



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE LA
PRUEBA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO
DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

EDMUNDO MEDINA GONZÁLEZ

DIRECTOR: M. en C. SANDRA CUEVAS ROMERO
ASESOR: Dr. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE LA
PRUEBA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO
DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO (VON).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

EDMUNDO MEDINA GONZÁLEZ

DIRECTOR: M. en C. SANDRA CUEVAS ROMERO
ASESOR: Dr. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

MÉXICO D. F.

2006

La presente tesis fue parcialmente financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el proyecto CONACYT-SAGARPA - 2003/025.

El único límite es tu propia imaginación

DEDICATORIA

A mis padres:

Gloria González Silva y Sabino Medina Canales

A quienes me han heredado el tesoro más valioso que pueda dársele a un hijo: Amor.

A quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme.

A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho.

A quienes me inculcaron el respeto hacia los demás.

A quienes en todo momento me han apoyado para alcanzar mis metas y sueños.

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo.

Por esto y más... Gracias.

A mis sobrinas:

Katia y Daniela Álvarez Medina,

Por estar todo este tiempo conmigo en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Epizootiología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, INIFAP, en el Laboratorio de Alta Seguridad de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA), y en el laboratorio L-121 de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Mi más sincero agradecimiento a estas Instituciones por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al CONACYT:

Por el apoyo económico otorgado.

A mi asesor de tesis:

Al Doctor Rubén Marroquín Segura por su incondicional apoyo en la asesoría y revisión de esta tesis, ya que con su experiencia en esta área de la ciencia me aportó valiosos conocimientos para la realización de este trabajo y que me serán de gran utilidad en mi desarrollo profesional.

A mi directora de tesis:

A la M. en C. Sandra Cuevas Romero por todos los conocimientos que me transmitió, antes, durante y al final del desarrollo de mi tesis, así como las críticas constructivas realizadas a mi trabajo, con sus puntos de vista durante la revisión mecanográfica, para el enriquecimiento de este trabajo.

Al personal del laboratorio de alta seguridad:

En especial al M.V.Z Pedro Paz Ramírez y a todo el personal que labora en este laboratorio, por el apoyo técnico para la obtención del antígeno inactivado del Virus del Oeste del Nilo (VON)

Al jurado:

Presidente:	Q.F.B María de las Mercedes Zamudio Durán
Vocal:	M. en C. Sandra Cuevas Romero
Secretario:	Dr. Rubén Marroquín Segura
Suplente	M.C. Maurilio Flores Pimentel
Suplente	M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

Por su valiosa participación en la revisión de este trabajo, ya que sus sugerencias realizadas, fueron una parte esencial para la culminación de este trabajo.

A todo el personal del laboratorio de Epizootiología:

M. en C. Arcelia Alvarado Islas, M.V.Z. Miguel Cámara Viana, M. en C. Germán Colmenares Viladomat, M. en C. Arturo García Fraustro y el M. en C. Pedro Mejía Sánchez, ya que durante mi estancia dentro de este laboratorio cada uno de ellos me aportaron valiosos conocimientos, así como durante la realización de este trabajo me dieron soporte técnico-científico y lo más importante que son un magnífico grupo de personas que me alentaron en los momentos difíciles durante la fase experimental del presente trabajo.

Al laboratorio de PRONABIVE:

Especialmente a la T.F.I. Susana Martínez, por el apoyo otorgado, proporcionándome alícuotas de sueros de caballo positivos al VON.

A todas las personas:

Que creyeron en mí al empezar este difícil camino y que me estuvieron apoyando durante este largo recorrido para llegar al final.

A todos los maestros:

Que de una u otra forma intervinieron en mi formación académica, ya que cada uno de ellos me dejó algún tipo de conocimiento, mediante sus enseñanzas o con sus críticas constructivas y destructivas.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
3.1 Definición	3
3.2 Antecedentes históricos	3
3.3 Agente etiológico.....	3
3.4 Ciclo biológico.....	5
3.5 Distribución geográfica.....	9
3.6 Formas clínicas	13
3.6.1 Forma leve.....	13
3.6.2 Forma severa	13
3.7 Epidemiología	14
3.8 Bioseguridad	15
3.9 Diagnóstico de laboratorio.....	15
3.10 Respuesta inmune	16
3.11 Tratamiento.....	16
3.12 Prevención	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo.....	19
5.2 Objetivos específicos	19
6. HIPÓTESIS	19
7. BIOLÓGICOS, REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES EMPLEADOS	20
8. MÉTODOS (Diagrama de flujo)	23
8.1 Propagación de células de riñón de mono verde africano (VERO)	24
8.2 Replicación del virus en línea celular VERO, con la cepa TM171-03 del Virus del Oeste del Nilo.....	24
8.3 Obtención del antígeno	25
8.4 Inactivación del antígeno.....	25
8.4.1 Inactivación química con β -propiolactona.....	25
8.4.2 Inactivación física con irradiación gamma	25
8.5 Pruebas de inactivación del antígeno	25
8.6 Cuantificación de proteínas del antígeno inactivado por el método Lowry...	26
8.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
8.8 Inmunotransferencia	33
8.9 Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA-Indirecta.	36
8.10 Desarrollo de la técnica de ELISA indirecta	38
8.11 Análisis estadístico.....	40
9. RESULTADOS	42
9.1 Obtención de antígeno.....	42

9.2	Determinación de proteínas por el método de Lowry	42
9.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	43
9.4	Inmunotransferencia y Western-Blot.	46
9.5	Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA	48
9.6	Desarrollo del ELISA indirecto.	48
10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
11.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
12.	CONCLUSIONES	59
13.	PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.....	61
14.	ANEXOS.....	62
14.1	Prueba de verificación de inactivación viral, mediante infección de cultivos celulares.....	62
14.2	Prueba de verificación de inactivación viral mediante inoculación en ratón lactante	62
14.3	Prueba de reducción por neutralización de placas (PRNT).....	62
14.4	Reactivos empleados para la cuantificación de proteínas por el método Lowry:	63
14.5	Preparación de reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida:.....	63
14.6	Preparación de reactivos para inmunotransferencia	66
14.7	Preparación de reactivos para la estandarización de la técnica de ELISA	68
15.	REFERENCIAS	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas del VON, WNV-Mex03 (Cepa TM171-03).....	5
Tabla 2. Aislamientos del Virus del Oeste del Nilo de artrópodos hematófagos.....	6
Tabla 3. Especies de aves de las cuales se ha aislado el VON.....	8
Tabla 4. Aves Norteamericanas en cautiverio y silvestres, donde se aisló el VON..	9
Tabla 5. Curva estándar de Albúmina Bovina (BSA).....	26
Tabla 6. Cantidades de muestra cuantificadas por Lowry.....	27
Tabla 7. Preparación del gel separador de poliacrilamida al 12 %.....	28
Tabla 8. Preparación del gel empacador de poliacrilamida al 10 %.....	28
Tabla 9. Colocación de las muestras en el gel SDS-PAGE.....	30
Tabla 10. Colocación de las muestras en un gel preparativo de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %.....	31
Tabla 11. Preparación del gel separador de poliacrilamida al 10 %.....	32
Tabla 12. Preparación del gel empacador de poliacrilamida al 10 %.....	32
Tabla 13. Colocación de las muestras en el gel SDS-PAGE.....	32
Tabla 14. Colocación de las muestras en el gel SDS-PAGE para inmunotransferencia.....	33
Tabla 15. Tabla de contingencia de 2X2 para obtener la sensibilidad y especificidad.....	40
Tabla 16. Tabla de contingencia de 2x2 para obtener la concordancia entre ensayos.....	41
Tabla 17. Concentración de proteína obtenida en cada una de las muestras por el método de Lowry.....	43
Tabla 18. Estandarización del ensayo ELISA-I para el VON en 5 repeticiones, para los sueros controles	54
Tabla 19. Sensibilidad y Especificidad de ELISA-I para el VON (punto de corte a 0.206 DO. comparada con la prueba de reducción de placas por seroneutralización (PRNT) (estándar de oro) determinada en sueros de equinos sanos y vacunados contra el VON.	55
Tabla 20. Tabla de contingencia de 2x2 para obtener la concordancia entre ensayos.....	55
Tabla 21. Marcador preteñido de Bio-Rad.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virus del Oeste del Nilo.....	4
Figura 2. Genoma del VON.....	4
Figura 3. Mosco tipo <i>Culex</i>	7
Figura 4. Ciclo biológico del VON.....	7
Figura 5. Mapa de casos en Estados Unidos y México 2004.....	10
Figura 6. Rutas migratorias de aves del sudeste.....	11
Figura 7. Ruta migratoria Noratlántica.....	12
Figura 8. Ruta migratoria del Golfo.....	12
Figura 9. Equipo para electroforesis Mini-Protean 3 Cell de bio-Rad.....	29
Figura 10. Colocación de las muestras en el gel de electroforesis.....	30
Figura 11. Equipo de inmunotransferencia, Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad.....	35
Figura 12. Esquema para la titulación de antígeno y conjugado.....	37
Figura 13. Esquema para colocar los controles y sueros en las placas.....	39
Figura 14. Curva Estándar de seroalbúmina Bovina.....	42
Figura 15. PAGE-SDS al 12 % en condiciones reductoras, teñido con azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (PM), antígeno pellet (AgP), antígeno sobrenadante (AgS) y antígeno sobrenadante (AgS).....	44
Figura 16. PAGE-SDS al 10 % en condiciones no reductoras, teñido con azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (PM), antígeno (Ag), control de células (Cc), medio de crecimiento (M).....	45
Figura 17. Prueba de Western-blot de la muestra de antígeno (sobrenadante) a partir de un gel preparativo al 12 % en condiciones reductoras. Marcador de peso molecular (PM), antígeno con suero positivo en leche (AgL+), antígeno con suero negativo en leche (AgL-), antígeno con suero positivo en caseína (AgL+), antígeno con suero negativo en caseína (AgL-).....	46
Figura 18. Inmunotransferencia de un gel al 12 % en condiciones no reductoras de: marcador de peso molecular (PM), antígeno del VON (A), control de células (Cc), medio de crecimiento (M) y empleando un pool de sueros positivos al VON. Marcador de peso molecular (PM), antígeno del VON (A), control de células (Cc), medio de crecimiento (M), emplenado un pool de sueros negativos al VON.....	47
Figura 19. Resultado de la titulación de conjugado y antígeno, antes de detener la reacción con H ₂ SO ₄	49
Figura 20. Resultado de la titulación en bloque del antígeno y conjugado.....	50
Figura 21. Cinética de reacción del substrato TMB, para la prueba de ELISA-I para el VON.....	51
Figura 22. Placa de ELISA con muestras de sueros positivos, negativos y controles.....	52
Figura 23. Dispersión de las densidades ópticas de los sueros positivos y negativos (n=20) a anticuerpos contra el VON de acuerdo a los resultados obtenidos mediante la prueba de ELISA-I.....	53

1. RESUMEN

El virus del Oeste del Nilo (VON), o West Nile Virus (WNV), es un arbovirus (transmitido por artrópodos), miembro del complejo antigénico de la encefalitis japonesa, pertenece al género de los flavivirus y a la familia *Flaviviridae*. Se caracteriza por ocasionar una enfermedad denominada “fiebre del Nilo Occidental”. Es una enfermedad transmitida por vector, que se propaga a una amplia gama de vertebrados a través de mosquitos infectados. Las aves actúan como huésped (reservorio natural) infectando a los mosquitos (vector) que a su vez infectan a los vertebrados. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método enzimático de ELISA–Indirecto para el diagnóstico del Virus del Oeste del Nilo en México. Este inmunoensayo se desarrolló utilizando una cepa nacional procedente del aislamiento de un caso clínico de un cuervo TM171-03, a partir de la cual se obtuvo un antígeno inactivado e irradiado para la implementación de un sistema de ELISA-I como una prueba “tamiz”, que permitirá el diagnóstico serológico del VON en grandes poblaciones de equinos principalmente en áreas de alto riesgo donde es necesaria mayor vigilancia epidemiológica.

El antígeno viral se obtuvo a partir del sobrenadante de los cultivos de células VERO infectadas con la cepa TM 171-03 ($10^{5.5}$ TCID₅₀/ ml), en donde se logró demostrar mediante electroforesis e inmunotransferencia, una proteína de 53 Kd, la cual se sugiere corresponde a la glicoproteína E del VON secretada al medio de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que esta proteína se presenta exclusivamente en los cultivos infectados con el VON, en comparación con cultivo de células normales, medio de cultivo y medio de cultivo con suero fetal bovino.

A partir de este antígeno se establecieron las condiciones óptimas para el desarrollo de la prueba de ELISA-Indirecta, donde se determinó que la dilución óptima del antígeno fue a una dilución de 1:100, utilizando una dilución de conjugado de 1:2000 (anti IgG de caballo) con lecturas a 25 minutos, que fue donde se presentó mayor diferencia en las densidades ópticas entre los sueros positivos y negativos. La estandarización de este ensayo se realizó con 10 sueros controles positivos y 10 sueros controles negativos obteniendo resultados del 100% de especificidad y sensibilidad. Con estos datos se concluye que el desarrollo de este método permitirá la obtención de resultados confiables con alta sensibilidad y especificidad, sin riesgo para el usuario, de fácil manejo y rápida estandarización del ensayo.

2. INTRODUCCIÓN

El virus del Oeste del Nilo (VON), o West Nile Virus (WNV), es un arbovirus (transmitido por artrópodos), miembro del complejo antigénico de la encefalitis japonesa, pertenece al género de los flavivirus y a la familia *Flaviviridae* (1). Se aisló por primera vez en una mujer, en el distrito de West Nile (Nilo Occidental), Uganda en 1937 (2). Desde entonces ha sido reportado en otras poblaciones de África, Europa, Asia y Australia (3). Sin embargo hasta 1999 fue identificado por primera vez en los Estados Unidos de América (EUA) (4). Al respecto la OPS/OMS ha sugerido que para implementar actividades de vigilancia en países en los que no se ha detectado la circulación del Virus del Nilo Occidental, las poblaciones que deben ser estudiadas en orden prioritario son: las aves, los mosquitos, los caballos y finalmente los seres humanos (5).

Las aves silvestres son consideradas los principales huéspedes del VON, y los mosquitos particularmente del género *Culex* se identifican como los vectores primarios (6,7).

La diseminación de este virus en el continente Americano ha seguido claramente los patrones migratorios de diversas aves, que pueden alcanzar cualquier parte del Suroeste de EUA, México, América Central, Islas del Caribe y Sudamérica siguiendo tres rutas principalmente: la del sudeste en USA, Noratlántica y la del Golfo donde más de 125 especies de aves procedentes de USA invernan en México y América Central viajando a través del golfo de México o de la costa, de éstas se han identificado 12 especies portadoras del VON (8).

Clínicamente la fiebre del Oeste del Nilo es una infección severa con afección del sistema nervioso central; la manifestación más grave es la encefalitis de evolución fatal en el hombre y el caballo, así como la muerte de ciertas especies de aves silvestres y domésticas (8,9). El periodo de incubación se encuentra en un margen de 3 a 14 días (10). Este padecimiento se caracteriza en caballos por presentar manifestaciones neurológicas como encefalitis, indiferencia, ataxia, incoordinación, tambaleo, caída de labio inferior, parálisis parcial o muerte. La vigilancia de la actividad de este virus en los equinos es importante dado que estos animales pueden ser centinelas de la actividad enzoótica del agente (5). Interesantemente, no se ha observado que los seres humanos y los caballos que han sido infectados por el VON pueden transmitir la enfermedad sin la participación de los vectores.

En nuestro país cobra vital importancia el establecer técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) necesarias para el diagnóstico de la enfermedad ocasionada por el VON y para realizar estudios de vigilancia epidemiológica a nivel nacional que permitan determinar las áreas de circulación del virus mediante estudios serológicos.

Este proyecto de tesis, se realizó en CENID-Microbiología en coordinación con el laboratorio de alta seguridad nivel 3 (CPA-SENASICA) y con apoyo técnico de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

El almacenamiento y transporte de especímenes se realizó de acuerdo a las normas de Bioseguridad de la OMS (11).

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Definición

La fiebre del Nilo Occidental (NO) es una enfermedad causada por un flavivirus denominado Virus del Oeste del Nilo (VON), que taxonómicamente pertenece al serocomplejo de la Encefalitis Japonesa. Es una enfermedad transmitida por vector, que se propaga a una amplia gama de vertebrados a través de mosquitos infectados. Las aves actúan como huésped (reservorio natural) infectando a los mosquitos que a su vez infectan a los vertebrados (12). La manifestación más grave de la infección es la encefalitis, con una evolución fatal en el hombre y el caballo, ocasionando también mortalidad de ciertas especies de aves silvestres y domésticas (9).

3.2 Antecedentes históricos

El VON fue aislado por primera vez de una muestra de sangre de una mujer con fiebre en Uganda en 1937 (2,10). En la década de los años 50, 40 % de la población humana que habitaba el Delta del Río Nilo en Egipto era positiva serológicamente al VON (8).

La ecología del virus fue caracterizada en Egipto en 1950 y éste comenzó a conocerse a causa de una meningoencefalitis severa que padecieron unos ancianos, durante un brote registrado en Israel 1957 (13).

El virus pronto se convirtió en el más extendido de los Flavivirus, con distribución geográfica, que incluye África y Euroasia. Fuera de Europa el virus ha sido reportado en Argelia, Rusia asiática, Azerbaijón, Botswana, República Central de África, Chipre, República Democrática del Congo, Egipto, Etiopía, India, Israel, Kazajistán, Madagascar, Marruecos, Mozambique, Nigeria, Pakistán, Senegal, Sudáfrica, Tadjikistán, Turkmenistán, Uganda y Uzbekistán (12).

En 1960 se presentó en el sureste de Rumania (14). En 1962 se reportaron varios casos en humanos en el Sur de Francia. En 1974, en la provincia del Cabo en Sudáfrica, se presenta un brote con más de 3,000 casos en humanos. En 1983 se reportaron cuatro casos fatales de encefalitis por este virus en la República Centroafricana (8), y en la región centro-sur de Rusia (1999); también se han presentado epizootias equinas en Italia (1998) y Francia (2000) (14). El virus ha sido reportado en África, Europa, Medio Oriente, Oeste y Centro de Asia, Oceanía (subtipo Kunjin) y más recientemente en Norteamérica (14).

3.3 Agente etiológico

El VON es un arbovirus (transmitido por artrópodos) del serogrupo B de los Flavivirus (familia *Flaviviridae*), con una sola cadena de ARN con sentido positivo, que mide de 45 a 50 nanómetros de diámetro con una envoltura derivada de las membranas de las células huésped, y una nucleocápside icosaédrica de 30-35 nanómetros compuesta de múltiples copias de una proteína de 12 kilodaltones. (**Figura 1**) (8,15). La glicoproteína E constituye la proteína estructural más importante ya que es la mediadora de la unión del virus a sus células huésped,

tiene actividad de hemaglutinina y provoca la formación de anticuerpos neutralizantes (8).

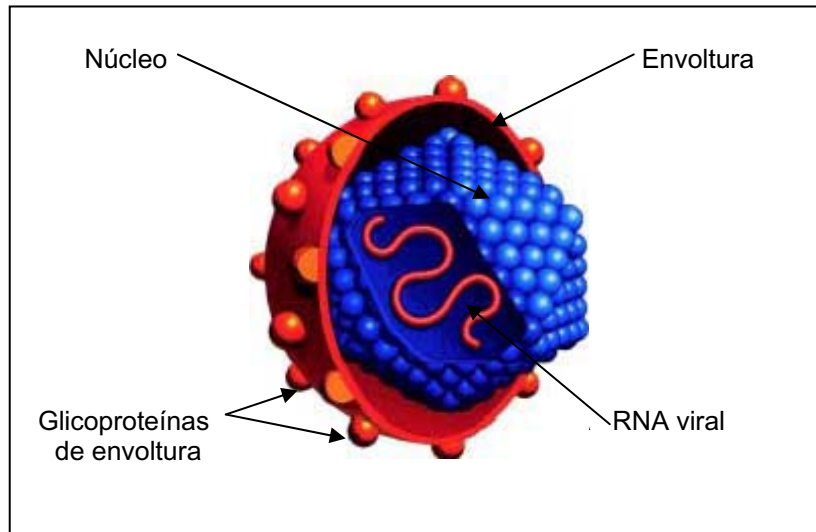


Figura 1. Virus del Oeste del Nilo (8).

El genoma del flavivirus es de 11.000 a 12.000 nucleótidos, que codifica 10 proteínas, 3 de las cuales corresponden a las proteínas estructurales (C, M, y E), y 7 son las proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, y NS5) (Tabla 1, Figura 2) (16).



Figura 2. Genoma del VON (8).

Tabla 1. Proteínas del VON, WNV–Mex03 (Cepa TM171-03) (17).

Proteína	Peso molecular (Daltons)	Punto isoeléctrico (pH)
C	13315.23046875	12.3124
M	8213.654296875	9.8702
E	53630.6953125	7.6605
NS1	39750.01953125	5.8490
NS2a	25391.76953125	9.5814
NS2b	14466.84375	4.1093
NS3	68995.6640625	6.9821
NS4a	16062.603515625	6.0780
NS4b	27574.515625	8.7030
NS5	103695.6328125	8.6295

Todos los flavivirus están relacionados antigénicamente formando el complejo antigénico de la encefalitis japonesa que incluye los virus de: Alfuy, Calcipacore, Koutango, Kunjin (Australia y sudeste asiático), Valle de Murray, Usutu, Yaounde, Kokobera, Stafford, Fiebre amarilla y virus de la encefalitis de San Luis, por lo cual se observan reacciones serológicas cruzadas en el diagnóstico por laboratorio (8,9,10,18).

Estudios moleculares filogenéticos han demostrado que el virus puede ser dividido genéticamente en dos linajes. Solamente los virus del linaje 1, han sido asociados con encefalitis humana. Estos virus han sido aislados de África, India, Europa, Asia y Norteamérica. Los virus del linaje 2, se mantienen en África y no están asociados con encefalitis humana (10,15).

3.4 Ciclo biológico

Los seres humanos contraen el Virus del Oeste del Nilo a través de picaduras de mosquitos que se han expuesto al virus como resultado de haberse alimentado de aves infectadas, por lo que es considerada una zoonosis. El virus no se transmite directamente de persona a persona, es decir, el hombre es considerado como hospedero final, como dato de interés, no se han dado casos de transmisión directa de las aves a los seres humanos (14).

Las aves constituyen la fuente del virus que infecta a los humanos, ya que son consideradas los principales huéspedes del VON, y los mosquitos son los principales vectores del VON (**Figura 3**) (6,7,19).

El virus ha sido aislado de 43 especies de mosquitos, predominantemente del género *Culex* (*Cx*), pero también es transmitido por *Anopheles*, *Aedes* y otros géneros (10,20). En Europa se han identificado como los vectores principales a mosquitos del género, *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, y *Coquillettidia richiardi*. En Asia, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus* y *Cx. visnui*. Y en los Estados Unidos de Norteamérica, al *Cx. pipiens*, *Cx. restuans* y *Cx. quinquefasciatus* (**Tabla 2**) (10).

Tabla 2. Aislamientos del Virus del Oeste del Nilo de artrópodos hematófagos (20).

Especies	No.	Países
Mosquitos		
<i>Culex antennatus</i> ^a	6	Egipto, Madagascar
<i>decens</i> group	8	Madagascar
<i>Ethiopicus</i>	1	Etiopia
<i>Guiarti</i>	1	Costa de Marfil
<i>Modestus</i>	3	Francia, Rusia
<i>Neavei</i>	4	Senegal, Sudáfrica
<i>Nigripes</i>	1	Republica central africana
<i>Perexiguus</i>	1	Israel
<i>perfuscus</i> grupo	3	Republica central africana
<i>pipiens</i> ^a	7	Sudáfrica, Egipto, Israel, Rumania, Checo, Bulgaria
<i>Poicilipes</i>	29	Senegal
<i>Pruina</i>	1	Republica central africana
<i>quinquefasciatus</i> ^a	7	India, Pakistán, Madagascar
<i>Scottii</i>	1	Madagascar
<i>theileri</i> ^a	4	Sudáfrica
<i>tritaeniorhynchus</i> ^a	3	Pakistán, India, Madagascar
<i>univittatus</i> ^a	51	Egipto, Israel, Sudáfrica, Madagascar
<i>vishnui</i> ^a grupo	6	India, Pakistan
<i>Weschei</i>	1	Republica central africana
<i>sp.</i>	3	Egipto, Argelia, Republica central africana
<i>Coquillettidia metallica</i>	1	Uganda
<i>Microannulata</i>	1	Sudáfrica
<i>Richiardi</i>	5	Sur de Rusia, Bulgaria ^b
<i>Mansonia uniformis</i>	1	Etiopía
<i>Aedes aegypti</i> ^a	1	Madagascar
<i>Africanus</i>	1	Republica central africana
<i>Albocephalus</i>	35	Madagascar
<i>Albothorax</i>	1	Kenia
<i>Cantans</i>	7	Eslovaquia, Ucrania, Bulgaria ^b
<i>caspius</i> ^a	1	Ucrania
<i>Circumluteolus</i>	2	Sudáfrica, Madagascar
<i>Excrucians</i>	1	Ucrania
<i>juppi+caballus</i>	1	Sudáfrica
<i>madagascarensis</i>	1	Madagascar
<i>Vexans</i>	3	Senegal, Rusia
<i>Anopheles brunnipes</i>	1	Madagascar
<i>Coustani</i>	1	Israel
<i>Maculipalpis</i>	1	Madagascar
<i>Maculipennis</i>	3	Portugal, Ucrania
<i>Subpictus</i>	1	India
<i>sp.</i>	1	Madagascar
<i>Mimomyia hispida</i>	8	Senegal
<i>Lacustris</i>	4	Senegal
<i>Splendens</i>	6	Senegal
<i>sp.</i>	2	Senegal
<i>Aedeomyia africana</i>	1	Senegal
Soft ticks		
<i>Argas hermanni</i> ^a	3	Egipto
<i>Ornithodoros capensis</i> ^a	5	Azerbaijan
Hard ticks		
<i>Hyalomma marginatum</i>	5	Astrakhan, Azerbaijan
<i>Detritum</i>	1	Turkmenistan
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	1	Azerbaijan
<i>Muhsamae</i>	1	Republica central africana
<i>Amblyomma variegatum</i>	1	Republica central africana
<i>Dermacentor marginatus</i> ^a	1	Moldavia

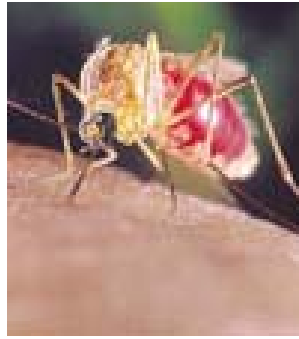


Figura 3. Mosco tipo *Culex* (21).

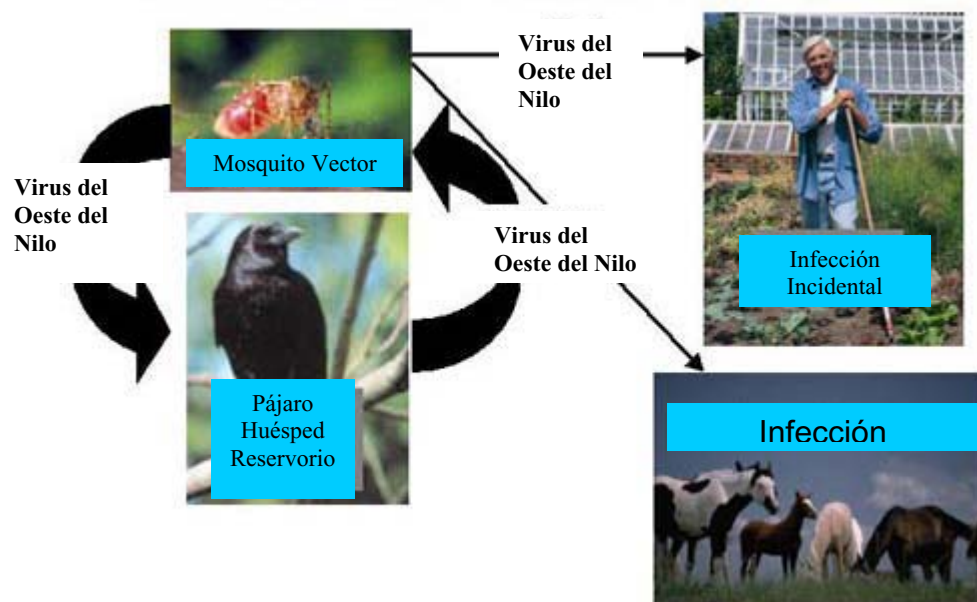


Figura 4. Ciclo Biológico del VON (22).

Durante la presencia de brotes en Norteamérica, el VON tiene como hospederos primarios alrededor de unas 60 especies de aves silvestres nativas de Norteamérica (**Tabla 3**), también se han dado casos en aves en cautiverio y aves silvestres introducidas (**Tabla 4**), y también se ha observado que puede infectar a caballos, gatos, mofetas, ardillas, conejos domésticos, mapaches, perros, borregos, murciélagos, cocodrilos, tortugas y caimanes, además del humano (18,19).

Tabla 3. Especies de aves de las cuales se ha aislado el VON (5).

Aves nativas silvestres de Norteamérica	Aves nativas silvestres de Norteamérica
Ave torito americano, <i>garcita Ixobrychus sinensis</i>	Garza verde, Garcita verde <i>Butorides virescens</i>
Tordo sargento <i>Agelaius phoeniceus</i>	Colibrí gorjirubi, Colibrí garganta Rubí
Azulejo <i>Sialia sialis</i>	<i>Archilochus colubris</i>
Cardinal <i>Cardinalis cardinales</i>	Martín pescador <i>Ceryle alcyon</i>
Pájaro Gato <i>Dumetella carolinensis</i>	Esmerejón <i>Falco columbarius</i>
Paro <i>Parus atricapillus</i>	Cenzontle <i>Mimus polyglottos</i>
Cormorán bicrestado <i>Phalacrocorax auritus</i>	Chotacabras Norteño o tapacaminos <i>Chordeiles minor</i>
Tordo vaquero <i>Molothrus ater</i>	Chipe suelero Coronado, Reinita homera
Cuervo <i>Corvus Brachyrhynchos</i>	<i>Seiurus aurocapillus</i>
Cuervo <i>Corvus ossifragus</i>	Búho comudo, Búho Real <i>Bubo virginianus</i>
Torcaza plañidera, Paloma <i>huilota Zenaida macroura</i>	Mosquero fibe, papamoscas <i>Sayornis phoebe</i>
Pato de collar <i>Anas platyrhynchos</i>	Rascón de Virginia <i>Rallus limicola</i>
Gorrión mejicano, fringílido mejicano	Cuervo <i>corvus corax</i>
<i>Carpodacus mexicanus</i>	Zorzal petirrojo, Primavera, Tordo, Mirla <i>Turdus migratorius</i>
Carpintero de collar <i>Colaptes auratus</i>	Playero blanco <i>Calidris alba</i>
Dominico Americano <i>Carduelis tristis</i>	Skimmer, Black <i>Rynchops niger</i>
Ganso canadiense <i>Branta canadensis</i>	Gorrión cantor <i>Melospiza melodia</i>
Zanate <i>Quiscalus quiscula</i>	Zorzalito <i>Catharus guttatus</i>
Grouse, Ruffed <i>Bonasa umbellus</i>	Zorzal de Bosque, Zorzalito <i>Catharus mustelinus</i>
Gaviota Atlántica, Gaviota de dorso Negro <i>Larus marinus</i>	Guajolote, Cócono, Pavo de monte <i>Meleagris gallopavo</i>
Gaviota plateada <i>Larus argentatus</i>	Vuelve piedras rojizo <i>Arenaria interpres</i>
Gaviota de Delaware o Gaviota de pico anillado <i>Larus delawarensis</i>	Zorzalito rojizo <i>Catharus fuscescens</i>
Gavilán aliancho, Aguillilla <i>aluda Buteo platypterus</i>	Zopilote negro, Gallinazo negro <i>Coragyps atratus</i>
Uric azul <i>Cyanocitta cristata</i>	Chipe gorrinegro, Reinita rayada <i>Dendroica striata</i>
Cernícalo Americano <i>Falco sparverius</i>	Chipe collarejo, Reinita de Canadá <i>Wilsonia canadensis</i>
Chorlito tildío, Chorlitejo, Culirrojo <i>Charadrius vociferus</i>	Chipe rabadilla amarilla, Reinita culiamarilla <i>Dendroica coronata</i>
Azor de Cooper, Gavián de Cooper <i>Accipiter cooperii</i>	Chipe azuloso, Reinita negriazul <i>Dendroica caerulescens</i>
Halcón de cola roja <i>Buteo jamaicensis</i>	Ampelis americano, Chinitos <i>Bombycilla cedrorum</i>
Azor, Gavilán pajarero <i>Accipter striatus</i>	
Garzón cenizo, Garzón azulado <i>Ardea herodias</i>	

Tabla 4. Aves Norteamericanas en cautiverio y silvestres introducidas, donde se aisló el VON (5).

Aves norteamericanas en cautiverio	Aves silvestres introducidas en Norteamérica
Grulla canadiense <i>Grus canadensis</i>	Paloma <i>Columba livia</i>
Águila calva, águila cabeciblanca <i>Haliaeetus leucocephalus</i>	Faisán de la india <i>Phasianus colchicus</i>
Gaviota reidera <i>Larus atricillus</i>	Gorrión <i>Passer domesticus</i>
Urraca <i>Pica pica</i>	Estomino <i>Stumus vulgaris</i>
Garza nocturna coroninegra <i>Nycticorax nycticorax</i>	Cisne <i>Cygnus olor</i>
Búho de las nieves <i>Nyctea scandiaca</i>	

3.5 Distribución geográfica

Desde mediados de los años 90 la frecuencia y gravedad clínica de la encefalitis vírica del VON aparentemente se incrementó, ocurriendo brotes en seres humanos en Argelia en 1994, Rumania en 1996-1997, República Checa en 1997, República Democrática del Congo en 1998, Rusia en 1999, Estados Unidos en 1999-2000 e Israel en 2000 (12).

En agosto de 1999, el Virus del Oeste del Nilo fue reportado por primera vez en Norteamérica en la ciudad de New York al presentarse un brote con muertes en humanos, caballos, y numerosas especies de aves (4). La cepa del VON de New York fue aislada de un cuervo americano (23). Durante esta epidemia/epizootia, el virus se detectó en 4 estados: Connecticut, Maryland, New Jersey y New York. En 2000, hubo 18 casos y una muerte en humanos y se registró una actividad epizootica en las aves y los mosquitos en 12 estados de Norteamérica (Connecticut, Delaware, Maryland, Massachussets, New Hampshire, New Jersey, New York, Carolina del norte, Pensilvania, Rhode Island, Vermont, Virginia) y el distrito de Columbia (12).

Actualmente la distribución geográfica del VON en Norteamérica se ha incrementado considerablemente (24). En 2002 la actividad de VON fue reportada de 2,289 condados en 44 estados de los EUA y en el distrito de Columbia (DC), comparado con los 359 condados en 27 estados y el DC en el 2001 y el VON fue detectado por primera vez en 1,929 condados y 16 estados de EUA. En 2002 un total de 3,389 casos humanos al VON fueron reportados, comparados con los 149 casos durante 1999-2001, y un gran número de pájaros, equinos y mosquitos fueron reportados (24).

Un total de 8,567 casos en humanos al VON se dieron a conocer en el 2003. Adicionalmente 11,350 pájaros muertos por infección al VON, se reportaron de 43 estados, el DC y la ciudad de New York. La infección se reportó de 41 estados en 4,146 caballos, 30 perros, 17 ardillas, 1 gato y 32 especies de animales no identificadas (25).

Durante el 2004, un total de 20 estados fueron reportados positivos con un total de 406 casos de la enfermedad del VON en humanos, 1,823 cuervos muertos y otros 223 pájaros muertos. La infección en caballos se informó de 20 estados y de un perro en Nuevo México y un total de 1,486 pools de mosquitos positivos que se dieron a conocer de 24 estados (**Figura 5**) (26).

Durante el periodo del 1 de enero a 1 de diciembre del 2005, un total de 2744 casos del VON en humanos fueron reportados de 596 condados en 42 estados, 18.8 % de los 3,142 condados de EUA, un incremento de 2,539 casos durante el mismo periodo en 2004. Un total de 5,204 cuervos muertos se reportaron de 583 condados en 45 estados; 325 condados de 43 estados reportaron pájaros infectados, de 1089 casos reportados de mamíferos no humanos, 1,072 ocurrieron en equinos y 17 en otras especies (5 perros, 6 ardillas y 6 especies no especificadas). Los casos equinos se reportaron de 344 condados en 33 estados y un total de 11,263 "pools" de mosquitos de 410 condados en 43 estados y el distrito de Columbia, fueron positivos al VON (27).

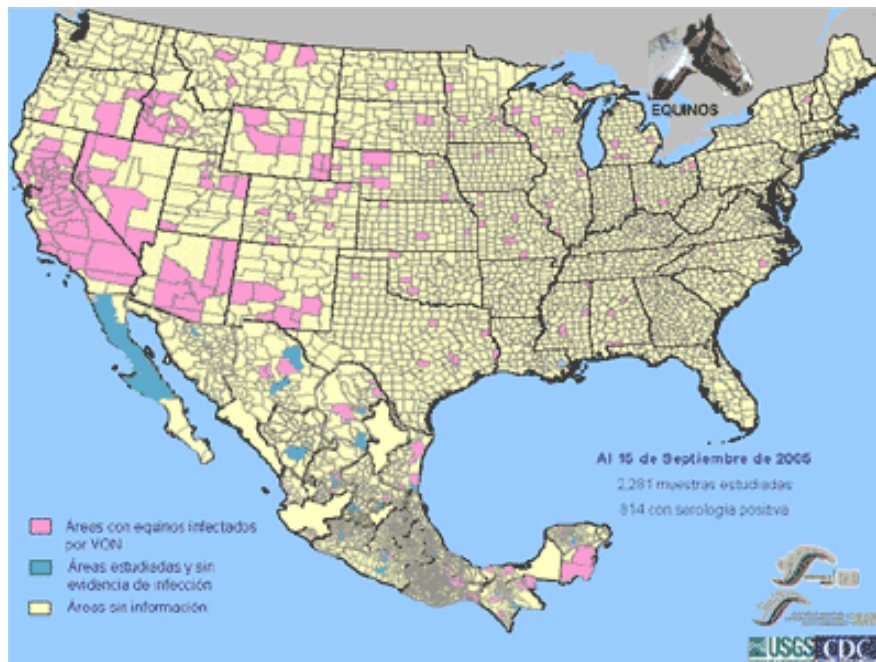


Figura 5. Mapa de casos en Estados Unidos y México 2004 (26).

De los 2949 casos reportados en humanos desde el 2005 hasta el 16 de febrero de 2006, 1272 (43%) fueron reportados como meningitis o encefalitis del Nilo Occidental (enfermedad grave), 1566 (53%) fueron reportados como una enfermedad más leve, y 111 (4%) no fueron especificados clínicamente (28).

Desde la introducción del VON dentro de Estados Unidos, la rápida y repentina distribución de este virus ha causado mucha preocupación (29). La diseminación de este virus en el continente Americano está siguiendo claramente los patrones migratorios de diversas aves, que pueden alcanzar cualquier parte del Suroeste de Estados Unidos (USA), México, América Central, Islas del Caribe y Sudamérica, siguiendo tres rutas principalmente: la del Sudeste en USA (**Figura 6**); Noratlántica (**Figura 7**) y la del Golfo (**Figura 8**), donde más de 125 especies de aves procedentes de USA invernaban en México y América Central viajando a través del Golfo de México o de la costa, de las cuales se han identificado 12 especies portadoras del VON (8).

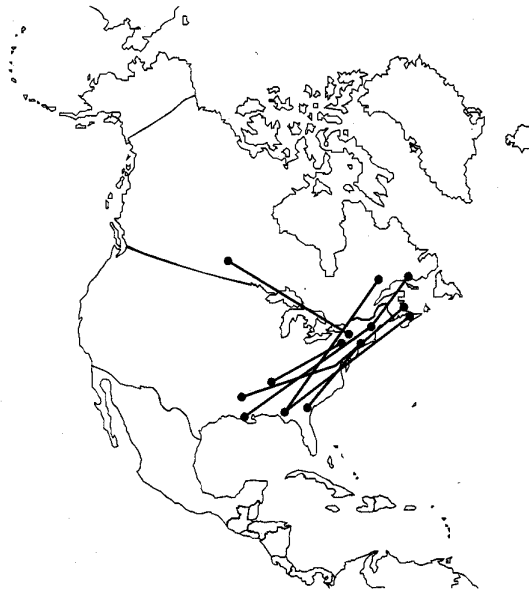


Figura 6. Rutas migratorias de aves del sudeste (8).



Figura 7. Ruta migratoria Noratlántica (8).



Figura 8. Ruta migratoria del Golfo (8).

La costa del golfo de México es una ruta migratoria de muchas especies de pájaros que viajan del noreste, medio occidente y sureste de Estados Unidos. Muchos de estos pájaros migran entre o en el fin de la estación durante el tiempo que se considera la transmisión de los arbovirus en Estados Unidos (30).

3.6 Formas clínicas

El período de incubación del virus del Nilo, no se conoce con precisión, sin embargo se presenta en un margen de 3 a 14 días. En reportes recientes la meningitis aislada ocurre en un 22%, la meningoencefalitis en un 9%, debilidad aislada en 4% y las tres manifestaciones juntas en 26%. La parálisis producida por el VON es de tipo flácido, de curso progresivo en tres a ocho días, con tendencia a ser proximal y asimétrica. En algunos pacientes sólo se ven afectadas extremidades, pero en otros hay afección bulbar con la consecuente debilidad de músculos respiratorios. Se ha descrito una presentación tipo Guillain-Barré, debida a la neuromielopatía de astas anteriores, sin embargo, la afección asimétrica y proximal son claves en el diagnóstico diferencial (15).

De los 8,567 casos reportados en EUA durante 2003, 70 % tuvieron forma leve y 2,505 casos (30) % cursaron con la forma severa. El establecimiento de dicha clasificación se debe a que el cuadro clínico de la forma severa suele incluir encefalitis y conllevar a una mayor mortalidad (15).

3.6.1 Forma leve

La infección en el hombre es usualmente asintomática o con manifestaciones parecidas a las de la Influenza, es también llamada "Fiebre del Virus del Oeste del Nilo". Los síntomas son inespecíficos, se presentan de tres a seis días y se caracterizan por fiebre (100%) de moderada a alta, en aproximadamente la mitad de los casos ocurre una erupción roseolar que se extiende del tronco a las extremidades y la cabeza. acompañada de malestar, fatiga, conjuntivitis, dolor abdominal y torácico, diarreas, amigdalitis severa, complicaciones respiratorias, cefalea, anorexia, mialgias, vómitos, dolor ocular, rash cutáneo y linfadenopatía (10,13,14,15).

3.6.2 Forma severa

En humanos, ocurre en aproximadamente uno de cada 150 infecciones, con síntomas que persisten durante semanas. El factor de riesgo más significativo para desarrollar la forma más severa es edad avanzada (mayor a 50 años). Los síntomas incluyen fiebre (presente en el 100% en algún momento de la enfermedad), debilidad (80%), alteración de la esfera mental (74%), vómito (43%) y rash máculo-papular (26%) de cuello y tronco. La debilidad puede evolucionar hasta parálisis flácida (15).

La presentación neurológica comprende ataxia y signos extrapiramidales, neuritis óptica, afección a nervios craneales (frecuentemente el facial), polirradiculitis, mielitis y convulsiones. Los trastornos del movimiento incluyen temblor, parkinsonismo y mioclonos (15).

En algunos pacientes la infección resulta severa y letal. Ésta incluye mielitis anterior, hepatoesplenomegalia, hepatitis, pancreatitis, miocarditis, meningitis aséptica y encefalitis (13). De los casos reportados en el continente Americano, aún no se han descrito pacientes con miocarditis, pancreatitis y hepatitis fulminante a diferencia de algunos casos de África. Durante 2002 en Louisiana Estados Unidos, fue también reconocido un caso con una presentación clínica de parálisis flácida tipo poliomielitis, en una paciente infectada por el VON (31).

3.7 Epidemiología

La actividad del VON se ha detectado en 204 (80 %) de 254 condados de Texas, incluyendo la mayoría de los condados que rodean el estado de Coahuila. De tal manera que el estado de Coahuila está considerado a ser un probable punto de incursión del VON en México desde los EUA (30).

Debido a que el VON es considerada una enfermedad emergente en México, se ha realizado vigilancia epidemiológica en algunos estados del noreste de México como es Coahuila (30), y Tamaulipas (rodeado en el este por el golfo de México y en el norte por Texas) (32). Obteniendo evidencia serológica del VON en caballos en el estado de Coahuila (30). Así como en el estado de Yucatán. El modo de entrada de este virus en el estado de Yucatán no ha sido identificado: sin embargo, se sugiere que el virus pudo haber sido traído por aves migratorias del norte (33). También se ha establecido vigilancia en equinos y aves en el estado de Yucatán, que es considerado como un punto probable de entrada de este virus en América latina, dado que éste es un área principal de descenso para muchas especies de pájaros que emigran del noreste y mediados del occidente de Estados Unidos (33). En 2001 fue reportada la presencia de anticuerpos detectados en un solo bóvido durante una encuesta serológica en el estado de Chiapas, México, contra el VON o un virus relacionado (34). El 5 de mayo del 2003, CPA-SAGARPA recibió el reporte de un Cuervo común (*Corvus corax*) muerto del zoológico del Yumká en la ciudad de Villahermosa, en el estado de Tabasco. Aunque esta especie es nativa de Tabasco y otras regiones de México, este pájaro era uno de dos cuervos importados de los Estados Unidos en 1999. Se realizó la necropsia y el aislamiento del virus fue probado y confirmado el 16 de mayo del 2003, en muestras de tejido en el laboratorio de bioseguridad nivel 3 de CPA-SAGARPA, en Palo Alto, en la ciudad de México (35, 36). El RNA viral de este aislamiento fue genéticamente caracterizado en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) en la ciudad de México y en la universidad de Texas Medical Branch en Galveston (35,37). La introducción detectada del primer aislamiento del virus en México podría estar asociada a la presencia de un ave migratoria (38).

Desde la aparición del primer caso clínico del VON en el país (2003), se han realizado otros aislamientos en diferentes estados de la República Mexicana, como fue en: el municipio de Aldama, Tamaulipas el 12 de noviembre del mismo año, a partir de un encéfalo de equino; el 27 de noviembre a partir de un zanate en Hermosillo, Sonora; el 28 de noviembre en Altamira, Tamaulipas a partir de un pelicano; el 5 de diciembre en seis aves de Mexicali, Baja California y finalmente el

24 de diciembre también se aisló el virus, de lagartos en dos municipios del estado de Tabasco (Centla y Centro) (36).

Recientes brotes del VON a nivel mundial han sido asociados con una aparente evolución de nuevas variantes del virus. Las que probablemente estén involucradas en la circulación de éste en la zona Sureste del territorio nacional.

3.8 Bioseguridad

El VON es un agente de alto riesgo para la salud humana, por ello, se recomienda utilizar instalaciones clasificadas como BSL-3 (Biosafety level 3) nivel de seguridad biológica 3. Esto implica trabajar en laboratorios con doble puerta de acceso, presión negativa en su interior, limitación del acceso a personas y manipulación de las muestras en cabinas de seguridad biológica de clase IIA. Para manipular las muestras con fines diagnósticos en aquellos centros que no disponen de instalaciones de tipo BSL-3 puede utilizarse un laboratorio de bioseguridad nivel 2, siempre que se cumplan algunas condiciones como: salida del aire a través de un sistema de filtración, dirección de flujo de aire desde el exterior al interior del laboratorio, acceso restringido de personas al laboratorio durante el trabajo con las muestras, seguir las normas de trabajo en un laboratorio de bioseguridad nivel 3, realización de las manipulaciones dentro de cabinas de bioseguridad nivel 2, realizar todas las pruebas que puedan generar aerosoles, incluyendo los lavados de las pruebas de ELISA, en el interior de cabinas de seguridad de clase II (39).

Para la necropsia de los animales infectados, deben usarse las precauciones universales tales como: la protección personal (usando ropa protectora, guantes, protectores faciales y protección de ojos), el desecho de aves y animales muertos o muestras contaminadas, mediante incineración y la desinfección de todos los elementos después del procesamiento de muestras (5).

3.9 Diagnóstico de laboratorio

El éxito de las actividades de vigilancia en EUA ha dependido de la disponibilidad de los laboratorios que pueden proporcionar apoyo de diagnóstico. Los ensayos inmunoenzimáticos de inmunoglobulina M y G (ELISA) deben estar disponibles en los laboratorios de salud pública y veterinaria, para proporcionar el primer tamizaje y diagnóstico del suero humano, animal y especímenes de líquido cefalorraquídeo (12).

El VON, al pertenecer a la familia de los flavivirus, puede tener reacciones cruzadas. La presencia de reacciones cruzadas de anticuerpos entre los diferentes flavivirus, sobre todo con el de la encefalitis de San Luis, requiere necesariamente en caso de positividad, de realizar confirmación mediante pruebas de neutralización en placa (8).

Para identificar el virus aislado de cultivo celular, infectado con muestras de líquido cefalorraquídeo, suero o tejido, se requiere una prueba de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales (39), o técnicas de biología molecular como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar ARN viral (9).

La sospecha de infección por el VON puede ser eventualmente confirmada en pacientes fallecidos por encefalitis mediante técnicas de inmunohistoquímica y PCR en tejido cerebral. Se recomienda remitir al laboratorio especializado muestras de páncreas, hígado, bazo, corazón, pulmón, y riñones para estudio convencional y específico. Las muestras de sistema nervioso central deberían incluir médula y raíces nerviosas (9).

3.10 Respuesta inmune

Los anticuerpos IgG en suero son detectados tres semanas después de la infección (y a menudo antes), virtualmente todas las personas infectadas deben demostrar los anticuerpos IgG del suero al VON por la prueba de ELISA por 500 días o más (40).

Los anticuerpos IgM en suero son detectados por el día 8 de la infección, una gran mayoría de personas infectadas tendrán anticuerpos IgM detectables en el suero al VON; en muchos casos serán detectables por menos de 1 a 2 meses después del inicio de los síntomas; y en algunos casos podrán ser detectados por 500 o más días (40). Una ventaja de ELISA para IgM sobre de otras es que la IgM es producida en etapas tempranas de la infección y persiste por un corto tiempo relativamente, esto permite la identificación de recientes infecciones del VON (41).

3.11 Tratamiento

Las infecciones por flavivirus no tienen tratamiento específico, sólo sintomático, los casos leves con sintomatología seudogripal responden habitualmente a los antitérmicos y a medidas de soporte como el reposo domiciliario y la hidratación abundante. Los pacientes graves, que requieren ingreso hospitalario, frecuentemente necesitan soporte ventilatorio (encefalitis, polirradiculoneuritis). Las secuelas neurológicas inmediatas suelen mejorar con el paso del tiempo, aunque precisan rehabilitación motora. Algunos pacientes presentan debilidad muscular persistente, residual. Recientemente se ha propuesto la ribavirina, un fármaco antivírico que ha demostrado efectividad “*in vitro*” a altas dosis para el tratamiento de esta enfermedad (9). Sin embargo no hay estudios clínicos controlados que avalen la indicación terapéutica de la ribavirina, el interferón, los esteroides, los agentes osmoprotectores o los medicamentos anticonvulsivos. No obstante en un estudio pequeño se observó que la inmunoglobulina humana, obtenida en Israel, protegió a ratones y humanos, cuando se administró en etapas tempranas de la enfermedad (42).

3.12 Prevención

Un componente crítico de cualquier programa de prevención y control, de enfermedades de transmisión vectorial es la educación al público acerca de estas enfermedades, para informar cómo se transmiten y cómo prevenir o reducir el riesgo de la exposición (5).

El control y la prevención del VON están dirigidos principalmente hacia sus vectores y huéspedes. Esto significa una vigilancia activa de las aves para detectar posible mortalidad entre las poblaciones de vida silvestre que servirían como centinelas de la eventual presencia del VON, así como la vigilancia activa del mosquito vector y la identificación de otros vectores potenciales en una zona concreta (9).

Una forma limitada de prevenir la enfermedad es evitando la exposición a las picaduras de mosquitos, manteniendo los caballos en el interior de los establos en los momentos de mayor riesgo de picaduras (atardecer y noche), así como utilizando insecticidas y repelentes de mosquitos (39).

Las estrategias de control contra los mosquitos incluyen la vigilancia y el estudio de las especies involucradas en el ciclo de transmisión, así como la fumigación aérea y en tierra. Estas tácticas reducen y controlan estos vectores y constituyen la mejor acción cuando tienen lugar cambios sensibles en los factores ambientales.

La vacunación en caballos es una medida profiláctica que se ha empleado en los Estados Unidos de América, sin embargo, para la prevención en el humano, se ha desarrollado un inmunógeno contra el VON, que aún se encuentra en fase experimental temprana (42).

En el caso de los caballos, se comenzaron a desarrollar y producir vacunas de uso veterinario en "Fort Dodge Animal Health". Esta empresa obtuvo una "aprobación condicional" del Departamento de Agricultura Americano el 1 de agosto de 2001. La aprobación condicional se otorgó por tratarse de una situación que requería una actuación urgente, por haberse demostrado que el producto tenía suficiente pureza y seguridad, y al mismo tiempo se tenía una esperanza razonable de eficacia, aunque no se tuviese en aquel momento información suficiente de su eficacia y potencia. Cuando se introdujo la disponibilidad de la vacuna era limitada e insuficiente para la cantidad requerida para inmunizar a todos los caballos existentes en EUA, ya que la enfermedad se había detectado en muchos lugares. Por este motivo, se utilizó primero en aquellos lugares donde se habían detectado caballos con resultados de pruebas positivas al VON. La vacuna existente requiere dos dosis de 1 ml intramusculares separadas tres a seis semanas entre ellas y una dosis de refuerzo anual. No se han observado efectos adversos importantes en los animales (39).

Recientemente se elaboró en México, una vacuna inactivada a partir de un aislamiento mexicano, mediante la cual se ha dado inicio a ciertos programas de prevención principalmente en la zona Norte del país (43).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El virus de la encefalitis del Oeste del Nilo se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, ocasionando un severo impacto económico y social en los países afectados. Con la aparición de casos clínicos del VON en los Estados Unidos de Norteamérica (1999) y el movimiento de aves migratorias diseminadoras del virus hacia el sur y el Caribe (Ruta Migratoria del Golfo), para México era inminente la propagación del Virus del Oeste del Nilo hacia los estados cercanos a la frontera con los Estados Unidos de Norteamérica y en las costas del Golfo de México (44). Recientemente ha sido reportada la circulación del VON en nuestro país mediante estudios serológicos en cinco estados de la República (Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Chihuahua y Yucatán), simultáneamente fue identificado un caso clínico procedente de un cuervo (*Corvus corax*) del estado de Tabasco, del zoológico del Yumká, el cual fue confirmado mediante el aislamiento del virus (35).

A raíz de estos hallazgos el pasado 14 de Julio del 2003, fue declarado en el Diario Oficial de la Federación, la presencia del VON como enfermedad emergente en México, originando con esto la activación de un dispositivo de vigilancia epizootiológica a nivel nacional (45).

Sin embargo, el diagnóstico del VON, se encuentra restringido a su realización en laboratorios de alta seguridad BSL-3, y actualmente estas pruebas solamente se realizan en el laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA), limitando así la capacidad diagnóstica a nivel nacional.

Por tal motivo, cobra vital importancia el desarrollar métodos de diagnóstico inmunoenzimáticos con alta sensibilidad, especificidad y bajo riesgo de contagio, que permitan su adecuación en laboratorios con infraestructura Nivel 2, y que a su vez permitan establecer un diagnóstico masivo y específico a nivel nacional en poblaciones de animales susceptibles y áreas de alto riesgo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y estandarizar un método inmunoenzimático de ELISA-Indirecto a partir de la "cepa" del VON, TM171-03 inactivada e irradiada, para detectar la presencia de inmunoglobulina G (IgG) en sueros de equinos, como una herramienta diagnóstica sensible y específica que permita su manejo en condiciones seguras evitando el riesgo de contagio y su aplicación en grandes poblaciones de animales susceptibles.

5.2 Objetivos específicos

Elaborar y establecer las condiciones para la obtención de un antígeno inactivado e irradiado del Virus del Oeste del Nilo.

Desarrollar un método de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad, mediante la utilización de un ELISA indirecto con antígeno inactivado del VON, para la detección de IgG, como indicador de infección tardía en sueros de equinos.

Estandarización del inmunoensayo desarrollado, mediante la utilización de sueros de referencia positivos y negativos, de animales vacunados y sanos, evaluados previamente por la prueba de PRNT.

6. HIPÓTESIS

Mediante el uso de un antígeno nacional inactivado e irradiado del VON, será posible diagnosticar la presencia de anticuerpos IgG en sueros de equino a través de una prueba de ELISA-Indirecta que estará disponible para laboratorios con bioseguridad tipo II.

7. BIOLÓGICOS, REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES EMPLEADOS

Biológicos

NOMBRE	PROVEEDOR
Células de riñón de mono verde africano (VERO).	Laboratorio de alta seguridad (CPA).
Cepa del Virus del Oeste del Nilo (TM-171-03).	Laboratorio de alta seguridad (CPA).
Conjugado Anti-Horse IgG en cabra	Jackson Immunoresearch
Ratones lactantes (3 días de edad).	Bioterio del CENID-Microbiología
Sueros de caballos positivos y negativos al Virus del Oeste del Nilo (VON), evaluados por PRNT (Anexo 15.3).	Laboratorio de alta seguridad (CPA). Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE).
Suero fetal de bovino inactivado.	Sigma

Reactivos

NOMBRE	FÓRMULA	PROVEEDOR
Ácido acético	CH ₃ COOH	Merck
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Técnica Química
Ácido clorhídrico	HCl	Merck
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Merck
Acrilamida	CH ₂ :CHCONH ₂	Bio-Rad
Agua desionizada	H ₂ O	Millipore
Albúmina sérica bovina (BSA) fracción V.		Difco
Azul de Coomassie	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ O ₇ S ₂ Na	Bio-Rad
Bis-acrilamida	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	Bio-Rad
β-propiolactona	C ₃ H ₄ O ₂	Sigma
Carbonato de sodio anhidro	Na ₂ CO ₃	Merck
Cloroformo	CHCl ₃	Monterrey
4-Cloronaftol	C ₁₀ H ₇ ClO	Sigma
Cloruro de potasio	KCl	Sigma
Cloruro de sodio	NaCl	Laitz
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ -CH ₂ -O-(SO ₃) ¹⁻ Na ¹⁺	Sigma
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Baker
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	Sigma
Glicina	H ₂ NCH ₂ COOH	Bio-Rad
Hidróxido de sodio	NaOH	Laitz
Hipoclorito de sodio	HCIO ₃	Cloralex
Leche descremada		Sveltys
Marcador de peso molecular		Bio-Rad
Metanol	CH ₃ OH	Baker

Medio Esencial Mínimo Glasgow		In Vitro
Persulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Bio-Rad
Reactivo Folin-Ciocalteu		Merck
Rojo de fenol	$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$	Técnica Química
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Baker
Tabletas de buffer de carbonatos		Sigma
Tabletas de buffer fosfato salino.		Sigma
Tabletas de fosfato-citrato con perborato de sodio		Sigma
Tartrato de sodio y potasio	$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
TEMED	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	Bio-Rad
3,3',5,5'- Tetrametilbencidina	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$	Sigma
Trietanolamina	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$	Baker
Tripsina 0.5% y Versen 0.1%		In Vitro
Tris	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Merck
Tritón X 100	$[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2]_n$	SIGMA

Equipo

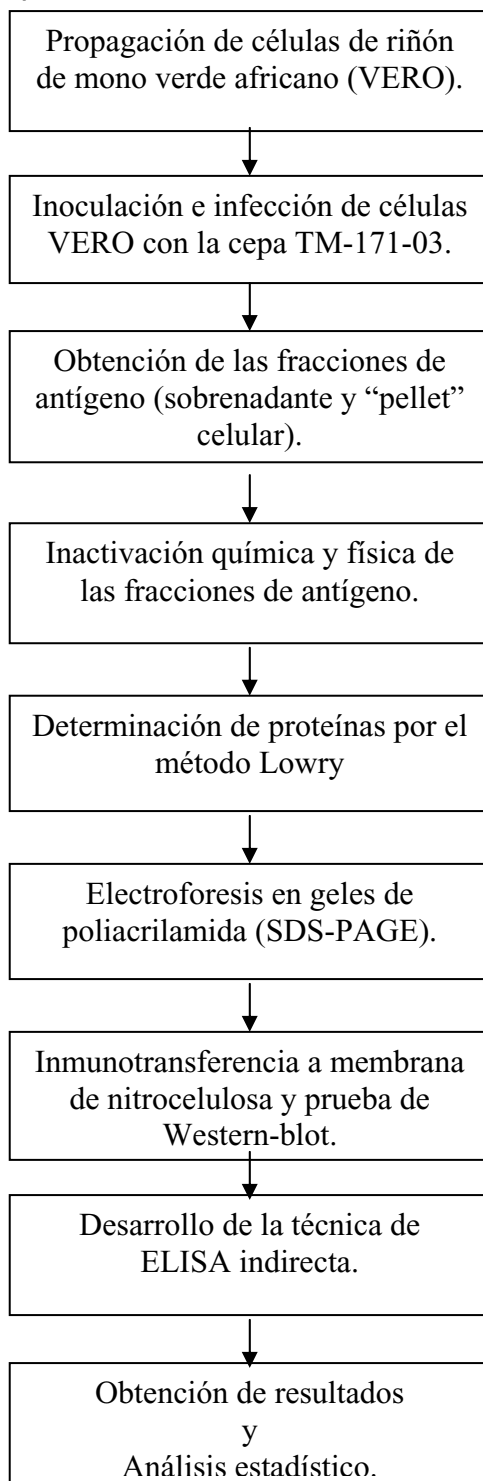
NOMBRE	MARCA
Agitador Lab rotator	Barnstead Lab. Line.
Agitador vortex	Genie
Balanza analítica	Sartorius
Biofotómetro	Eppendorf
Centrífuga refrigerada a 4° C	Beckman GS-6KR
Congelador a -20° C	Frigidaire
Congelador a -70° C	ScienTemp
Campana de flujo laminar	Troemmer
Incubadora a 37° C	Fisher Scientific
Lector de placas de ELISA	Multiskan II
Micropipetas multicanal de 200-1000 ul	Biohit
Micropipetas unicanal de 1-200 µl	Biohit, Gilson
Microscopio invertido	Zeiss
Mini-protean® 3 Cell	Bio-Rad
Mini-Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Potenciómetro digital	Corning
Refrigerador a 4° C	Nieto
Ultracentrífuga refrigerada	MSE

Material

MATERIAL	MARCA
Botellas para cultivo celular 75, 250 cm ³	Nunclon®
Cajas para ratón con bebedero	S/M
Crioviales	Costar
Gendarme	Costar
Guantes de latex	Digiflex
Gradilla para tubos Eppendorf	Eppendorf
Jeringas de 1,3 y 20 ml	Plastipak
Matraces Erlenmeyer	Pyrex
Placas de 96 pozos para ELISA	NUNC-Immuno Plate Polysorp Surface
Pipetas de vidrio 10 ml	Pyrex
Probetas de vidrio	Pyrex
Puntas para micropipeta de 200 ul	Sorenson
Tinas de plástico para micropipeta multicanal.	S/M
Toallas secantes de papel	Sanitas
Tubos Eppendorf 2 ml	Eppendorf
Tubos Falcón de 50 ml	Corning

8. MÉTODOS (Diagrama de flujo)

Los procedimientos realizados cuando se manejó el virus infeccioso del VON, fueron efectuados dentro de las instalaciones del laboratorio de Alta Seguridad de la CPA. Una vez confirmada la inactivación del virus mediante la inoculación en ratón e infección de cultivos celulares (**Anexo 15.1 y 15.2**), fue posible obtener el antígeno para su uso en el laboratorio con bioseguridad tipo II.



8.1 Propagación de células de riñón de mono verde africano (VERO)

La propagación de la línea celular VERO, se efectuó mediante la realización de pases seriados a partir de una botella de 25 cm² que contenía un monoestrato con una capa 100% confluyente de células adherida en la superficie de la botella. La botella se abrió cerca de la flama de un mechero y dentro de una campana de flujo laminar horizontal, se desechó el medio de cultivo y se adicionó 0.5 ml de una solución de tripsina-verseno (0.5%) con la finalidad de lavar el monoestrato y retirar los restos celulares no adheridos, inmediatamente se desechó y cambió esta solución, para realizar un segundo lavado, agregando nuevamente 0.5 ml de esta solución de la cual se eliminó una pequeña parte dejando aproximadamente 0.25 ml de tripsina-verseno (0.5%) durante 5 minutos, se incubó a una temperatura de 37° C para favorecer el desprendimiento del monoestrato adherido a la superficie de la botella. Pasados los 5 minutos de incubación, ligeramente se golpeó la botella para el desprendimiento total de las células, las cuales se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo sin suero con la ayuda de una jeringa de 20 ml, la cual permitió mediante la acción de aspirar y regresar el contenido a la botella, promover la disgregación de las células y evitar la presencia de grumos. Finalmente, esta suspensión de células se colocó en otro recipiente que contenía 14 ml de Medio Mínimo Esencial (MEM) adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado, los cuales se distribuyeron en partes iguales en dos botellas nuevas Nunclon® exclusivas para cultivo celular de 25 cm², las cuales se incubaron a 37° C en una estufa con suministro de CO₂ (5%), para permitir que la células se desarrollaran y nuevamente se formara un monoestrato completo. Siguiendo el mismo procedimiento se replicaron los cultivos celulares escalando a botellas de 75 cm², para obtener un lote de células suficiente para proceder a la infección viral y obtención del lote de trabajo de antígeno viral y de células control.

8.2 Replicación del virus en línea celular VERO, con la cepa TM171-03 del Virus del Oeste del Nilo

La semilla de trabajo se preparó a partir de la cepa TM171-03, procedente del primer aislamiento nacional, en su tercer pase en cultivos celulares, con un título viral de 10^{5.5} / ml TCID (35). El virus se replicó en 6 botellas Nunclon® de 75 cm² con un monoestrato 100% confluyente de 48 hrs de incubación, cada botella se infectó con un dilución de 1:10 del inóculo viral (100 µl de la cepa del VON y 900 µl de MEM) las cuales fueron colocadas en una estufa de cultivo a 37° C (CO₂ 5%) durante 60 minutos para permitir la adsorción viral; una vez transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo y se procedió a agregar 15 ml de medio de mantenimiento (MEM con 1 % de SFB) y colocar nuevamente los cultivos en 37° C (CO₂ 5%). Diariamente se revisaron las botellas infectadas en un microscopio invertido hasta observar en el monoestrato el 85% de lisis celular (efecto citopático) aproximadamente de 4 a 5 días. Inmediatamente se congelaron las botellas a - 70° C hasta su utilización. Simultáneamente se preparó un lote de células VERO sin infectar, utilizando el mismo procedimiento anterior, el cual fue

sometido a las mismas condiciones de crecimiento, para posteriormente utilizarlo como un control negativo en pruebas posteriores.

8.3 Obtención del antígeno

Las botellas infectadas se sometieron a un proceso de congelación y descongelación y con la ayuda de un gendarme se desprendieron las células infectadas de la superficie de las botellas. Se colectó el inóculo de las seis botellas en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó a 10,000 g durante 20 minutos a 4° C. La obtención del antígeno se realizó a partir del sobrenadante que fue almacenado a -70° C para su uso posterior, el “pellet” celular también fue conservado e inactivado para su verificación posterior. Los cultivos celulares propagados para el control celular sin infectar fueron sometidos al mismo procedimiento.

8.4 Inactivación del antígeno

8.4.1 Inactivación química con β -propiolactona

El sobrenadante y el pellet celular obtenidos fueron descongelados e inactivados a una dilución de 1:3000 mediante el uso de β -propiolactona, durante 72 hrs con agitación ligera en 4° C (inactivación química).

8.4.2 Inactivación física con irradiación gamma

Posterior a la inactivación química, considerando que las muestras del antígeno inactivado con β -propiolactona cumplió satisfactoriamente con la prueba de no tener efecto viral residual en cultivos celulares y ratones lactantes. Este antígeno se obtuvo de las instalaciones del laboratorio de alta seguridad CPA, siguiendo las recomendaciones e instrucciones para el embalaje/envasado y transporte de sustancias infecciosas de la OMS (11,46), empleando recipientes adecuados, debidamente sellados y etiquetados. Y se procedió a realizar la inactivación física mediante el uso de cobalto 60 a una dosis de radiación de 25 Kilogreys (Kgrs).

8.5 Pruebas de inactivación del antígeno

Las pruebas de inactivación, se realizaron en cultivos celulares para detectar que no se presentara efecto citopático por acción residual del virus (**Anexo 15.1**). Simultáneamente también se realizó la inoculación de ratones lactantes de 2 a 3 días de edad, para verificar la inactivación viral y como consecuencia no se presentara muerte en los ratones inoculados (**Anexo 15.2**).

8.6 Cuantificación de proteínas del antígeno inactivado por el método Lowry

La técnica de Lowry (47) se utilizó para determinar el contenido total de proteína en las muestras de antígeno inactivado (sobrenadante y pellet celular), control de células sin infectar (Cc) y medio de crecimiento (M)

Inicialmente se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina de 25 a 250 μg (**Tabla 5**) en agua desionizada. Las muestras problema tanto del antígeno, el control negativo de células y el medio de crecimiento se diluyeron de la siguiente manera (**Tabla 6**). A cada uno de los tubos se le adicionó 1 ml de reactivo de Lowry (**Anexo 15.4**) y se mezclaron perfectamente con ayuda de un vortex, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se les agregaron 100 μl de una solución sin diluir del reactivo Folin-Ciocalteu (también llamado reactivo de fenol) y agua. Finalmente, se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y la lectura se realizó en un biofotómetro a 595 nm.

La concentración de proteína presente en cada muestra se determinó interpolando los datos de la absorbancia obtenida, en la curva estándar de albúmina sérica bovina. Para el ajuste de la curva, fue empleada una regresión lineal y con este ajuste se determinó la concentración de proteína, tomando en cuenta el factor de dilución en cada una de las muestras.

Tabla 5. Curva estándar de Albúmina Bovina (BSA): 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tubo	Cantidad de Muestra Cuantificada	Volumen de agua desionizada	Concentración de BSA
Blanco	0 μl	1000 μl	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	0.1 μl	900 μl	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
2	0.2 μl	800 μl	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
3	0.3 μl	700 μl	75 $\mu\text{g}/\text{ml}$
4	0.4 μl	600 μl	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
5	0.5 μl	500 μl	125 $\mu\text{g}/\text{ml}$
6	0.6 μl	400 μl	150 $\mu\text{g}/\text{ml}$
7	0.7 μl	300 μl	175 $\mu\text{g}/\text{ml}$
8	0.8 μl	200 μl	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
9	0.9 μl	100 μl	225 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tabla 6. Cantidades de muestra cuantificadas por Lowry

Muestra	Volumen de muestra y diluyente (μ l)	Dilución
Antígeno (sobrenadante)	10/190	1:20
Antígeno (pellet celular)	10/190	1:20
Control de células	10/190	1:20
Medio de crecimiento	10/190	1:20

8.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La separación e identificación de las proteínas, se realizó en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) en condiciones no reductoras, por el método de Laemmli (48), de tal forma que las posiciones de las diferentes proteínas presentes en el gel se separan con la aplicación de la corriente eléctrica en función de sus pesos moleculares, esto se comparó con un marcador de peso molecular comercial (**Tabla 21**).

Preparación del gel separador o de corrimiento 12 % (PAGE-SDS).

Mediante el uso de un equipo Mini-PROTEAN[®] 3 cell de Bio-Rad, se preparó un gel de poliacrilamida a una concentración del 12 %. Este sistema permite la formación del gel de poliacrilamida mediante la utilización de dos cristales de 12x11 y 12x10 cm con espaciadores de vidrio de 75 mm incluidos con el equipo, los cuales fueron montados en un soporte para su corrimiento en la cámara de electroforesis Bio-Rad (**Ver figura 9**).

Inicialmente se preparó la mezcla de reactivos (**Anexo 15.5**) para un gel, evitando la formación de burbujas, esto debido a que el aire interfiere con la polimerización del gel. Una vez realizada la mezcla (**Tabla 7**), un volumen aproximado de 2.5 ml fue depositado cuidadosamente dentro del soporte armado previamente para la formación del gel, a un nivel aproximado de 2 cm del borde. Posteriormente por el borde de los cristales, se agregó lentamente 500 μ l de etanol a la superficie del gel, con la finalidad de eliminar posibles burbujas formadas, alinear la superficie del gel y obtener una capa, cuya interfase se observó cuando el gel ya había polimerizado. Una vez polimerizado el gel, se inclinó el soporte para eliminar el etanol, se lavó la superficie con agua desionizada y se agregó 1 ml de la solución F (para regularizar las condiciones de pH necesarias para el gel de corrimiento). El gel se dejó reposar durante 5 minutos.

Tabla 7. Preparación del gel separador o de corrimiento de poliacrilamida al 12 %.

Reactivos	Volumen (μ l)
Agua desionizada	1600
Mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30 %	2000
Amortiguador 1.5 M, TRIS pH=8.8	1300
Dodecil sulfato de sodio al 10 %	50
Persulfato de amonio al 10 %	50
TEMED	2

Preparación del gel empacador 10% (PAGE-SDS).

Se eliminó el líquido que se encontraba en la parte superior del gel separador (Solución F), y posteriormente se agregó 0.5 ml de gel empacador el cual se preparó a una concentración del 5 % de poliacrilamida, (**Tabla 8**). Se mezcló perfectamente todos los reactivos, evitando la formación de burbujas. Se adicionó esta mezcla a la superficie del gel separador y se llenó el soporte conteniendo el separador hasta el borde. En el gel se insertó el peine para la formación de 10 pozos, evitando generar burbujas bajo los dientes de éste, permitiendo así la formación de diferentes pozos o carriles para la colocación de las diferentes muestras. El gel se dejó reposar durante 30 minutos.

Tabla 8. Preparación del gel empacador de poliacrilamida al 10 %.

Reactivos	Volumen (μ l)
Agua desionizada	2350
Mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30 %	690
Amortiguador 1 M, TRIS pH=6.8	870
Dodecil sulfato de sodio al 10 %	41.4
Persulfato de amonio al 10 %	41.4
TEMED	6

Montaje del gel en la cámara de electroforesis.

Se retiró el peine suavemente del gel, evitando la destrucción de los pozos. Inmediatamente se llenaron los pozos con agua desionizada y posteriormente se drenaron invirtiendo la cámara y eliminando el excedente de agua, mediante el uso de una toalla absorbente. El soporte de los geles se colocó en su posición dentro de la cámara electroforética (**Figura 9**) y cada pozo fue llenado con amortiguador de corrimiento (solución H).

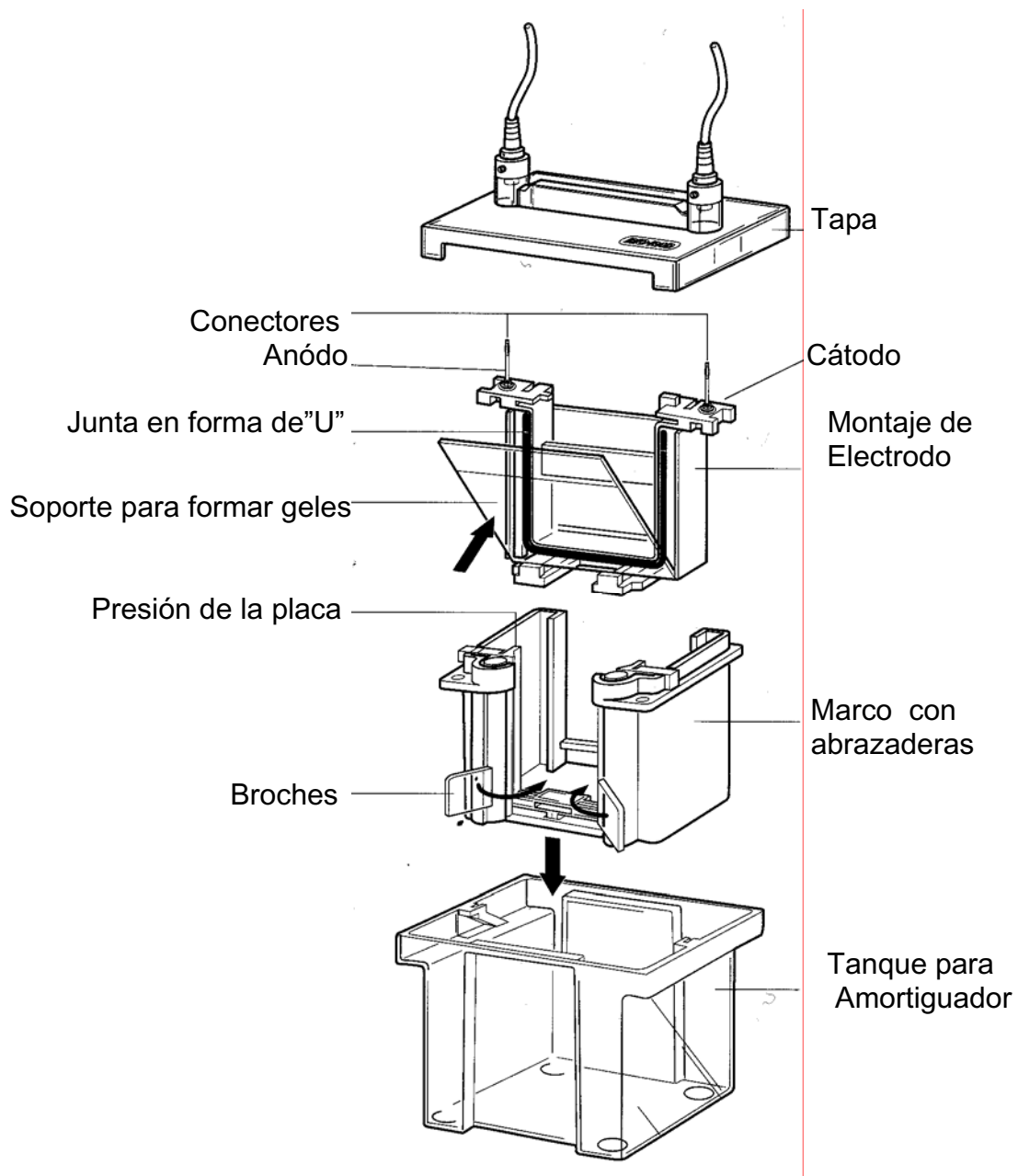


Figura 9. Equipo para electroforesis Mini-Protean 3 Cell de Bio-Rad

Preparación de la muestra.

A partir de la concentración de proteína determinada por el método de Lowry, de las muestras de antígeno inactivado (sobrenadante y pellet celular), se procedió a tomar una alícuota en tubos eppendorf conteniendo la cantidad necesaria para colocar 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína en cada carril del gel por cada muestra, simultáneamente se agregó un volumen igual de amortiguador de muestra y se adiciono 1 μl de rojo de fenol a 0.1 %. (**Tabla 9**), inmediatamente se colocó en baño María a ebullición durante 90 segundos, con la finalidad de lograr la desnaturalización de la proteína en presencia de SDS y en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol.

Carga de las muestras y corrida electroforética.

El marcador de pesos moleculares y las diferentes muestras se colocaron de acuerdo a la (**Tabla 9, Figura 10**). Se llenó la parte inferior de la cámara de electroforesis con amortiguador de corrimiento y posteriormente se llenó el compartimento interior. Se conectó la cámara de electroforesis a una fuente de poder, aplicando una corriente eléctrica de 80 V durante 2 o 3 minutos, hasta que las muestras penetraron al gel separador, posteriormente se procedió a elevar el voltaje a 100 V y se suspendió cuando el colorante (rojo de fenol) se colocaba a un cm. del final del gel.

Tabla 9. Colocación de las muestras en el gel SDS-PAGE

Muestra	Carril	Volumen de muestra	Volumen de amortiguador de muestra
Marcador de P.M	1	5 μl	0 μl
Antígeno(Pellet)	2	10.1 μl	10.1 μl
Antígeno(sobrenadante)	3	6.3 μl	6.3 μl

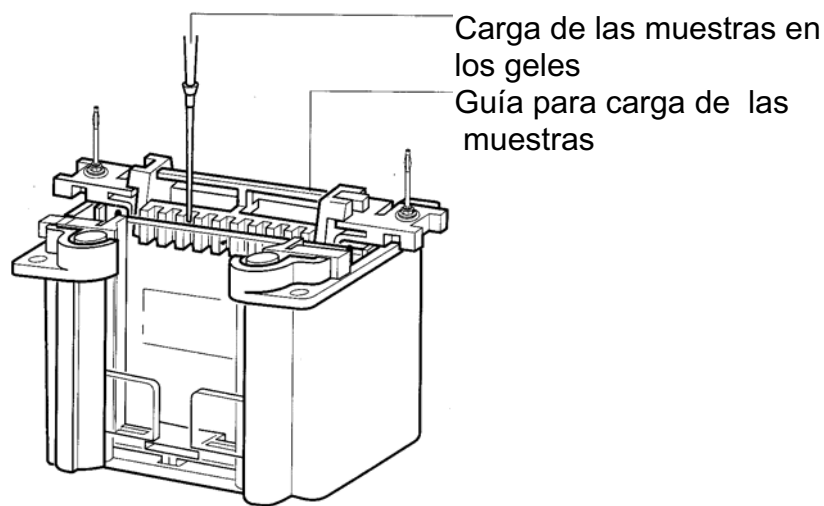


Figura 10. Colocación de las muestras en el gel de poliacrilamida.

Tinción y decoloración de los geles de poliacrilamida.

Al término del corrimiento electroforético, el gel fue colocado en un recipiente que contenía solución colorante de azul de Coomassie en un volumen suficiente para cubrir el gel completamente, la tinción se llevó a cabo por 24 horas en una placa de agitación. Posteriormente, el exceso de colorante en el gel se eliminó con solución decolorante 1, hasta que se logró apreciar con claridad las bandas de proteína, aproximadamente una hora y se transfirió el gel a la solución decolorante 2, hasta que se observaron perfectamente las bandas y el fondo azul desapareció. El gel fue evaluado determinando el peso molecular de las proteínas obtenidas de las muestras, considerando su posición en el gel, respecto al estándar de proteínas conocido (marcador de peso molecular), utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf.

Siguiendo el procedimiento anterior para la formación de geles de poliacrilamida, se procedió a realizar un gel preparativo de poliacrilamida al 12 %, partiendo de la concentración de proteína obtenida por el método de Lowry, de la muestra de antígeno inactivado (sobrenadante) se procedió a tomar una alícuota en un tubo eppendorf conteniendo la cantidad necesaria para colocar 10 µg/ml de proteína en un carril del gel para toda la muestra, simultáneamente se agregó un volumen igual de amortiguador de muestra y se adicionó 1 µl de rojo de fenol al 0.1 %. (**Tabla 10**), inmediatamente se colocó en baño María a ebullición durante 90 segundos, con la finalidad de lograr la desnaturalización de la proteína en presencia de SDS y en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol. Posteriormente el gel fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa, para su posterior evaluación.

Tabla 10. Colocación de las muestras en un gel preparativo de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %

Muestra	Carril	Volumen de muestra	de	Volumen de amortiguador de muestra
Marcador de P.M	1	5 µl		0 µl
Antígeno(Sobrenadante)	2-10	153.5 µl		153.5 µl

Geles de poliacrilamida discontinuos al 10% en condiciones no reductoras.

Mediante el uso del equipo Mini-PROTEAN® 3 cell de Bio-Rad, se prepararon dos geles de poliacrilamida a una concentración del 10 %. Este sistema permite la formación de dos geles de poliacrilamida simultáneamente, la mezcla de reactivos empleada para la preparación de los geles se describe en las (**Tablas 11 y 12**).

Con el objeto de evidenciar con mayor precisión las proteínas recuperadas del antígeno (sobrenadante) con respecto al control de células negativo (Cc) y medio de crecimiento con 1 % de SFB (M), se colocaron en ambos geles las diferentes muestras, de las cuales se procedió a tomar una alícuota en tubos eppendorf conteniendo la cantidad necesaria para colocar 10 µg/ml de proteína en

cada carril del gel por cada muestra, simultáneamente se agregó un volumen igual de amortiguador de muestra y se adicionó 1 μ l de rojo de fenol a 0.1 %, inmediatamente se colocó en baño María a ebullición durante 90 segundos, con la finalidad de lograr la desnaturalización de la proteínas en presencia de SDS, en condiciones no reductoras. Las muestras fueron colocadas en los geles de acuerdo a las (Tablas 13 y 14). Uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y el otro fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa.

Tabla 11. Preparación del gel separador de poliacrilamida al 10 %.

Reactivos	Volumen (μ l)
Agua desionizada	3232
Mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30 %	2333
Amortiguador 1.5 M, TRIS pH=8.8	1316
Dodecil sulfato de sodio al 10 %	70
Persulfato de amonio al 10 %	36
TEMED	10

Tabla 12. Preparación del gel empacador de poliacrilamida al 10 %.

Reactivos	Volumen (μ l)
Agua desionizada	2350
Mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30 %	690
Amortiguador 1 M, TRIS pH=6.8	870
Dodecil sulfato de sodio al 10 %	41.4
Persulfato de amonio al 10 %	41.4
TEMED	6

Tabla 13. Colocación de las muestras en el gel SDS-PAGE

Muestra	Carril	Volumen de muestra	Volumen de amortiguador de muestra
Marcador	1	5 μ l	0 μ l
Antígeno	2	6.3 μ l	6.3 μ l
Células (Cc)	3	4.57 μ l	4.57 μ l
Medio de crecimiento (M)	4	5.62 μ l	5.62 μ l

Tabla 14. Colocación de las muestras en el gel SDS-PAGE para inmunotransferencia

Muestra	Carril	Volumen de muestra	de	Volumen de amortiguador de muestra
Marcador	1	5 μ l		5 μ l
Antígeno(sobrenadante)	2	6.3 μ l		6.3 μ l
Células (Cc)	3	4.57 μ l		4.57 μ l
Medio de crecimiento (M)	4	5.62 μ l		5.62 μ l
Marcador	6	5 μ l		5 μ l
Antígeno(sobrenadante)	7	6.3 μ l		6.3 μ l
Células (Cc)	8	4.57 μ l		4.57 μ l
Medio de crecimiento (M)	9	5.62 μ l		5.62 μ l

8.8 Inmunotransferencia

A partir de la separación electroforética de las proteínas en PAGE-SDS, la muestra se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 10X10 cm en un aparato Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad.

La metodología que se empleó fue el sistema de emparedado, que consistió en colocar sobre una rejilla de plástico provista en el equipo para electrotransferencia, diferentes hojas en el siguiente orden: una esponja, papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja (**Figura 11**). La rejilla fue cerrada perfectamente y se colocó en la cámara de electrotransferencia que contenía amortiguador de transferencia (**Anexo 15.6**), teniendo especial cuidado en la orientación de la membrana de nitrocelulosa hacia el ánodo. El equipo se conectó a la corriente eléctrica y se realizó la transferencia durante una hora a 400 miliamperes (mA), de acuerdo con Towbin y Gordon (49).

Una vez realizada la transferencia de proteínas del gel preparativo de poliacrilamida en condiciones reductoras a la membrana de nitrocelulosa, la membrana se cortó en cuatro partes, colocando dos porciones en leche descremada al 5% y las otras dos en solución de caseína al 1%, con la finalidad de bloquearlas para evitar posteriores reacciones inespecíficas. Al día siguiente se eliminó la leche descremada y la caseína de las membranas, las cuales se lavaron en agitación agregando en dos ocasiones PBS-Tween al 0.1 %, durante 5 minutos respectivamente y dos veces con PBS cada 5 minutos. Posteriormente las membranas se colocaron en cuatro recipientes independientes que contenían suero positivo y negativo diluido (1:40) en leche descremada y caseína, las cuales fueron incubados toda la noche a 4° C para permitir la reacción antígeno-anticuerpo. Se retiró el suero de cada membrana y se aplicó el mismo sistema de lavado en agitación. Inmediatamente, las membranas se colocaron en una dilución 1:500 del conjugado anti IgG de caballo en leche descremada y caseína, las cuales se incubaron durante dos horas a 37° C. Al finalizar la incubación las membranas se lavaron nuevamente como en el paso anterior y finalmente se revelaron con 4-cloronaftol y peróxido de hidrógeno, que se preparó inmediatamente antes de usarse. El mismo procedimiento se realizó para las diferentes muestras evaluadas

Siguiendo el mismo procedimiento para la inmunoelectrotransferencia de proteínas de geles de poliacrilamida, se realizó la transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras a la membrana de nitrocelulosa, la membrana fue colocada en un recipiente que contenía leche descremada al 5 %, durante toda la noche a 4° C, para bloquear y evitar reacciones inespecíficas. Al día siguiente se eliminó la leche descremada y la membrana se lavó en agitación agregando en dos ocasiones PBS-Tween al 0.1 %, durante 5 minutos respectivamente y dos veces con PBS cada 5 minutos. Posteriormente la membrana se cortó por la mitad y cada una de las partes se colocó en recipientes independientes que contenían suero positivo y negativo diluido (1:40) en leche descremada, las cuales fueron incubadas toda la noche a 4 ° C para permitir la reacción antígeno-anticuerpo. Se retiró el suero de cada membrana y se aplicó el mismo sistema de lavado en agitación. Inmediatamente, las membranas se colocaron en una dilución 1:500 del conjugado anti IgG de caballo en leche descremada las cuales se incubaron durante dos horas a 37° C. Al término de la incubación las membranas se lavaron nuevamente como en el paso anterior y finalmente se revelaron con 4-cloronaftol y peróxido de hidrógeno, que se preparó inmediatamente antes de usarse. El mismo procedimiento se realizó para las diferentes muestras evaluadas.

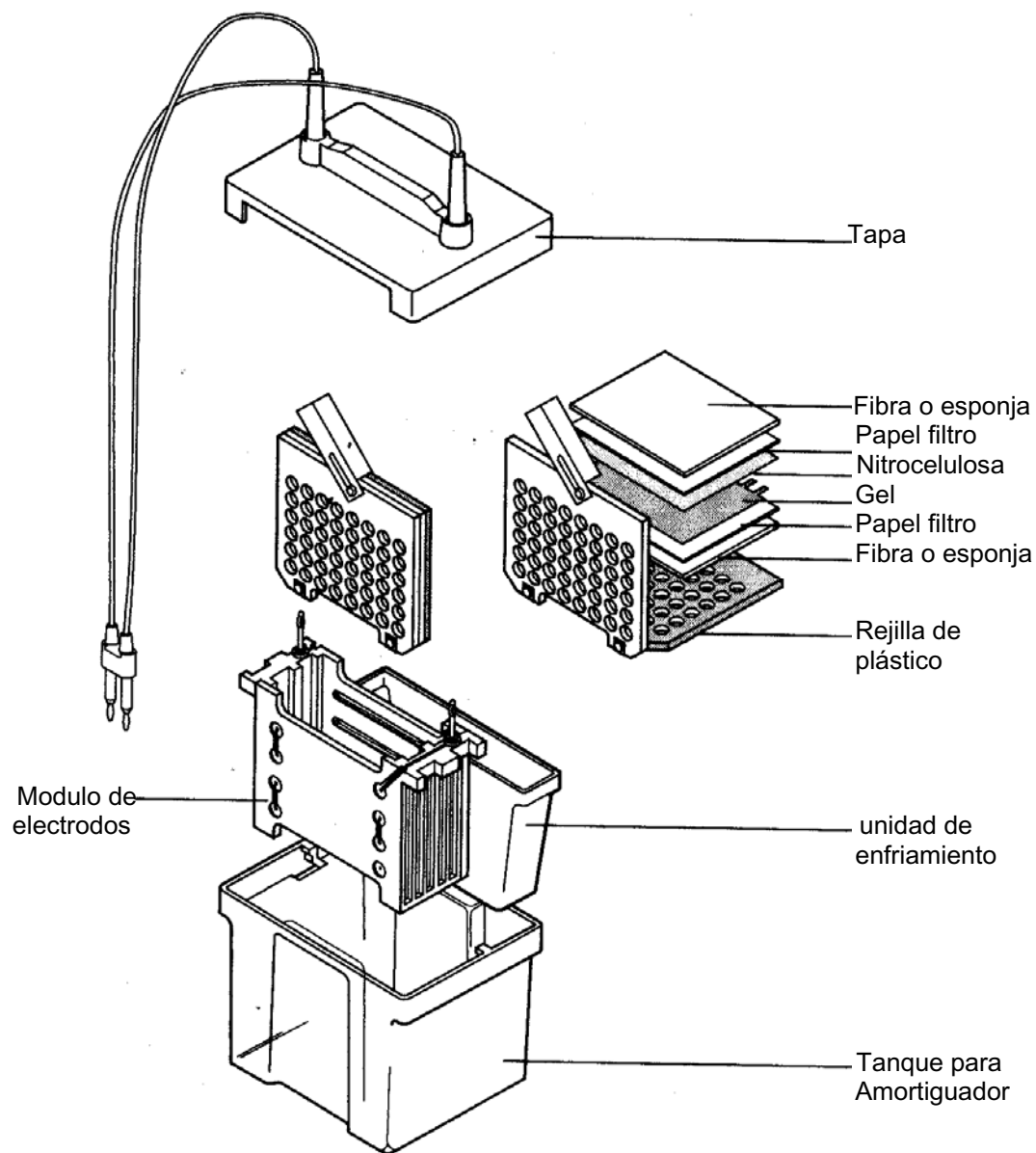


Figura 11. Equipo de inmunotransferencia, Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad.

8.9 Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA-Indirecta.

Para el desarrollo de la técnica de ELISA (50), se consideraron algunos factores importantes tales como: adsorción y titulación del antígeno, pool de controles de suero positivos (procedentes de animales vacunados), pool de sueros negativos (animales libres), titulación de conjugado, cinética de reacción del sustrato, tiempo de incubación, temperatura, pH de las soluciones amortiguadoras, tiempo óptimo de lectura e interpretación de resultados (51).

Procedimiento para la estandarización del ELISA

Con el antígeno del VON inactivado e irradiado se preparó un lote piloto en microplacas de fondo plano con 96 pocillos (NUNC Polysorp Surface) para su evaluación. Se determinó la concentración óptima de antígeno para sensibilizar microplacas, utilizando diluciones dobles desde 1:25 hasta 1:800 con el modelo denominado "titulación por bloque" es decir; se utilizaron diferentes diluciones de antígeno frente a diferentes diluciones de conjugado a partir de una dilución de 1:125 hasta 1:8000 (**Figura 12**), fijando la dilución de los sueros controles a 1:200 en toda la placa (52).

La absorción del antígeno en el fondo de las placas, se probó mediante el uso de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 y amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 (**Anexo 15.7**). Simultáneamente se antigenaron dos placas con el antígeno solamente inactivado antes de irradiarlo en amortiguador de carbonatos y fosfatos, para determinar su título de la misma manera que para el antígeno inactivado e irradiado. En todos los ensayos se consideró un volumen de 100 μ l para cada pozo, las placas se sellaron con papel parafilm y se colocaron dentro de una cámara húmeda la cual se incubó en refrigeración a 4° C durante toda la noche. El criterio para seleccionar la dilución de antígeno se consideró en donde se encontrara la mayor diferencia entre el suero control positivo y negativo (mínimo 0.25 unidades de densidad óptica (DO), y donde la reacción inespecífica (fondo) fuera menor de 0.05 DO.

Para la determinación del tiempo de lectura del ensayo, se elaboró la curva de cinética de reacción del sustrato TMB, mediante lecturas de la densidad óptica durante 30' a intervalos de 5', en un densitómetro automático Multiskan Plus MKII (Flow Laboratories) con filtro de interferencia a 450 nm, buscando el punto en el cual es preferible detener químicamente la reacción en relación al criterio anteriormente mencionado.

Prueba de ELISA

1. Se antigenaron las placas PolySorp con el antígeno inactivado y se incubaron durante toda la noche a 4° C.
2. Al día siguiente se eliminó el antígeno que no se adhirió a las placas y se realizaron 3 lavados de 200 μ l con PBS-Tween al 0.1 %, sacudiendo las placas en una toalla de papel, después de desechar el contenido de cada lavado.

3. Inmediatamente en cada pozo se adicionaron 200 μ l de leche descremada al 5 % en PBS y se incubó la placa a 37° C, durante 1 hora.
4. Posteriormente se lavaron 3 veces las placas con PBS-Tween al 0.1 % y se agregaron 50 μ l de los controles positivo y negativo (pools de 10 sueros) diluidos 1:200 en leche al 5 % en PBS, la placa se sello con parafilm y se metió dentro de una cámara húmeda, la cual se incubó 1 hora a 37° C.
5. Pasado este tiempo se realizaron 4 lavados como en el paso anterior y se colocaron 50 μ l de la dilución de conjugado, diluido en leche al 5 % en PBS, las placas se sellaron e incubaron en cámara húmeda, durante 1 hora a 37° C.
6. Al término del periodo de incubación de las placas, éstas se lavaron con la solución de lavado durante 4 veces como se mencionó anteriormente, inmediatamente se depositaron 95 μ l de la solución de cromógeno, las placas se incubaron durante 10 minutos a 37° C, la reacción se paró con 95 μ l de ácido sulfúrico 2 M, cambiando de una coloración azul a color amarillo y se tomo la lectura de cada uno de los pozos de la placa con un lector automático de placas a 450 nm.

Figura 12. Esquema para la titulación de antígeno y conjugado.

Antígeno \longrightarrow

		1:25		1:50		1:100		1:200		1:400		1:800	
Conjugado \downarrow		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:125	A	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:250	B	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:500	C	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:1000	D	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:2000	E	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:4000	F	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:8000	G	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
C.C	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

8.10 Desarrollo de la técnica de ELISA indirecta

Mediante el establecimiento de las condiciones óptimas para la prueba de ELISA, fue posible emplearla en sueros positivos y negativos al VON. Se analizaron un total de 20 sueros de equinos, clasificados previamente como positivos (n=10) o negativos (n=10) por la prueba de PRNT, en relación con un juego de sueros control (control fuerte positivo, control débil positivo y control negativo).

1. Se antigenaron las placas Polysorp con una dilución de antígeno 1:100 en amortiguador de fosfatos pH 7.4. Adicionando 100 μ l de la dilución anterior en cada uno de los 96 pozos. Las placas se sellaron con parafilm y se introdujeron en una cámara húmeda la cual se incubó a 4° C, durante toda la noche.
2. Al día siguiente se eliminó el antígeno no absorbido dentro de la placa, mediante 3 lavados de 200 μ l por pozo con amortiguador de fosfatos-Tween 20 al 0.1%. Al finalizar los lavados, se depositaron 200 μ l por pozo de leche descremada al 5 % en PBS pH 7.4 y se incubaron las placas durante 1 hora a 37° C.
3. Al término del periodo de incubación, la leche descremada se eliminó y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 1%. Se prepararon las diluciones de controles de suero y muestra 1:200 en PBS-Leche descremada al 5 % y se colocaron 50 μ l en cuatro pozos de la placa, para cada uno de los controles y 2 pozos para cada una de las 40 muestras por placa, de la siguiente manera: (**Figura 13**). Las placas se sellaron e introdujeron en cámara húmeda, se procedió a incubarlas 1 hora a 37° C.
Al finalizar la incubación las placas se lavaron en 4 ocasiones con 200 μ l por pozo de PBS-TWEEN 20 y se agregaron 50 μ l por pozo de una dilución 1:500 de conjugado anti-igG de caballo marcado con peroxidasa, se incubaron las placas durante el lapso de 1 hora a 37° C.
4. Al concluir el periodo de incubación, se lavaron 4 veces las placas con 200 μ l por pozo de PBS-TWEEN y se depositaron 95 μ l de substrato (TMB), inmediatamente las placas se incubaron durante 25 minutos a 37° C.
5. La reacción fue detenida al finalizar los 25 minutos de incubación, mediante la adición de 95 μ l por pozo de H₂SO₄ 2 M. La lectura de cada uno de los pozos se llevó a cabo en el lector automático de ELISA con un filtro de 450 nm y mediante un programa de cómputo desarrollado originalmente en el ADRI (Animal Diseases Research Institute) Canadá (53), para su uso por la AIEA/FAO y actualmente adaptado para el diagnóstico del VON.
Mediante los resultados obtenidos se realizó el cálculo del punto de corte con el programa Win-Episcopo (54).

Figura. 13 Esquema para colocar los controles y sueros en las placas.

	Controles		Muestras de suero en duplicado									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C.C	C.C	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
B	C.C	C.C	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
C	C++	C++	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
D	C++	C++	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
E	C+	C+	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
F	C+	C+	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
G	C-	C-	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
H	C-	C-	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40

- C. C control de conjugado
- C++ control fuerte positivo
- C+ control débil positivo
- C- control negativo

8.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Win-Episcope (54).

La evaluación de las pruebas de ELISA, se realizó en comparación con los resultados de la PRNT, mediante una tabla de contingencia de 2 x 2 (**Tabla 15**), empleando el programa de cómputo Win-Episcope, Ver 2.0, para determinar valores de sensibilidad y especificidad (54, 55).

Tabla 15. Tabla de contingencia de 2x2 para obtener la sensibilidad y especificidad (53).

		PRNT(Prueba de oro)		Total
		SI	NO	
ELISA	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
Total		A+C	B+D	N

- A = número de verdaderos positivos
- B = número de falsos positivos
- C = número de falsos negativos
- D = número de verdaderos negativos

$$\text{Sensibilidad (\%)} = 100 \cdot A / (A+C)$$

$$\text{Especificidad (\%)} = 100 \cdot D / (B+D)$$

La validación de los inmunoensayos se realizó mediante un análisis de concordancia con respecto a la prueba de referencia. La concordancia entre ambas pruebas se determinará mediante la prueba de KAPPA, que expresa la proporción de concordancia de que ambas pruebas coincidan más allá del azar (**Tabla 16**). Cuando KAPPA tiene un valor de 0 indica que no existe concordancia entre las pruebas evaluadas; si se presenta un valor de 1.0, indica una perfecta concordancia. KAPPA no indica cual método da mejores resultados en términos de números correctos de animales sanos o enfermos (56, 57).

Tabla 16. Tabla de contingencia de 2x2 para obtener la concordancia entre ensayos (53).

		PRNT(Prueba de oro)		Total
		+	-	
ELISA	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
Total		A+C	B+D	N

A+D = número de resultados iguales

$(A+D)/N$ = proporción de resultados iguales

B+C = número de resultados diferentes

Según el azar, la proporción esperada (EP) o resultados iguales debidos al azar es:

$$EP = \frac{(A+B)}{N} \cdot \frac{(A+C)}{N} + \frac{(C+D)}{N} \cdot \frac{(B+D)}{N}$$

La máxima proporción de concordancia no debida al azar es 1-EP.

La proporción de concordancia descontado el azar es: $\frac{(A+D)}{N} - EP$

Kappa se define como:

$$\kappa = \frac{\frac{(A+D)}{N} - EP}{1-EP}$$

9. RESULTADOS

9.1 Obtención de antígeno

Se obtuvo un lote piloto de antígeno de 50 ml, producto de la infección de 6 botellas (75 cm³) de células Vero infectadas con el VON. El efecto citopático en los cultivos se observó al día 5 postinoculación. Los cultivos fueron sometidos a un proceso de congelación y descongelación, para la obtención del sobrenadante y el pellet celular, estas dos fracciones obtenidas de antígeno fueron sometidas a la inactivación química utilizando β -propiolactona a una dilución de 1:3000 y física mediante la aplicación de una dosis de radiación gamma de 25 Kgr. La correcta inactivación se evidenció al observar resultados negativos en las pruebas de aislamiento viral en cultivo celular, así como en la prueba de inoculación de ratones lactantes; es decir: al no observarse efecto de actividad viral residual, con la ausencia de efecto citopático, ni muerte de los ratones lactantes hasta 15 días después de su inoculación, respectivamente.

9.2 Determinación de proteínas por el método de Lowry

Los resultados obtenidos en el establecimiento de la curva estándar mediante el método de Lowry, se muestran en la **Figura 14**, la cual fue construida para la determinación de proteínas en las muestras de antígeno inactivado (sobrenadante y pellet celular). Así como también para el control de células (Cc) y el medio de cultivo (M) empleado para el crecimiento de los cultivos celulares, los resultados se muestran en la **Tabla 17**.

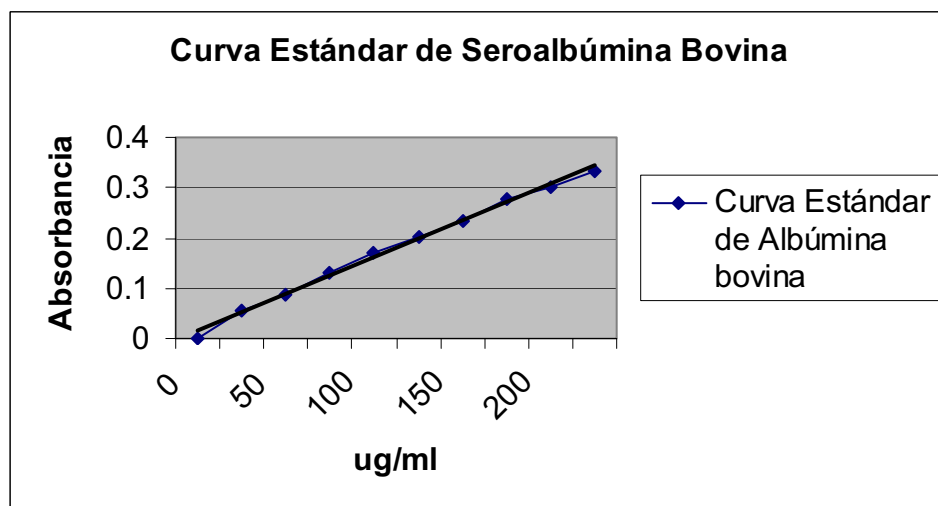


Figura 14. Curva Estándar de Seroalbúmina Bovina

Tabla 17. Concentración de proteína obtenida en cada una de las muestras por el método de Lowry

Muestra	Concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$)
Antígeno (Pellet)	991
Antígeno(sobrenadante)	1580
Control de células	2185
Medio de crecimiento con 1 % de suero	1777

9.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El gel de electroforesis (SDS-PAGE) al 12 % en condiciones reductoras para las muestras de antígeno del pellet y sobrenadante, se presenta en la **Figura 15**. En la muestra de pellet se puede observar la presencia de un gran número de bandas pertenecientes a material proteico con poca definición; a diferencia del antígeno obtenido a partir del sobrenadante, donde se logró visualizar una proteína de aproximadamente 53 Kd que se sugiere corresponde a la glicoproteína E del VON y otra banda inespecífica (B2).

El gel (SDS-PAGE) al 10 %, en condiciones no reductoras, funcionó para precisar que la proteína de 53 Kd, es exclusiva del antígeno (sobrenadante) como se puede observar en la **Figura 16**, a diferencia de las muestras de control de células y medio de crecimiento donde no aparece esta banda. Interesantemente en la muestra de antígeno, también se logra observar una segunda banda superior a los 53 Kd, la cual podría pertenecer al suero fetal bovino utilizado para el mantenimiento de los cultivos celulares durante la producción del antígeno, ya que la misma banda se logró observar en los carriles de las muestras correspondientes al control de células y medio de crecimiento con 1% de SFB respectivamente. (**Figura 16 y 18**).

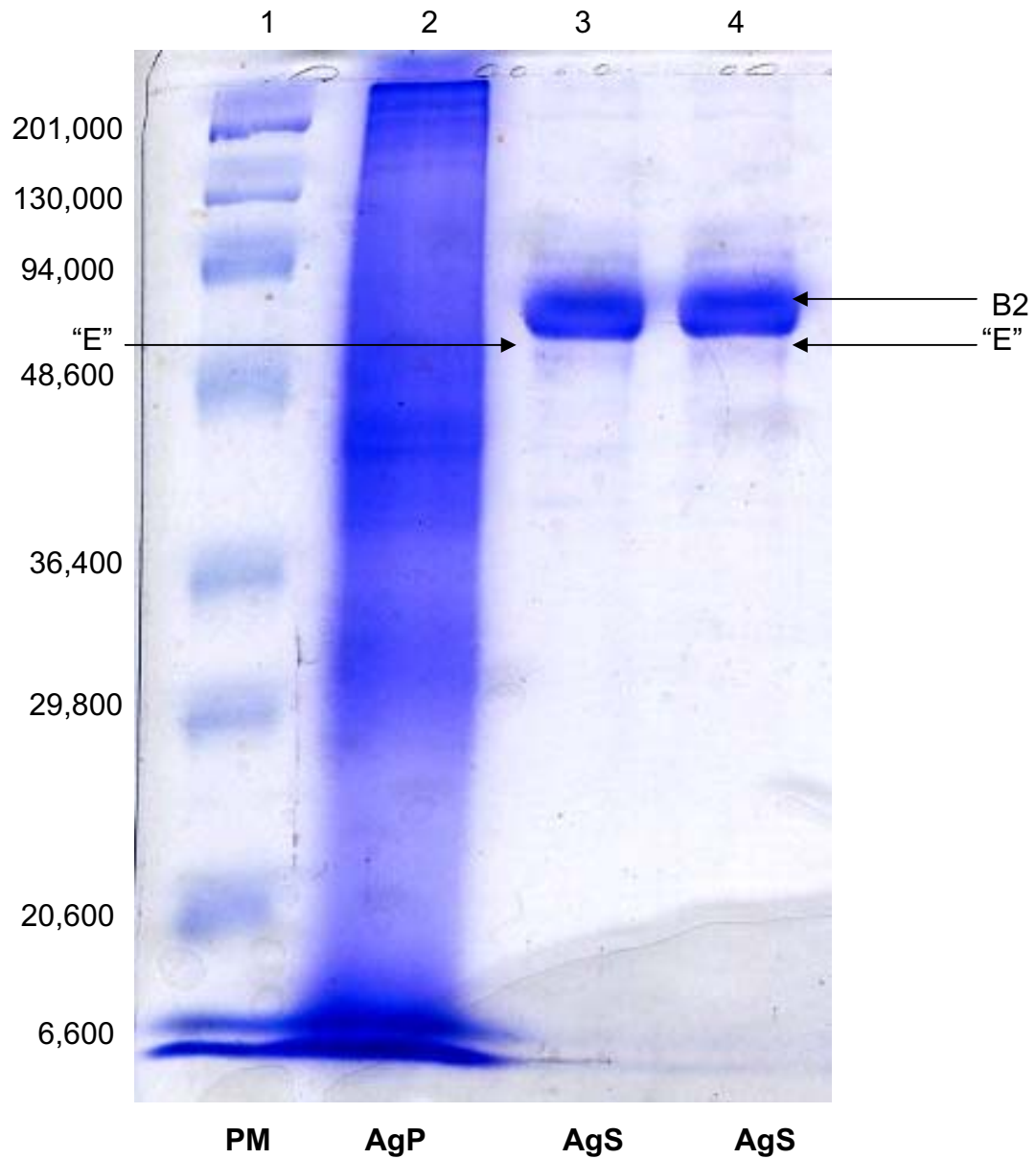


Figura 15. PAGE-SDS al 12 % en condiciones reductoras, teñido con azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (PM), antígeno pellet (AgP), antígeno sobrenadante (AgS) y antígeno sobrenadante (AgS).

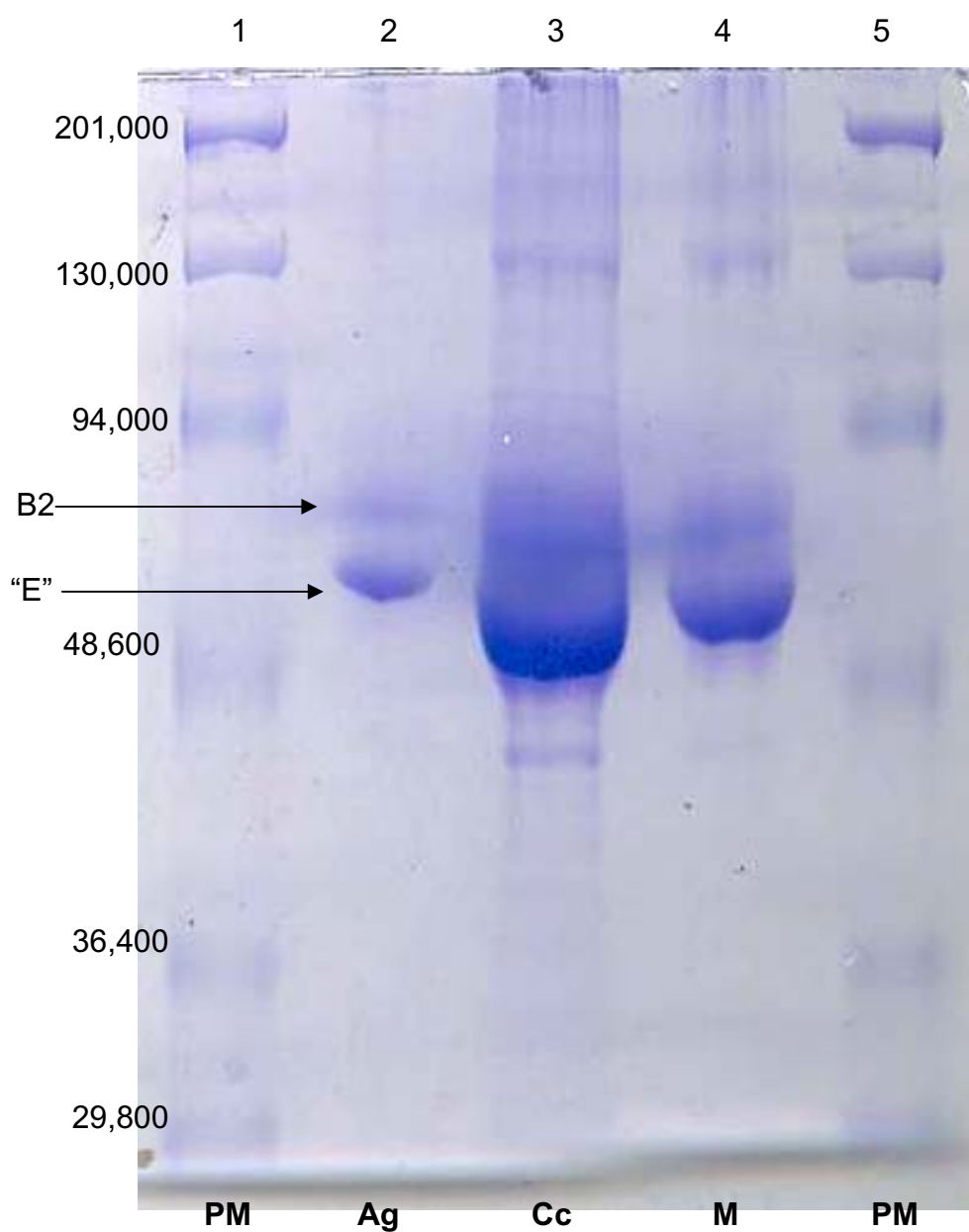


Figura 16. PAGE-SDS al 10 % en condiciones no reductoras, teñido con azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (PM), antígeno (Ag), control de células (Cc), medio de crecimiento (M).

9.4 Inmunotransferencia y Western-Blot.

La inmunotransferencia de las proteínas contenidas en el antígeno se realizó a partir del gel preparativo de poliacrilamida en condiciones reductoras, a una membrana de nitrocelulosa. Con estas membranas, se hicieron reaccionar los sueros controles (positivo y negativo) utilizando dos tipos de bloqueadores como fue Caseína al 1% y Leche descremada al 5%, los resultados obtenidos cuando se utilizó caseína, mostraron una gran cantidad de reacción de fondo tanto en el suero positivo, como en el negativo, a diferencia de cuando se utilizó leche descremada, como se observa en la **Figura 17**.

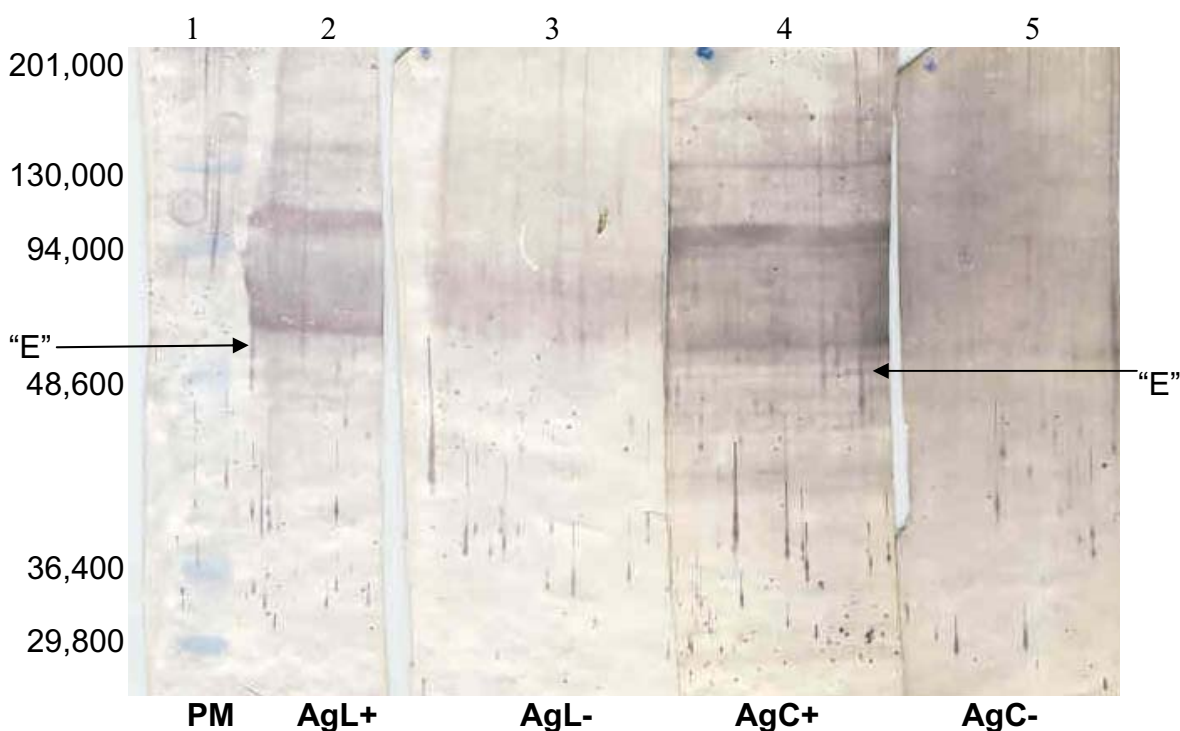


Figura 17. Prueba de Western-blot de la muestra de antígeno (sobrenadante) a partir de un gel preparativo al 12 % en condiciones reductoras. Marcador de peso molecular (PM), antígeno con suero positivo en leche (AgL+), antígeno con suero negativo en leche (AgL-), antígeno con suero positivo en caseína (AgC+), antígeno con suero negativo en caseína (AgC-).

Adicionalmente también se realizó una prueba de Western-blot de las proteínas presentes en el control de células (Cc) y medio de crecimiento junto con el antígeno obtenido del sobrenadante. Los resultados obtenidos son mostrados en la **Figura 18**, donde se observa en el carril No. 2 (muestra del antígeno), dos bandas una de las cuales (B1) de aproximadamente 53 Kd, que se considera es específica del antígeno que corresponde a la glicoproteína E del VON misma que no aparece en las otras muestras en presencia de suero control positivo (carril 3 y 4). La otra banda (B2) que se observa, que corresponde a proteínas presentes tanto en el medio de cultivo como en las células (carril 3 y 4). Los resultados de esta prueba son muy similares a los observados en el gel de poliacrilamida de la **Figura 16**, que se realizó bajo las mismas condiciones no reductoras. En el carril 7, 8 y 9 correspondiente a las mismas muestras, en presencia de suero control negativo, se observó que el antígeno (carril 7) no presentó reacciones inespecíficas en la membrana de nitrocelulosa, no obstante las muestras de Cc y medio de cultivo (carril 8 y 9) presentaron ciertas bandas inespecíficas, mismas que no aparecen en el antígeno seleccionado.

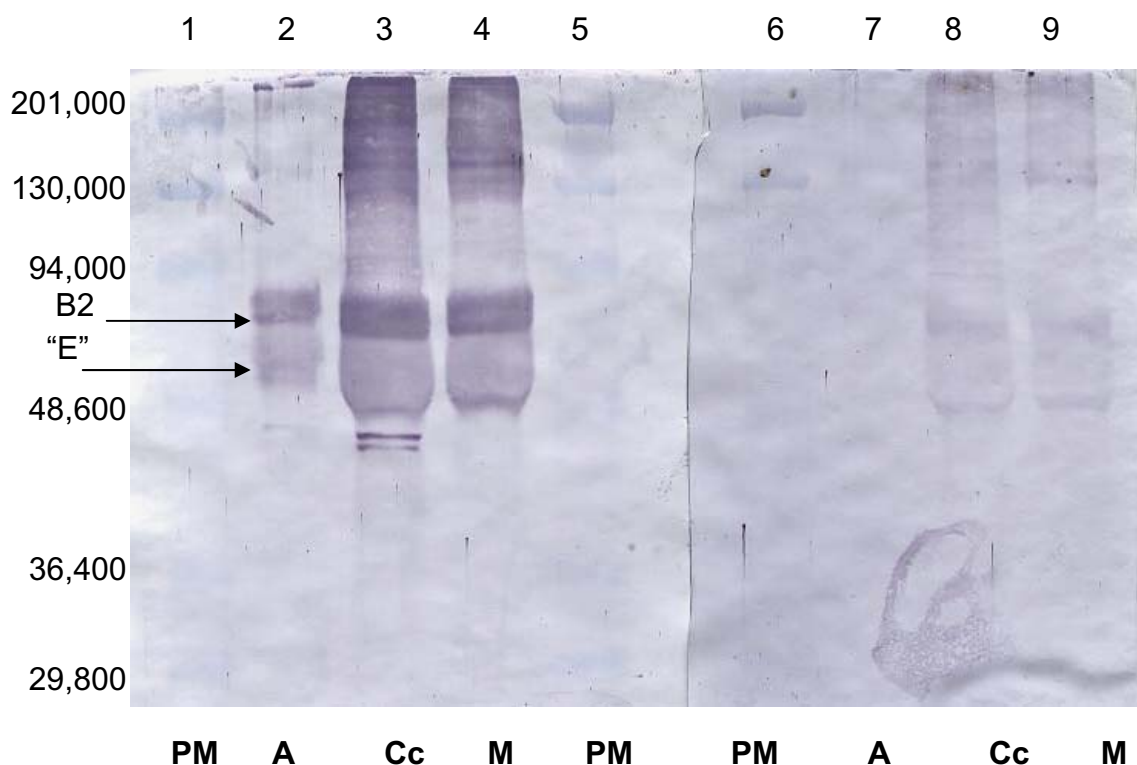


Figura 18. Inmunotransferencia de un gel al 12 % en condiciones no reductoras de: marcador de peso molecular (PM), antígeno del VON (A), control de células (Cc), medio de crecimiento (M) y empleando un pool de sueros positivos al VON. Marcador de peso molecular (PM), antígeno del VON (A), control de células (Cc), medio de crecimiento (M), empleando un pool de sueros negativos al VON.

9.5 Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA

Mediante la titulación en bloque se logro establecer la cantidad mínima necesaria del antígeno para sensibilizar las placas de poliestireno para la prueba de ELISA. Se determinó que la concentración óptima de antígeno fue a una dilución de 1:100 (16 µg/ml). También se observó que al realizar la antigenación con el amortiguador de fosfatos se obtenía una mayor diferencia entre los sueros positivos y negativos, a diferencia de cuando se utilizó el amortiguador de carbonatos, el suero negativo mostraba una mayor reacción de fondo en cada unas de las diferentes diluciones de antígeno y conjugado. La dilución de suero para la realización de este ensayo fue fijada a 1:200. La concentración de conjugado anti IgG de Caballo conjugado con peroxidasa, que permitió la mayor diferencia entre los controles de suero y que presentó una baja reacción de fondo, fue a una dilución 1:2000 (**Figuras 22 y 23**).

El tiempo óptimo de incubación del sustrato TMB, empleado en este ensayo, fue determinado mediante la construcción de una curva para la cinética de reacción (**Figura 21**), realizando diferentes lecturas de la absorbancia (450 nm) durante un período de 30 minutos a intervalos de 5 min., donde se observó la mayor diferencia en las unidades de densidad óptica (DO) entre los sueros control positivo y negativo a 25 min., después de iniciada la reacción. La lectura promedio que se obtuvo para el control de suero negativo fue de 0.271 DO. y para el suero control positivo una absorbancia promedio de 1.03425 DO. Estos resultados se obtuvieron realizando cinco repeticiones del ensayo, como se puede observar en la **Tabla 19**.

Los resultados de la titulación en bloque para el antígeno inactivado antes de irradiar, mostraron que la dilución óptima para sensibilizar placas fue de 1:400.

9.6 Desarrollo del ELISA indirecto.

Una vez establecidas las condiciones para el desarrollo de la prueba de ELISA-I, se evaluaron 10 sueros positivos y 10 sueros negativos seleccionados previamente, obteniendo los siguientes resultados (**Figura 22**), en un gráfico de dispersión obtenido mediante el programa Medcalc 8.0.0.1 (58).

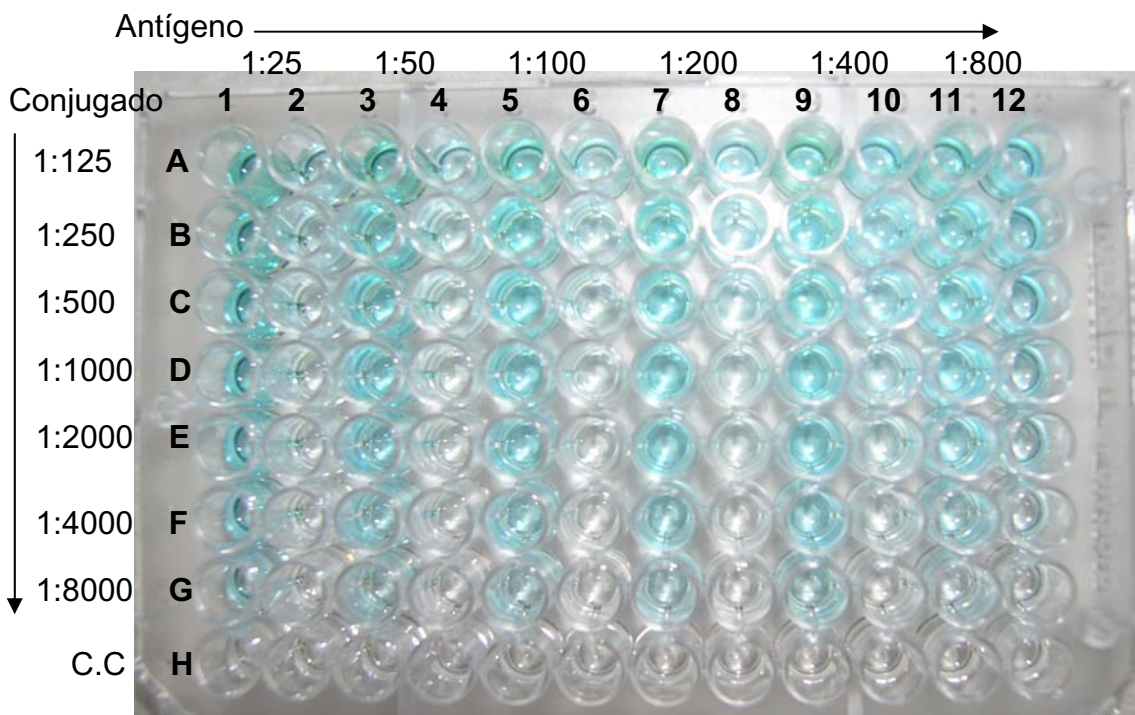


Figura 19. Resultado de la titulación de conjugado y antígeno, antes de detener la reacción con H₂SO₄.

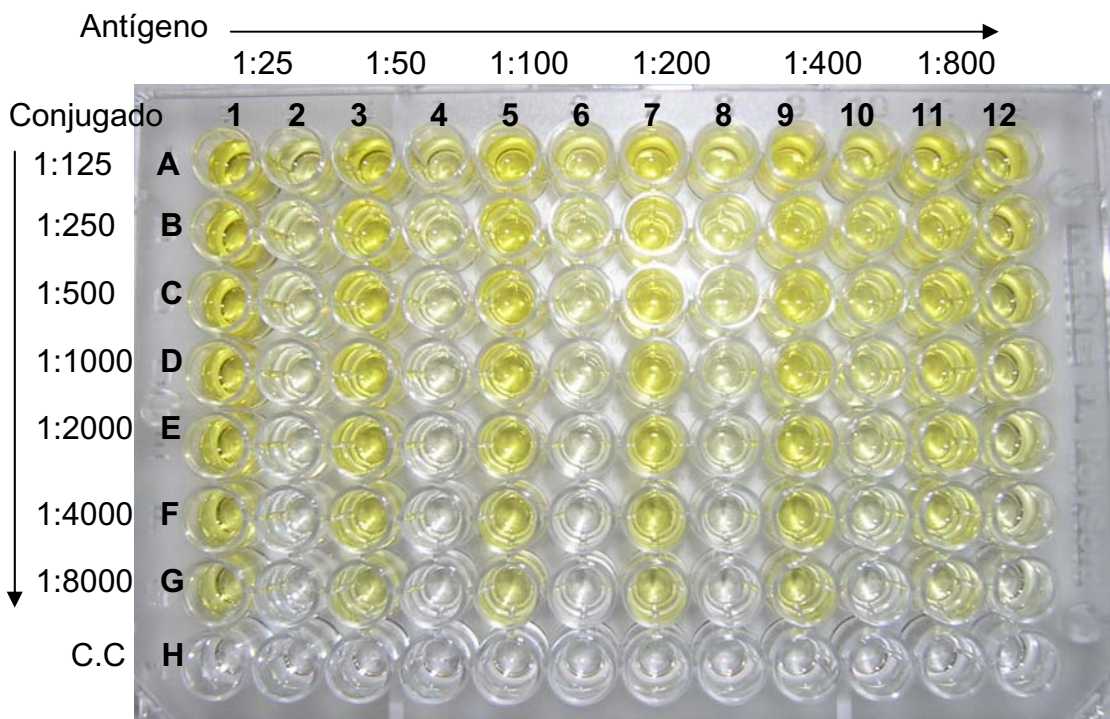


Figura 20. Resultado de la titulación en bloque del antígeno y conjugado

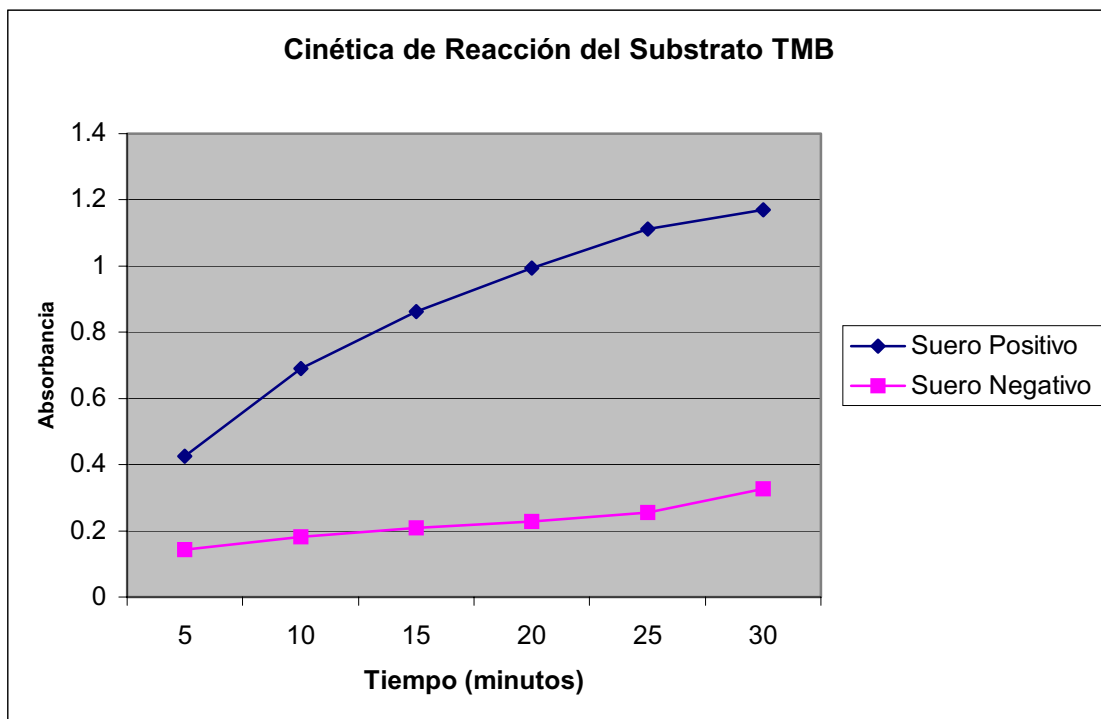
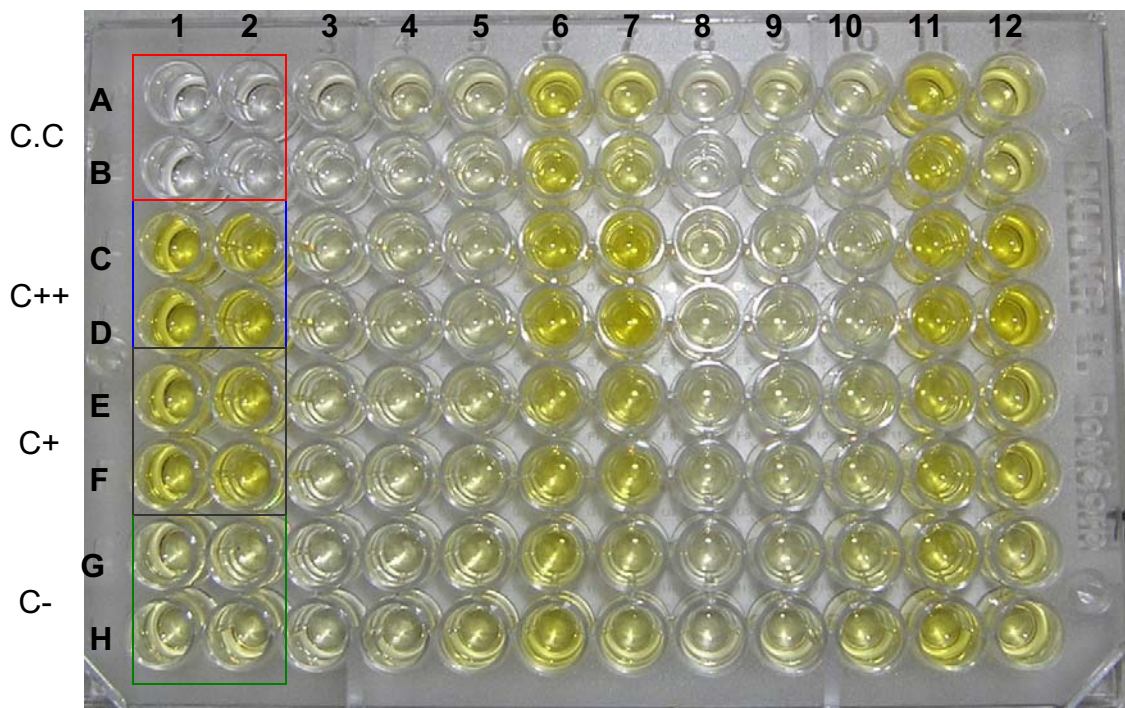


Figura 21. Cinética de reacción del sustrato TMB, para la prueba de ELISA-I para el VON.



Sueros negativos dobles: a partir de (A3-B3) hasta los pozos (C5-D5) y su repetición (A8-B8) hasta (C10-D10).

Sueros positivos dobles: a partir de (E5-F5) hasta los pozos (E7-F7) y su repetición (E10-F10) hasta (G12-H12).

Figura 22. Placa de ELISA con muestras de sueros positivos, negativos y controles.

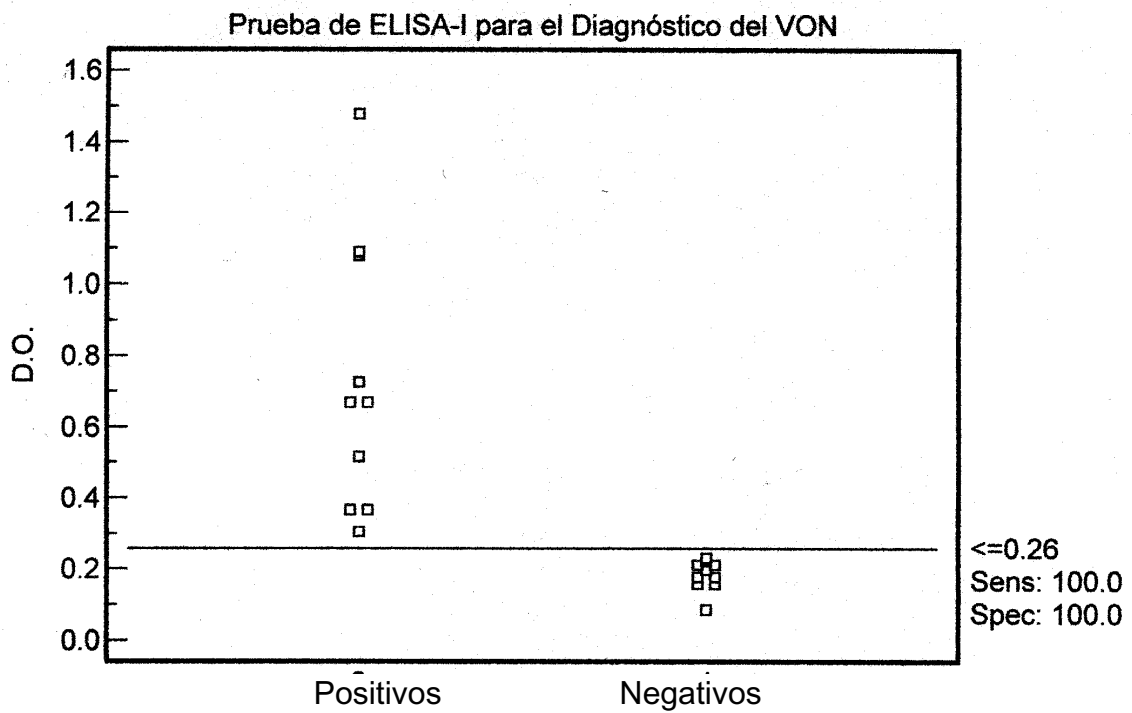


Figura 23. Dispersión de las densidades ópticas de los sueros positivos y negativos (n= 20), a la presencia de anticuerpos contra el VON de acuerdo a los resultados obtenidos mediante la prueba de ELISA-I.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las lecturas de densidad óptica de los resultados obtenidos en las placas de ELISA-I para el VON, mediante el lector automático de ELISA con un filtro de 450 nm y mediante un programa de cómputo desarrollado originalmente en el ADRI (Animal Diseases Research Institute) Canadá, para su uso por la AIEA/FAO y actualmente adaptado para el diagnóstico del VON (53). Se empleó para la estandarización de los sueros, mediante 5 repeticiones del mismo ensayo para determinar la variación del mismo y establecer las densidades ópticas de los sueros controles.

Los valores obtenidos para las densidades ópticas (a 450 nm) se establecieron por el promedio de los datos observados en 5 repeticiones del ensayo, para el suero control fuerte positivo (C++) de 0.937 a 1.126, para el suero control débil positivo (C+) de 0.806 a 0.867 y para el suero control negativo (C-) de 0.259 a 0.287 (**Tabla 18**).

Tabla 18. Estandarización del ensayo ELISA-I para el VON en 5 repeticiones, para los sueros controles

Sueros	Promedio	Desviación estándar
Control fuerte positivo C++	1.03425	0.08892459
Control débil positivo C+	0.837	0.02585859
Control negativo C-	0.271	0.0121106
Control de conjugado (CC)	0.0275	0.00776745

Evaluación de la prueba de ELISA indirecta para el VON.

La evaluación de las prueba de ELISA se realizó en comparación con los resultados de PRNT, mediante una tabla de contingencia de 2 X 2, para determinar valores de sensibilidad y especificidad (**Tabla 19**). Los resultados de ambas pruebas se correlacionaron, considerando a PRNT como prueba de referencia ("Gold Standard"). El análisis estadístico se realizó mediante el programa Win-Episcope (54).

Tabla 19. Sensibilidad y Especificidad de ELISA-I para el VON (punto de corte a 0.206 DO. comparada con la prueba de reducción de placas por seroneutralización (PRNT) (estándar de oro) determinada en sueros de equinos sanos y vacunados contra el VON.

		PRNT(Prueba de oro)		Total
		SI	NO	
ELISA	+	10	0	10
	-	0	10	10
	Total	10	10	20

Se obtuvo una sensibilidad comparada 100%; Especificidad comparada 100%
 Valor predictivo: para detectar animales positivos 100%; para detectar animales negativos: 100%

Los resultados obtenidos mediante la tabla de contingencia de 2X2 tabla fueron obtenidos mediante el programa Win-Episcope (54).

Los sueros de referencia positivos evaluados mediante la prueba de PRNT, mostraron títulos superiores a 1:100, y los sueros negativos no mostraron actividad neutralizante. La sensibilidad y especificidad relativas de la prueba ELISA-I comparada con la prueba de PRNT considerada como "estándar de oro", fue del 100% de sensibilidad y 100% de especificidad.

Se determinó la distribución de frecuencia de los sueros positivos y negativos en los intervalos de densidades ópticas correspondientes. Se observó que la distribución de los sueros que corresponden a animales negativos (n=10), se agrupa en el intervalo de (0.0855 a 0.2305 DO) y Los sueros positivos (n=10) mostraron valores de 0.3055 a 1.47875 DO).

La concordancia entre ambas pruebas se determinó mediante KAPPA. En el análisis de comparación de ELISA-I, con la prueba PRNT, donde se observó un valor de KAPPA = 1, (**Tabla 20**) indica un alto nivel de concordancia (54).

Tabla 20. Tabla de contingencia de 2x2 para obtener la concordancia entre ensayos

		PRNT(Prueba de oro)		Total
		SI	NO	
ELISA	+	10	0	10
	-	0	10	10
	Total	10	10	20

11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La línea celular VERO resultó ser de gran utilidad para la infección con el VON, ya que se pudo observar perfectamente el efecto citopático en los cultivos de estas células al día 5 postinoculación, demostrando con esto que la infección se realizó correctamente y que estas células infectadas se pudieron emplear para la obtención de un lote de antígeno del VON. Las dos fracciones de antígeno obtenidas, sometidas a inactivación química y física, se pudieron emplear después de que se logró comprobar que habían perdido su capacidad infecciosa, a través de las pruebas para aislamiento viral, las cuales resultaron negativas. Obteniendo con ello la certeza de poder trabajar con las fracciones de antígeno en los ensayos posteriores sin ningún riesgo biológico-infeccioso. En un laboratorio con nivel dos de bioseguridad.

La cuantificación de proteínas por el método de Lowry en las dos fracciones de antígeno y en las otras muestras trabajadas, resultó ser un método rápido, sensible y confiable, ya que con este método es posible detectar pequeñas cantidades de proteína, empleando albúmina sérica bovina como estándar, con la cual se logró obtener una curva estándar, la cual fue de gran utilidad, ya que al interpolar en esta curva las absorbancias obtenidas de las lecturas de las muestras, fue posible conocer la concentración de proteína, necesaria para los siguientes ensayos realizados.

Los resultados observados en la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones reductoras para las muestras de antígeno del pellet y sobrenadante, se observó que el pellet presentaba una gran cantidad de bandas, pero con poca definición ya que las bandas se notaban barridas o desnaturalizadas, esto debido probablemente a que no se empleó algún inhibidor de proteasas, tal como el ácido p-hidroximercuribenzoico (PHMB) al realizar el procedimiento para obtener dicha fracción. En cuanto a la fracción de antígeno contenida en el sobrenadante, se logró ver un par de bandas, una de aproximadamente 53 Kd, que se sugiere corresponde a la glicoproteína E del VON, dado que en reportes anteriores se ha demostrado que esta proteína es secretada al medio de cultivo, durante la infección de las células (59, 60,61).

La otra banda observada en la muestra de antígeno, posiblemente pertenece al cultivo de células o al medio de crecimiento. Por lo que posteriormente estas muestras se evaluaron simultáneamente con el antígeno.

Respecto al gel de poliacrilamida al 10 %, mediante condiciones no reductoras, es decir sin emplear 2-mercaptoetanol, en este gel se encontraron las mismas dos bandas que en gel anterior, presentes en la muestras de antígeno, sólo que se lograron observar con una mejor separación, esto debido a que el gel de poliacrilamida al 10 % tiene menor entrecruzamiento entre la acrilamida y la bis-acrilamida, comparado con el gel al 12 % y esto permitió que las proteínas grandes tuvieran mayor facilidad para atravesar el gel y con esto obtener una mejor separación y resolución al revelarlas. Otro factor importante que se consideró al emplear este gel es que al trabajar en condiciones no reductoras, se logra evitar la posible aparición de un mayor número de bandas, ya que algunas proteínas pueden dar lugar a varios fragmentos en condiciones reductoras, por el hecho de que el 2-mercaptoetanol disuelve los enlaces cisteína o puentes disulfuro

de estas proteínas, también el 2-mercaptoetanol puede dar lugar a la aparición de bandas fantasma, por un inadecuado calentamiento de las muestras.

En cuanto a las muestras de control de células y medio de crecimiento, colocadas en este mismo gel, evidenciaron que la otra banda que apareció en la muestra de antígeno, corresponde a una proteína presente en estas fracciones, ya que esta banda fue observada en ambas muestras.

La inmunotransferencia a membrana de nitrocelulosa de las proteínas contenidas en el gel preparativo de poliacrilamida al 12 %, en condiciones reductoras para la muestra de antígeno, evaluada en dos diferentes soluciones de bloqueo y la dilución de reactivos utilizados, demostró que con las condiciones establecidas tanto del uso de una alta concentración del monómero acrilamida-bis-acrilamida y del 2-mercaptoetanol, la resolución obtenida de las bandas no era muy evidente, ya que no se logró observar claramente la separación entre bandas. Además se observó que para las membranas trabajadas con leche y caseína, que se hicieron reaccionar frente a un suero positivo y un negativo. Se observó que con el bloqueo y demás reacciones utilizando leche se obtenían mejores resultados, ya que la reacción de fondo era menor que con caseína.

La inmunotransferencia realizada, a partir de un gel de poliacrilamida al 10 % y en condiciones no reductoras, para la evaluación del antígeno, control de células y medio de cultivo en membrana de nitrocelulosa, demostró una gran resolución de las bandas obtenidas, ya que se podían ver perfectamente y con una buena separación. En cuanto a la muestra de antígeno se logró ver que aparecían dos bandas, mismas que se observaron en el gel de poliacrilamida realizado simultáneamente, una de las bandas obtenidas de 53 Kd obtenida con un suero positivo al VON, se sugiere es específica a la glicoproteína E del VON, como se mencionó anteriormente (59,60,61), dado que esta misma banda no apareció en el control de suero negativo, ni en ningún otro carril del gel, donde se evaluaron el control de células y medio de cultivo, tanto con el suero positivo y negativo. A diferencia de la otra banda obtenida en la muestra de antígeno, que aparentemente corresponde a una proteína que se encuentra también en el control de células y medio de cultivo. Como coincide con lo observado en el gel SDS-PAGE obtenido bajo las mismas condiciones y teñido con azul de Coomassie.

Al obtener los resultados de la electroforesis e inmunotransferencia, se decidió seleccionar como antígeno para la prueba de ELISA la fracción del sobrenadante del lote de trabajo obtenido, para los siguientes ensayos, dado que se observó mayor definición en las proteínas presentes.

El título de antígeno obtenido antes de irradiar, determinado a partir del empleo de diferentes diluciones de antígeno frente a diversas diluciones de conjugado y utilizando el suero a una dilución constante, dejó ver que se obtenía un mayor título comparado con el antígeno inactivado e irradiado, esto es debido a que durante el proceso de inactivación se lleva a cabo una desnaturalización de las proteínas presentes en la fracciones de antígeno (59,60,61). En ambos amortiguadores se lograron obtener diferencias entre los sueros, pero en el amortiguador de fosfatos se tienen mejores resultados que con carbonatos, esto se debe a que el amortiguador de fosfatos tiene un pH cercano al punto isoeléctrico de la glicoproteína E, que es de 7.66, por lo tanto la carga neta se

vuelve cero y hay una precipitación de las proteínas cerca de su punto isoeléctrico, por lo que existe un mayor contacto con la superficie de las placas y una mayor absorción de la proteína a estas.

Mediante la titulación en bloque para el antígeno inactivado e irradiado, se logró obtener un título óptimo de revestimiento para las placas de 1:100 y una dilución de conjugado de 1:2000, con los sueros fijados a 1:200. Con una lectura a 25 minutos, en donde se observó una mayor diferencia entre los sueros control positivo y negativo y una menor reacción de fondo, tanto en el suero negativo y control de conjugado. Por lo que estas condiciones fueron empleadas para los siguientes ensayos.

Para el desarrollo de la prueba de ELISA-I para el VON se evaluaron 10 sueros positivos y 10 sueros negativos, los cuales se comportaron de acuerdo a lo esperado, con una clara diferencia entre los positivos y negativos, con lo cual se pudo calcular la especificidad y sensibilidad de la prueba, empleando una tabla de contingencia de 2X2, con el programa de computo Win-Episcop, obteniendo una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 %, estos datos podrían variar considerablemente al utilizar un mayor número de sueros. En esta ocasión debido a que el VON es una enfermedad emergente en México, y que solamente se trabaja en condiciones de Bioseguridad nivel 3; se presentó la limitante en la obtención de sueros, así como en su determinación específica por la prueba de PRNT; no obstante se considera que los resultados obtenidos en este trabajo establecen las condiciones óptimas de una prueba de ELISA-I, para su aplicación como una prueba Tamiz para el diagnóstico del VON. Sin riesgo para el usuario, de fácil manejo y rápida estandarización del ensayo.

12. CONCLUSIONES

La línea de cultivo celular VERO, empleada para la infección y replicación del VON, resultó ser altamente susceptible, como se ha reportado en otros trabajos, permitiendo así fácilmente la obtención de antígeno del VON, ya que se puede observar claramente el efecto citopático en el monoestrato de estas células, debido a la infección por este virus en cinco días.

Los procesos de inactivación de las dos fracciones de antígeno, mediante β -propiolactona e irradiación gamma demostró ser una manera eficaz para inactivar la actividad viral del VON. La evaluación de la inactivación viral en cultivo de células e inoculación de ratones lactantes, confirmó ser una manera eficaz de verificar la ausencia de riesgo biológico que implicaría trabajar con el antígeno vivo.

La técnica de Lowry demostró ser un método fácil para la cuantificación de proteínas contenidas tanto en las fracciones de antígeno, medio de cultivo y control de células.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), mediante el uso de un gel al 10 % y el uso de condiciones no reductoras, demostró ser la mejor opción para el análisis de las proteínas presentes tanto en las fracciones de antígeno, así como las contenidas en el medio de cultivo y control de células, ya que bajo estos parámetros se obtiene una mejor resolución y separación de las proteínas, a diferencia de utilizar una concentración del 12 % y en condiciones reductoras.

La inmunotransferencia realizada para el análisis de las fracciones de antígeno, medio de cultivo y control de células, es una técnica más específica ya que permitió determinar que proteínas existentes en cada una de las muestras reaccionaban con el suero positivo y negativo al VON.

Las técnicas de electroforesis e inmunotransferencia, confirman la presencia de la glicoproteína E del VON en la fracción de sobrenadante, la cual no se logró observar en la fracción del pellet, debido a la poca definición de las bandas presentes en esta fracción. Por lo cual la fracción de sobrenadante fue empleada como antígeno para la prueba de ELISA-Indirecta para el diagnóstico del VON.

La titulación de antígeno para el revestimiento de placas de poliestireno, se determinó más rápidamente, mediante la "titulación en bloque", es decir utilizando una dilución fija de los sueros positivos y negativos en toda la placa, que si se hiciera con diferentes diluciones de los sueros.

Mediante este sistema se observó que el antígeno solamente inactivado presenta un mayor título, comparado con el antígeno inactivado e irradiado. En este caso con el antígeno inactivado se podría obtener un mayor número de placas revestidas. Pero con el antígeno inactivado e irradiado se puede trabajar con mayor seguridad biológica.

Para la dilución de antígeno necesaria para el revestimiento o antigenación de las placas, se obtienen mejores resultados empleando amortiguador de fosfatos, con el cual se disminuyó evidentemente la reacción de fondo.

Con este trabajo se establece la metodología para el desarrollo de la técnica de ELISA-Indirecta para el diagnóstico serológico del VON en equinos.

13. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Purificación de la fracción de sobrenadante empleada como antígeno, para su posterior expresión en cultivos bacterianos para la obtención de un antígeno recombinante (plásmido), necesario para eliminar la reacción cruzada con la encefalitis de San Luis.

Realizar la validación de esta técnica desarrollada, empleando una mayor cantidad de sueros positivos y negativos conocidos, en donde se establezca el punto de corte, sensibilidad y especificidad con mayor precisión estadística.

14. ANEXOS

14.1 Prueba de verificación de inactivación viral, mediante infección de cultivos celulares

La verificación del antígeno viral tratado previamente con β -propiolactona, se evaluó mediante la inoculación de dos botellas de 25 cm² con un monoestrato confluyente, con 1 ml de una dilución 1:10 y 1:100 de las muestras de antígeno, dejando incubar por una hora y agitando suavemente para cubrir el monoestrato. Pasado este tiempo se adicionaron 15 ml de medio de mantenimiento con el 1 % de SFB, con la finalidad de preservar el crecimiento celular. Se incubó la botella a 37 ° C con 5% de CO₂ y se revisó diariamente, durante 10 días en un microscopio invertido. La ausencia de efecto citopático dentro de este periodo, evidenció la correcta inactivación del antígeno.

14.2 Prueba de verificación de inactivación viral mediante inoculación en ratón lactante

Para verificar la inactivación adecuada de las muestras de antígeno viral tratado previamente con β -propiolactona, y determinar si existía la presencia de virus residual, se realizó la inoculación de diferentes camadas de 7 ratones lactantes de 3 días de edad con (0.02 ml) por vía intracerebral, con una dilución 1:10 y 1:100 de cada muestra. Se revisaron diariamente los animales durante 16 días, verificando su estado físico y desarrollo. Pasado este tiempo cuando se observó que no existió muerte en alguno de los ratones se dio por concluida la prueba y se procedió a sacrificarlos, mediante el uso de cloroformo.

14.3 Prueba de reducción por neutralización de placas (PRNT)

La prueba de reducción por neutralización de placas (PRNT) es usada para detectar y cuantificar anticuerpos específicos del suero directamente contra el VON, es considerada como la prueba "Estándar de Oro". Esta prueba es realizada con diluciones de prueba del suero contra una concentración constante del virus. En el primer paso, las diluciones del suero se mezclan con un volumen igual de concentración conocida del virus y se incuba. Entonces, la mezcla del virus-suero se inoculara sobre cultivos de células sensibles en botellas de 25 cm², o en placas de 6 pozos. Las células se sobreponen en una solución de agar y se dejan incubar por varios días y entonces se sobreponen en una segunda solución de agar que contiene un colorante rojo neutro. Después de incubar toda la noche las botellas/placas se observan para la formación de placas producidas por el virus. El suero que reduce el número de placas de 90 % o más, con respecto a las botellas de control de virus, se considera positivo para el anticuerpo que neutraliza al virus (62).

14.4 Reactivos empleados para la cuantificación de proteínas por el método Lowry:

Reactivo A:

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)	2 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	0.4 g
Tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.02 g
Agua desionizada	100 ml

Reactivo B:

Sulfato de cobre (CuSO_4)	0.5 g
Agua desionizada	100 ml

Reactivo Lowry:

Reactivo A	25 ml
Reactivo B	0.5 ml

14.5 Preparación de reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida:

Solución A: Monómero de acrilamida.

Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1 g

Disolver en 50 ml de agua desionizada y aforar a 100 ml.

Solución B: Amortiguador para el gel de corrimiento 4X (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8).

TRIS	45.375 g
------	----------

Disolver en 200 ml de agua desionizada y desgasificada, ajustar el pH a 8.8 con HCl y aforar a 250 ml.

Solución C: Amortiguador para gel de empacamiento 4X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8).

Tris	3.75 g
------	--------

Disolver en 200 ml de agua desionizada y desgasificada, ajustar el pH a 6.8 con HCl y aforar a 250 ml.

Solución D: SDS al 10 %.

SDS 25 g

Disolver en agua desionizada y desgasificada, aforar a 250 ml.

Solución E: Persulfato de amonio.

Persulfato de amonio 100 mg

Se prepara al momento de su uso, disolviendo en 1 ml de agua desionizada y desgasificada.

Solución F: Sobrecapa para el gel de corrimiento (Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1 %).

TRIS 25 ml de la solución B.

SDS 1 ml de la solución C.

Mezclar y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Solución G: Amortiguador para tratamiento (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, 2-mercaptoetanol 10 %).

TRIS 2.5 ml de la solución C.

SDS 4 ml de la solución D.

Glicerol 2.0 ml

2-mercaptoetanol 1.0 ml

Mezclar y aforar a 10 ml con agua desionizada.

Solución H: Amortiguador de desarrollo. (Tris-HCl 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1 %).

TRIS 3 g

Glicina 14.4 g

SDS 10 ml de la solución D.

Mezclar y aforar en agua desionizada a 1 litro.

Solución I: Colorante (Azul de Coomassie R-250 al 1%).

Azul de Coomassie R-250	2.5 g
-------------------------	-------

Disolver y aforar a 250 ml en agua desionizada.

Solución J: Colorante (Azul de Coomassie R-250 0.125 %, Metanol 50 %, Ácido acético 10 %).

Azul de Coomassie R-250	62.5 ml de la solución anterior.
-------------------------	----------------------------------

Metanol	250 ml
---------	--------

Ácido acético	50 ml
---------------	-------

Mezclar y aforar con agua desionizada a 500 ml.

Solución K: Solución decolorante 1 (Metanol 50 %, Ácido acético 10 %).

Metanol	250 ml
---------	--------

Ácido acético	50 ml
---------------	-------

Aforar a 500 ml con agua desionizada.

Solución L: Solución decolorante 2 (Metanol 5 %, Ácido acético 7 %).

Metanol	70 ml
---------	-------

Ácido acético	50 ml
---------------	-------

Aforar a 1000 ml con agua desionizada.

Marcador de peso molecular (Tabla 21)

Tabla 21. Marcador preteñido de Bio-rad.

Proteína	Peso molecular (Daltons)
Miosina	201,000
β -galactosidasa	130,000
Seroalbúmina bovina	94,000
Ovoalbúmina	48,600
Anhidrasa carbonica	36,400
Soybean trypsin inhibitor	29,800
Lisozima	20,600
Aprotinina	6,600

14.6 Preparación de reactivos para inmunotransferencia

Amortiguador para inmunotransferencia (TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, 20 % v/v metanol pH= 8.3)

TRIS	3.03 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 ml

Disolver el TRIS, la glicina y el metanol en un agua desionizada, ajustando a un litro.

Amortiguador de fosfatos (PBS pH=7.4, 0.01 M).

Fosfato de sodio	1.21 g
Fosfato de potasio	0.20 g
Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de potasio	0.20 g

Disolver el fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio y cloruro de potasio en agua desionizada, ajustando a un litro.

Amortiguador de lavado (Amortiguador PBS + Tween 20 al 0.1 %)

PBS	1 litro
Tween 20	1 ml

Para obtener un litro de solución de lavado, a un litro de PBS 0.01 M, se le agrega 1 ml de Tween 20.

Amortiguador para bloqueo, dilución de sueros y conjugado (PBS + Leche descremada al 5 %).

PBS	100 ml
Leche descremada Sveltys	5 g

Disolver 5 g de leche descremada en 100 ml de PBS.

Reconstitución conjugado anti IgG de caballo en cabra.

El contenido del vial de conjugado anti IgG de caballo en cabra, conjugado con peroxidasa fue reconstituido con 2 ml de agua para inyectables y posteriormente se le agregaron 2 ml de glicerol estéril.

Amortiguador para cromógeno

Tris

Trietanolamina

Cromógeno (4-cloronaftol).

Cloronaftol	30 mg
Metanol	10 ml

Disolver una tableta de 4-cloronaftol en 10 ml de metanol.

Solución de revelado

4-cloronaftol	1 ml
Amortiguador	10 ml

Peroxido de hidrógeno al 30 %

14.7 Preparación de reactivos para la estandarización de la técnica de ELISA

Amortiguador de carbonatos, pH 9.60 +/- 0.05

En un matraz aforado, se disolvió una tableta de Carbonato/Bicarbonato en 100 ml de agua desionizada y estéril.

Carbonato de Sodio	2.93 g/l
Bicarbonato de Sodio	1.59 g/l

Amortiguador de fosfatos (PBS pH=7.4, 0.01 M).

En un matraz aforado de un litro, disolver fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio y cloruro de potasio en agua desionizada de acuerdo a las siguientes cantidades.

Fosfato de sodio	1.21 g/l
Fosfato de potasio	0.20 g/l
Cloruro de sodio	8 g/l
Cloruro de potasio	0.20 g/l

Amortiguador de lavado (Amortiguador PBS + Tween 20 al 0.1 %)

Para obtener un litro de solución de lavado, se preparó a un litro de PBS 0.01 M, se le agregó 1 ml de Tween 20.

PBS	1 litro
Tween 20	1 ml

Amortiguador para bloqueo, dilución de sueros y conjugado (PBS + Leche descremada al 5 %).

Se preparó mezclando en un vaso de precipitado, 5 g de leche descremada en 100 ml de PBS.

PBS	100 ml
Leche descremada Sveltys	5 g

Reconstitución conjugado anti IgG de caballo en cabra.

El contenido de un vial de conjugado anti IgG de caballo en cabra conjugado con peroxidasa (ver reactivos) fue reconstituido con 2 ml de agua para inyectables y posteriormente se le agregaron 2 ml de glicerol estéril de acuerdo al protocolo del laboratorio productor.

Amortiguador de Substrato, Citratos con perborato de sodio, pH 5.0 +/- 0.05

Se disolvió una cápsula de amortiguador de citratos (0.05 M Fosfato-Citrato, 0.03% Perborato de Na) en 100 ml de agua desionizada incubada previamente a 37°C, y se agito enérgicamente para promover la completa disolución del contenido de la cápsula, este amortiguador se prepara 15 minutos previos a su utilización.

Cromógeno, 3,3',5,5' Tetrametilbencidina dihidrocloruro (TMB).

Para cada placa de ELISA, se colocaron 10 ml del amortiguador de citratos con perborato de sodio en un frasco ámbar, donde se disolvió una tableta de TMB (1 mg), se agita ligeramente. Este reactivo se preparó inmediatamente antes de su utilización.

Solución detenedora, Ácido sulfúrico 2 M

En un matraz aforado de un litro, se adicionan lentamente 105 ml de ácido sulfúrico concentrado a 895 ml de agua desionizada y se mantiene a temperatura ambiente.

Ácido sulfúrico

105 ml

15. REFERENCIAS

1. Gubler DJ. Surveillance for West Nile Virus in the Americas, PAHO/WHO, Third Meeting of the Surveillance Networks for Emerging Infectious Diseases in the Amazon and Southern Cone Regions, 2000.
2. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 1940; 20:471-92.
3. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, et al. Introducing of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(4): 392-7.
4. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med.* 2001; 344:1807-14.
5. Boletín Epidemiológico, Vol. 23 No. 4, 2002. Organización Panamericana de la Salud. Disponible en: http://www.paho.org/Spanish/dd/ais/be_v23n4-West_Nile.htm. [2006 Marzo 20].
6. Nasci RS, Savage HM, White DJ, Miller JR, Cropp BC, Godsey MS, Kerst AJ, Bennett P, Gottfried K, Lanciotti RS. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:742-744.
7. Komar N, Panella NA, Boyce E. Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(4), 636-8.
8. Barriga AG, Arumir EC, Mercado GF. Actualidades sobre la fiebre del Nilo Occidental. *Rev Mex Patol Clin* 2002; 49 (4): 203-211.
9. Valles X, Sánchez F. West Nile virus: el virus del la Fiebre del Oeste del Nilo. *Enf Emerg Inf.* 2000; 2(4):232-238.
10. Delgado-López N. Andrade-Zárate V, Nellen-Hummel H, Halabe-Cherem J. Fiebre del nilo Oeste. *Cir Ciruj.* 2003; 71(1), 66-69.
11. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad. Disponible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf. [2006 Marzo 15].
12. Boletín epidemiológico, Vol. 21, No. 4, 2000. Organización Panamericana de la Salud. Disponible en: http://www.paho.org/Spanish/sha/be_v21n4-nilo.htm. [2006 20 Marzo].
13. Rodríguez Tamayo R. Virus del Nilo Occidental: aspectos epidemiológicos y Clínicos. *Boletín Epidemiológico Semanal del IPK.* 2001; 11(37).

14. Díaz-Martínez LA, Cáceres-Manrique FM, Muñoz G. Apuntes para el desarrollo de sistemas de vigilancia para la detección precoz del virus del Oeste del Nilo. *Infectio*. 2002; 6(4): 226-234.
15. Romero-Vargas S, García-Navarro V, González-Cornejo S, Ruiz-Sandoval JL. West Nile virus. Un diferencial obligado en Neurología. *Rev Mex Neuroci*. 2004; 5(2): 137-140.
16. Petersen RL, Roehring JT. West Nile Virus: A reemerging global pathogen. *Rev Biomed*. 2001; 12(3): 208-216.
17. Flaviviridae Bioinformatics Resource. Genes of WNV-Mex03. *Viral Bioinformatics-Canada*. Disponible en: <http://athena.bioc.uvic.ca/ca.virology/php/geneBrowser.php?db=flaviviridae,id=79,name=WNV-Mex03>. [2006 Marzo 23].
18. Ramos C, Lezama Falcón JA. La fiebre del Nilo occidental: Una enfermedad emergente en México. *Salud publica de México*. 2004; 46(5): 488-490.
19. Vargas Vargas M. Una nueva Enfermedad emergente en el continente Americano: Encefalitis del Oeste del Nilo. *Rev. Col de MQC de Costa rica*. 2002; 8(4);1-3.
20. Hubálek Z, Halouzka J. West Nile Fever, a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5:643-650.
21. Centro Nacional de vigilancia Epidemiológica. Guía para la vigilancia, Prevención y Control del Virus del Oeste del Nilo. Disponible en: <http://www.cenave.gob.mx/von/>. [2006 Febrero 17].
22. Centers for Disease Control and Prevention. Ciclo de Transmisión del VON. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/cycle.htm>. [2006 Abril 2].
23. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie, JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*. 1999; 286:2333-2337.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Provisional surveillance summary of the West Nile Virus epidemic-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002 December 20;51(50):1129-33.
25. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus activity-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2003 Nov 28;52(47):1160.

26. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus activity-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004 August 5;53(30):686-7.
27. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus activity-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2005 Dec 16;54(49):1253-6
28. Centers for Disease Control and Prevention. Estadísticas, Vigilancia y control del VON. Disponible en: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/spanish/surv&control05Maps_spanish.htm. [2006 Abril 6].
29. Yang JS, Ramanathan MP, Muthumani K, Choo AY, Jin SH, Yu QC, Hwang DS, Choo DK, Lee MD, Dang K, Tang W, Kim JJ, Weiner DB. Induction of inflammation by West Nile virus capsid through the caspase-9 apoptotic pathway. *Emerg Infect Dis.* 2002 Dec;8(12):1379-84.
30. Blitvich, BJ, Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF., Marlenee NL, González-Rojas JI, Komar N, Glubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, México. *Emerg Infect Dis.* 2003; Jul;9(7):853-6.
31. Glass JD, Samuels O, Rich MM. Poliomyelitis due to west Nile virus. *N Engl J Med.* 2002; 347: 1280-1
32. Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Blitvich BJ, Gonzalez-Rojas JI, Cavazos-Alvarez A, Marlenee NL, Elizondo-Quiroga A, Lorono-Pino MA, Gubler DJ, Cropp BC, Calisher CH, Beaty BJ. Serologic Evidence of West Nile virus Infection in Birds, Tamaulipas State, México. *Vector Borne and Zoonotic Diseases.* *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2003 Winter;3(4):209-13.
33. Loroño-Pino MA, Blitvich BJ, Farfán-Ale JA, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):857-9
34. Ulloa A, Langevin SA, Mendez-Sanchez JD, Arredondo-Jimenez JI, Raetz JL, Powers AM, et al. Serologic survey of domestic animals for zoonotic arbovirus infections in the Lacandón Forest Region of Chiapas, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* In press 2003.
35. Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos da Rosa A, Clements T, Wang E, Ludwig GV, Cortes AC, Ramirez PP, Tesh RB, Barrett AD, Weaver SC. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(12):1604-7.

36. Servicio Nacional de Sanidad e inocuidad y calidad agroalimentaria. Virus del Oeste del Nilo. Disponible en: <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/dett/Doc1194/>. [2006 Enero 26].
37. Beasley DW, Davis CT, Estrada-Franco J, Navarro-Lopez R, Campomanes-Cortes A, Tesh RB, Weaver SC, Barrett AD. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(12):2221-4.
38. Deardorff E, Estrada-Franco JG, Brault AC, Navarro-López R, Campomanes-Cortes A, et al. Introductions of West Nile Virus Strains to Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(2):314-8.
39. García Lomas J. Virus del Oeste del Nilo (West Nile Virus): ¿Estamos preparados?. Asociación Española de vacunología. 2003
40. Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, Campbell GL. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed west nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(3):376-9.
41. Johnson JA, Langevin S, Wolff KL, Komar N. Detection of Anti-West Nile Virus Immunoglobulin M in Chicken Serum by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J of Clin Micro.* 2003; 41(5): 2002-2007.
42. Carrada-Bravo T. Encefalitis por virus Nilo-Oeste: Epidemiología, ecología, diagnóstico y prevención. *Rev Mex Patol Clin.* 2004; 51(1): 6-15.
43. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. Vacuna para la prevención de la Enfermedad del Virus del Oeste del Nilo. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Pronabive/PEQUIVON.htm>. [2006 Febrero 15].
44. Rappole J, Derrickson S, Hubalek Z. Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infectious Diseases*, 2000; 6:319-327
45. Diario oficial de la federación: Acuerdo por el que se activa el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal en los términos del artículo 35 de la Ley Federal de Sanidad Animal, con el objeto de vigilar, diagnosticar, prevenir y controlar al Virus del Oeste del Nilo. SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. México, 14 julio de 2003.
46. Organización Mundial de la Salud, Transporte de sustancias Infecciosas. Disponible en:

<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CSR%20Trspt%20oc%20sp.pdf>. [2006 Marzo 23].

47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
48. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 1970; 227: 680-685.
49. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and Dot immunoblotting. Current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984; 72:313.
50. Avrameas S. Brief general review of immunoenzyme techniques united d´immunocytochimie, Institute Pasteur (France): 1-25
51. Sánchez-Vizcaino JM, Cambra AM. Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal. Madrid. 1981: 11-35.
52. Rose R. Noel, Hamilton G. Robert, Detrick Barbara. *Manual of clinical Laboratory Immunology*. 15-19
53. JOINT FAO/IAEA Programme. Brucellosis indirect ELISA kit. *Animal Production and Health*. 1993 July.
54. Frankena K, Goelma J. O. Programa Win-EPISCOPE. Agricultural University, Dep. of Animal Husbandry, P.O. Box 338, 6700 Ah Wageningen, The Netherlands. 1991.
55. Bailey TJ N. *Statistical methods in biology*. Cambridge University Press. 1981. 52-66.
56. Thorner RM, Romoin QR, *Principles and Procedures in the evaluation of Screening for Disease*. Public Health Monograph. 1981:67.
57. Wrigth P. Enzyme Immunoassay: Observations on aspects of quality control. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 1987 Dec:17 (1-4):441-52.
58. *Animal Diseases Research*. Med Calc version demo 8.0.0.01
59. Scholle F, Girard YA, Zhao Q, Higgs S, Mason PW. Trans-Packaged West Nile Virus-Like Particles: Infectious Properties In Vitro and in Infected Mosquito Vectors. *J of Virology*. 2004; 78(21): 11605-11614.
60. Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchell CJ, et al. West Nile Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from virus challenge and Expresses In vitro a Noninfectious recombinant antigen that can Be used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J of Virology*. 2001; 75(9): 4040-4047.
61. Putnak R, Fuller J, Vanderzanden L, Innis B, Vaughn DW. Vaccination of Rhesus Macaques Against Dengue-2 Virus With a Plasmid DNA Vaccine

encoding The Viral Pre-Membrane and Envelope genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(4): 469-476.

62. Ostlund EN, Schmitt BJ. Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) for Detection of antibodies Against west Nile Virus. Center for Veterinary Biologics and National Veterinary Services Laboratories Testing Protocol. 2001.