



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE P16
DEL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA PARA
EL DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE ELISA
INDIRECTA.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAÉSTRA EN MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

PRESENTA:
SILICEO CANTERO IRLANDA JUDITH

TUTORA: LAURA COBOS MARÍN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
COMITÉ TUTORAL: GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE 2014



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.

DEDICATORIAS

A dios por darme la vida y mucho más.

A mi familia por ser la base de mi vida. Mi madre la mujer más maravillosa, valiente, el apoyo constante en mi vida y el mejor ejemplo de perseverancia, entrega, trabajo y amor. Mi padre el hombre más inteligente, ingenioso, creativo, pilar importante para realizar todo lo que me propongo, protección y mi respaldo incondicional. Mi hermano por ser el mejor modelo a seguir, inteligente, perseverante, paciente, dedicado y mi mejor amigo. Gracias por siempre estar a mi lado, los amo.

A mi amor Julian por su amor, paciencia, consejos, tiempo, compañía, por encontrarme y por todo su apoyo para la realización de este y todos los proyectos en mi vida. Eres el compañero perfecto, te amo.

A la familia Cantero y Siliceo esperando sea un aliciente. A Andreita gracias por los muy buenos momentos que pasamos juntas. Tía Rosita gracias por tus cuidados, tu tiempo y tu cariño.

A la familia Romero: Rosa María, Julian RM, Zaira, Tania, Ana Rosa, Daira y Mateo por su apoyo, sus consejos y su cariño los quiero mucho.

Al pedrito más maravilloso y extraño que he tenido, gracias por las alegrías que me diste te extraño Shivita.

A mis más que amigos, Istarina, Danielita, Tere Tere, Vianey, Amanda, Mario E, Pablito, Mario P. Maritza, Carolina, por escucharme, aconsejarme, ayudarme y por los momentos tan divertidos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el conocimiento, las oportunidades y por permitirme formar parte de su gran familia.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a todos los académicos y alumnos que contribuyeron de alguna manera en la realización de esta investigación.

A mi tutora Laura Cobos por su cobijo, sus conocimientos, consejos y por motivarme para la conclusión de esta tesis.

Al Dr. Glafiro Torres Hernández por confiar en mí desde el inicio del proyecto.

A todos los animales que ayudaron en mi formación como MVZ y maestra.

AGRADECIMIENTOS

A dios por cada una de las oportunidades y la hermosa vida que me ha dado.

A mis papas y mi hermano por respaldarme siempre y sin condiciones.

A mi amore Julian por protegerme siempre.

A mi tutora Dra. Laura Cobos Marín por el conocimiento, los regaños, el tiempo y todas las cosas conferidas para la realización de esta tesis, gracias por ampararme.

Al PAPIIT IN211310 por los recursos ofrecidos para realizar esta tesis de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca académica otorgada para esta maestría.

A mi comité tutorial Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez y Glafiro Torres Hernández por todos los consejos, tiempo y enseñanzas que me dieron.

Al laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en especial al Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales y Amanda Gayosso Vázquez.

Al Dr. Alejandro de las Peñas Nava y a MC. Norma Concepción Vázquez Franco por las cepas y la información donada.

Al Dr. Andrés Ernesto Ducoing Watty, Al Dr. Abel Manuel Trujillo García, la Dra. Myrna Alicia Vicencio Mallén y al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano CEIEPAA por las facilidades otorgadas.

A la MC. Ana Delia Rodríguez Cortez gracias por compartirme tu conocimiento y tu amistad. Gracias por todo el tiempo y demás cosas que me concediste.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ y a todos los integrantes que contribuyeron para la realización de este trabajo.

A la Dra. Carolina Segundo Zaragoza, a la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, el Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares, a la Dra. Liliana Valdés Vázquez, al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y al Dr. Raimundo Iturbe Ramírez.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal y a todo su personal. Y a Mercedes y Maru que nos apoyan y orientan inmensamente en todos los tramites.

A todos los maestros que contribuyeron en mi formación en la maestría.

A todos los animales que participaron en mi formación como médico y como maestra.

Al Jurado que revisó y contribuyó en la mejoría de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de adquirir nuevos e infinitos conocimientos.

RESUMEN

SILICEO CANTERO IRLANDA JUDITH. Evaluación de la proteína recombinante p16 del virus de Artritis Encefalitis Caprina para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta; Asesora: Dra. Laura Cobos Marín; Comité tutorial: Jorge Luis Tórtora Pérez, Glafiro Torres Hernández.

Se evaluó la proteína recombinante de matriz p16 del virus de artritis encefalitis caprina (VAEC) como posible antígeno en pruebas diagnósticas de ELISA. Se sembró e indujo una colonia de bacterias *Escherichia coli* que contenía el plásmido que codificaba para p16, se probó su expresión mediante SDS-PAGE y se corroboró su presencia con Western Blot (WB) contra la cola de histidinas de la construcción del plásmido y posteriormente se constató por WB si era reconocida por sueros de animales seropositivos a la enfermedad. A continuación se estandarizó la técnica de ELISA indirecta y se analizaron 303 sueros de caprinos, machos y hembras (>1 año) procedentes de 3 rebaños lecheros semiintensivos de los estados de Querétaro y Guanajuato, dos de ellos con signología y antecedentes de diagnóstico serológico positivo y el otro negativo a ambos. Se comparó el resultado de los sueros entre un ELISA comercial y el ELISA experimental con p16. Para el análisis estadístico se utilizó el coeficiente kappa que indica el índice de concordancia entre ambas pruebas. Los resultados mostraron un índice de concordancia de 0.617 lo que indica que la proteína recombinante p16 puede ser un buen candidato para emplearse como antígeno en ensayos de ELISA. Este es el primer estudio en México que demuestra la inmunogenicidad de dicha proteína, aunque sería importante ampliar los estudios para validar la prueba con un mayor número de animales. Finalmente, este trabajo arrojó una positividad del 59.4% (empleando el ELISA comercial) y 49.5% (con el ELISA experimental con p16) en los hatos muestreados, que se incluyeron en el estudio precisamente por sus antecedentes de positividad.

Palabras clave: Artritis-encefalitis caprina; proteína de matriz; ELISA; p16.

ABSTRACT

SILICEO CANTERO IRLANDA JUDITH. Evaluation of the recombinant protein p16 of Caprine Arthritis Encephalitis virus for the development of an indirect ELISA test; Advisory: Dra. Laura Cobos Marín; Committee tutorials: Jorge Luis Tórtora Pérez, Glafiro Torres Hernández.

It was evaluated the recombinant protein of matrix p16 of the Caprine Arthritis Encephalitis virus as a possible antigen in diagnostic ELISA. Seeded an induced a colony of bacteria *Escherichia coli* containing plasmid encoding p16, its expression was tested by SDS-PAGE and its presence was confirmed by WB against the histidine tag of the construction of plasmid and subsequently found by WB if it was recognized by sera positive animals disease by serology. Then the indirect ELISA technique was standardized and 303 animal sera (>1year) was analyzed from 3 semi-intensive dairy herds in the states of Queretaro and Guanajuato, two of them with history and sinology and positive serological diagnosis and the other negative on both. The result of the sera from a commercial ELISA and experimental p16 ELISA was compared. For statistical analysis, the kappa coefficient indicating the rate of concordance between the two tests was used. The results showed concordance index of 0.617 which points out that the recombinant p16 protein may be a good candidate for use as the antigen in ELISA assays. This is the first study in Mexico demonstrating the immunogenicity of the protein, although it would be important to extend the studies to validate the test with a larger number of animals. Finally, this study showed a positivity of 59.4% (using the commercial ELISA) and 49.5 (with experimental p16 ELISA) in the sampled herds although they were included in the study precisely because of his background as positive herds, called attention such a high percentage of seropositivity.

Key words: Caprine Arthritis encephalitis; matrix protein; ELISA; p16.

CONTENIDO	Página
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
Historia	2
Etiología	2
Estructura Viral	2
Clasificación	5
Ciclo de Replicación viral	6
Patogenia	7
Vías de Transmisión	7
Respuesta Inmune	8
Inmunidad innata	8
Inmunidad adaptativa	9
Respuesta inmune hacia Virus de Artritis Encefalitis Caprina	10
Presentaciones clínicas de la Artritis Encefalitis Caprina	11
Diagnóstico	12
Proteínas inmunodominantes	13
Antecedentes	13
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVO GENERAL	14
HIPÓTESIS	14

MATERIAL Y MÉTODOS	15
Obtención de sueros de cabra	15
ELISA comercial	15
Obtención de extractos de <i>E. coli</i> transformadas	15
Inducción de la proteína recombinante de matriz p16	15
Determinación de la expresión de p16 con Western Blot antihistidina	16
Reconocimiento inmunológico de la proteína p16	16
Purificación de la proteína p16	17
Desarrollo de ELISA a partir de p16	17
Cuantificación de proteína	17
Estandarización de ELISA	17
Reconocimiento de p16 por sueros de cabras positivas a la enfermedad	18
Análisis del reconocimiento de p16 mediante ELISA mediante la prueba de kappa	19
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	35
ANEXO 1	41
ANEXO2	45

LISTA DE CUADROS

Página

1. Pruebas serológicas disponibles comercialmente para VAEC	13
2. Tabla de contingencia	20
3. Tabla de valores teóricos para calcular $kappa$	20
4. Valoración del coeficiente $kappa$	21
5. Tabla de contingencia con los valores asignados	28
6. Valores obtenidos de las dos pruebas de ELISA	28

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Organización genética y estructural del VAEC	4
2. Clasificación filogenética de los LVPR	5
3. Ciclo de replicación viral del VAEC	6
4. Índice de inhibición de la cELISA comercial de todos los animales	22
5. Índice de inhibición de la cELISA comercial por granja	23
6. Cultivo de bacterias transformadas	24
7. Expresión de la proteína p16	24
8. Reconocimiento de la p16 recombinante a través de WB contra histidina	25
9. Reconocimiento de la p16 recombinante por sueros	25
10. Purificación de rp16	26
11. Densidad óptica de ELISA con p16	27

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

Ab	Anticuerpos.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AEC	Artritis Encefalitis Caprina.
AGID	Inmunodifusion en Gel Agar.
APC	Células Presentadoras de Antígeno. (Siglas en inglés antigen-presenting cells)
AP-1	Proteína Activadora del factor de transcripción.
ARN	Ácido ribonucleico.
ASB	Albumina Sérica Bovina.
CA	Cápside.
CTL	Linfocitos T Citotoxicos. (Siglas en inglés cytotoxic T Lymphocyte)
DC	Células dendríticas. (Siglas en inglés dendritic cells)
DO	Densidad Óptica.
DU	dUTPasa.
ELISA	Inmunoensayo enzimático. (Siglas en inglés Enzyme-linked Immunosorbent assay)
cELISA	Inmunoensayo enzimático competitivo.
iELISA	Inmunoensayo enzimático indirecto.
<i>env</i>	Gen de la envoltura.
<i>gag</i>	Gen del grupo antígeno. (Siglas en inglés group antigen gen)
GC	Centros Germinales.
HRP	Horseradish peroxidase.
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina.

IN	Integrasa.
IPTG	Isopropil-b-D-tiogalactosidasa.
Km	Kanamicina.
kDa	Kilodaltones.
LB	Luria Bertani.
LVPR	Lentivirus de Pequeños Rumiantes.
MA	Matriz.
mA	Mili amperes.
MCP	Proteína Quimiotáctica de Monocitos.
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated Gene.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
mM	Micromolar.
MP	Marcado de peso molecular.
NC	Nucleocápside.
NK	Células asesinas naturales.
NLR'S	NOD-Like Receptors.
NOD	Nucleotide Oligomerization-Domain.
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal.
PBS	Phosphate Buffered Saline.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PIC	Complejo de preintegración.
<i>pol</i>	Gen polimerasa.
PRR'S	Receptores de reconocimiento a patrones moleculares.
PR	Proteasa.
RI	Respuesta inmune.
RIPA	Radio Inmunoprecipitación.

RIA	Radio Inmunoensayo.
RIG-I	Retinoic acid-inducible Gen Receptor.
RT	Transcriptasa reversa.
RT-PCR	Retrotranscripción-PCR.
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico.
SU	Superficie.
TLR	Toll Like Receptor.
TM	Transmembranal.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
UNE	Unión inespecífica.
VAEC	Virus de Artritis Encefalitis Caprina.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.
VMRD	Veterinary Medical Research & Development.
VMV	Virus de Maedi Visna.
WB	Western Blot.

Evaluación de la proteína recombinante p16 del virus de Artritis Encefalitis Caprina para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta.

INTRODUCCIÓN.

La producción pecuaria además se ha visto muy afectada por la situación económica del país (Guerrero Cruz 2010) y a nivel nacional ha disminuido considerablemente, aunque la producción caprina mantiene su importancia en diversas regiones de la república mexicana donde juega un papel relevante en su economía y desarrollo.(INEGI 2007). Las explotaciones caprinas, en especial la producción de leche, se ha incrementado en los últimos diez años al desarrollar sistemas más tecnificados e intensivos, con mejoras genéticas, para intentar cubrir la demanda del sector.

El mejorar la cantidad y calidad de la leche producida, conlleva emplear programas de mejoramiento genético con dos estrategias: por un lado seleccionar a los animales más productivos, fuertes, con alta prolificidad y de buena conformación para cruzarlos entre sí y preservar dichas características y por otro buscar material genético de otras regiones o países para incrementar la producción, con el riesgo de movilizar enfermedades. En 1983, una de las enfermedades que se introdujo a México de esta forma fue la artritis-encefalitis caprina (AEC) con importantes repercusiones económicas, debido a sus presentaciones clínicas, alta incidencia en los lugares endémicos que afecta todas las razas y todas las edades. Otra problemática importante es su repercusión económica con limitaciones en la exportación(Contreras *et al.* 2001) y la merma en la producción de leche y carne.

En el país, la investigación sobre la enfermedad es muy aislada, con pocos estudios de prevalencia y pruebas diagnósticas, pero no existen programas de control por parte del gobierno y la prevalencia ha aumentado en los rebaños lecheros.

REVISIÓN DE LA LITERATURA.

Historia.

La artritis encefalitis caprina (AEC) fue descrita por primera vez en 1974 en Estados Unidos por Cork *et al.* En 1980 Crawford *et al.*, aislaron al virus de la membrana sinovial de un animal con artritis y le dieron el nombre de Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC), ya que en un principio se observó encefalitis desmielinizante en cabritos y artritis en animales adultos. Más adelante se descubrió que también causa mastitis y neumonía. El virus presenta características similares a las del Virus de Maedi Visna y al igual que éste, tiene distribución mundial (Gilles & Robert 1999). En México se aisló e identificó en el año de 1986. (Trigo Tavera 1991)

Etiología.

El VAEC pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género de los *lentivirus*, (ICTVdB Management 2006) dentro de éste también se encuentran: el virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH), el virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de anemia infecciosa equina (EIAV), el virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y el virus de Maedi Visna (MVV), entre otros. Este último, es muy semejante al VAEC en estructura, clasificación y en las presentaciones clínicas que tienen los animales, por lo que algunos autores los han clasificado en un mismo grupo, como Lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR). (Jörg Schüpbach *et al.* 2004) (Zanoni 1998) (The center for food security & public healthsity 2007) (Leroux *et al.* 1997)

Estructura Viral.

El virus de AEC es una partícula envuelta de 80-120 nm de diámetro, con espigas de 8 nm en la superficie y un núcleo electrodenso en forma de cono. Se compone de: proteína 60%, lípidos 35%, carbohidratos 3% y de ARN 2% (ICTVdB Management 2006). Su estructura consta de una doble membrana externa de envoltura, en la que se localizan las proteínas de superficie y transmembranales que utiliza para entrar en la célula blanco. Después se localiza una matriz proteica y dentro de ella otra estructura en forma de cono: la cápside, que contiene el genoma viral, una cadena simple de RNA de sentido positivo, no segmentado, con 9.2 kb y que constituye el 2% del peso del virus. Cada virión contiene dos copias de genoma viral unidas de forma no covalente, como dímero, su composición es 38.2% adenina, 16% citosina, 25.1% guanina y 20.8% uracilo; a esta cadena de ácidos nucleicos se asocia una proteína llamada nucleocápside (NC). De esta

estructura viral se conocen 3 genes que codifican para las proteínas estructurales: *gag*, *pol* y *env* y 3 genes reguladores: *vif*, *tat* y *rev* esenciales en la replicación del virus.(Gilles & Robert 1999)

El gen *gag* (por sus siglas en inglés group antigen gen), codifica para tres proteínas: p28 de la cápside, p14 de la nucleocápside, que se encuentra fosforilada y es esencial para el ensamblaje del virus y p16 de matriz, que une a la cápside y la envoltura externa.(Gilles & Robert 1999)

El gen *pol* (polimerasa) codifica varias proteínas víricas muy importantes para la replicación viral: transcriptasa reversa (RT, p66/p51), que convierte el ARN en ADN viral; la integrasa (IN, 29 kDa), que integra el ADN viral en el de la célula del hospedero; la proteasa (PR, 12 kDa), que fragmenta a los precursores de *gag* y *pol* para dividir las proteínas y la dUTPasa (DU, 17 kDa), que favorece la replicación en células que no se dividen, como los macrófagos y disminuye las mutaciones que pueden alterar el ADN viral.(Gilles & Robert 1999)

El gen *env* (envoltura) codifica para la glicoproteína precursora gp160 que se fragmenta en dos subunidades por una proteasa de la célula hospedadora: gp135, una glicoproteína hidrofílica de superficie, responsable de la entrada del virus, ya que interactúa con el receptor de la célula hospedadora y gp38 glicoproteína hidrofóbica transmembranal, que se encuentra anclada en la doble capa lipídica de la envoltura y soporta a la gp135.(Gilles & Robert 1999)

El gen *vif* es análogo al gen *vif* de VIH, presenta tamaño similar (230 aminoácidos), localización en el genoma, tipo de aminoácidos (triptófano) y se requiere para una replicación completa del virus. Cuando hay mutación en este gen, su replicación en células de membrana sinovial y en macrófagos es muy pobre. *Vif* actúa en la etapa tardía de la replicación, modulando la infectividad del virión.(Gilles & Robert 1999)

El gen *tat* incrementa, en menor grado que el gen *tat* de HIV, la transcripción de los genes virales en varios órdenes de magnitud; modula ciertos genes celulares, como los del Complejo principal de histocompatibilidad.(Gilles & Robert 1999)

El gen *rev* modula el procesamiento y transporte de los RNA mensajeros que codifican para los componentes del virión y es indispensable para la replicación viral.(Gilles & Robert 1999) En la Figura 1 se muestra un esquema de los genes antes mencionados y la estructura viral a la que codifican.

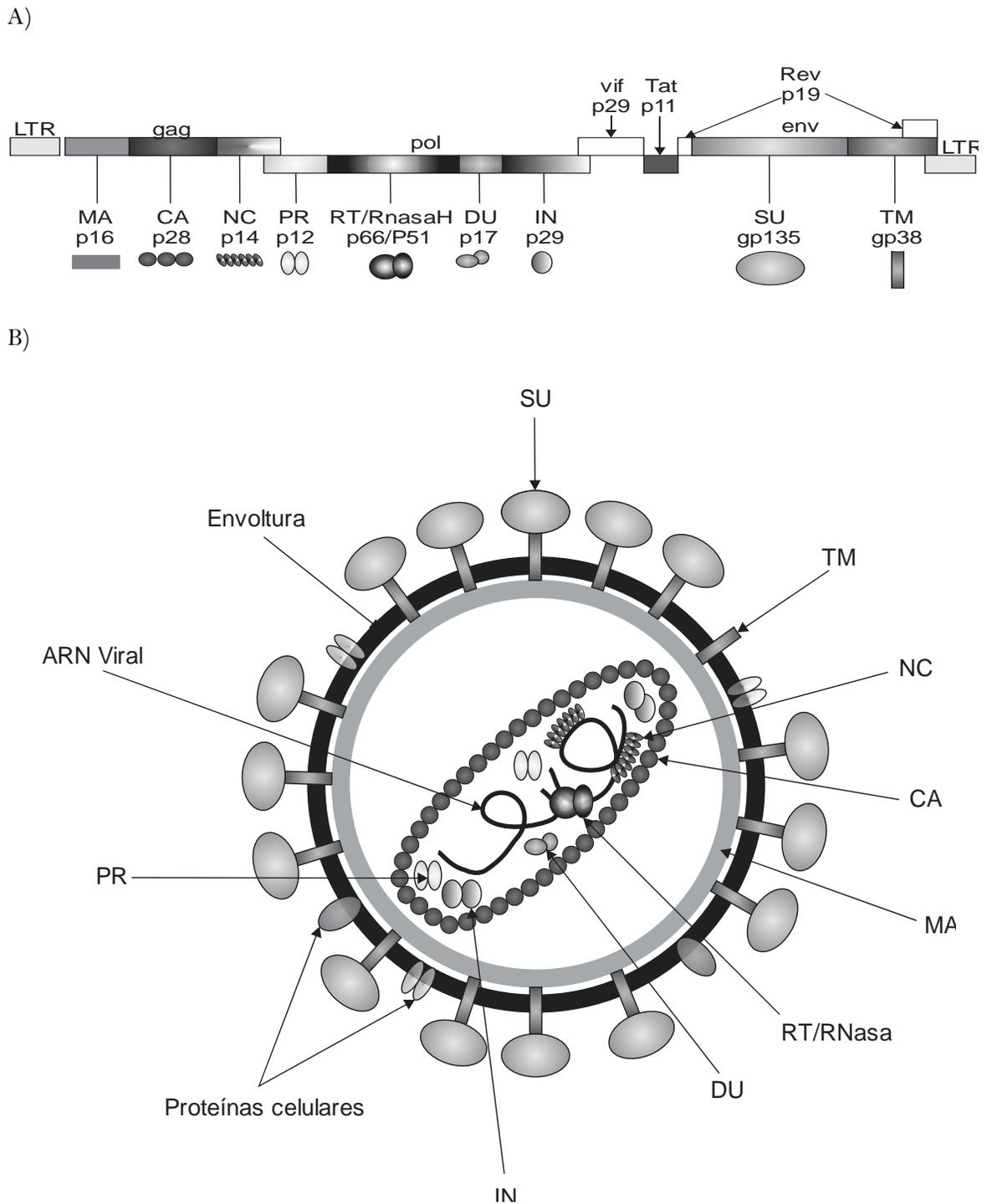


Figura 1. A) Organización genética. B) estructura del virus de Artritis-encefalitis caprina. SU: proteínas de superficie, TM: proteínas transmembranales, NC: nucleocápside, CA: cápside, MA: matriz, RT/RNasa: transcriptasa reversa, DU: dUTPasa, IN: integrasa, Proteínas celulares, PR: proteasa, ARN viral, Envoltura. Tomado de Enciclopedia de virología segunda edición (Gilles & Robert 1999) y adaptado por Siliceo.

Clasificación.

Los análisis filogenéticos relacionan estrechamente al VAEC con el virus de Maedi Visna, *lentivirus* que afecta principalmente a ovejas. Ambos virus comparten características genéticas, por lo que ahora se catalogan como lentivirus de pequeños rumiantes. (Leroux *et al.* 2010)(Blacklaws 2012) Con base en este análisis se han clasificado en 4 grupos secuenciales, de la A a la D. El grupo A se divide a su vez en siete subtipos y el grupo B en dos subtipos. Hasta hoy los subtipos A5, A7, C y D se han identificado en cabras únicamente. Los subtipos A1 y A2 se han aislado exclusivamente en ovejas. Los subtipos A3, A4, A6, B1 y B2 se han identificado en ambas especies. Se han encontrado recombinaciones entre un VMV del grupo A y un virus de AEC del grupo B, en cabras infectadas con ambos virus. (The center for food security & public health 2007)(Zanoni 1998)(Jörg Schüpbach *et al.* 2004)(Leroux *et al.* 1997)(J Schüpbach *et al.* 2004) En la Figura 2 se muestra la clasificación filogenética de los Lentivirus de los pequeños rumiantes.

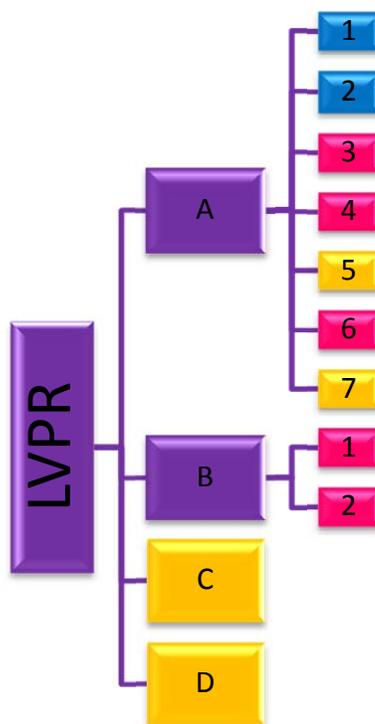


Figura 2. Morado: Clasificación filogenética de los Lentivirus de pequeños rumiantes y la especie en la que ha sido aislados. Azul: aislado sólo en ovejas (A1 y A2), amarillo: aislado sólo en cabras (A5, A7, C y D), rosa mexicano: aislado en ambas especies (A3, A4, A6, B1, B2).

Ciclo de Replicación viral.

Comienza con la adsorción de viriones libres a la célula y la interacción con los receptores (paso 1), después de la fusión de la membrana celular con la viral, ocurre la entrada a la cápside (paso 2), sigue el desenvolvimiento parcial de los viriones (paso 3). Una vez que las partículas virales están dentro del citoplasma de la célula infectada, comienza la transcripción reversa (paso 4). A continuación se transporta la cadena doble de ADN dentro del núcleo en un complejo de preintegración (PIC) (paso 5), allí se da la integración del ADN viral al cromosomal mediado por la enzima integrasa (paso 6). Este ADN integrado sirve como plantilla para la ADN polimerasa dependiente de ARN, dando lugar a la producción de RNA mensajero (paso 7) que se empalma y exporta al citoplasma y se traduce en proteínas (paso 8). La envoltura (paso 9) y las poliproteínas *Gag* plus y *Gag-pol* (paso 10) se transportan a la membrana plasmática en forma independiente, las partículas virales inmaduras se liberan por gemación de la célula (paso 11). Subsecuentemente la proteólisis madura los viriones mediante la Proteasa viral generando partículas maduras (paso 12) con una cápside condensada muy característica. En el paso 13, son liberadas de la célula las glicoproteínas gp135. Cada virión contiene dos copias del genoma para permitir la síntesis del virión y la envoltura, la proteína *Env* se incorpora a la membrana del virión ya que ésta media la interacción con el receptor de la célula y se fusiona con la membrana plasmática y endosomal. (Knipe & Howley 2007) En la Figura 3 se muestra un esquema de la replicación viral.

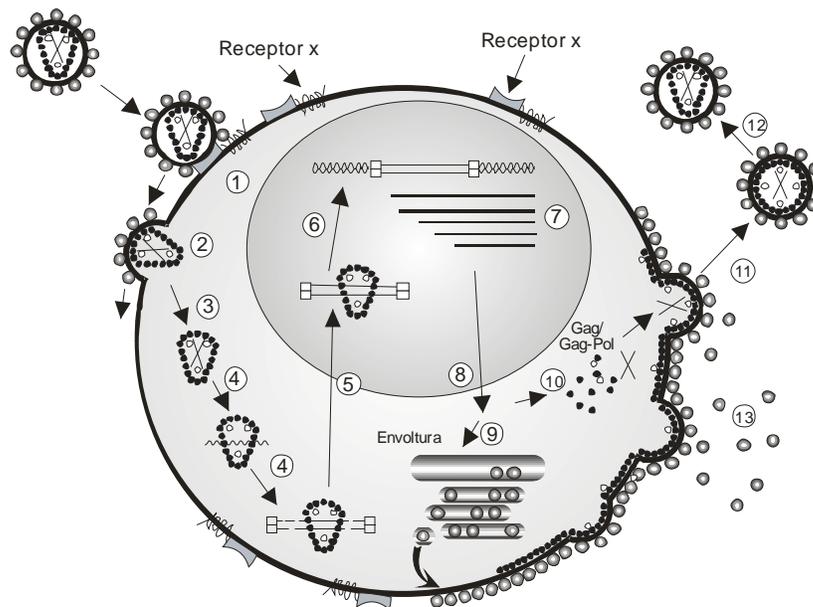


Figura 3. Ciclo de replicación viral del virus de Artritis-encefalitis caprina. Tomado del libro Fields 5ª edición de Virología (Knipe & Howley 2007) y adaptado por Siliceo.

Patogenia.

El principal tropismo de los LVPR es por monocitos/macrófagos y células dendríticas.(Blacklaws 2012)(Ravazzolo *et al.* 2006) Estas células infectadas diseminan el virus a diferentes órganos(Peluso & Haase 1985), ya que tienen en su genoma al provirus que tiene poca o nula transcripción viral y elude al sistema inmune. Cuando el monocito madura y se convierte en macrófago se activa la replicación viral dando como resultado la producción de virus infeccioso.(Narayan *et al.* 1983) Así, el macrófago puede actuar como un reservorio del virus y favorecer la infección de una gran variedad de células en los tejidos. Entre éstas se encuentran las células epiteliales de glándula mamaria que actúan como una importante fuente de transmisión de madre a hijo al liberar células infectadas y virus. (Blacklaws *et al.* 2004)(Ravazzolo *et al.* 2006)(Lerondelle *et al.* 1995)

Además, se ha encontrado evidencia de infección en células de la glía y microglia, neuronas, células epiteliales de criptas intestinales, de túbulos renales y glomérulos, en células foliculares y epiteliales de la tiroides, células de membrana sinovial, peribronquiales, de hígado (Kupffer), en células epiteliales de la paratiroides y glándulas adrenales, células de oviducto, células epiteliales e intermedias de prepucio. (Aguilar Tapia 2009)(Bertoni 2007)(Zink *et al.* 1990)

Vías de transmisión.

Horizontal

Aunque esta vía de transmisión es muy limitada y está asociada al manejo, las partículas virales o células infectadas pueden diseminarse a otros animales por contacto directo, inhalación de aerosoles o exposición a la leche contaminada a través del ordeño. Bajo condiciones de confinamiento permanente aumenta la probabilidad de transmisión.(East *et al.* 1993)(The center for food security & public healthsity 2007) Por su parte la transmisión venérea no se ha descartado ya que se ha encontrado virus en semen e incluso se ha logrado aislar el virus de muestras seminales.(Martínez Rodríguez *et al.* 2005)(Travassos *et al.* 1999)

Vertical

Es considerada la vía de transmisión más importante, ya que se ha comprobado la presencia de partículas virales y células infectadas en calostro y leche. Se da principalmente en etapas tempranas de la vida.(Ellis *et al.* 1983) La transmisión intrauterina ha sido difícil de comprobar.

Respuesta Inmune.

Los virus han encontrado diferentes vías de entrada al organismo de los animales: por vía oral, en aerosoles o por mucosas.

Inmunidad innata

Es la primera barrera inmunológica del organismo hacia agentes patógenos, actúa de forma no específica y no crea protección a largo plazo. Juega un papel importante en bloquear infecciones iniciales al proteger a las células y destruir las ya infectadas. Se activa con el reconocimiento del virus por receptores reconocedores de patrones (PRR'S), como los receptores tipo "Toll" (TLR), los receptores RLR'S como RIG-I (por sus siglas en inglés: Retinoic acid-inducible gen Receptor) y MDA5 (por sus siglas en inglés: melanoma differentiation-associated gene), las lectinas dependientes de calcio llamadas C-Type Lectin Receptor o los receptores tipo NOD (por sus siglas en inglés nucleotide oligomerization-domain) también llamados NLR'S (de sus siglas: NOD-Like Receptors). El reconocimiento a través de estos PRR'S desencadena la activación de factores de transcripción nucleares para la expresión de genes para la producción de interferones (IFN) tipo I (α/β) y citocinas inflamatorias. Estos receptores se encuentran en la superficie celular o membrana endosomal de diversas células entre las que se encuentran las células dendríticas (DC), macrófagos, linfocitos y células del parénquima. Los TLR son fácilmente inducibles en la mayoría de las células, por ejemplo el TLR7/8/9 son expresados constantemente a altos niveles por células DC para una rápida producción de IFN; cada molécula de TLR está diseñada para reconocer productos virales específicos como el TLR 3 y TLR 7/8 que reconocen ARN de cadena simple o doble respectivamente, o el TLR 9 que reconoce ADN de doble cadena; mientras que RIG-I y MDA5 reconocen RNA de doble cadena intracitoplasmáticos.(Mueller & Rouse 2008)

La inmunidad innata consta de diversos componentes celulares y proteínas especializadas; entre las proteínas antivirales más estudiadas se encuentran los IFN α/β , que inducen la transcripción de diversos genes. Una de las consecuencias del estado "antiviral" que adopta el organismo es la inhibición de la síntesis de proteínas celulares previniendo así la replicación viral.(Mueller & Rouse 2008) Otro son las células asesinas naturales (NK), que se estimulan por la interleucina 12 (IL-12) eliminan las células infectadas mediante apoptosis, interactúan con las células dendríticas y producen citocinas proinflamatorias. Las células no infectadas, están protegidas de las NK porque tienen una alta expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC-I) en su membrana. Existen diferentes tipos de células NK y cada una de ellas provee una inmunidad innata específica contra

ciertos virus. Además del IFN tipo I, hay muchas proteínas en el huésped que tienen una función antiviral entre estas se encuentran: el complemento (algunas veces se une a los viriones para que sean fagocitados), las citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-6) y las quimiocinas (MIP-1 α) que organizan la respuesta de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células asesinas naturales. Todos estos componentes tienen un papel importante en la efectividad de la inmunidad adaptativa hacia el virus ya que, además de contener el proceso de infección, dan las señales de alarma para activar y modular a esta última.(Mueller & Rouse 2008)

Inmunidad adaptativa

En la respuesta inmune (RI) adaptativa participan dos elementos centrales: los anticuerpos (Ab) y las células T. Los anticuerpos reconocen las partículas virales y se unen a ellas para bloquear la infección. Además, si se encuentran en los sitios de entrada (mucosas), funcionan como barrera inmunológica contra una reinfección. El principal anticuerpo en mucosas es la inmunoglobulina A secretora (IgAs) aunque también la IgG puede ser protectora, particularmente en la circulación sanguínea.(Mueller & Rouse 2008)

La unión de los Abs hacia los epitopos en los viriones libres, bloquea la penetración del virus a las células diana y algunas veces la consecuencia es la lisis viral por activación de complemento, la opsonización y fagocitosis. Otro mecanismo, es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, en el que la IgG se une a antígenos virales presentes en la superficie de las células dañadas, estos anticuerpos son a su vez reconocidos por receptores presentes en las células NK y ésta induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Sin embargo, la unión del receptor para Fc también puede facilitar la infección y resultar en un daño mayor al tejido. Esto puede ocurrir en la infección con VIH.(Mueller & Rouse 2008)

El inicio de la inmunidad adaptativa depende de los mecanismos de la inmunidad innata para activar a las células presentadoras de antígeno (APC). Éstas al igual que los linfocitos son atraídas hacia el tejido linfoide por las citocinas y quimiocinas y allí son retenidas para asegurar y facilitar la interacción entre ellas.(Mueller & Rouse 2008)

Los linfocitos T se dividen en CD4+ y CD8+, ambas reconocen los péptidos virales unidos al MHC. Las MHC clase II son generadas por las APC infectadas y presentan péptidos virales. Aunque muchos de éstos tienen la propiedad de permitir la unión del MHC, la mayoría de los CD8+ y posiblemente CD4+ son específicos de pocos epitopos inmunodominantes.(Mueller & Rouse 2008)

Los linfocitos T cooperadores-CD4+ (Th) también son importantes para controlar infecciones en la inmunidad antiviral. Algunas actúan como cooperadoras en la inducción de anticuerpos, al participar en la activación de las células B en los centros germinales (GC) y asegurar la hipermutación somática, la maduración de la afinidad, así como la generación de células plasmáticas de larga vida y células B de memoria. Otras cooperan en la respuesta de T CD8+, y otras tienen la función de efectoras generando células de memoria estables. Los Th, particularmente Th1 pueden producir citocinas involucradas en la defensa antiviral como IFN γ , LT α , IL2 y TNF α .(Mueller & Rouse 2008)

La respuesta de las células T CD8+hacia la infección viral también comienza dentro del tejido linfóide. El linfocito reconoce al complejo antígeno-MHC clase I en las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas (DC). Posteriormente se activa, prolifera y diferencia en linfocitos T citotóxicos (Tc ó CTL) que son las células efectoras. Los linfocitos Tc reconocen a las células infectadas y las eliminan mediante apoptosis, por medio de perforinas y granzimas presentes en gránulos citoplasmáticos, o por la unión al ligando Fas que tienen dichas células. La resolución de la enfermedad recae particularmente en las células Tc puesto que la replicación viral se lleva a cabo dentro de las células. Algunos factores, incluyendo el antígeno, las APC, moléculas coestimuladoras (CD28) y las citocinas inflamatorias (IFN- α/β o IL-12) son requeridas para programar el desarrollo de linfocitos Tc funcionales. Estas citocinas junto con las linfotoxina- α , tienen múltiples efectos antivirales como depurar el virus de las células infectadas sin matarlas, una acción muy importante en los virus que infectan células como las nerviosas que tienen lenta regeneración. Los Tc entran en la linfa eferente y torrente sanguíneo y acceden a casi todas las locaciones del cuerpo. Sin embargo, no permanecen activos por largo tiempo, una vez que se elimina al virus, aproximadamente el 95% de las células muere; las células restantes se diferencian en células de memoria, una población estable en el hospedero por varios años y que puede activarse al encontrar nuevamente el antígeno, para proveer una mejor protección ante una reinfección con el mismo virus.(Mueller & Rouse 2008)

Respuesta inmune hacia VAEC.

A diferencia del VIH, el virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de inmunodeficiencia en simios (SIV), el VAEC no causa inmunodeficiencia; pero al igual que en todos los lentivirus, la respuesta inmune humoral y celular no es capaz de eliminar al virus del hospedador. Se ha observado una disminución en la producción de linfocitos eferentes que se producen. Uno de los principales mediadores de la RI es el interferón tipo I (IFN) ya que interfiere con la replicación y

diferenciación de los monocitos. Los cabritos infectados producen anticuerpos (predominantemente IgG) contra todos los péptidos virales, especialmente contra las proteínas de la envoltura;(Gilles & Robert 1999) pero son de baja afinidad y con títulos muy bajos.(Narayan & Cork 1985) Los anticuerpos neutralizantes se desarrollan muy lentamente pudiendo aparecer meses después de la infección. Además, al diseminarse de célula a célula, la producción de anticuerpos pierde importancia.(Blacklaws 2012) En cabras se induce una respuesta inmune dominada por IgG1 que sugiere la participación de linfocitos Th2 e IL-4; pero también se desarrollan IgG2, lo que hace suponer que el Th1, también se involucra en la respuesta. Esta última regula la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, por lo que la respuesta inmune compuesta por ambas Th1 y 2 no genera lesiones ni manifestaciones clínicas mientras que una compuesta únicamente por Th1 desarrolla manifestaciones clínicas, como la inflamación de los carpos.

Presentaciones clínicas de la Artritis Encefalitis Caprina.

Artritis

Unilateral o bilateral, afecta principalmente la articulación de los carpos pero también puede afectar otras articulaciones como la de los tarsos o la femoro-tibio-patelar, entre otras. Se caracteriza por aumento de tamaño, engrosamiento de la capsula articular, tumefacción de la articulación, sinovitis proliferativa, fibrosis y mineralización del tejido. Histológicamente se observa infiltración masiva de células mononucleares (linfocitos, monocitos, macrófagos, plasmáticas), atrofia de las vellosidades sinoviales y angiogénesis.(Peterhans *et al.* 1996)(von Bodungen *et al.* 1998)

Encefalitis

Se presenta principalmente en cabritos de dos a cuatro meses de edad y se caracteriza por disfunción del sistema nervioso central. Histológicamente se observan áreas multifocales de necrosis y malacia en cerebro y médula espinal, desmielinización perivascular, displasia cerebelar, inflamación difusa linfoplasmática y acumulación masiva de macrófagos en la materia blanca e infiltración de linfocitos.(Murphy *et al.* 2010)(Zink *et al.* 1990) Clínicamente, los cabritos presentan dos manifestaciones: la medular que se caracteriza por paraparesia que progresa a tetraparesia y la cerebral en la que se observa ataxia, movimientos circulares, inclinación de la cabeza, temblor de músculos de la cara e incluso ceguera.(Leginagoikoa de la Arena 2010)

Mastitis

Esta presentación se observa principalmente en animales mayores a un año y en etapa de lactación. Las lesiones microscópicas que se han descrito son una densa infiltración nodular o difusa de leucocitos mononucleares con predominio de linfocitos en el intersticio y en la periferia de los ductos en la base del epitelio e hiperplasia de los nódulos linfoides retromamarios. (Ravazzolo *et al.* 2006) En los animales más afectados se observan lóbulos atróficos, cuerpos amiláceos prominentes y metaplasia escamosa del epitelio de los ductos. En cuanto a los signos clínicos se observa mastitis indurativa es decir, endurecimiento bilateral de ubres con aspecto terso, firme, pero el signo principal es la disminución en la producción de leche.(The center for food security & public healthcity 2007)

Neumonía

La neumonía intersticial crónica se presenta en animales adultos de aproximadamente 2 a 3 años. Inicialmente tienen disnea, posteriormente respiración abdominal, jadeo y finalmente mueren por insuficiencia respiratoria. Los hallazgos histológicos en los pulmones son inflamación intersticial con infiltración de linfocitos, macrófagos, monocitos y células plasmáticas, hiperplasia del musculo liso interalveolar y fibrosis.(Bertoni 2007)(Murphy *et al.* 2010)

Diagnóstico.

El diagnóstico se puede hacer clínicamente ya que es muy raro observar animales menores a dos años con signología, a excepción de los cabritos con encefalitis. Los órganos afectados presentan lesiones a nivel histológico asociadas con infiltrados de células mononucleares pero no son patognomónicas de la enfermedad.(de Andrés *et al.* 2005) También se podría hacer aislamiento viral pero es complicado y costoso, debido a que hay muy bajos niveles de virus en sangre y los cocultivos muchas veces no muestran cambios que indiquen la presencia del virus, por lo que se debe hacer microscopia electrónica o inmunofluorescencia indirecta.(OIE 2008) El diagnóstico más práctico y accesible es demostrar la presencia de anticuerpos contra el virus por serología, a partir de suero sanguíneo, de leche o calostro.(Martínez Rodríguez *et al.* 2005) Entre las pruebas serológicas se incluyen: inmunodifusión en gel agar (AGID), inmunoensayo enzimático (ELISA), radio inmunoprecipitación (RIPA), radio inmunoensayo (RIA), y western blot (WB). Además de las pruebas moleculares, entre las que se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR Retrotranscriptasa (RT-PCR)(de Andrés *et al.* 2005) a través del ADN de las células

infectadas donde se encuentra el provirus.(Martínez Rodríguez *et al.* 2005) El Cuadro 1 muestra las pruebas comerciales disponibles para diagnosticar los LVPR.

Cuadro 1. Pruebas serológicas disponibles comercialmente para diagnosticar VAEC, que proteína es la que reconocen, sensibilidad y especificidad reportada.(de Andrés *et al.* 2005).(Herrmann *et al.* 2003).(Saman *et al.* 1999).(Zanoni *et al.* 1994)

Prueba serológica comercial	Proteína detectada	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
AGID	p25 (cápside) y gp135 (superficie) de VMV	76.3-91	98.3- 100
ELISA	Virus completo (VMV)	98.6	99.3
	p25 y gp46 (VMV)	99.4	99.3
	gp135 (VAEC)	100	96.4

Proteínas inmunodominantes.

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra proteínas virales como la p16, p19, p25, p27, p71, p90, gp38(Peterhans *et al.* 1994) y gp135. Predomina el reconocimiento de las proteínas del gen *gag* (p16, p19 y p27). (Martínez Rodríguez *et al.* 2005)(Knowles *et al.* 1990), pero las reportadas como inmunodominantes son: gp135 SU, p28 CA(Perry *et al.* 1995). (Johnson *et al.* 1983). (Rimstad & East 1994) y p16 MA. Esta última proteína tiene una importancia relevante debido a que puede ser detectada al inicio de la infección y puede representar un buen marcador de infección en animales que son negativos a la proteína de CA.(Grego *et al.* 2005) En el caso de VIH-1 la proteína de matriz es liberada por las células infectadas y permanece en los tejidos y plasma en concentraciones nanomolares.(Fiorentini *et al.* 2008)

Antecedentes.

En un estudio previo Vázquez *et al* (Vázquez Franco & Ducoing Watty 2011) realizó un análisis bioinformático y filogenético de los lentivirus de pequeños rumiantes e identificó el genotipo y subtipo del virus que circula en algunos hatos de México. Además, transformó bacterias (*E. coli*) con plásmidos que contenían los fragmentos que codifican para algunas proteínas estructurales de LVPR B1.(Vázquez Franco & Ducoing Watty 2011) Para el presente trabajo, se utilizó una cepa

que contenía el plásmido para la proteína de matriz p16, por haber sido previamente reportada como inmunogénica en otros estudios.(Zanoni *et al.* 1989). (Rosati *et al.* 2004)

JUSTIFICACIÓN.

En México, el escaso desarrollo de pruebas de laboratorio viables para los productores, dificulta el diagnóstico oportuno de Artritis encefalitis caprina afectando la producción, así como la exportación de animales, por lo que la importancia de este estudio radica en la posibilidad de implementar una prueba de ELISA indirecta accesible y de menor costo. Por otro lado, el hecho de que la proteína p16 sea un marcador de infección temprana, daría la posibilidad de que la prueba de ELISA pudiera utilizarse de forma complementaria a las pruebas comerciales que emplean la gp135.

OBJETIVO GENERAL.

Comprobar el reconocimiento de la proteína recombinante p16 del VAEC por sueros de cabras seropositivas, mediante una prueba de ELISA indirecta, para determinar el nivel de concordancia con la prueba de ELISA comercial.

Objetivos particulares.

1. Determinar la seropositividad al VAEC en sueros de caprinos, utilizando una prueba de ELISA comercial, para establecer grupos de animales seropositivos y seronegativos.
2. Demostrar, mediante Western Blot, el reconocimiento de esta proteína por sueros de animales positivos, para usarla en la estandarización de una prueba de ELISA indirecta y medir su nivel de concordancia con la prueba de ELISA comercial.

HIPÓTESIS.

La proteína recombinante p16 del VAEC será reconocida, mediante la técnica de ELISA indirecta, por sueros de cabras identificadas como seropositivas a la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Obtención de sueros de cabra.

Con el fin de determinar la presencia de anticuerpos (Ab) contra el Virus de Artritis Encefalitis Caprina en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA-UNAM), la Granja del Carmen y la granja La Matega, se tomaron muestras de suero de los caprinos mayores a un año. Estos eran de las razas Saanen, Toggenburg, Alpino Francés y mestizas. Las muestras se obtuvieron de la vena yugular (6ml sangre/muestra) con tubos Vacutainer® sin anticoagulante. Se centrifugaron a 450 g durante 15 minutos, se obtuvo la fracción del suero, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se congelaron a -20°C hasta su utilización. El manejo de los animales fue uniforme y de acuerdo a la rutina de cada rebaño; se les proporcionó agua *ad libitum* y una alimentación de heno de alfalfa y concentrado comercial que se administra dos veces al día.

ELISA comercial.

El ELISA fue realizado con el kit comercial caprine arthritis-encephalitis virus antibody test kit cELISA No. de catálogo 289-5 del laboratorio VMRD y siguiendo las especificaciones del fabricante.

Obtención de extractos de *E. coli* transformadas.

Se trabajó con la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido que contenía la región para codificar la proteína viral de matriz p16. Esta cepa fue donada por Vázquez.(Vázquez Franco & Ducoing Watty 2011) Se sembró por estría de en caja de Petri, con medio de cultivo Luria Bertani (LB) y kanamicina (Km) a una concentración de 30 µg/ml. Se incubó a 37°C 24 h y se verificó el crecimiento de las colonias bacterianas.

Inducción de la proteína recombinante de matriz p16.

De la placa de LB Km se tomó una colonia de bacterias y por agitación de asa, se sembró en 2ml de medio líquido de LB Km y se incubó 37°C durante 24 h en agitación constante (“over night”). Se tomaron 2000 µl de este cultivo y se agregaron a 500 ml de medio de cultivo LB, se incubó a 37°C en agitación constante, hasta que alcanzó una densidad óptica DO₆₀₀ igual a 0.5 (aproximadamente 2 h). Posteriormente se indujo con isopropil-b-D-tiogalactosidasa (IPTG) 1mM y se volvió a

incubar a 37°C durante 24 h en agitación constante. Se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se mantuvo la pastilla de bacterias en congelación a -20°C hasta su uso. Una alícuota de la pastilla, se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% (PAGE) en condiciones desnaturalizantes con diodecil sulfato de sodio (SDS) a 90 volts durante 3 h 46 minutos, con una dilución 1:2 con el regulador de muestra para verificar su expresión mediante la tinción del gel con azul de Coomassie y el marcador de peso de Bio-rad pre teñido No. de catálogo 161-0394.

Determinación de la expresión de p16 con Western Blot antihistidina.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 90 volts (durante 4 horas aproximadamente) con el extracto obtenido de la cepa de *E. coli* inducida. Posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF (immobilon millipore) a 200 volts durante una hora en una cámara semi-seca (Biorad trans-blot'SD semi-dry transfer cell). Se bloqueó con leche semidescremada (svelty) al 5% durante 60 minutos en agitación constante a temperatura ambiente; después se lavó cinco veces con solución de lavado y se agregó el primer anticuerpo (antihistidina) de la marca Santa Cruz biotechnology a una dilución 1:300 en solución de dilutora y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se hicieron cinco lavados; se agregó el segundo anticuerpo anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano HRP Santa Cruz biotechnology, a una dilución 1:1000 incubando 1 h a 37°C. Se realizó el mismo protocolo de lavado anterior, se reveló con el set fast DAB tablet de SIGMA (diaminobenzidina, urea y peróxido de hidrogeno), se monitoreó durante 5 minutos hasta observar un cambio de coloración y se paró la reacción con agua (protocolo del laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ).

Reconocimiento inmunológico de la proteína p16.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 90 volts (durante 4 horas aproximadamente) con el extracto crudo de la bacteria inducida para la sobre expresión de la proteína de matriz. Posteriormente se hizo la transferencia durante 4 horas a 100 mili amperes (mA) a una membrana de nitrocelulosa y se regeneró durante 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS 1X, se agregó 1 ml de solución de bloqueo e incubó 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS. Posteriormente se adicionó el primer anticuerpo: sueros de animales positivos y negativos a la prueba de ELISA) a una dilución 1:50, se incubó durante toda la noche a 4°C y al día siguiente se lavó 7 veces con PBS-Tween 0.1% y tres veces con PBS 1X e inmediatamente se

agregó el segundo anticuerpo Proteína G conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución de 1:3000 Bio-rad No. catálogo 170-6425. Se incubó 1 h a temperatura ambiente en agitación, se realizó el mismo protocolo de lavado antes mencionado 7 y 3 veces, finalmente se incubó con la solución reveladora durante 15 min en oscuridad y se paró la reacción con agua.

Purificación de la proteína p16.

Se purificó por cromatografía de afinidad, a la proteína p16 con el kit Ni-NTA Fast Start Kit No. de catálogo 30600 de laboratorios Quiagen® y de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Posteriormente, a través de un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 90 volts durante 4 horas aproximadamente, se verificó la presencia de la proteína p16. Se realizó un Western Blot contra la cola de histidina de igual manera como se explica previamente, pero en este caso fue la proteína purificada y no el extracto crudo de la bacteria.

Desarrollo de ELISA a partir de p16.

Cuantificación de proteína.

Por el método de Bradford, se determinó cuantos nanogramos de proteína se obtenían de la purificación, para poder fijar la cantidad necesaria, una vez que se estandarizara el ELISA. Primero se hizo una curva de concentración de albumina sérica bovina (ASB) diluyendo 1:10 con agua milliQ es decir 0.1 g ASB cbp 1ml (dilución A), a continuación se hizo una dilución 1:100 con la dilución previa 10 µl de A más 990 µl de H₂O milliQ (dilución B) y a partir de la dilución lograda se hicieron 6 diluciones de 200 µl al 2% (196 µl de H₂O más 4 µl de la dilución B), 4% (192 µl de H₂O más 8 µl de la dilución B), 6% (188 µl de H₂O más 12µl de la dilución B), 8% (184µl de H₂O más 16 µl de la dilución B), 10% (180 µl de H₂O más 20 µl de la dilución B) y 12% (176 µl de H₂O más 24 µl de la dilución B) se agregó cbp 1 ml del reactivo de Bradford a cada dilución y se midió en el espectrofotómetro con una linealidad de 99.8%. Por último se hicieron diluciones de la muestra (p16 purificada) 1:10 (1 µl de p16 más 10 µl de la H₂O y 1 ml) y se adicionó 990 µl de reactivo Bradford y se midió en el espectrofotómetro (protocolo del laboratorio de bacteriología molecular de la FMVZ).

Estandarización de ELISA.

En una placa de noventa y seis pozos Maxisorp® se fijó la p16 con el amortiguador de carbonatos (coating buffer) (1 µg /50 µl /pozo), se dejaron pozos vacíos para determinar la unión inespecífica

(UNE) y se incubó tapado a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron 4 lavados de 1 minuto con 350 µl de solución de lavado, a continuación se hicieron diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 del suero testigo en este caso un pool de sueros positivos y otro de sueros negativos con amortiguador de fosfatos salinos (EIA buffer) y se colocaron 50 µl en cada pozo y por duplicado; se incubó a 30°C durante 2 h, se lavó 4 veces con solución de lavado, se hicieron diluciones 1:2000, 1:10000, 1:20000 y 1:40000 de la proteína G peroxidada (conjugado) Bio-rad No. catálogo 170-6425 con EIA buffer, se incubó a 30°C durante 2 h, se lavó 4 veces, se adicionó 100 µl de sustrato, se incubó 15 minutos en oscuridad a 30°C y se leyó a 530 nm en el espectrofotómetro se dejaron otros 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se adicionó 50 µl de solución de frenado y se leyó a 490 nm y 450 nm. Se analizaron las densidades ópticas obtenidas en todas las diluciones y los UNE para establecer las condiciones óptimas para analizar todos los sueros (Protocolo del laboratorio de reproducción de la FMVZ).

Reconocimiento de p16 por sueros de cabras positivas a la enfermedad.

Una vez establecidos los parámetros a emplear en la prueba, se realizó el ELISA de todos los sueros pertenecientes a tres hatos: uno negativo por PCR, (Vázquez Franco & Ducoing Watty 2011) y dos positivos a signología clínica y a pruebas serológicas contra VAEC, de la siguiente forma:

En una placa de noventa y seis pozos Maxisorp® se fijó a 4°C toda la noche el antígeno p16 a una concentración de 1 µg/pozo, en 50 µl del amortiguador de carbonatos 0.05 Molar, cada placa se lavó 4 veces con la solución de lavado durante 30 segundos, se hizo una dilución 1:50 de cada suero con la solución de fosfatos y se colocaron 50 µl en cada pozo, se incubó durante 2 h a 30°C. Se hizo un segundo lavado de la placa 4 veces durante 30 segundos, del conjugado (proteína G peroxidada Bio-rad No. catálogo 170-6425) se hizo una dilución 1:15000 con la solución de fosfatos salinos y se agregaron 50 µl a cada pozo, se incubó nuevamente durante 2 h a 30°C, se hizo un tercer lavado igual al descrito anteriormente. Finalmente se adicionan 100µl de sustrato, se incubó 15 minutos a 30°C y otros 15 minutos a temperatura ambiente y por último se hizo la lectura con espectrofotómetro a 450 nm con solución de frenado. Se calculó el promedio y la desviación estándar de las densidades ópticas obtenidas de 50 sueros procedentes del hato negativo (La Matega), y el punto de corte se estableció como la suma del promedio más dos desviaciones estándar. (Herrmann-Hoesing *et al.* 2010)

$$PC = m + 2\sigma$$

PC= punto de corte

m= densidad óptica de las 50 muestras

σ = desviación estándar

Análisis del reconocimiento de p16 en ELISA, mediante la prueba de kappa.

Para medir el nivel de concordancia entre los resultados de la ELISA comercial y la ELISA con p16, se utilizó el coeficiente kappa de Cohen con las siguientes fórmulas.(Cohen 1968)(Lluís Carrasco & Jover 2004)(Cerdeja L & Villarroel Del P 2008)

Formula 1(Lluís Carrasco & Jover 2004)

$$K = \frac{\pi_{11} + \pi_{22} - \pi_{1.}\pi_{.1} - \pi_{2.}\pi_{.2}}{1 - \pi_{1.}\pi_{.1} - \pi_{2.}\pi_{.2}}$$

Dónde:

K = kappa

n = número de individuos

$$\pi_{11} = \frac{n_{11}}{n} \quad \pi_{22} = \frac{n_{22}}{n} \quad \pi_{1.} = \frac{n_{11}+n_{12}}{n}$$

$$\pi_{2.} = \frac{n_{21}+n_{22}}{n} \quad \pi_{.1} = \frac{n_{11}+n_{21}}{n} \quad \text{y} \quad \pi_{.2} = \frac{n_{22}+n_{12}}{n}$$

Cuadro 2. Tabla de contingencia referente a las mediciones que realizan dos pruebas sobre una serie de individuos.

		Prueba A	
		Positivos	Negativos
Prueba B	Positivos	n_{11}	n_{12}
	Negativos	n_{21}	n_{22}

Formula 2(Olave Leyva & Setién 2009)

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Dónde

Po= probabilidad de observados

Pe= probabilidad de esperados

$$Po = \frac{a + b}{n}$$

$$Pe = \frac{(mi)(ni) + (mo)(no)}{n^2}$$

Cuadro 3. Valores teóricos asignados a cada celda para el calcular el coeficiente kappa.(Olave Leyva & Setién 2009)

		Prueba A	
		Positivos	Negativos
Prueba B	Positivos	a	ni
	Negativos	b	no
	mi	mo	n

Cuadro 4. Valoración del coeficiente kappa. (Landis y Koch, 1997)

Coeficiente kappa	Fuerza de la concordancia
0.00	Pobre (Poor)
0.01 – 0.20	Leve (Slight)
0.21 – 0.40	Aceptable (Fair)
0.41 – 0.60	Moderada (Moderate)
0.61 – 0.80	Substancial (Substantial)
0.81 – 1.00	Casi perfecta (Almost perfect)

RESULTADOS.

Obtención de sueros de cabra.

Se obtuvieron 303 sueros (3 ml por muestra aproximadamente). De éstos, 50 animales procedentes de La Matega se consideraron como presuntamente negativos debido a que no tienen antecedentes de signología positiva y a que el hato fue negativo por PCR de acuerdo a Vázquez y Ducoing *et al.*(Vázquez Franco & Ducoing Watty 2011) 85 animales de Granja del Carmen, y 168 animales del CEIEPAA se catalogaron como positivos debido a que ambos rebaños tienen signología y serología positiva al VAEC.

ELISA comercial.

Se analizaron los 303 sueros antes mencionados. De éstos 180 resultaron positivos y 123 negativos de los cuales cada granja tuvo los siguientes resultados: Granja La Matega 50 negativos, 0 positivos; Granja del Carmen 29 negativos, 56 positivos y CEIEPAA 44 negativos, 124 positivos de acuerdo al punto de corte resultante del protocolo que señala el kit. (Índice de inhibición mayor al 35% se considera como positivo), véase Figura 4. La seropositividad total fue del 59.40% y por granja del 0% La Matega; 65.88% Granja del Carmen y 73.81% CEIEPAA, véase Figura 5.

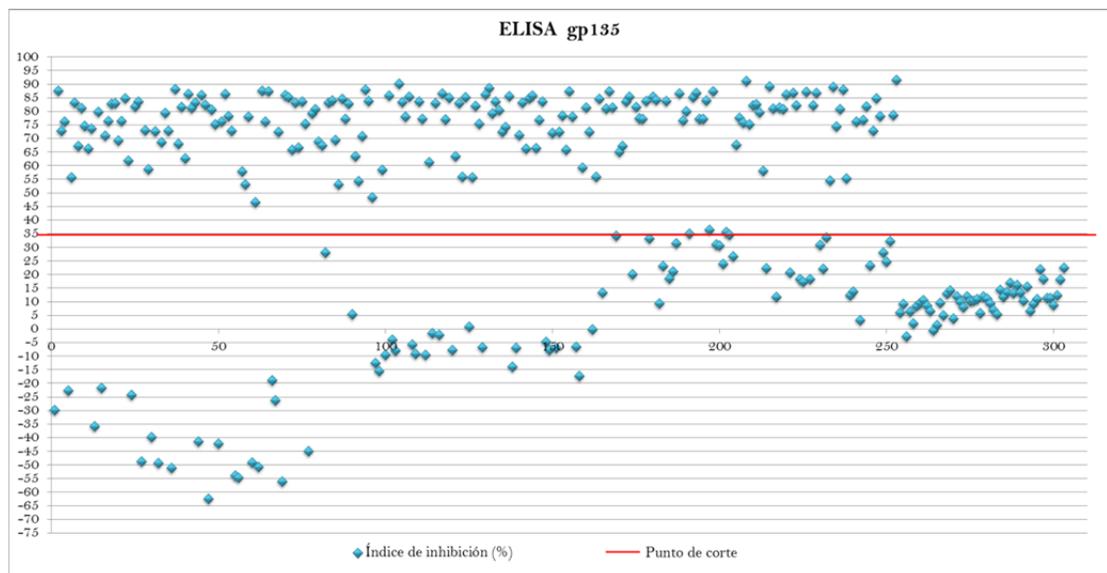


Figura 4. Índice de inhibición en porcentaje de los 303 sueros en la cELISA comercial para gp135, (porcentaje de inhibición mayor a 35% será positivo). Positivos 122 y negativos 181. Prevalencia total de 59.40%. Caprine arthritis-encephalitis virus antibody test kit cELISA no de catálogo 289-5, laboratorio VMRD, Especificidad 99.6%, Sensibilidad 100%.

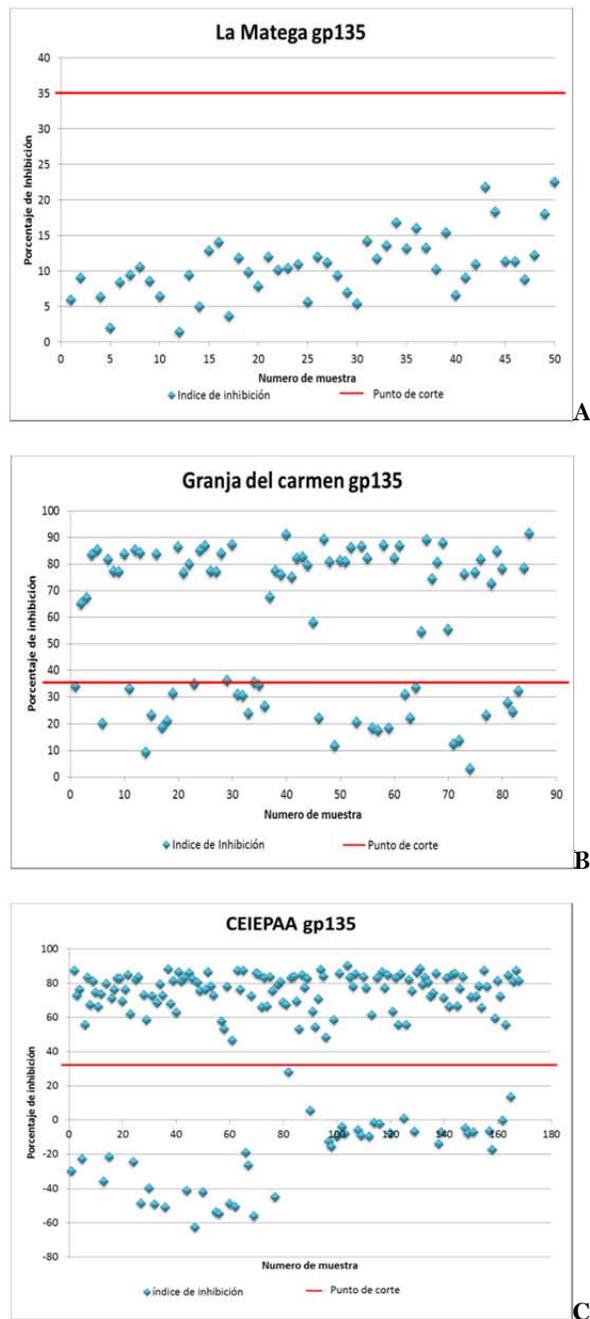


Figura 5. Índice de inhibición (%) de cELISA por granja. **A:** La Matega 0 positivos, 50 negativos, prevalencia de 0%; **B:** Granja del Carmen 56 positivos, 29 negativos, prevalencia de 65.88%; **C:** CEIEPAA: 124 positivos, 44 negativos, prevalencia de 73.81%. Caprine arthritis-encephalitis virus antibody test kit cELISA no de catálogo 289-5, laboratorio VMRD Especificidad 99.6%, Sensibilidad 100%.

Obtención de extractos *E. coli* transformadas.

Se obtuvieron numerosas colonias de bacterias en toda la placa de medio LB, de forma redonda de aproximadamente 2 mm de diámetro color blanco lisas. Véase Figura 6.



Figura 6. Caja de Petri con bacterias *E. coli* transformadas para expresar la proteína de matriz p16 del virus de Artritis Encefalitis Caprina en medio de cultivo LB.

Inducción de la proteína recombinante de matriz p16.

En el gel de poliacrilamida se observó una banda más ancha de 16 kDa aproximadamente que coincide con el peso esperado de la proteína inducida. Véase Figura 7.

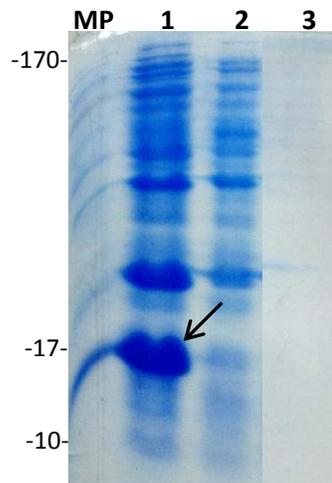


Figura 7. Expresión de la proteína p16 en SDS-PAGE 15% teñido con Azul de Coomassie de la cepa de *E. coli* con el plásmido que codifica para la proteína p16 de matriz. **MP:** Marcado de peso molecular (kilodaltones), **1:** Cepa inducida, **2:** Cepa sin inducir, **3:** Sobrenadante Cepa inducida.

Determinación de la expresión de p16 con Western Blot antihistidina.

La cola de histidina que posee la proteína recombinante fue reconocida por el anticuerpo antihistidina. En la membrana de nitrocelulosa se observa una banda de color vino de 16 kDa aproximadamente. Véase Figura 8.

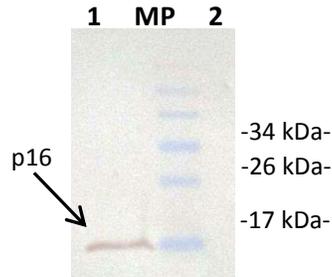


Figura 8. Reconocimiento de la proteína p16 a través de Western Blot de la cepa *E. coli* contra la cola de histidina que posee la proteína recombinante de matriz. **1:** Cepa inducida para p16, **2:** Cepa sin inducir, **MP:** Marcador de peso molecular (kilodaltones).

Reconocimiento inmunológico de la proteína p16.

La proteína recombinante de matriz p16 del VAEC fue reconocida por diversos sueros de animales positivos. Véase Figura 9.



Figura 9. Reconocimiento de la proteína p16 por sueros de animales positivos mediante Western Blot de la cepa *E. coli* proteína recombinante p16 de matriz. Carriles **1- 22:** sueros positivos por kit de ELISA comercial, carril **23:** Marcador de peso molecular (kilodaltones), carriles **24-33:** suero de animales negativos por kit de ELISA comercial.

Purificación de la proteína p16.

Se obtuvo con éxito la proteína recombinante purificada, en el gel de poliacrilamida se observa una banda clara y marcada en el carril de Eluido I y II. Véase Figura 10.

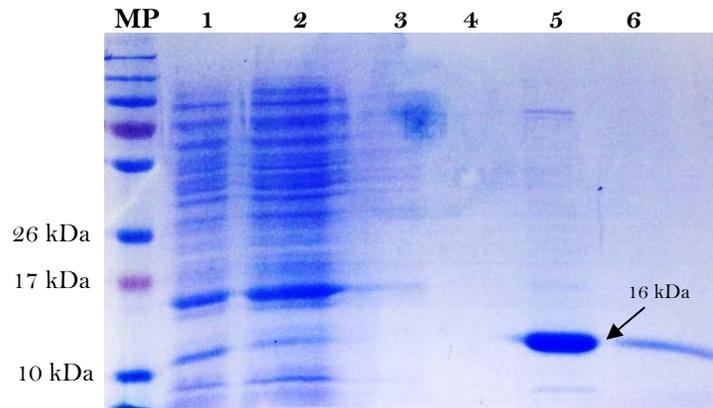


Figura 10. Purificación de p16 en SDS-PAGE 15% tinción Azul de Coomassie de matriz. **MP:** Marcado de peso, **1:** Sobrenadante del lisado, **2:** Filtrado, **3:** Lavado I, **4:** Lavado II, **5:** Eluido I, **6:** Eluido II.

Desarrollo de ELISA a partir de p16.

Cuantificación de proteína.

Con un 99.8% de linealidad en la curva de concentración de albumina sérica bovina (ASB) se obtuvo una cuantificación de 9.288 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ es decir 4.64 μg de proteína purificada por cada microlitro.

Estandarización de ELISA indirecta (iELISA).

Los parámetros que se establecieron para analizar todos los sueros de los animales muestreados tanto positivos como negativos fueron: dilución 1:50 del suero, 1:15000 del conjugado; incubación de 15 minutos a 30 °C en oscuridad más 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y lectura de 450 nm en espectrofotómetro.

Reconocimiento de p16 por sueros de cabras positivas a la enfermedad.

El punto de corte resultante fue de 0.173 DO. Por lo que de un total de 303 sueros, 150 fueron positivos y 153 negativos de los cuales cada granja tuvo los siguientes resultados Granja La Matega 46 negativos, 4 positivos; Granja del Carmen 47 negativos, 38 positivos y CEIEPAA 60 negativos, 108 positivos. La seropositividad fue de 49.50% y por granja del 8% La Matega; 44.70% Granja del Carmen y 64.28% CEIEPAA (Figura 11).

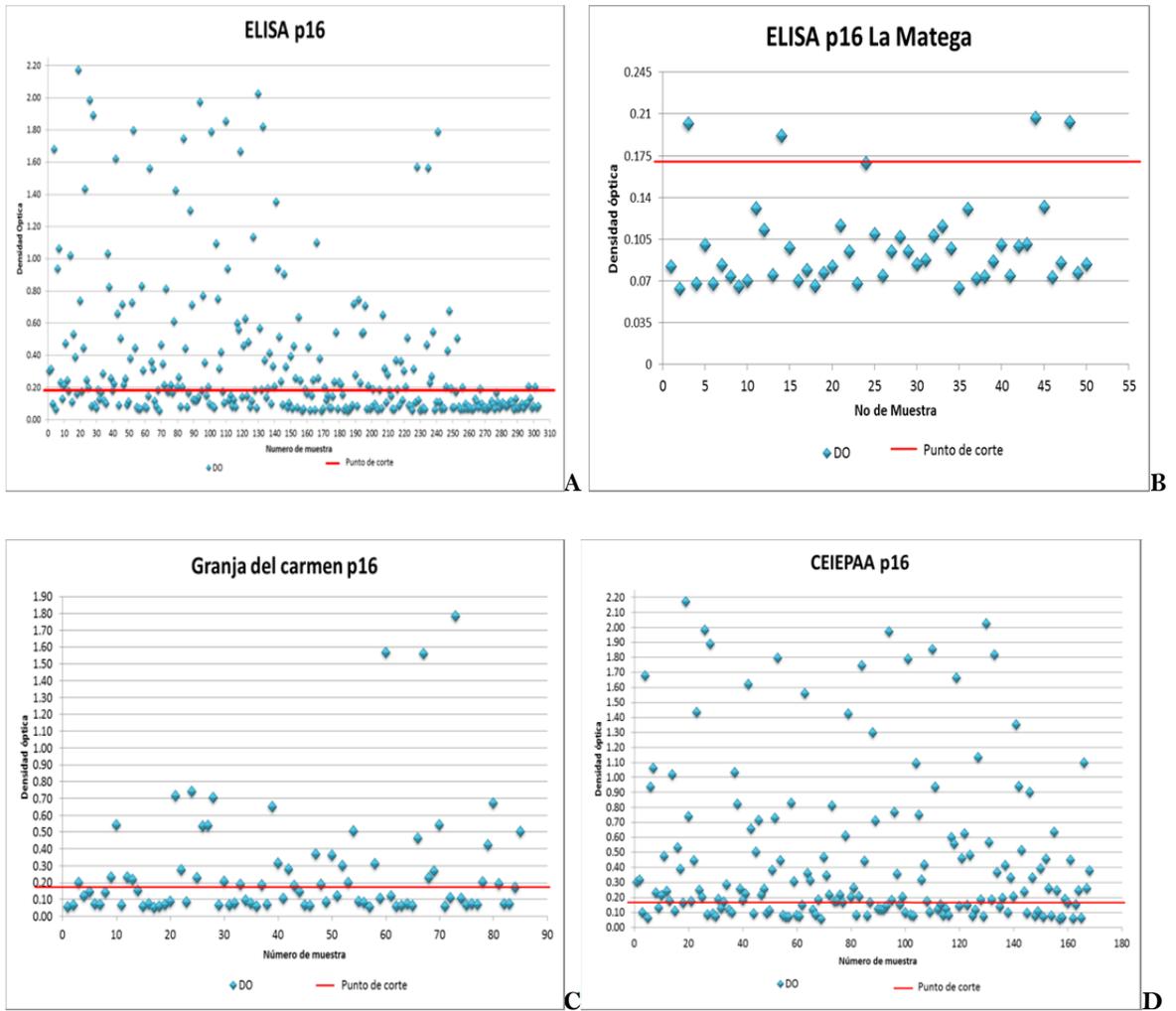


Figura 11. Densidad óptica (nm) de ELISA indirecta con la proteína recombinante de matriz p16. **A:** sueros totales 303 de los cuales 153 negativos, 150 positivos, prevalencia total 49.50%. Por granja **B:** La Matega 4 positivos, 46 negativos, prevalencia de 8%; **C:** Granja del Carmen 38 positivos, 47 negativos, prevalencia de 44.70%; **D:** CEIEPAA: 108 positivos, 60 negativos, prevalencia de 64.28%. Punto de corte 0.173 nm.

Análisis del reconocimiento de p16 por iELISA mediante la prueba de kappa.

El nivel de concordancia resultante con la primera fórmula fue $k = 0.615$ es decir tiene una fuerza de concordancia sustancial.(Lluís Carrasco & Jover 2004)

Cuadro 5. Tabla de contingencia referente a los valores obtenidos de cELISA gp135 Caprine arthritis-encephalitis virus antibody test kit cELISA no de catálogo 289-5 VMRD y iELISA p16 proteína recombinante de matriz desarrollada en este estudio.

		gp135	
		Positivos	Negativos
p16	Positivos	136	14
	Negativos	44	109

El nivel de concordancia resultante con la segunda fórmula fue $k = 0.618$ de igual manera tiene una fuerza de concordancia sustancial.(Olave Leyva & Setién 2009)

Cuadro 6. Valores obtenidos de ELISA gp135 Caprine arthritis-encephalitis virus antibody test kit cELISA no de catálogo 289-5 VMRD y iELISA p16 proteína recombinante de matriz desarrollada en este estudio para calcular el coeficiente de kappa de acuerdo a Olave *et al.*

		ELISA gp135		
		Positivos	Negativos	
ELISA p16	Positivos	136	14	150
	Negativos	44	109	153
		180	123	303

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, mostraron que los sueros de animales seropositivos al ELISA comercial de VAEC reconocen a la proteína recombinante p16 empleada en la prueba de iELISA experimental. La proteína de matriz (MA) es una proteína estructural de 15-17 kDa codificada por el gen *gag*.(Grego *et al.* 2005) En un estudio realizado por Zanoni(Zanoni *et al.* 1989) se observó un reconocimiento de la P15 de Maedi Visna (homóloga de la p16 de VAEC) al probar, mediante western blot, sueros de cabra positivos a VAEC, por lo que sugiere que esta proteína puede ser una importante herramienta para detectar animales que son negativos al antígeno principal: la proteína de la cápside. Otros estudios han demostrado que la proteína p16, al igual que la proteína de cápside p25 son inmunodominantes y sugieren que la p16 recombinante puede ser empleada para el diagnóstico de los LVPR.(Rosati *et al.* 2004)(Rosati *et al.* 1995) Estudios posteriores demostraron que la producción de anticuerpos contra MA de MVV puede ser detectada al inicio de la infección. Además, se demostró que existe una reacción cruzada con VAEC por lo esta proteína podría usarse para diagnosticar LVPR en general y como un marcador de infección temprana.(Grego *et al.* 2005) Cabe destacar que en este estudio, no se determinó si los animales positivos al ELISA comercial cursaban con una enfermedad crónica o reciente; sin embargo el presente trabajo es el primero en México en el que se utiliza la proteína recombinante de matriz p16 del virus de Artritis Encefalitis Caprina en una prueba de ELISA indirecta.

En otros retrovirus como el VIH-1, se ha encontrado que la proteína de matriz MA (p17) es más útil como antígeno para detectar anticuerpos en etapas tempranas de la infección, que la retrotranscriptasa reversa RT, la proteína de cápside CA (p24) o que el virus completo.(Hashida *et al.* 1996) En otro trabajo Jiang (Jiang *et al.* 1992) hizo un mapeo de los diferentes epitopos de p17 encontrando que son objetivo de la producción de Abs.

Si bien, en VIH-1 existe una fuerte respuesta de anticuerpos contra las proteínas de envoltura, matriz y cápside, la producción de anticuerpos contra las proteínas de envoltura no tiene relevancia sobre el curso de la enfermedad, mientras que la ausencia temprana o la posterior pérdida de anticuerpos contra *Gag* es un indicador de un mal pronóstico en la infección.(Fiorentini *et al.* 2010) Particularmente, existe la hipótesis de que p17 juega un papel importante en la patogenia del virus, ya que es el blanco de los anticuerpos neutralizantes y existe una correlación entre los altos niveles de anticuerpos contra p17 y la lenta progresión de la enfermedad, por lo que se sugiere que la respuesta de Ab contra p17 representa un mejor marcador serológico de la progresión de la enfermedad que los dirigidos contra p24.(Fiorentini *et al.* 2010) Además, se ha

demostrado que las células infectadas por VIH liberan a la proteína p17 y ésta permanece en tejidos de pacientes infectados o en plasma a concentraciones nanomolares, incluso en ausencia de replicación viral. Se sugiere que esta proteína tiene un papel relevante en la evasión de la respuesta inmune al favorecer y crear un ambiente más adecuado para la infección y replicación de VIH-1, particularmente en los linfocitos T aumenta la producción de IL-2 lo que induce la proliferación celular y la secreción de las interleucinas pro inflamatorias $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$. Además, disminuye la secreción de IL-4 y bloquea la maduración de los linfocitos T CD8. En las células NK, aumenta la secreción de IL-12 e IL-15, lo que favorece la proliferación celular, y la producción de citocinas pro-inflamatorias. En los monocitos, aumenta la producción de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 y aumenta la secreción de la proteína activadora del factor de transcripción (AP)-1. Por último, en las células dendríticas aumenta la secreción del receptor de quimiocina CCR7, que madura a las células dendríticas plasmocitoides y aumenta su migración.(Fiorentini *et al.* 2008) Hasta el momento no se han encontrado estudios sobre el posible papel inmunomodulador de esta proteína en los LVPR. Sería de gran importancia indagar, en un futuro, sobre la función de la P16 en la infección con Maedi Visna o Artritis Encefalitis Caprina, así como el posible papel protector de los anticuerpos contra esta proteína.

El presente trabajo es un estudio piloto en el que se sientan las bases para utilizar la p16 como antígeno en pruebas de diagnóstico, lo que abre la posibilidad de en un futuro, poder ofrecer la técnica de ELISA de forma comercial. Contar con pruebas diagnósticas contra VAEC accesibles para los productores, podría significar un avance en el estudio del estatus serológico de la enfermedad a costos menores de los que supone el emplear pruebas comerciales. En este sentido, cabe destacar que existen diferentes técnicas serológicas para la detección de anticuerpos contra LVPR, las que se usan comúnmente son la de inmunodifusión en gel agar (AGID), que tiene una alta especificidad pero no muy buena sensibilidad y con mucha mayor sensibilidad las pruebas de ELISA. (Leginagoikoa *et al.* 2009) Si bien, los métodos serológicos tienen una aplicación limitada por la variación antigénica en LVPR, porque existen animales infectados que no desarrollan respuesta inmune humoral o por la interferencia de los anticuerpos adquiridos por medio del calostro en animales jóvenes, siguen siendo la opción más económica para detectar animales positivos, particularmente en esta enfermedad, en la que no se vacuna y por lo tanto no existe la necesidad de distinguir anticuerpos por vacunación y por infección. (Leginagoikoa *et al.* 2009)

En ausencia de vacunas efectivas contra la enfermedad, el control y erradicación se basa en la información epidemiológica, las lesiones clínicas y la detección de los animales infectados (que en

México es casi nula). Las pruebas de laboratorio más recomendadas por la OIE, son la AGID y ELISA, (OIE 2008) la PCR y RT-PCR, así como el aislamiento viral mediante cocultivo de fluidos o células infectadas con células permisivas que indiquen infección (Reina *et al.* 2009). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en muestras de sangre es considerada un complemento de las pruebas serológicas. Para un diagnóstico efectivo con esta técnica comúnmente se requieren al menos dos muestras de sangre de cada individuo, lo que se refleja en un mayor costo y tiempo de realización. (Leginagoikoa *et al.* 2009) Además, este tipo de pruebas requieren de laboratorios más especializados y con experiencia en biología molecular, por lo que resulta más difícil su implementación en relación a las pruebas serológicas. Por otro lado, la PCR tiene algunas desventajas en estos retrovirus ya que el genoma de los LVPR es inestable lo que dificulta utilizar los mismos iniciadores para diferentes áreas geográficas. En diversos estudios la prueba de PCR ha demostrado tener una sensibilidad baja, por ejemplo en el caso de Brodie *et al.* (Brodie *et al.* 1993) que observó una sensibilidad de 66% en ovejas con enfermedad clínica y 38% en ovejas clínicamente sanas. Barquero *et al.* (Barquero *et al.* 2013) al comparar PCR contra ELISA obtuvo una sensibilidad de 28.35% (PCR) y 1.58% (LTR-PCR) atribuyendo la baja sensibilidad a que los iniciadores no hibridaron correctamente con el extracto de ADN por la alta tasa de mutación que tienen estos virus ($1/c 10^5$ nucleótidos). Por lo anterior, confirman que para incrementar el número de animales infectados detectados se debe complementar el PCR con el ELISA. (Barquero *et al.* 2013) Por último, el aislamiento viral, es muy difícil ya que existen tipos celulares que tienen replicación restringida contra ciertas cepas virales, la producción de los LVPR es lenta y en algunos casos no se observa efecto citopático por lo que es difícil confirmar su presencia y se debe observar el antígeno con inmunofluorescencia indirecta o microscopía electrónica de transmisión. (Reina *et al.* 2009)

En este estudio no se pudo contar con datos confirmados como positivos por aislamiento viral, o usar animales infectados de forma experimental que permitieran hacer la validación de la prueba con animales “verdaderos positivos” y “verdaderos negativos”, lo que además hubiera facilitado hacer el seguimiento de la respuesta inmune hacia la proteína p16 en el transcurso de la infección para demostrar su importancia como marcador de infección temprana o su papel protector en la enfermedad. Sin embargo, hay que destacar que este tipo de estudios son difíciles de realizar debido a su costo y factibilidad, por lo que el análisis de concordancia *kappa* comparando los resultados del iELISA con la p16 con el ELISA comercial, se propone como una herramienta útil para valorar la posibilidad de una nueva prueba serológica. El índice de concordancia obtenido entre ambas pruebas dio un resultado prometedor para la iELISA experimental con la p16, al

obtenerse un valor *kappa* de: 0.615 que es un índice de concordancia sustancial. Otros estudios han empleado este método para valorar posibles pruebas diagnósticas comparando dos pruebas serológicas: Brinkhof y Maanen (Brinkhof & Maanen 2007) al comparar la correlación entre 5 ELISAs y la AGID (considerada como prueba de referencia para AEC por la OIE); encontraron valores de *kappa* de 0.76 a 0.78 en cabras y de 0.40 hasta 0.79 en ovejas, lo que se refleja como una concordancia sustancial. En otras enfermedades como Leptospirosis, al comparar el ELISA contra la prueba de aglutinación microscópica (“prueba de oro”) encontraron un índice de concordancia casi perfecto: de 0.96 y concluyen que puede usarse el ELISA para diagnosticar la enfermedad. (Jimenez-Coello *et al.* 2008) En otro estudio con *Trypanosoma cruzi*, analizaron un total de 50 sueros para comparar ELISA y WB contra una prueba validada del Instituto Nacional de Cardiología y obtuvieron un índice de concordancia de 0.96, por lo que señalan que se obtuvieron dos pruebas para diagnosticar la enfermedad de Chagas. (Sánchez *et al.* 2001) Finalmente, en Anemia Infecciosa Equina, hay un trabajo que compara la prueba de ELISA contra AGID (que es la “prueba de oro” para esta enfermedad) en el que se obtuvo un índice *kappa* de 0.83 lo que demostró una excelente concordancia entre las dos pruebas. (Reis *et al.* 2012) En otros estudios se ha comparado una prueba serológica contra una molecular: Barquero *et al.*, (Barquero *et al.* 2013) compararon dos técnicas de PCR una para el fragmento *pol* y otra para la región LTR contra una ELISA comercial, analizando muestras de leche de oveja y cabra y obtuvieron valores de *kappa* de entre 0.020 y 0.124 concluyendo que deben usarse pruebas complementarias para incrementar el número de animales enfermos detectados. Leginagoikoa (Leginagoikoa *et al.* 2009) comparó dos PCR (*gag* y LTR) contra una ELISA comercial y obtuvo valores de *kappa* de 0.684 y 0.588 respectivamente. Es muy importante mencionar que para el diagnóstico de los lentivirus de pequeños rumiantes no hay establecida una “prueba de oro” por lo tanto para estimar la eficacia de cada prueba se compara con otra, independientemente de si es molecular o serológica. (de Andrés *et al.* 2005). (Brinkhof & Maanen 2007). (Barquero *et al.* 2013) Otra alternativa para validar la prueba de ELISA experimental, sería ampliar el número de muestras estudiadas, la OIE marca que para estimar la sensibilidad y especificidad de una prueba serológica, con un intervalo confianza alto (99%) y un porcentaje de error pequeño (2%), se deben evaluar por lo menos 1493 animales negativos y el mismo número de positivos aproximadamente. (OIE 2013)

Hay trabajos que se demuestran que la p16 es una proteína con una gran variabilidad antigénica entre una cepa y otra; (Rosati *et al.* 2004) por lo tanto un aporte importante del presente trabajo es contar con la proteína recombinante obtenida de una cepa mexicana, lo que permitiría tener acceso a ella de forma muy rápida y sin necesidad de hacer el aislamiento viral y sobretodo mejorar la

posibilidad de detectar animales infectados con cepas nacionales. En este sentido, las pruebas diagnósticas que existen comercialmente para los LVPR elaboradas con cepas clásicas de VMV y AEC pueden tener una menor sensibilidad para detectar a los animales positivos que estuvieran infectados con cepas virales diferentes. (Rosati *et al.* 2004)

El área de estudio del presente trabajo se limitó a Querétaro y Guanajuato, que son importantes, debido a que Guanajuato es el 5° estado productor del país al contar con un total de 323 065 caprinos, lo que representa el 7.83% de la población total del país. De estos 25 961 son para producción de leche. Por su parte Querétaro cuenta con 46 733 caprinos y aunque no es tan importante como Guanajuato también cuenta con un número considerable de animales. (INEGI 2007) En esta investigación se determinó la seropositividad de la enfermedad en tres hatos de producción lechera semi-intensivos empleando la prueba de ELISA comercial, que es la prueba de diagnóstico rutinaria para la enfermedad y la experimental con p16. Los resultados para los 2 hatos de Querétaro mostraron una positividad del 59.4% en el ELISA comercial y de 49.50% en la experimental. Estos hatos cuentan con animales de la raza Alpino Francés, Saanen y Toggenburg, mayores a un año y se sabe que han importado material genético de Francia. Cabe destacar que si bien en el hato del CEIEPAA sólo una cabra mostraba signología al momento del muestreo y en la Granja del Carmen eran dos, ambos fueron seleccionados para el estudio debido a los antecedentes de la enfermedad reportados. Es de llamar la atención el alto porcentaje de animales seropositivos, lo que confirma la dificultad para controlar y erradicar esta enfermedad, una vez que se presenta en un rebaño. En el caso Guanajuato el único hato probado fue seleccionado por ser reportado como negativo y en este trabajo se encontró que todos los sueros probados con ELISA comercial fueron negativos. Sin embargo, hay que destacar el hecho de que 4 animales resultaron positivos al ELISA experimental y si bien estos fueron considerados como falsos positivos al tomar como prueba de oro el ELISA comercial, sería interesante hacer un monitoreo del hato, pues como se mencionó anteriormente la p16 es considerada como un marcador de infección temprana, con lo que cabría la posibilidad de que estos animales estén cursando con la enfermedad en sus fases iniciales.

Es importante destacar que existen muy pocos estudios en México sobre la enfermedad. Uno de éstos fue realizado en 1983 en varios estados del país, en el que se obtuvo una seroprevalencia general de 9.33%. El 21.1% de los animales positivos eran importados, mientras que ningún animal mestizo mostró seropositividad, lo cual sugiere que la enfermedad se importó al país al introducir material genético. (Nazara *et al.* 1985) Más adelante Reséndiz *et al.* (Reséndiz Martínez *et al.* 2005) realizaron otro estudio en el estado de Puebla, con un total de 800 animales (600 raza Alpino

Francés y Saanen, 200 criollas); en éste empleó la prueba AGID y obtuvo una prevalencia del 0.75% ya que sólo 6 cabras resultaron positivas, además de que fueron las únicas que presentaban signología clínica. Posteriormente Salazar-Olivo *et al* (Salazar-olivo et al. 2003) estudiaron dos hatos intensivos del Estado de San Luis Potosí y encontraron una prevalencia del 19% y 43%. Torres-Acosta *et al* (Torres-Acosta *et al.* 2003) también hicieron un estudio con 1078 muestras de los diferentes municipios de Yucatán y a través de la prueba comercial AGID, 4 cabras resultaron positivas lo que representa un 0.4% de seroprevalencia. Por último Vázquez *et al* (Vázquez Franco 2008) realizó un trabajo en el Altiplano de 5 hatos particulares y tres centros de enseñanza de la UNAM en total 1196 muestras y encontró una prevalencia de 39.55%, lo que refleja un aumento en la prevalencia del 2008 a la fecha de aproximadamente el 20%. Si bien el presente estudio se realizó en un área limitada, los resultados parecerían estar en concordancia con lo reportado por Vázquez *et al* (Vázquez Franco 2008) en el sentido de que la enfermedad ha ido aumentando; lo cual también se explicaría por la poca información y estímulos para implementar programas de control y erradicación de la enfermedad. La importancia de este trabajo radica en que si se pudiera desarrollar esta prueba de iELISA existiría la posibilidad de ampliar el estudio a toda la república mexicana a bajo costo.

El presente trabajo es el primer estudio en México que demuestra el reconocimiento de la p16 del VAEC por caprinos seropositivos al ELISA comercial, por lo que se plantea su posible uso como antígeno para el diagnóstico de la enfermedad en el país, mediante esta prueba de iELISA.

CONCLUSIONES

La proteína recombinante p16 del VAEC fue reconocida por sueros de cabras.

La ELISA indirecta experimental del presente trabajo de investigación mostró una concordancia sustancial con la ELISA comercial.

La proteína recombinante es un fuerte candidato como antígeno para el desarrollo de pruebas serológicas como la ELISA.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar Tapia, M. del carmen, 2009. *Detección del Antígeno del Virus de Artritis Encefalitis Caprina en células epiteliales del prepucio caprino*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- De Andrés, D. et al., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*, 107, pp.49–62.
- Barquero, N., Domenech, A. & Arjona, A., 2013. Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, 94, pp.817–819. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.004>.
- Bertoni, G., 2007. Caprine Arthritis Encephalitis Complex. *International Veterinary Information Service*, Tempesta M(Ithaca NY), p.www.ivis.org.
- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35, pp.259–269. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237012> [Accessed March 8, 2013].
- Blacklaws, B.A. et al., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 101, pp.199–208.
- Von Bodungen, U. et al., 1998. Immunohistology of the early course of lentivirus-induced arthritis. *Clinical and experimental immunology*, 111(2), pp.384–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1904922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brinkhof, J. & Maanen, C. Van, 2007. Evaluation of Five Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and an Agar Gel Immunodiffusion Test for Detection of Antibodies to Small Ruminant Lentiviruses. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(9), pp.1210–1214.
- Brodie, S.J. et al., 1993. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Virology*, 130, pp.413–428.
- Cerda L, J. & Villarroel Del P, L., 2008. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), pp.54–58.
- Cohen, J., 1968. Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychological bulletin*, 70(4), pp.213–220. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19586159>.

- Contreras, A. et al., 2001. Etiología de la infección intramamaria caprina en relación con los programas de control. In *Congresos y jornadas. Seria Ganaderia Ovino-Caprino-Junta Andalucía*. Murcia, pp. 1 – 14.
- East, N.E. et al., 1993. Modes of transmission of caprine arthritis- encephalitis virus infection. *Small Ruminant Research*, 10, pp.251–262.
- Ellis, T., Robinson, W. & Wilcox, G., 1983. Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Australian Veterinary Journal*, 60(11), pp.326–329.
- Fiorentini, S. et al., 2010. HIV-1 matrix protein p17: a candidate antigen for therapeutic vaccines against AIDS. *Pharmacology & therapeutics*, 128, pp.433–444. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816696> [Accessed February 12, 2014].
- Fiorentini, S. et al., 2008. Synthetic peptide AT20 coupled to KLH elicits antibodies against a conserved conformational epitope from a major functional area of the HIV-1 matrix protein p17. *Vaccine*, 26, pp.4758–4765. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602957> [Accessed February 12, 2014].
- Gilles, Q. & Robert, V., 1999. Caprine Arthritis Encephalitis Virus (Retroviridae). A. Granoff & R. G. Webster, eds. *Enciclopedia of Virology (second edition)*, pp.223–229.
- Grego, E. et al., 2005. Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 106, pp.179–185. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778023> [Accessed August 1, 2013].
- Guerrero Cruz, M., 2010. La caprinocultura en México, una estrategia de desarrollo. *Revista Universitaria Digital de Ciencias Sociales*, 1(1), pp.1–8.
- Hashida, S. et al., 1996. Shortening of the window period in diagnosis of HIV-1 infection by simultaneous detection of p24 antigen and antibody IgG to p17 and reverse transcriptase in serum with ultrasensitive enzyme immunoassay. *Journal of Virological Methods*, 62, pp.43–53.
- Herrmann, L.M. et al., 2003. Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum Antibodies to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Diagnostic Tool for Successful Eradication. *Clinical and Diagnostic Labora*, 10(2), pp.267–271.
- Herrmann-Hoesing, L.M. et al., 2010. Evaluation of a caprine arthritis-encephalitis virus/maedi-visna virus indirect enzyme-linked immunosorbent assay in the serological diagnosis of ovine progressive pneumonia virus in U.S. sheep. *Clinical and vaccine immunology*: *CVI*, 17(2), pp.307–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2815521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2013].
- ICTVdB Management, 2006. 00.061.1.06.007. Caprine arthritis encephalitis virus. *ICTVdB - The Universal Virus Database 4 versión*, p.Columbia University, New York, USA.

- INEGI, 2007. *Censo agropecuario 2007*, Mexico DF.
- Jiang, J.-D. et al., 1992. Specific Antibody Responses to Synthetic Peptides of HIV-1 p17 Correlate with Different Stages of HIV-1 Infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 5, pp.382 – 390.
- Jimenez-Coello, M. et al., 2008. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. *Acta tropica*, 106, pp.22–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18299115> [Accessed February 11, 2014].
- Johnson, G.C. et al., 1983. Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infection and immunity*, 41(2), pp.657–665. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=264693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Knipe, D. & Howley, P., 2007. *Virology Fields 5th Editio*. D. E. Griffin et al., eds., Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer.
- Knowles, D. et al., 1990. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *Journal of virology*, 64(5), pp.2396–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=249403&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Leginagoikoa de la Arena, I., 2010. *Epidemiología y Diagnostico de la infección por el Virus Maedi Visna en Diferentes Sistemas de explotación ovinos españoles*. Tesis doctoral, Universidad de Leon.
- Leginagoikoa, I. et al., 2009. Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *Journal of Virological Methods*, 156, pp.145–149.
- Lerondelle, C. et al., 1995. Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus. *Journal of dairy science*, 78(4), pp.850–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790575> [Accessed April 21, 2013].
- Leroux, C. et al., 1997. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of virology*, 142(6), pp.1125–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9229003>.
- Leroux, C., Cruz, J.C.M. & Mornex, J.-F., 2010. SRLVs: a genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. *Current HIV research*, 8(1), pp.94–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210785>.
- Lluís Carrasco, J. & Jover, L., 2004. Métodos estadísticos para evaluar la concordancia. *Medicina Clínica*, 122(Supl.1), pp.28–34. Available at: <http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.fulltext?pid=13057543>.

- Martínez Rodríguez, H.A. et al., 2005. Effect of the caprine arthritis encephalitis virus in the reproductive system of male goats. *Veterinaria Mexico*, 36(2), pp.159–176.
- Mueller, S.N. & Rouse, B.T., 2008. Immune responses to viruses. In R. R. Rich et al., eds. *Clinical Immunology: Principles and practice*. Baltimore: Elsevier, pp. 421–431. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-04404-2.10027-2>.
- Murphy, B. et al., 2010. Tissue tropism and promoter sequence variation in caprine arthritis encephalitis virus infected goats. *Virus research*, 151(2), pp.177–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466024> [Accessed January 30, 2013].
- Narayan, O. et al., 1983. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and immunity*, 41(1), pp.67–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=264744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Narayan, O. & Cork, L.C., 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of infectious diseases*, 7(1), pp.89–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3885367>.
- Nazara, S. de J. et al., 1985. Estudio Serológico de la Artritis-encefalitis Caprina en México. *Técnica Pecuaria Mexico*, (48), pp.98–101.
- OIE, 2008. Artritis-Encefalitis caprina y Maedi-visna. In *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.07.03-04_Artritis-Encefalitis_caprina_Maedi_Visna.pdf, pp. 1–10.
- OIE, 2013. Principios y Métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. In *Manual terrestre de la OIE 2013*. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf, pp. 1–18.
- Olave Leyva, J.I. & Setién, Á.A., 2009. *Frecuencia del virus de la rabia en quirópteros hematófagos de algunas áreas endémicas del estado de Hidalgo y la Sierra Norte del Estado de Veracruz por inmunofluorescencia directa y detección molecular*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Peluso, R. & Haase, A., 1985. A Trojan Horse Mechanism for the Spread of Visna Virus in Monocytes. *Virology*, 147, pp.231–236.
- Perry, L.L. et al., 1995. Depressed CD4+ T lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis. *The Journal of infectious diseases*, 171, pp.328–334. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844368>.

- Peterhans, E. et al., 1994. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane proteins associates with the developments of arthritis. *Journal of Virology*, 68, pp.7139–7147.
- Peterhans, E. et al., 1996. Expression of TNF α in arthritis caused by caprine arthritis encephalitis virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 54, pp.281–289.
- Ravazzolo, A.P. et al., 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*, 350(1), pp.116–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537085> [Accessed January 30, 2013].
- Reina, R. et al., 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *The Veterinary Journal*, 182, pp.31–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755622> [Accessed March 3, 2014].
- Reis, J.K.P. et al., 2012. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *Journal of Virological Methods*, 180, pp.62–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227617> [Accessed January 23, 2014].
- Reséndiz Martínez, R. et al., 2005. Estudio de la Artritis Encefalitis Caprina en el Municipio de Atlixco, Puebla y su posible relación con el humano. *Patología Animal*, pp.317–321.
- Rimstad, E. & East, N., 1994. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Archives of Virology*, 134, pp.345–356.
- Rosati, S. et al., 2004. Antigenic Variability of Ovine Lentivirus Isolated in Italy. *Veterinary Research Communications*, 28, pp.319–322.
- Rosati, S. et al., 1995. Genetic and antigenic characterization of caev (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Veterinary microbiology*, 45(4), pp.363–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7483249>.
- Salazar-olivo, L. et al., 2003. La Artritis- Encefalitis Caprina: Amenaza de la Caprinocultura Potosina. *Tertio Milenio*, p.1. Available at: http://www.ipicyt.edu.mx/storage-sipicyt/difusion/pulso_diciembre_03.pdf.
- Saman, E. et al., 1999. A New Sensitive Serological Assay for Detection of Lentivirus Infections in Small Ruminants. , 6(5), pp.734–740.
- Sánchez, B. et al., 2001. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of Trypanosoma cruzi antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Archives of medical research*, 32, pp.382–388. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578752>.
- Schüpbach, J. et al., 2004. Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. , 78(14), pp.7518–7522.

- Schüpbach, J. et al., 2004. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, 319(1), pp.12–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14967484> [Accessed July 8, 2013].
- The center for food security & public healthsity, O., 2007. Artritis y encefalitis caprina. *Iowa State University*, (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/artritis-encefalitis-caprina.pdf>), pp.1–5.
- Torres-Acosta, J.F.J. et al., 2003. Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small Ruminant Research*, 49, pp.207–211. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448803000932> [Accessed April 21, 2013].
- Travassos, C.E. et al., 1999. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*, 32, pp.101–106.
- Trigo Tavera, F.J., 1991. La Artritis encefalitis caprina. *Ciencia Veterinaria*, 5, pp.49–66.
- Vázquez Franco, N.C., 2008. *Estudio sobre la Seroprevalencia de la Artritis-Encefalitis Caprina en Sistemas Lecheras Intensivos en la Región del Altiplano Mexicano*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vázquez Franco, N.C. & Ducoing Watty, A.E., 2011. *Identificación de Lentivirus de Pequeños Rumiantes genotipo B1 y desarrollo de herramientas moleculares para su diagnóstico*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zanoni, R., Krieg, A. & Peterhans, E., 1989. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Journal of clinical microbiology*, 27(3), pp.580–582. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=267367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zanoni, R.G. et al., 1994. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *Journal of veterinary medicine*, 41(10), pp.662–669. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7597859>.
- Zanoni, R.G., 1998. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *Journal of General Virology*, 79, pp.1951–1961. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714243>.
- Zink, M.C., Yager, J. a & Myers, J.D., 1990. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *The American journal of pathology*, 136(4), pp.843–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1877653&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ANEXO 1

SOLUCIONES ELECTROFORESIS

Solución reguladora de resolución 5x

2M Tris HCl pH 8.8

Solución reg. de concentración 4x

0.5M Tris HCl pH6.8

Solución reg. para corrimiento 10x pH 8.3

Tris 15 g

Glicina 72 g

En 500 ml H₂O destilada

Solución fijadora

Metanol 30%

Ácido Acético Glacial 7%

Para usarse:

Solución reg. para corrimiento 150 ml

SDS 10% 15 ml

H₂O destilada 1355 ml

Regulador de la muestra 2x

Tris HCl pH 8.4 200 mM

Sacarosa 0.5 M

EDTA pH 8.0 5 mM

Azul de bromofenol 0.03%

Solución de coloración

Azul de Coomassie R-250 0.2%

Ácido Acético Glacial 10%

Metanol 20%

Para usarse SDS-PAGE (500 µl):

Regulador de la muestra 2x 400 µl

SDS 10% 90 µl

DTT 1M 10 µl

DTT

0.77 G de DTT aforar a 500 µl

SOLUCIONES WESTERN BLOT

Solución reg. para transferencia 5x pH 8.2 a 8.4

Tris 7.5 g

Glicina 36 g

Para usarse

Solución reg. transferencia 5x 300 ml

Metanol 300 ml

H₂O 900 ml

Regulador salina de boratos pH8.4

Ácido bórico 1.546 g

Na₂B₄O₇ 2.339 g

NaCl 1.096 g

En 250 ml de H₂O destilada

Para usarse (solución salina boratos):

Disolver regulado salina de boratos 1:20 en SS 0.15 M

Regulador de regeneración

Triton 100x 1% en PBS

Regulador de acetatos

Acetato de sodio 0.05 M

Ajustar a pH 5.0 con ácido acético

Solución para diluir Anticuerpos

PBS 10X pH 7.4

Na₂HPO₄ 14.2 g

NaH₂PO₄ 6.9 g

NaCl 87.5 g

En 1000ml de H₂O destilada

PBS -T

PBS con Tween 20 al 0.1%

Solución de bloqueo

Leche descremada al 3% en

solución salina boratos

Leche descremada al 2% en PBS-T

Solución de revelado 1 (25 ml)

- | | |
|-------------------------------|---------|
| 1. 3' amino9'etil carbazolona | 0.006 g |
| 2. NN'dimetilformamida | 1.6 ml |
| 3. Regulador de acetatos | 25 ml |
| 4. Peróxido de Hidrogeno | 10 µl |

Mezclar primero 1 con 2 y 3 con 4 luego todo

Solución de revelado 2 (10 ml)

- | | |
|--------------------------|-------|
| 1. Diaminobenzidina | pizca |
| 2. PBS | 10 ml |
| 3. Peróxido de Hidrogeno | 10 µl |

primero mezclar 1 con 2 y luego el Peróxido

Solución de revelado 3 (10 ml)

- | | |
|--------------------------|---------|
| 1. Metanol | 1.66 ml |
| 2. 4'cloro1'naftol | 8.3 mg |
| 3. PBS | 8.3 ml |
| 4. Peróxido de Hidrogeno | 8.3 µl |

Primero mezclar 1 con 2 y 3 con 4 y luego todo

SOLUCIONES ELISA

Solución de lavado

- | | |
|----------------------------|---------|
| NaCl 1.5M | 17.58 g |
| Tween20 0.5% | 1 ml |
| Cbp (H ₂ Odest) | 200 ml |

Amortiguador de carbonatos

(coating buffer) 0.05M pH 9.6

- | | |
|---------------------------------|--------|
| Na ₂ CO ₃ | 0.795g |
| NaHCO ₃ | 1.46 g |
| NaN ₃ | 0.1 g |
| Cbp (H ₂ Odest) | 500 ml |

ajustar pH con NaOH

Amortiguador fosfatos salinos

(EIA buffer) 0.1M pH 7

NaH₂PO₄ 0.2M 5.421 g

Na₂HPO₄ 0.2M 8.662 g

NaCl 4.35 g

cbp (H₂Odest) 500 ml

Ajustar pH con NaOH y luego

Agregar BSA 0.5 g

Solución de conjugado o

solución citratos pH 6.0

Ácido cítrico 4.8 g

cbp (H₂Odest) 500 ml

Sustrato (TMB) (2 placas aprox)

0.0025 g TMB +250 µl DMSO

 125 µl
┌───────────────────┐
 ↓
12.5 ml solución de conjugado o citratos

2.5 µl Peróxido de Hidrógeno 30%

Almacenar en refrigeración excepto solución de lavado (a temperatura ambiente) un mes de caducidad

ANEXO 2

Soluciones para preparar gel de resolución SDS-PAGE

Componentes	Volumen (ml) de componentes requeridos para modelar geles de concentraciones y volúmenes indicados				
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml
Gel 10%					
H₂O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9
Acrilamida 30%	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
Persulfato de amonio 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01
Gel 12%					
H₂O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2
Acrilamida 30%	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
Persulfato de amonio 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01
Gel 15%					
H₂O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7
Acrilamida 30%	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
Persulfato de amonio 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01

Soluciones para preparar gel concentrador SDS-PAGE

Componentes	Volumen (ml) de componentes requeridos para modelar geles de volúmenes indicados				
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
H₂O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4
Acrilamida 30%	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63
SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
Persulfato de amonio 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005