodifusión en gel de agar

Hay dos antígenos víricos de MV y de AEC que son importantes en serología, una glicoproteína superficial de la envoltura vírica denominada SU o gp135 y una proteína interna de la nucleocápsida llamada CA o p38. Ambas se conservan en una preparación antigénica constituida por medio recogido de cultivos celulares infectados que se concentra aproximadamente 50 veces por diálisis con polietilén glicol. Como ejemplo, para la prueba AGID se utiliza en Estados Unidos la cepa WLC-1 del virus de MV¹ (Cutlip *et al.*, 1977) y en Canadá una cepa de MV canadiense de campo para la misma prueba (Simard & Briscoe, 1990b).

Es importante reconocer que la sensibilidad de la prueba AGID para detectar anticuerpo anti-VAEC depende tanto del antígeno empleado como de la cepa del virus (Adams & Gorham, 1986; Knowles *et al.*, 1994). Se ha demostrado que una prueba AGID con gp135 de VAEC aporta más sensibilidad que

¹ Este virus ha sido distribuido por el Dr. Howard Lemkuhl, National Animal Disease Center, United States Department of Agriculture, P.O. Box 70, Ames, Iowa, EE.UU.

una prueba AGID con p28 de VAEC (Adams & Gorham, 1986). Además, se ha comprobado que en comparación con la radio-inmunoprecipitación, la sensibilidad de la prueba AGID para anticuerpos anti-VAEC es 35% mayor con antígeno de VAEC que con antígeno de MV (Knowles *et al.*, 1994). La explicación más probable para esta diferencia en sensibilidad entre el antígeno de los virus de AEC y MV para detectar anticuerpos anti-VAEC es que aunque la prueba de radio-inmunoprecipitación requiere solo la unión de un único epítipo por el anticuerpo para dar un resultado positivo, la precipitación en gel de agar requiere múltiples interacciones entre epítipo-anticuerpo. Pese a que los virus de la MV y la AEC tienen una identidad del 73–74.4 % en la secuencia de nucleótidos del gen de la envuelta, esta identidad puede no ser bastante para producir suficiente anticuerpo contra epítopos mutuamente comunes de NV y VAEC ocasionando líneas indetectables de precipitina antígeno/anticuerpo usando el antígeno del virus MV. Cuando se utiliza el antígeno apropiado, la eficacia de la prueba AGID es elevada. En comparación con la inmunoprecipitación, la AGID para detectar anticuerpos anti-VAEC tiene un 92% de sensibilidad y un 100% de especificidad si se utiliza antígeno de VAEC (Knowles *et al.*, 1994). Además, la AGID para detectar anticuerpo anti-VMV, si se usaba antígeno VMV, tuvo un 99,3 y 99,4% de sensibilidad y especificidad, respectivamente.

En ovejas adultas infectadas persistentemente con VMV y en cabras infectadas con VAEC, la respuesta de anticuerpos inmunoprecipitantes predominantes que se detecta va dirigida contra el antígeno gp135. La respuesta anti-p28 se presenta por lo general a títulos inferiores que la respuesta anti-gp135 en pequeños rumiantes adultos infectados persistentemente usando inmunoprecipitación. En algunas cabras infectadas con VAEC hay evidencias que sugieren que en una proporción de individuos se produce una respuesta anti-gp135 en ausencia de una respuesta anti-p28 y viceversa (Rimstad *et al.*, 1994). Por tanto, para validar la prueba, se necesitan sueros estándar que produzcan tanto líneas de precipitado anti-gp135 como anti-p28.

El medio de gel es 0,7–1% de agarosa en tampón Tris 0,05 M, pH 7,2, con 8% de NaCl. La prueba se realiza en placas Petri o en bandejas de plástico de 10 cm². La disposición y el tamaño de los pocillos determinan el número de sueros probados por placa. Se pueden adoptar varias disposiciones pero la hexagonal con un pocillo central es la normal: por ejemplo, un modelo con pocillos periféricos grandes (5 mm de diámetro) y pequeños (3 mm de diámetro) alternados, separados entre sí 2 mm y separados 2 mm de un pocillo central de 3 mm de diámetro con el antígeno. Los pocillos periféricos grandes son para los sueros problema y los pequeños para los sueros estándar. En cada prueba debe incluirse también un control positivo débil. Las placas se incuban durante una noche a 20–25°C en una cámara húmeda y se examinan después para observar las líneas de precipitado. Si es necesario, las placas pueden incubarse a 2–8°C durante otras 24 horas para resaltar las líneas de precipitina.

Una consideración importante es la necesidad de personal experimentado para interpretar la AGID. La interpretación de los resultados depende del antígeno utilizado. En Adams *et al.*, 1983 se pueden encontrar ejemplos de AGID con diferentes preparaciones antigénicas y una guía para la interpretación de los resultados.

2.2. Enzimoimmunoanálisis

En la actualidad hay más de 30 ensayos ELISA descritos para detectar anticuerpos anti-VMV o anti-VAEC en sueros de ovejas o cabras, respectivamente (Deandres *et al.*, 2005). La mayoría de estos ELISA son indirectos (I-ELISA) aunque hay descritos tres ELISA de competición (C-ELISA) en los que se utilizan anticuerpos monoclonales (Herrmann *et al.*, 2003; Houwers & Schaake, 1987). La mitad de los I-ELISA utilizan preparaciones de virus enteros como antígenos mientras que la otra mitad emplean proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos como antígenos. Unos cuantos I-ELISA muestran alta sensibilidad y especificidad frente a un estándar de comparación, análisis tipo Western o radio-inmunoprecipitación (Rosati *et al.*, 1994; Saman *et al.*, 1999). En USA, en comparación con la radio-inmunoprecipitación, un C-ELISA muestra elevada sensibilidad y especificidad tanto en ovejas como en cabras, sugiriendo que esta prueba puede usarse para el control de VMV y VAEC (Herrmann *et al.*, 2003). En algunos países europeos se ha usado durante años el ELISA en proyectos de control y erradicación del VMV y del VAEC en cabras (Motha & Ralston, 1994; Pépin *et al.*, 1998); la AGID es útil para confirmar resultados positivos en el ELISA debido a su alta especificidad.

Las preparaciones de antígenos de virus completos se producen por centrifugación diferencial de sobrenadantes de cultivos celulares infectados y por tratamiento del virus purificado con detergente, y se utilizan para recubrir microplacas (Dawson *et al.* 1982; Simard & Briscoe, 1990a; Zaroni *et al.* 1994). Las preparaciones de virus completos deben contener tanto gp135 como p28. Los antígenos recombinantes o los péptidos sintéticos se producen generalmente a partir de segmentos completos o parciales de los genes gag o envelope y pueden usarse en combinación (Power *et al.* 1995; Rosati *et al.* 1994; Saman *et al.* 1999). Así, los productos recombinantes de los genes gag o envelope unidos con la proteína de fusión glutatión-S-transferasa y producidos en *Escherichia coli* constituyen una fuente constante de antígeno para distribución y estandarización internacional.

La técnica ELISA puede aplicarse también al calostro y a la leche y algunos estudios han evaluado suero pareado y muestras de leche, Como el calostro y la leche son fuente de transmisión del VAEC, el ensayo de muestras de leche para la detección de anticuerpos anti-VAEC o anti-VMV no suministra información temporal adecuada para evitar la transmisión, especialmente a la descendencia de la gestación inmediata.

El ELISA se realiza a temperatura ambiente (aprox. 25°C) y es fácil de realizar en laboratorios con un equipamiento adecuado (lector de microplacas) y reactivos. Es una técnica conveniente y cuantitativa para análisis a gran escala ya que es fiable para demostrar anticuerpos frente a lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) en ovejas y cabras. Requiere un antígeno relativamente puro. Una desventaja de varios ELISA es que no se han validado frente a un estándar de comparación como la inmunotransferencia tipo Western o la radio-inmunoprecipitación. El método analítico debe validarse de acuerdo con el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas* usando un estándar de comparación como los antes indicados y, hasta la fecha, solo un ELISA ha superado las pruebas realizadas con estos estándares (Zanoni *et al.*, 1994).

En el I-ELISA, se antígenan los pocillos de la microplaca. Se añaden a los pocillos muestras de suero diluido que reaccionan con los antígenos unidos al soporte sólido. El material no unido se elimina por lavados después de un tiempo de incubación adecuado. El conjugado (por ejemplo, Ig anti-rumiante marcada con peroxidasa) reacciona con los anticuerpos específicos unidos al antígeno y el conjugado que no reacciona se elimina por lavados después de un tiempo de incubación adecuado. Después se añade sustrato del enzima. La velocidad de conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos. La reacción se detiene después de un tiempo adecuado y el color desarrollado se mide espectrofotométricamente. Una desventaja del I-ELISA es que normalmente los sueros necesitan diluirse 1/50 o más para disminuir el número de falsos positivos.

En un C-ELISA para LVPR se han utilizado MAb específicos para capturar gp135 o p28 como antígenos (Frevreiro *et al.*, 1999; Herrmann *et al.*, 2003; 2003b; Houwers & Schaake, 1987; Ozyoruk *et al.*, 2001). El C-ELISA supera el problema de la pureza del antígeno, ya que la especificidad de esta prueba depende del epítipo del MAb. En C-ELISA, las muestras de suero con anticuerpos anti-LVPR inhiben la unión del MAb marcado enzimáticamente al antígeno de LVPR fijado a los pocillos de plástico. La unión del MAb marcado enzimáticamente se detecta añadiendo el sustrato del enzima y cuantificando la aparición del consiguiente producto coloreado. Un color fuerte indica un bloqueo escaso o inexistente de la unión del MAb marcado con enzima y, por tanto, la ausencia de anticuerpos contra LVPR en las muestras de suero. Por el contrario, un color débil debido a la inhibición de la unión del MAb marcado enzimáticamente con el antígeno de la fase sólida, indica la presencia de anticuerpos contra LVPR en las muestras de suero. El formato del C-ELISA requiere que los anticuerpos del suero se unan al epítipo específicos del MAb o a su estrecha proximidad.

2.2.1. Materiales y reactivos

Placas de microtitulación con 96 pocillos de fondo plano, antigenadas previamente o de forma reciente con antígeno LVPR; lector de microplacas (equipado con filtros de 405, 450, 490 y 620 nm); incubador a 37°C con humedad; pipetas de 1-, 8- y 12-canales con puntas de plástico desechables; agitador de microplacas (opcional); frigorífico; congelador.

Sueros control positivos y negativos; conjugado (por ejemplo, anti-inmunoglobulina de rumiante marcada con peroxidasa); diluyente concentrado 10 veces (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato/Tween); agua destilada; solución de lavado concentrada 10x; sustrato o cromógeno (por ejemplo, ABTS [ácido 2-2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico)] o TMB [3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina]); solución de parada (por ejemplo, detergente, ácido sulfúrico).

2.2.2. ELISA indirecto: procedimiento analítico

- i) Diluir las muestras de suero, incluyendo los sueros control, hasta la dilución apropiada (por ejemplo, 1/20) y distribuir 0,1–0,2 ml por pocillo (por duplicado en ELISA bifásico). Utilizar los sueros control positivo y negativo suministrados por el fabricante y un suero interno del laboratorio como referencia positiva para comparar los títulos entre pruebas diferentes.
- ii) Cubrir la placa con tapadera e incubar a temperatura ambiente o a 37°C durante 30–90 minutos. Vaciar el contenido y lavar tres veces con solución de lavado a temperatura ambiente.
- iii) Añadir a los pocillos la dilución apropiada de conjugado recién preparado (0,1 ml por pocillo). Cubrir cada placa e incubar como en el paso ii. Lavar de nuevo tres veces.

- iv) Añadir a cada pocillo 0,1 ml de solución cromogénica de sustrato recién preparada o lista para el uso (por ejemplo, ABTS en tampón citrato fosfato, pH 5,0, y solución de H₂O₂ al 30% [0,1 µl/ml]).
- v) Agitar la placa; después de incubar, detener la reacción con solución de parada (por ejemplo, añadiendo 0,1 ml de ácido sulfúrico a cada pocillo).
- vi) Leer la absorbancia de cada pocillo con el lector de microplacas a 405 nm (ABTS) o 450–620 nm (TMB). Los valores de absorbancia se emplean para calcular los resultados.

vii) Interpretación de los resultados

En los kits comerciales, las interpretaciones y los criterios de validación se suministran con el kit.

Deben establecerse y validarse criterios de interpretación para cada prueba y reactivo utilizados en el laboratorio. A continuación, se muestra un ejemplo:

Calcular la absorbancia media (Ab) de la muestra de suero y de los sueros control positivo (Ab_{pos}) y negativo (Ab_{neg}) y, para cada suero, calcular el porcentaje:

$$\frac{Ab - Ab_{neg}}{Ab_{pos} - Ab_{neg}} \times 100$$

Si una muestra problema tiene una absorbancia media <30% se considera negativa, si tiene una absorbancia del 30-40% se considera ambigua, y si la tiene >40% se considera positiva.

2.2.3. ELISA de competición: procedimiento analítico

- i) Añadir a placas antigenadas 0,05 ml de suero sin diluir y de controles positivos y negativos.
- ii) Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- iii) Vaciar la placa y lavarla tres veces con solución diluida de lavado.
- iv) Añadir a cada pocillo 0,05 ml de conjugado diluido de anticuerpo-peroxidasa. Mezclar bien e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- v) Después de incubar 30 minutos, vaciar la placa y repetir el proceso de lavado descrito en el paso iii.
- vi) Añadir a cada pocillo 0,05 ml de solución de sustrato (por ejemplo, TMB). Mezclar, tapar la placa con papel de aluminio. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. No vaciar los pocillos.
- vii) Añadir a cada pocillo 0,05 ml de solución de parada. No vaciar los pocillos.
- viii) Inmediatamente después de añadir la solución de parada, leer la placa con un lector de placas (a 620, 630 o 650 nm).
- ix) *Interpretación de los resultados*

Deben establecerse y validarse criterios de interpretación para cada procedimiento y reactivo utilizados en el laboratorio. A continuación, se muestra un ejemplo:

Cálculo: % de inhibición = 100 – [(Ab de la muestra × 100) / Ab media del control negativo].

Para cabras, si una muestra problema causa una inhibición > 33,2 % es positiva; si causa una inhibición < 33,2% es negativa. Para ovejas, si una muestra problema causa una inhibición > 20,9%, es positiva; si causa una inhibición < 20,9%, es negativa.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No se dispone de vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS D.S. & GORHAM J.R. (1986). The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, **40**, 157–160.
- ADAMS D.S., KLEVJER-ANDERSON P., CARLSON J.L., MCGUIRE T.C. & GORHAM J.R. (1983). Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1670–1675.
- ALVAREZ V., ARRANZ J., DALTABUIT M., LEGINAGOIKOA I., JUSTE R.A., AMORENA B., DE ANDRES D., LUJAN L.L., BADIOLA J.J. & BARRIATUA E. (2006). PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res. Vet. Sci.*, **80**, 226–234.
- BALBIN M.M., BELOTINDOS L.P., ABES N.S. & MINGALA C.N. (2014). Caprine arthritis encephalitis virus detection in blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the proviral gag region. *Diag. Micro. & Infect. Dis.*, 79:37-42.
- CHAKRABORTY S., KUMAR A., TIWARI R., RAHAL A., MALIK Y., DHAMA K., PAL A. & PRASAD M. (2014). Advances in diagnosis of respiratory diseases of small ruminants. *Veterinary Medicine International Article ID 508304*, 16 pp.
- CRAWFORD T.B. & ADAMS D.S. (1981). Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **178**, 713–719.
- CRAWFORD T.B., ADAMS D.S., CHEEVERS W.P. & CORK L. C. (1980). Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, **207**, 997–999.
- CUTLIP R.C., JACKSON T.A. & LAIRD O.A. (1977). Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 1081–1084.
- DAWSON M., BIRONT P. & HOUWERS D.J. (1982). Comparison of serological tests used in three state veterinary laboratories to identify maedi-visna virus infection. *Vet. Rec.*, **111**, 432–434.
- DEANDRES D., KLEIN D., WATT N.J., BERRIATUA E., TORSTEINSDOTTIR S., BLACKLAWS B.A. & HARKISS G.D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.*, **107**, 49–62.
- DE REGGE N. & CAY B. (2013). Development, validation and evaluation of added diagnostic value of a q(RT)-PCR for the detection of genotype A strains of small ruminant lentiviruses. *J. Virol. Methods*, **194**, 250–257.
- FREVEREIRO M., BARROS S. & FUGULHA T. (1999). Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *J. Virol. Methods*, **81**, 101–108.
- HERRMANN L.M., CHEEVERS W.P., MCGUIRE T.C., ADAMS D.S., HUTTON M.M., GAVIN W.G. & KNOWLES D.P.A. (2003). A competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV): a diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 267–271.
- HERRMANN-HOESING L.M., WHITE S.N., LEWIS G.S., MOUSEL M.R. & KNOWLES D.P. (2007). Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin. Vacc. Immunol.*, **14**, 1274–1278.
- HOUWERS D.J., GIELKENS A.L.J. & SCHAAKE J. (1982). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet. Microbiol.*, **7**, 209.
- HOUWERS D.J. & SCHAAKE J. (1987). An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J. Immunol. Methods*, **98**, 151–154.
- JOHNSON L.K., MEYER A.L. & ZINK M.C. (1992). Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by *in situ* hybridization, PCR and cocultivation with susceptible cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **65**, 254–260.
- KNOWLES D.P., EVERMANN J.F., SCHROPSHIRE C., VANDER SCHALIE J., BRADWAY D., GEZON H.M. & CHEEVER W.P. (1994). Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine-arthritis encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 243–245.
- MINGUIJÓN E., REINA R., PÉREZ M., POLLEDO L., VILLORIA M., RAMÍREZ H., LEGINAGOIKOA I., BADIOLA J.J., GARCÍA-MARÍN J.F., DE ANDRÉS D., LUJÁN L., AMORENA B. & JUSTE R.A. (2015). Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.*, **181**, 75–89. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.08.007. Review.
- MOTHA M.J. & RALSTON J.C. (1994). Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAE in milk. *Vet. Microbiol.*, **38**, 359–367.

NOTOMI T., OKAYAMA H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO N. & HASE T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 15;28(12):E63.

OZYORUK F., CHEEVERS W.P., HULLINGER G.A., MCGUIRE T.C., HUTTON M. & KNOWLES D.P. (2001). Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus: potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 44–51.

PÉPIN M., VITU C., RUSSO P., MORNEX J.F. & PETERHANS E. (1998). Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet. Res.*, 29, 341–367.

PETERHANS E., GREENLAND T., BADIOLA J., HARKISS G., BERTONI G., AMORENA B., ELIASZEWICZ M., JUSTE R., KRASSNIG R., LAFONT J.P., LENIHAN P., PETURSSON G., PRITCHARD G., THORLEY G., VITU C., MORNEX J.F. & PÉPIN M. (2004). Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.*, 35, 257–274.

POWER C., RICHARDSON S., BRISCOE M. & PASICK J. (1995). Evaluation of two recombinant Maedi-Visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2, 631–633.

RIMSTAD E., EAST N., DEROCK E., HIGGINS J. & PEDERSEN N.C. (1994). Detection of antibodies to caprine arthritis/encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, 134, 345–356.

ROSATI S., KWANG J., TOLARI F. & KEEN J.E. (1994). A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Vet. Res. Commun.*, 18, 73–80.

SAMAN E., VAN EYNDE G., LUJAN L., EXTRAMANIA B., HARKISS G., TOLARI F., GONZALEZ L., AMORENA B., WATT N.J. & BADIOLA J.J. (1999). A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6, 734–740.

SHAH C., BÖNI J., HUDER J.B., VOGT H.R., MÜLHERR J., ZANONI R., MISEREZ R., LUTZ H. & SCHÜPBACH J. (2004a). Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, 319, 12–26.

SHAH C., HUDER J.B., BÖNI J., SCHÖNMANN M., MÜLHERR J., LUTZ H. & SCHÜPBACH J. (2004b). Direct evidence for natural transmission of small ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J. Virol.*, 78, 7518–7522.

SIMARD C.L. & BRISCOE M.R. (1990a). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. A simple technique for production of antigen using sodium dodecyl sulfate treatment. *Can. J. Vet. Res.*, 54, 446–450.

SIMARD C.L. & BRISCOE M.R. (1990b). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Maedi-visna virus in sheep. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can. J. Vet. Res.*, 54, 451–456.

TERPSTRA C. & DE BOER G.F. (1973). Precipitating antibodies against maedi-visna virus in experimentally infected sheep. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 43, 53–62.

ZANONI R.G., VOGT H.R., POHL B., BOTTCHE J., BOMMELI W. & PETERHANS E. (1994). An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *J. Vet. Med. B*, 41, 662–669.

*

* *

NB: EL CAPÍTULO SOBRE ARTRITIS/ENCEFALITIS CAPRINA SE ADOPTÓ POR PRIMERA VEZ EN 1990; EL CAPÍTULO SOBRE MAEDI-VISNA SE ADOPTÓ POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017.