



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

USO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS PARA LA DETECCIÓN DE
ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS
RUMIANTES (LVPR) EN LECHE DE REBAÑOS OVINOS Y CAPRINOS.

TESIS

PARA OPTAR. EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN AGUILAR TAPIA

TUTOR:

Dr. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

FACULTAD DE ESTÚDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTORAL:

M. C. MARÍA MARTHA GARCÍA FLORES

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNAM

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

Dr. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

FACULTAD DE ESTÚDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI EDO. MÉXICO NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

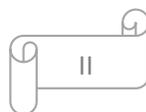
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

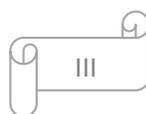
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. IMPACTO PRODUCTIVO.....	3
1.2. ANTECEDENTES DE LA INFECCION POR LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES EN MÉXICO.....	4
1.3. ETIOLOGÍA.....	5
1.4. GENES.....	5
1.5. PATOGENICIDAD E INMUNIDAD.....	6
1.6. TAZA DE INFECCIÓN.....	8
1.7. SÍGNOS CLÍNICOS.....	8
1.8. TRANSMISIÓN.....	10
1.9. DIAGNÓSTICO.....	11
1.10. CARACTERISTICAS DE LAS PRUEBAS DE ELISA COMERCIALES.....	12
1.11. PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	14
1.12. ESTUDIOS REALIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES UTILIZANDO ELISAs BASADAS EN PÉPTIDOS....	14
1.13. ESTUDIOS REALIZADOS EN LECHE PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUEROS CONTRA LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. HIPÓTESIS.....	18



4. OBJETIVO GENERAL.....	19
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
5.1. ANIMALES DE ESTUDIO.....	20
5.2. MUESTRAS.....	20
5.3. SEROLOGÍA.....	22
5.3.1. ELISAs COMERCIALES.....	22
5.3.2. ELISAs BASADAS EN PÉPTIDOS.....	22
5.3.3. PROCEDIMIENTO PARA EL ELISA INDIRECTO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	22
5.4. PCR.....	24
5.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN PROVIRAL.....	24
5.4.2. TÉCNICA DE PCR.....	24
5.5. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y CONCORDANCIA.....	25
6. RESULTADOS.....	26
6.1. SEROLOGÍA DE PLASMA CON ELISAs COMERCIALES Y PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	26
6.2. EVALUACION DE LECHE CON LOS ELISAs BASADOS EN PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	30
6.3. PCR.....	33
6.4. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y CONCORDANCIA.....	38
7. DISCUSIÓN.....	41
8. CONCLUSIONES.....	47



9. BIBLIOGRAFÍA.....	48
-----------------------------	-----------

10. GRÁFICAS

GRÁFICA 1.- Porcentajes de seropositividad en plasma de ovinos con las diferentes pruebas de ELISA en ambos muestreos.....	28
---	-----------

GRÁFICA 2.- Porcentajes de seropositividad en plasma de caprinos con las diferentes pruebas de ELISA en ambos muestreos.....	29
---	-----------

GRÁFICA 3.- Resultados en porcentaje obtenidos en los ELISAs de péptidos del genotipo A y B para la detección de anticuerpos contra lentivirus de pequeños en plasma y leche descremada de caprinos y ovinos para el primer muestreo.....	31
--	-----------

GRÁFICA 4.- Resultados en porcentaje obtenidos en los ELISAs de péptidos del genotipo A y B para la detección de anticuerpos contra lentivirus de pequeños en plasma y leche descremada de caprinos y ovinos para el segundo muestreo.....	32
---	-----------

GRÁFICA 5.- Valores de concordancia, sensibilidad y especificidad obtenidos en plasma y leche de caprinos evaluados con los ELISAs de péptidos del genotipo A y B.....	38
---	-----------

GRÁFICA 6.- Valores de concordancia, sensibilidad y especificidad obtenidos en plasma y leche de ovinos evaluados con los ELISAs de péptidos del genotipo A y B.....	39
---	-----------

11. CUADROS

CUADRO 1.- Antígenos utilizados en pruebas serológicas para el diagnóstico de lentivirus de pequeños rumiantes disponibles en el mercado.....	13
--	-----------

CUADRO 2.- Resultados obtenidos por las pruebas serológicas realizadas en plasma de ovinos y caprinos para detectar la presencia de anticuerpo contra lentivirus de pequeños rumiantes.....	27
--	-----------

CUADRO 3.- Valores de concordancia, sensibilidad y especificidad obtenidos en plasma y leche de ovinos y caprinos evaluados con los ELISAs de péptidos de genotipo A y B.....	40
--	-----------

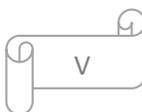
12. FIGURAS

FIGURA 1.- Diagrama de flujo de la colección y procesamiento de sangre y leche de ovinos y caprinos.....21

FIGURA 2.- Resultados de PCR en la región LTR de LVPR a partir de ADN de células mononucleares de sangre periférica y propias de la leche.....33

APÉNDICE

POBLACIÓN DE MUESTRAS EVALUADAS CON LAS DIFERENTES TÉCNICAS.....56



RESUMEN

En este trabajo se estandarizó una técnica de ELISA indirecta usando péptidos sintéticos, con el fin de detectar anticuerpos contra lentivirus de pequeños rumiantes en leche de dos explotaciones de pequeños rumiantes (ovinos y caprinos). Secuencias de 15 aminoácidos de la proteína de transmembrana de los genotipos A y B fueron usadas. Se colectaron muestras pareadas de sangre y leche de 71 ovejas y 35 cabras (provenientes de dos ranchos) al inicio de la lactancia. Estas muestras se procesaron para la obtención de plasma, leche descremada, células mononucleares de sangre periférica y células propias de la leche. El plasma se evaluó con dos pruebas comerciales y dos ELISAs de péptidos para los genotipos A y B. La leche fue evaluada solo con los ELISAs de péptidos. La sensibilidad, especificidad y concordancia (valor κ) fueron determinadas. En los animales en los cuales los resultados del ELISA de péptidos fueron discordantes entre las muestras pareadas (plasma y leche) se llevó a cabo la PCR para la detección del DNA proviral (estándar de oro). Los valores obtenidos en el plasma ovino evaluados con el ELISA del genotipo A, comparado con el estándar de oro fueron 64% de sensibilidad, 91% de especificidad y un grado de concordancia moderado (κ 0.550). En leche ovina la sensibilidad fue de 32%, la especificidad de 97% y la concordancia fue escasa (κ 0.290). Por otro lado, los resultados de sensibilidad, especificidad y concordancia en plasma de caprinos evaluados con el ELISA del genotipo B fueron de 97%, 98% y 0.770 respectivamente. En la leche caprina se obtuvo una sensibilidad de 77%, una especificidad de 100% y un grado de concordancia débil (κ 0.480). Los resultados muestran que el ELISA con el genotipo A fue mejor para detectar anticuerpos en ovinos y el ELISA del genotipo B lo fue para caprinos, obteniendo en este último un resultado equivalente a las pruebas comerciales. En los dos ELISAs basados en péptidos sintéticos utilizando plasma y leche de ambas especies la especificidad fue excelente (de 91 hasta 97% para ovinos y de 97 hasta 100% para caprinos). Se demostró que la leche caprina es adecuada para la detección de anticuerpos utilizando el ELISA del genotipo B, por lo cual, puede ser considerada una opción para el diagnóstico serológico de LVPR en rebaños caprinos.

ABSTRACT

The present study aimed to develop, validate and standardize on a Synthetic Peptide-based Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Synthetic Peptide-based μ ELISA) for detecting Small Ruminant Lentivirus (SRLV) antibodies in milk. Paired blood and milk samples were collected at the first stage of weaning from two flocks, where 71 sheep and 35 goats were studied. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), plasma, skimmed milk and milk somatic cells were obtained; by other hand, 15 amino acid sequences of transmembrane protein from genotypes A and B were used for the μ ELISA development. Plasma samples were used for antibody detection with two commercial kits and two Peptide Synthetic-based μ ELISA for the A and B genotypes identification, while the milk was only tested with the Synthetic Peptide-based ELISAs, so that sensitivity, specificity and agreement (κ value) could be determined. In discordant μ ELISA results between plasma and milk paired samples, PCR assay were developed for proviral DNA detection. In ovine plasma, results from Genotype A-detecting μ ELISA compared with gold standard (Results from PCR and commercial ELISAs) showed sensitivity of 64%, specificity of 91% and a moderate agreement range (kappa 0.550). In ovine milk, the results showed sensitivity of 32%, specificity of 97% and a poor agreement range (kappa 0.290). Whereas, Genotype B-detecting μ ELISA results from caprine plasma showed sensitivity, specificity and agreement of 97%, 98% and 0.770 respectively; while in caprine milk samples, results performed sensitivity of 77%, specificity of 100% and a poor agreement range (kappa 0.480). Genotype A-detecting μ ELISA outcomes were better for ovine antibodies detection, while Genotype B-detecting μ ELISA ones were for caprine antibodies detection, further these results are equivalent to commercial kits. In conclusion, both Synthetic Peptide-based μ ELISA (using plasma and milk) designed for both ovine and caprine species showed excellent specificity values, in addition, data indicate that caprine milk is a convenient sample for antibody detection using Genotype B-detecting μ ELISA, so that it could be a new option for SRLV serologic diagnosis in caprine flocks.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPACTO PRODUCTIVO

México ocupa el tercer lugar en cabezas de ganado de pequeños rumiantes en América. El inventario nacional de producción hasta 2010 fue de 9, 000,000 de caprinos y de 8, 000,000 para ovinos. De este total de animales se calcula que al año se producen 152,332 toneladas de leche al año (FAO & Alimentación, 2010); en muchos de los casos las crías se mantienen con las madres para que se alimenten de manera directa, además, en algunos sistemas un mismo productor posee ganado ovino y caprino en rebaños mixtos y dichos animales se encuentran alojados en un mismo corral compartiendo comederos y camas (Tesoro *et al.*, 2003, Torres-Acosta *et al.*, 2003). Parte del ganado de reemplazo que adquiere el ganadero es de importación (East *et al.*, 1993, Rowe & East, 1997), esto con el fin de mejorar la genética de sus animales para incrementar la producción. Dicho ganado en su mayoría proviene en su mayoría de los Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda y llega a este país sin un certificado sanitario que indique que el animal está libre de enfermedades (Tesoro *et al.*, 2003, Torres-Acosta *et al.*, 2003). Ambas especies son susceptibles a infecciones por lentivirus (Ramírez, 2010). Los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) incluyen al virus de la Artritis Encefalitis Caprina (AEC) y al virus del Maedi-Visna (MV) o Neumonía Progresiva Ovina (nombre que solo es utilizado en los Estados Unidos), los cuales son muy parecidos antigénicamente y reaccionan de manera similar en estas pruebas serológicas que se utilizan para su detección (OIE, 2008, Trigo, 1991, Banks *et al.*, 1983, Bertoni, 2007, Shah *et al.*, 2004b, Shah *et al.*, 2004a).

La infección por LVPR puede provocar una baja producción de leche, la cual a su vez es de menor calidad (15% menos grasa y sólidos) (Bertoni, 2007); emaciación progresiva, menor ganancia de peso, por lo tanto, canales de menor calidad. La reposición de estos animales representa un alto costo para los productores (Vázquez, 2011).

1.2. ANTECEDENTES DE LA INFECCIÓN POR LVPR EN MÉXICO

En México se han realizado diversos estudios para identificar la infección por lentivirus de pequeños rumiantes en ovinos y caprinos para determinar la prevalencia, la frecuencia de lesiones y los genotipos. Se han realizado pruebas para la identificación del virus de AEC utilizando Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG) en muestras de suero sanguíneo obtenidas de diversos países (Adams *et al.*, 1984); de igual manera la presencia del virus en animales procedentes de los Estados Unidos fue detectada en un estudio por IDAG e histopatología (Ramírez & Trigo, 1983). También se han realizado estudios serológicos, inmunohistoquímicos y de microscopia electrónica (Martínez, 2003, Leyva *et al.*, 1998). El primer aislamiento de LVPR se efectuó en cultivo celular y se corroboró por medio de la técnica de PCR (Daltabuit *et al.*, 1999). Otros estudios se evaluaron sueros de cabras y borregos mediante el uso de dos técnicas serológicas de ELISA y Western blot (WB) para comparar la eficiencia diagnóstica de dichas pruebas, encontrando que la técnica de WB fue más eficaz (Tesoro *et al.*, 2003). En otra investigación se evaluaron sueros de machos ovinos por medio de las técnicas de ELISA indirecta y WB encontrando que la técnica de WB detectó más animales positivos que la técnica de ELISA (Pérez *et al.*, 2003). Un estudio utilizando dos pruebas de ELISAs comerciales se evaluaron caprinos ubicados en el estado de Veracruz, obteniendo un 6% de seroprevalencia (Hernández, 2011). Un estudio en el cual se utilizó un ELISA del tipo competitivo y WB se detectó la presencia de anticuerpos y virus en líquido seminal por medio de las pruebas de PCR en ovinos y caprinos (Ortíz, 2011). Los únicos estudios de genotipificación realizados en México a la fecha fueron realizados por (Ramírez *et al.*, 2011) en los que se identificó el genotipo B1 en ambas especies y en caprinos por medio de PCR (Vázquez, 2011). En otro estudio se evaluaron machos caprinos y ovinos por medio de una ELISA competitiva encontrando 16 y 7% de seropositividad respectivamente (Lazcano, 2013, Siliceo, 2014).

1.3. ETIOLOGÍA

Los LVPR pertenecen a la Familia: *Retroviridae*; subfamilia: *Orthoretrovirinae*; género: *lentivirus* (ICTV, 2015). Son virus ARN en dos subunidades, envueltos y presentan pequeñas proyecciones de superficie denominadas spikes (Murphy *et al.*, 1999) y con una cápside icosaédrica (Amorena *et al.*, 2003, Bertoni, 2007).

1.4. GENES

Los LVPR poseen genes estructurales que desde el extremo 5´ a 3´ se ordenan en *gag*, *pol* y *env*. Se ha identificado que la presencia del gen *gag* (Antígeno Específico de Grupo) codifica 3 proteínas: cápside (CA - p25), núcleo cápside (NC - p14) y la proteína de matriz (MA - p17) que estimula una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección. El gen *pol* (Polimerasa) codifica la transcriptasa reversa la cual es clave para el proceso de retrotranscripción (ARN a ADN), la enzima dUTPasa, necesaria para la infección en macrófagos, la Integrasa (IN) que facilita la integración del provirus en el genoma de la célula y la Proteasa (PR) que es esencial para la infectividad y maduración del virus. El gen *env* (Envoltura) codifica las glicoproteínas de transmembrana (TM) y la de superficie (SU) que contienen los epítomos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes y que sirven para la interacción del virus con el receptor de la célula hospedadora (Murphy *et al.*, 1999, Petursson *et al.*, 2005, Daltabuit, 2006). Los genes regulatorios están encargados de la producción de proteínas no estructurales pero necesarias para la replicación viral. El gen *vpr-like* es indispensable para que la replicación viral se ejecute de manera eficiente y su ausencia produce un salto durante el transporte de ARN al citoplasma y por lo tanto, es indispensable para una replicación eficiente. Además, el gen *vpr-like* activa transcripcionalmente las repeticiones de las terminales largas (LTRs) del virus. El gen *rev* posee un factor de regulación selectiva con efectos diferenciales, su presencia o ausencia controla la expresión de los otros genes reguladores produciendo una proteína reguladora que el virus produce selectivamente inhibiendo consecuentemente la producción de genes estructurales. Dicha proteína bloquea la producción de proteínas regulatorias permitiendo la producción de

viriones (Jackson *et al.*, 1991). Finalmente, el gen *vif* el cual se encuentra dividido en dos subunidades y se ubica entre los genes *pol* y *env* es esencial para la replicación viral *in vitro* y especialmente *in vivo*; también interactúa con proteínas celulares, sugiriéndonos actividades similares en otros retrovirus que actúan paralelamente con su equivalente, la ausencia de este gen produce la pérdida de la capacidad citopática cuando se estudia en condiciones *in vitro* (De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1996).

Los LVPR han sido divididos en cinco grupos genéticos del grupo A al grupo E; dichos grupos difieren de un 25 a 37% en su secuencia de nucleótidos. A su vez se han subdividido en subtipos genéticos: a) Grupo A, contiene al menos 17 subtipos reconocidos, A1 a A17. Los subtipos A1, A3, A4, A5, A6, A9, A11, A12, A13, A16 y A17 se han aislado de ovinos y caprinos, mientras que los subtipos A2 y A15 solo de ovinos y los subtipos A7, A8, A10 y A14 solo se han encontrado en caprinos; b) Grupo B, contiene tres subtipos, B1 a B3 los cuales se han encontrado tanto en ovinos como en caprinos; c) Grupo C, detectado en ambas especies únicamente en Noruega; d) Grupo D, se ha detectado en ambas especies, solamente reconocido en España y Suiza y e) Grupo E, posee dos subtipos E1 y E2, los cuales se han aislado de caprinos en Italia (Shah *et al.*, 2004a, Ramírez *et al.*, 2013, Homme *et al.*, 2015).

1.5. PATOGENICIDAD E INMUNIDAD

Los estudios sobre patogenicidad de LVPR en animales indican que permanecen en el hospedero utilizando la infección de células del sistema inmunológico tales como monocitos-macrófagos (Daltabuit, 2006, Ramírez, 2010). El virus al utilizar estas células como sitios de replicación viral, evade la respuesta inmune y logra permanecer en el organismo infectado por períodos prolongados (Cutlip *et al.*, 1979). Estos virus infectan al individuo de por vida debido a la interacción virus/célula (Dawson, 1980). Debido al tipo celular que infectan (monocitos/macrófago) hacen uso de las propiedades biológicas y fisiológicas de estas células, para ser utilizadas como principales difusores de la infección por todo el organismo del animal. Este mecanismo de infección es denominado "caballo de Troya", las células

infectadas viajan por todo el organismo llevando consigo virus escondido en espera de condiciones fisiológicas determinadas para salir al exterior e infectar a otros tipos de células e iniciar patología en distintas áreas del cuerpo (Peluso *et al.*, 1985, Cutlip *et al.*, 1986, Daltabuit, 2006, Ramírez, 2010). En los rumiantes no existe una transferencia de anticuerpos a través de la placenta, por lo que el recién nacido se encuentra desprovisto de una protección inmunológica, lo que hace indispensable la ingesta de calostro, el cual contiene toda una gama de inmunoglobulinas que reconocen de forma específica a diferentes agentes infecciosos y pueden prevenir su colonización. La infección por retrovirus produce tanto una respuesta humoral como una celular. La respuesta humoral en LVPR genera la producción de anticuerpos específicos, como anti p25 y anti gp44 (TM), pero son de baja afinidad y de respuesta tardía (Perdigones., 2004). En animales infectados con LVPR y con signos de la enfermedad, se pueden encontrar anticuerpos del tipo IgG1 (relacionados a una respuesta inmune Th2) predominantemente como respuesta a los antígenos virales de superficie, mientras que los animales asintomáticos presentan una respuesta de tipo IgG2 (Cheevers *et al.*, 1997). Los anticuerpos IgG1 actúan durante la fase preclínica, en la cual se inicia la fase inflamatoria involucrando la producción de citocinas e IgG2 lo que es indicativo de una respuesta Th1 mediada por IN γ y LT CD4, no obstante, las infecciones retrovirales producen una alteración y/o desregulación en la producción de estas moléculas, las cuales están involucradas en la generación, diferenciación y activación de linfocitos T y B que incrementan la producción de inmunoglobulinas anti-glicoproteínas de superficie (Amorena *et al.*, 2003), esto puede suprimir la respuesta de los anticuerpos IgG2, como lo sugieren algunos autores; el progreso de la enfermedad depende de las respuestas preventivas a la misma, donde las células Th2 juegan un papel importante en la respuesta inmune humoral. Se ha sugerido que una modificación en la proporción de interferón asociado a Th1 y a Th2 puede modificar el progreso de la enfermedad (Amorena *et al.*, 2003, Bertoni, 2007).

1.6. TASA DE INFECCIÓN

En países industrializados como los pertenecientes a la Unión Europea, se han publicado datos que demuestran que de 30 a 51% de los animales desarrollan manifestación de la enfermedad por la infección de LVPR y en Estados Unidos hay hasta 73% de seroprevalencia (Rowe & East, 1997). En México no se tienen datos sobre tasa de infección, lo que nos deja en un total desconocimiento de la magnitud del problema.

1.7. SÍGNOS CLÍNICOS

Con frecuencia los LVPR provocan más de una manifestación de la enfermedad, la cual es considerada como una enfermedad multisistémica (Cutlip *et al.*, 1988, Daltauit, 2006, Ramírez *et al.*, 2013).

Mastitis indurativa

La principal afección en los pequeños rumiantes infectados con LVPR desde el punto de vista económico es la mastitis indurativa, la cual se manifiesta en animales seropositivos mayores de 12 meses (Castillo & Hernández, 2004), lo que puede desencadenar en una agalactia total sin regreso a las condiciones normales (Crawford & Adams, 1981, Lujan *et al.*, 2001).

Neumonía intersticial

La neumonía intersticial se presenta con mayor frecuencia en ovinos dañando tejido pulmonar, especialmente en los lóbulos caudales y craneoventrales, con inflamación de los bronquios y proliferación de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (Trigo, 1991, Lujan *et al.*, 2001, Castillo & Hernández, 2004). Los animales se vuelven lentos; al desplazamiento continuo su respiración aumenta y su frecuencia respiratoria es más notoria, al progresar la infección la respiración se vuelve más difícil al progresar la infección y a pesar de que los animales siguen comiendo hay emaciación progresiva, infecciones secundarias por bacterias pueden presentarse. En estos casos los animales presentan fiebre y puede morir debido a la anorexia e infecciones secundarias (Crawford & Adams, 1981, De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1996).

Artritis

La manifestación más evidente en caprinos es la forma artrítica, la cual se presenta en animales mayores al año de vida, con pérdida progresiva de peso, pelo escaso en la zona de afección, posibles abscesos, ulceraciones, dermatitis, aumento considerable de volumen de las articulaciones carpianas y osteomielitis por permanecer postradas. Esto trae como consecuencia disminución de la movilidad (Castillo & Hernández, 2004), dicha articulación se encuentra blanda en las etapas iniciales y a medida que la enfermedad progresa puede ser debilitante. El tejido periarticular al igual que la cápsula sinovial se mineraliza dando como consecuencia el endurecimiento de los miembros, esta afección se presenta de forma bilateral en la mayoría de las ocasiones y puede incluir a ligamentos y tendones; se puede llegar a encontrar calcificaciones (anquilosis) tornando articulaciones se tornan rugosas e irregulares (Trigo, 1991, Lujan *et al.*, 2001).

Leucoencefalomielitis

Es la manifestación menos frecuente, generalmente se presenta en cabritos de entre 2 y 4 meses de edad, en ovinos su presentación es en etapa adulta, posterior a los 2 años de vida, inicia con cojera y ataxia, seguido de debilidad en los miembros, parálisis, opistótonos e hiperestesia; el animal puede llegar a arquear el cuello, manifestar movimientos en círculo y pedaleo, la fiebre solo se presenta cuando interviene un agente bacteriano secundario, por lo general el animal muere; si sobrevive puede presentar secuelas neurológicas (Trigo, 1991, Lujan *et al.*, 2001).

1.8. TRANSMISIÓN

La transmisión en las crías es principalmente por medio de la ingesta de calostro y/o leche de hembras infectadas (Crawford & Adams, 1981). Es frecuente también la vía horizontal de transmisión que sucede por medio de fómites y máquinas de ordeno, por contacto directo prolongado de animales infectados a otros animales susceptibles (Rowe & East, 1997, Narayan & Cork, 1985). Además se ha documentado el riesgo potencial de transmisión por el manejo inadecuado de material infectado con sangre (Greenwood *et al.*, 1995, Narayan O. *et al.*, 1983, Daltabuit, 2006). Se han realizado estudios en los cuales se ha detectado el virus de AEC en el aparato reproductor y semen de machos caprinos y ovinos (Travassos *et al.*, 1998, Martínez *et al.*, 2005, Petursson *et al.*, 2005, Al Ahmad *et al.*, 2012). Estudios recientes demostraron la capacidad de transmisión del virus de AEC por inseminación artificial, por medio de semen y la influencia del uso de esponjas intravaginales (Martínez, 2003, Costa. S. K. *et al.*, 2013). No se ha demostrado que la infección por LVPR en los animales generen lesiones en aparato reproductor de los machos (Trujillo *et al.*, 2004, Martínez *et al.*, 2005).

1.9. DIAGNÓSTICO.

Consideraciones generales para el diagnóstico de lentivirus:

Aunque muchos animales infectados pueden nunca exhibir signos de la infección por LVPR (Reddy *et al.*, 1993, Clavijo & Thorsen, 1995, Leroux & Mornex, 2008), debe tenerse en cuenta que cualquier ovino o caprino seropositivo a las pruebas de LVPR está infectado de por vida con ARN proviral (dentro de las células del hospedero) manteniéndose de forma latente (Mattews, 1999). Por otro lado, los anticuerpos presentes son indicadores de la enfermedad, la infección no se elimina en presencia de anticuerpos neutralizantes.

En contraste un animal con un resultado seronegativo no puede considerarse libre de infección, ya que actualmente no es factible detectar la infección en cualquier etapa de la enfermedad con las pruebas disponibles. Los cabritos infectados al nacimiento tienen niveles detectables de anticuerpos calostrales de la madre durante 2 o 3 meses, después de este período pueden reaccionar negativos a las pruebas serológicas hasta que desarrollen la seroconversión entre los 6 y 12 meses de edad. Algunos ovinos y caprinos seropositivos pueden periódicamente dar resultados seronegativos periódicamente o seroconvertir después de un periodo de estrés. Realizar pruebas de diagnóstico antes de la preñez no necesariamente asegura que algunas madres no vayan a seroconvertir después del parto y sean una fuente potencial de infección para sus crías (Reddy *et al.*, 1993, Clavijo & Thorsen, 1995, Ramírez *et al.*, 2013).

Algunos métodos de diagnóstico serológico son muy poco sensibles y pueden fallar, dando reacciones negativas cuando el contenido de anticuerpos en el suero es relativamente bajo. En el caso de técnicas moleculares, como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se pueden producir reacciones negativas si no se eligen los cebadores adecuados o si el virus o provirus se halla muy escasamente en la muestra. Por todo esto, la repetición de las pruebas serológicas o de PCR es una práctica recomendable (Henriques *et al.*, 2007, Lacerenza *et al.*, 2006).

El éxito en el control de la infección de LVPR depende en gran parte de la detección temprana y la eliminación de los animales infectados del rebaño. Para esto el diagnóstico debe basarse en un análisis completo, considerando lo siguiente: niveles de anticuerpos en suero o leche y confirmación de la presencia del genoma viral por PCR. Además, la utilización de cepas locales empleadas como antígenos en pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) que se implementen en áreas particulares, puede reducir el riesgo de errores en el diagnóstico (Brinkhof *et al.*, 2010, Lacerenza *et al.*, 2006).

Un diagnóstico basado en síntomas clínicos y serología es indudablemente, el método más extendido y práctico para identificar las infecciones por LVPR. Adicionalmente, existen varios métodos basados en PCR que han sido desarrollados para detectar el ADN de virus integrado en las células (provirus). Revisiones amplias y detalladas de los métodos de diagnóstico para LVPR han sido publicadas (de Andrés *et al.*, 2005, Reina *et al.*, 2009, Herrmann-Hoesing, 2010, Ramírez *et al.*, 2013, de Andrés *et al.*, 2013).

1.10. CARACTERÍSTICAS DE LAS PRUEBAS DE ELISA COMERCIALES

Existen en el mercado distintas pruebas comerciales para la detección de LVPR, pero dichas pruebas presentan inconvenientes como son el alto costo, la fracción viral que utiliza y la especie en la que la prueba es más eficiente. Algunas pruebas son adecuadas en la detección de seroconversiones tempranas (Carrozza *et al.*, 2009) (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Antígenos utilizados en pruebas serológicas para el diagnóstico de LVPR disponibles en el mercado (Ramírez, 2013).

Pruebas	Clasificación	Fracción viral	Nombre comercial	Tipo genético
Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG)	Serológico	Virus completo	VTD	VMV
ELISAI de primera generación	Serológico	Virus completo	CHEKIT	AEC
ELISAI de segunda generación	Serológico	Proteínas de cápside y péptido transmembranal	ELITEST	VMV
ELISAI de segunda generación	Serológico	Proteína recombinante de cápside- transmembranal	POURQUIER	VMV
ELISAc de tercera generación	Serológico	Ag Gp135	VMRD	AEC/ VMV
ELISAI de tercera generación	Serológico	Oligopéptidos de (<i>gag</i> y <i>env</i>)	ERADIKIT	AEC/ VMV

ELISAI = indirecta, ELISAc = competitiva, Maedi-Visna= VMV, Artritis Encefalitis Caprina= AEC.

1.11. PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Los péptidos sintéticos actualmente se están utilizando como inmunógenos para el desarrollo de candidatos vacunales, antígenos en pruebas de detección inmunológicas y como tratamientos en enfermedades crónico degenerativas (Mordasini *et al.*, 2006, Carrozza *et al.*, 2009, de Andrés *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2014, Ramsey & Nicholas, 2015). Estos se pueden producir a partir de segmentos proteicos completos o parciales que se unen a la glutatión-S transferasa y son expresados en *Escherichia coli* (OIE, 2008). Por otra parte, es posible obtener por síntesis química los de péptidos utilizando como ensamblando un soporte solido insoluble en el extremo Carboxilo terminal del péptido a sintetizar, con esto se logra anclar la cadena de aminoácidos en una elongación gradual, para finalmente desprender el producto para su purificación en solución, lo que permite deshacerse de reactivos y productos secundarios después de cada etapa de síntesis (Técnica de Merrifield)(Lira, 2007). Esta técnica ha sufrido modificaciones consistentes en la sustitución del poliestireno por polidimetilacrilamida para la fijación del producto y la sustitución de Fomc-aminoácidos, utilizando dimetilformamida como solvente debido a que provee condiciones más adecuadas para el acoplamiento de los aminoácidos (Técnica de Sheppard) (Lira, 2007).

1.12. ESTUDIOS REALIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES INCLUYENDO ELISAS BASADOS EN PÉPTIDOS

En estudios realizados con un ELISA basada en una proteína transmembranal (GST-TM) 226 animales resultaron positivos de un total de 316 muestras obteniendo un 97.6% de especificidad, (Kwang *et al.*, 1993). Otro grupo que utilizó 190 sueros caprinos de referencia (AEC positivos) para evaluar la eficiencia de cinco ELISAs con diferentes péptidos determinando porcentajes de 93%, 64%, 72%, 92% y 76% de detección (Bertoni *et al.*, 1994). Cuando se probaron 78 péptidos de superficie (SU) mediante la técnica de ELISA (usando muestras con seropositividad conocida), para detectar la inmunoreactividad; los 17

más inmunoreactivos se eligieron 5 (con un 96.4% de positividad) de éstos se evaluó la sensibilidad individual más alta, que fue de 84% (Valas *et al.*, 2000).

Estudios realizados en España inicialmente evaluaron un grupo de 60 péptidos sintéticos de una longitud de 15 aminoácidos correspondientes a las proteínas de nucleocápside, matriz, cápside, envoltura y transmembrana de LVPR, obteniendo reactividades de muy bajas (<9%) a muy altas (>62%). Seis péptidos fueron los más reactivos, con los cuales identificaron ovinos y caprinos infectados con el genotipo A y B (de Andrés *et al.*, 2013).

1.13. ESTUDIOS REALIZADOS CON LECHE PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES

Uno de los primeros estudios realizados en una población 2,336 ovinos y 212 caprinos con muestras pareadas de suero y leche, para la detección de anticuerpos contra LVPR, mediante las técnicas de ELISA e IDAG mostraron 99.4% de sensibilidad y 99.3% de especificidad en ovinos y en caprinos se obtuvieron resultados similares. A partir de este estudio se implementó la prueba comercial de ELITEST (Saman *et al.*, 1999). También cuando se utilizó el kit de ELITEST se diagnosticó la infección por VMV en corderos que ingirieron calostro (de manera natural y artificial), encontrando una concordancia alta entre las pruebas realizadas con sangre y las realizadas con leche (98%), de la misma manera la concordancia de esta prueba con la prueba de PCR realizada fue mayor de 88% (muy buena) (Daltabuit, 2006). Otros estudios para detección de anticuerpos contra LVPR en suero, plasma y leche de ovejas y cabras por medio una prueba de ELISA (ELITEST) y con dos pruebas de PCR para la detección de ADN proviral, se encontró que el plasma y la leche son sustitutos adecuados del suero, resultando las pruebas más efectivas en ovinos que en caprinos, los niveles de significancia que se obtuvieron fueron del 95% entre plasma y leche. En otros estudios realizados en leche, se encontró una $\kappa = 0.950$, una S =97% y una E =98% para ovinos y una $\kappa = 0.980$, una S =98% y una E =100% para caprinos en leche (Brinkhof *et al.*, 2010). Estudios realizados utilizando muestras de sangre y leche de 250 ovejas y 163 cabras, en las cuales se buscó la presencia de anticuerpos contra LVPR con la técnica de ELITEST.

Los resultados obtenidos tuvieron una concordancia entre las muestras de sangre y leche del 90%, sin observarse una discrepancia significativa entre una especie y otra. Adicionalmente, células derivadas de leche y sangre fueron evaluadas con la técnica de PCR, aumentando el porcentaje de animales positivos a LVPR, obteniendo un mejor resultado en las muestras de leche y sus células, pasando de un 60% a un 72% de ovinos detectados cuando combinaron ambas pruebas (Barquero *et al.*, 2013a).

2. JUSTIFICACIÓN

Las pruebas de diagnóstico comerciales no siempre son eficientes para detectar la infección por LVPR, esta falta de detección depende, entre otras cosas, de los componentes genéticos/antígenos de las pruebas. Por otro lado, la mayoría de estas pruebas utilizan como fuente de anticuerpos muestras de suero/plasma lo que implica manejar al animal para obtener la muestra, generando estrés en los animales. Sin embargo, si se toma en consideración el bienestar animal, es importante implementar otras estrategias de muestreo que puedan ser útiles para un monitoreo de la enfermedad. La leche es una secreción en la cual se ha determinado la presencia de anticuerpos indicativos de la infección por LVPR y en los sistemas de producción lechera donde el objetivo es la obtención de este producto biológico, la leche podría ser una muestra que sin problema se utilice sin problemas para el diagnóstico serológico, contando con la ventaja de ser de fácil obtención en este tipo de explotaciones y los animales no requieren de un manejo especial.

3. HIPÓTESIS

El uso de leche como muestra para la detección de anticuerpos contra LVPR en técnicas de ELISA indirecta puede ser tan eficiente como el uso de muestras sanguíneas.

4. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar una técnica de ELISA indirecta utilizando péptidos sintéticos, con el fin de detectar anticuerpos contra Lentivirus de Pequeños Rumiantes en plasma y leche descremada de dos explotaciones de pequeños rumiantes (ovinos y caprinos).

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

a) Identificar anticuerpos contra Lentivirus de Pequeños Rumiantes en animales infectados en plasmas de ovinos y caprinos utilizando pruebas de ELISA comercial.

b) Estandarizar una técnica de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra LVPR basada en el uso de péptidos sintéticos utilizando como muestras plasma y leche descremada de ovinos y caprinos.

c) Comparar los resultados obtenidos entre pruebas de ELISA (comercial y de péptidos) así como entre las dos fuentes de anticuerpos (plasma y leche descremada).

d) Confirmar los verdaderos positivos y negativos en células de leche y sangre de animales con resultados en el ELISA de péptidos discordantes mediante la prueba de PCR.

e) Establecer los valores de sensibilidad, especificidad y concordancia de las técnicas de ELISA indirecta de péptidos sintéticos con respecto a las técnicas comerciales y el uso de plasma (sangre) y leche descremada como fuente de anticuerpos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. ANIMALES DE ESTUDIO

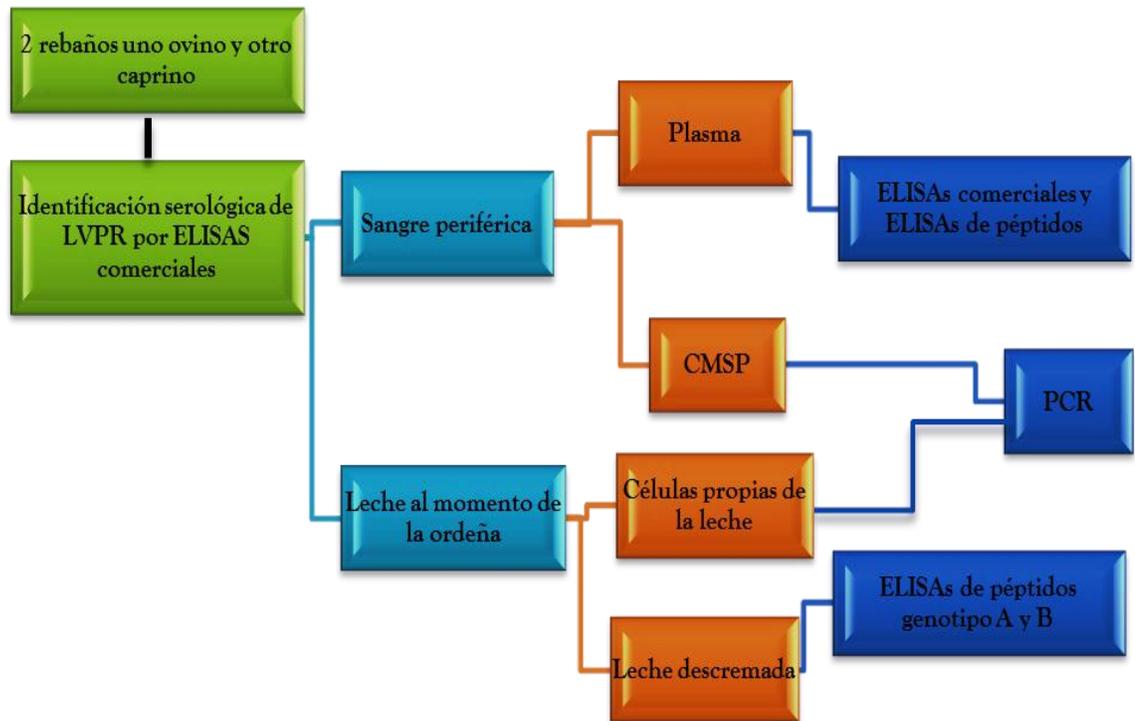
Se identificaron dos rebaños (uno caprino y otro ovino) destinados a la producción de leche, positivos a LVPR mediante las técnicas comerciales de ELISA (ELITEST y VMRD). Se realizaron dos colectas de sangre y leche a cada hembra, una al inicio de la lactancia y otra al final de la misma (un mes antes del secado). En el primer muestreo se obtuvieron 71 muestras y en el segundo muestreo 50 de hembras ovinas de las razas Awassi y Frisian, además de cruza entre estas, el rebaño se ubica en el Estado de México y cuenta con una población aproximada de 400 ovejas, 200 crías, 8 sementales y 20 cabras de raza Saanen con 20 crías aproximadamente y un semental de la misma raza. Por otro lado, del rebaño caprino se colectaron muestras de 35 hembras de raza Alpina en el primer muestreo y en el segundo muestreo solo de 10. El rebaño se ubica en el Estado de México y cuenta con una población aproximada de 60 hembras, 40 crías y 3 sementales. El presente proyecto fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán con la clave C13_18.

5.2. MUESTRAS

Las muestras de sangre se colectaron por punción de la vena yugular con aguja de calibre 0.8 x 38mm (Vacutainer® UK) y se depositaron en un tubo al vacío de 10 ml con heparina (Vacutainer® UK). Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1008 fuerzas G durante 10 min a temperatura ambiente, de estas se separaron el plasma y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en tubos de 1.5ml tipo eppendorf y fueron conservados a -20° C hasta su uso. La toma de muestras de leche se realizó al inicio de la ordeña en la sala destinada para tal actividad. Colectándose no más de 20 ml de leche de cada hembra en tubos estériles. Las muestras de leche se centrifugaron a 1792 fuerzas G durante 10 minutos a temperatura ambiente, a continuación, se retiró la capa de grasa con una espátula de madera,

se decantó para separar la leche descremada de las células y se congelaron por separado a -20°C hasta su uso (Brinkhof *et al.*, 2013) (ver Figura 1).

FIGURA 1.- Diagrama de flujo de la colección y procesamiento de sangre y leche de ovinos y caprinos



5.3. SEROLOGÍA

5.3.1. ELISAs COMERCIALES

El plasma sanguíneo se utilizó para la búsqueda de anticuerpos específicos a la infección por LVPR. Se utilizaron dos ELISAs comerciales, ELITEST laboratorios HYPHEN BioMed (ELISA indirecta) y VMRD PO Box 502 Pullman, WA 99163 USA (ELISA competitiva). Las pruebas se realizaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5.3.2. ELISAS BASADAS EN PÉPTIDOS

Las pruebas de ELISA indirecta fueron realizadas con péptidos diseñados de secuencias proteicas de la región transmembranal para los genotipos A y B de LVPR, de una longitud de 15 aminoácidos (de Andrés et al., 2005, de Andrés et al., 2013) (Database, 2015) http://toolsimmuneepitope.org/tools/bcell/jedb_imput) las secuencias de los péptidos sintéticos fueron: 126M1/ENV gp46-ELDCWHY**HQ**YCVTST (genotipo B) 126M2/ENV gp46-ELDCWHY**QH**YCITST (genotipo A). Los aminoácidos en rojo significan las diferencias en las secuencias entre los dos péptidos.

5.3.3. PROCEDIMIENTO PARA EL ELISA INDIRECTO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS

El plasma sanguíneo y la leche descremada se evaluaron de forma independiente para cada uno de los péptidos sintetizados (Peptide 2.0 Inc), de acuerdo al siguiente protocolo:

Se evaluaron diferentes concentraciones de antígeno (péptidos sintéticos) desde 300 ng/pozo hasta 600 ng/pozo, primer anticuerpo (plasma o leche) sin diluir hasta 1/40 y conjugado (proteína G acoplada a peroxidasa) diluido desde 1/650 hasta 1/10,000.

a) Los ELISAs se realizaron en placas de 96 pozos (Poli Sorp, SIGMA-ALDRICH, USA), distribuyendo en cada pozo 300 ng de péptido en 50µl de buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6. Se incubaron las placas 16 horas a 37°C hasta conseguir la evaporación en el pozo.

b) A continuación tras dos lavados con PBS pH 7.4 (SIGMA-ALDRICH, USA) conteniendo Tritón al 0.5%, se procedió a bloquear los sitios donde no se unió el antígeno con 150 µl de caseína al 2.5% durante 1 hora a 37°C.

c) Al finalizar el bloqueo se realizaron nuevos lavados con PBS-Tritón 0.5%.

d) Se añadió a cada pozo 100µl de plasma diluido 1/20 o leche descremada sin diluir en una solución de caseína al 1.25% en PBS (plasma), se incubo la placa 1 hora a 37°C.

e) La placa se lavó cinco veces con PBS Tritón al 0.5%.

f) Enseguida se añadieron 100µl de proteína G en cada pozo y se incubo una hora a 37°C. La dilución utilizada para el caso de caprinos fue de 1/5,000 en plasma y 1/1,250 en leche; para ovinos la dilución fue de 1/1,250 en plasma y 1/625 en leche.

g) Transcurrida la incubación se lavó la placa como anteriormente fue descrito y se agregó 100µl de cromógeno ABTS (Chemicon Milliphore USA) a cada pozo y se incubaron las placas de 20 a 30 minutos (en el caso de las muestras de plasma) y 40 minutos (para las muestras de leche) a temperatura ambiente (22 a 26°C).

h) La lectura de la absorbancia se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 405nm.

El valor de corte se determinó a partir de 30 muestras de plasmas seronegativos adicionando al valor promedio de absorbancia 3 desviaciones estándar y considerando el valor de corte establecido previamente por de Andrés et al., (2013), De esta forma el valor de corte fue para considerar una muestra positiva de ≥ 0.35 .

5.4. PCR

5.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL

Las células mononucleares de sangre periférica y las células de la leche de los animales discordantes se procesaron para extraer ácidos nucleicos (ADN celular y proviral) con el kit comercial (FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit FAVORGEN. Taiwan) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN se cuantificó y almacenó a -20°C hasta su uso.

5.4.2. TÉCNICA DE PCR

La técnica de PCR se empleó para detectar el ADN proviral y confirmar el estado de infección de animales en los que se presentaron discrepancias entre las muestras de plasma sanguíneo y leche descremada en la ELISA de péptidos. Se emplearon los iniciadores descritos con mayor frecuencia en ovinos y caprinos, con bases degeneradas para que se unieran a los genotipos A y B (Forward TCASKGTGACAAATGTAA y Reverse TGGTGCACAGAWTWAGGRACG). La mezcla utilizada fue: Buffer 1X- $2.5\mu\text{l}$, MgCl_2 2mM- $0.5\mu\text{l}$, de dNTPs 280mM- $0.7\mu\text{l}$, Fw 600 μM - $1.5\mu\text{l}$, Rv 600 μM - $1.5\mu\text{l}$ de cada primer 5UI- $1\mu\text{l}$ de Taq ADN polimerasa y de 0.5 a $1\mu\text{g}$ de ADN por reacción en un volumen final de $25\mu\text{l}$ por muestra. Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes: Desnaturalización inicial por 5 minutos a 95°C , seguido por 45 ciclos de 95°C por 30 segundos; 53°C por 40 segundos (hibridación) y para finalizar un paso de elongación a 72°C por 40 segundos y un paso final de extensión a 72°C por 7 minutos.

5.5. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y CONCORDANCIA

El análisis de la eficacia de los ELISAs de péptidos sintéticos (genotipo A y B) se llevó a cabo comparándolos con los ELISAs comerciales (ELITEST y VMRD), realizando las estimaciones de concordancia entre pruebas (estadístico kappa \pm error estándar e intervalos de confianza del 95% para dicho estadístico) según el criterio establecido por Landis (1977) (Landis & Koch, 1977b). Un resultado positivo de un animal en al menos dos pruebas (ELISAs comerciales y de PCR) se consideró con el criterio de positividad (Gold standard). Así mismo, la sensibilidad (S), especificidad (E) y concordancia (κ) se determinaron empleando (winepi.net & Universidad de Zaragoza, 2006) (<http://www.winepi.net/sp/index.htm>). Los resultados de las evaluaciones de S, E y κ obtenidos en la leche fueron comparados con los resultados de S, E y κ en plasma en los ELISAs de péptidos.

6. RESULTADOS

Las condiciones óptimas del ELISA para determinar anticuerpos contra LVPR genotipo A y B en muestras de leche se obtuvieron en común con una concentración de 300 nanogramos en 50 µl por pozo del péptido sintético 126 M1 y 126 M2 y la muestra de leche sin diluir como primer anticuerpo. Y una concentración de la Proteína G acoplada a peroxidasa, de 1.6 y 0.8 µg / ml para el ELISA del péptido sintético genotipo A (126 M1) y B (126 M2) respectivamente. La lectura de la densidad óptica para los 2 péptidos se realizó por espectrofotometría exactamente a los 40 minutos a una longitud de onda de 405nm.

6.1. SEROLOGÍA DE PLASMA CON ELISAs COMERCIALES Y PÉPTIDOS SINTÉTICOS

El total de muestras obtenidas al inicio de la lactancia en ovinos (n=71) y caprinos (n=35) y al final (ovinos n=50 y caprinos n=10) fueron diferentes debido Al manejo de la granja.

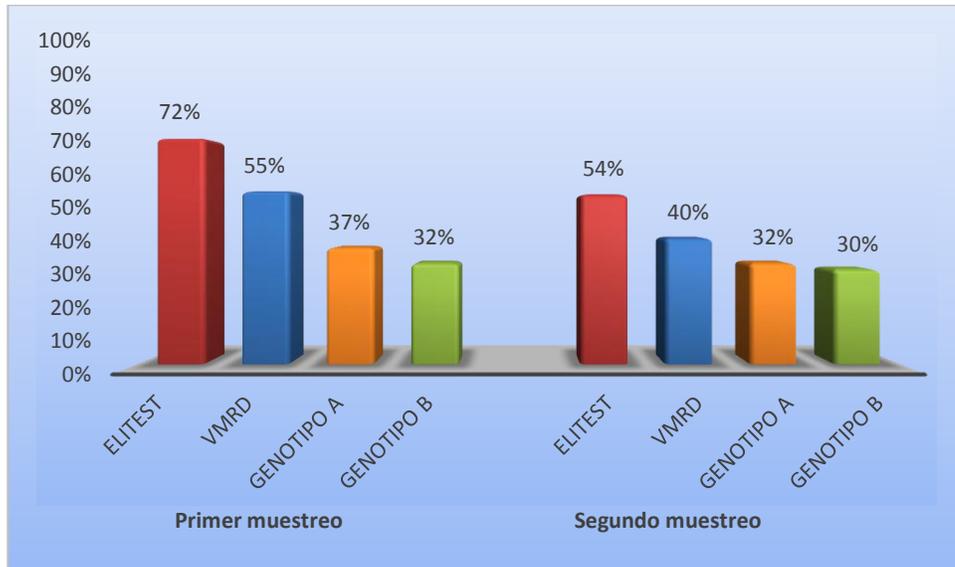
Los resultados por serología de las muestras de plasma con las pruebas de ELISA comerciales y las basadas en péptidos sintéticos (genotipo A y genotipo B) se muestran en la (Cuadro 2). En los plasmas del primer muestreo con el ELITEST se detectó la mayor cantidad de ovinos positivos y con el ELISA genotipo A se detectó más borregas positivas que con el ELISA genotipo B (Gráfica 1). Utilizando el plasma del primer muestreo los ELISAs basados en péptidos A y B. en caprinos se obtuvo una detección ligeramente más elevada que con el ELISA VMRD (Gráfica 2).

CUADRO 2.- Resultados obtenidos por las pruebas serológicas realizadas en plasma de ovinos y caprinos para detectar la presencia de anticuerpos contra LVPR.

1^{ER}					
MUESTREO	ELITEST	VMRD	GENOTIPO A*	GENOTIPO B*	TOTAL
	<u>Positivos/Negativos</u>	<u>Positivos/Negativos</u>	<u>Positivos/Negativos</u>	<u>Positivos/Negativos</u>	
OVEJAS	51/20	34/37	26/45	23/48	71
CABRAS	30/5	31/4	22/13	30/5	35
2^O					
MUESTREO	ELITEST	VMRD	Genotipo A*	Genotipo B*	Total
	<u>Positivos/Negativos</u>	<u>Positivos/Negativos</u>	<u>Positivos/Negativos</u>	<u>Positivos/Negativos</u>	
OVEJAS	27/23	20/30	16/34	15/35	50
CABRAS	8/2	8/2	6/4	8/2	10

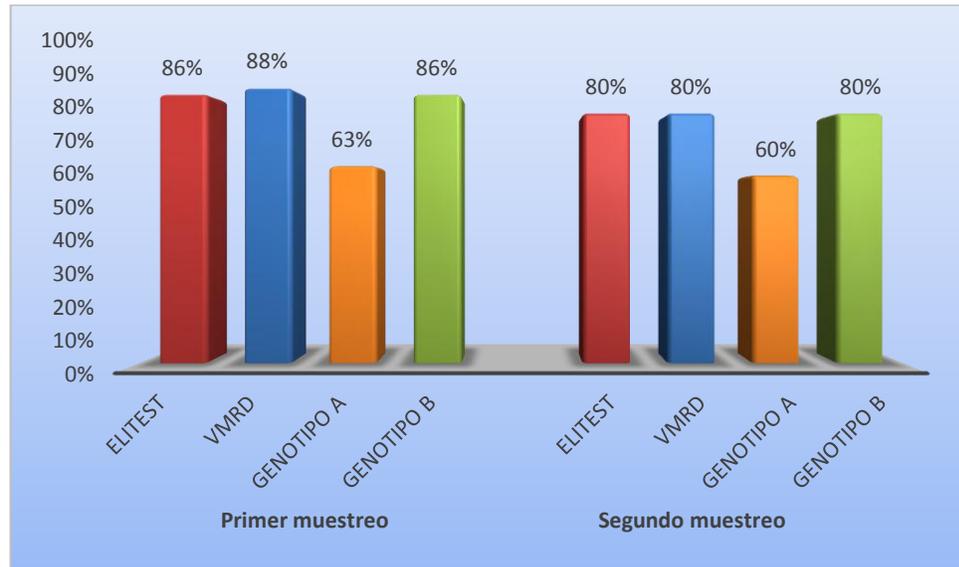
***Péptidos**

GRÁFICA 1.- Porcentajes de seropositividad en plasmas ovinos con las diferentes pruebas de ELISA en ambos muestreos.



De los resultados de las pruebas de ELISA en plasma ovino del primero y segundo muestreo se puede observar que el kit ELITEST detectó una cantidad mayor de animales positivos con respecto de las otras pruebas utilizadas. En ELISAI (indirecto) de péptido del genotipo A en la evaluación de plasmas de ambos muestreos, el ELISAI del genotipo A tuvo un desempeño ligeramente mejor que el ELISAI de péptido del genotipo B. En el segundo muestreo es importante mencionar que fueron detectados cuatro animales que seroconvirtieron (de un resultado negativo en el primer muestreo a positivo para el segundo muestreo), además de que se identificaron dos animales que en el primer muestreo resultaron positivos y en el segundo muestreo resultaron negativos.

GRÁFICA 2.- Porcentajes de seropositividad en plasmas de caprinos con las diferentes pruebas de ELISA en ambos muestreos.

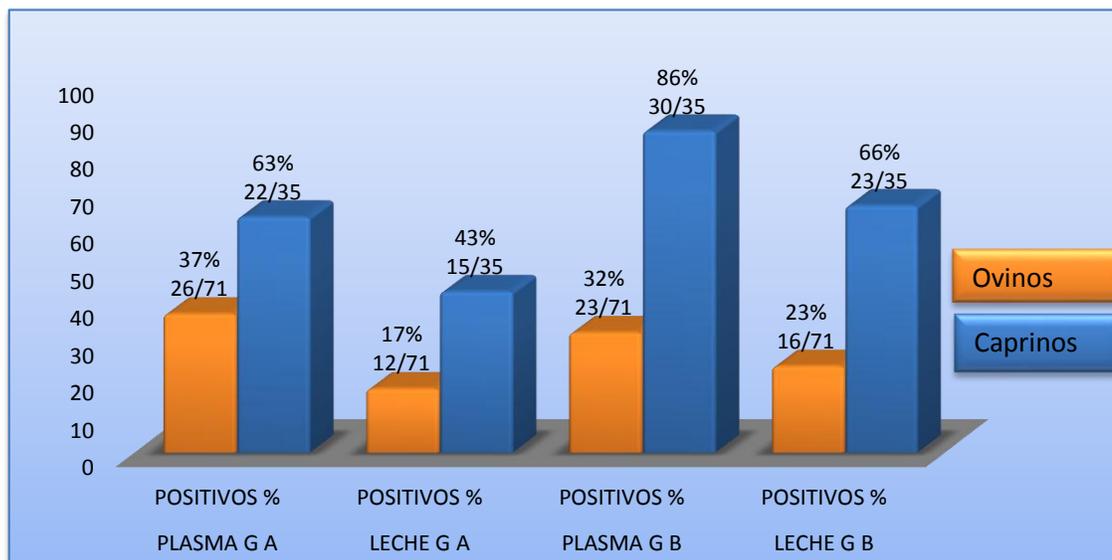


Resultados de las pruebas de ELISA en plasma del primer muestreo en caprinos, se observa una detección de positivos ligeramente más elevada en el ELISAc (competitivo) VMRD. En el segundo muestreo el ELISAi genotipo B detectó el mismo número de animales positivos que los ELISAs comerciales, además en este muestreo se detectó 1 animal que seroconvirtió (de negativo en el primer muestreo a positivo en el segundo muestreo) y otro que en el primer muestreo resultó positivo y para el segundo muestreo resultó negativo.

6.2. EVALUACIÓN DE LECHE CON LOS ELISAs BASADOS EN PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Los resultados de las muestras de leche con las pruebas basadas en péptidos sintéticos (genotipo A y genotipo B) para ovinos y caprinos se muestran en las gráficas 3 y 4 los cuales fueron comparados con los resultados obtenidos en plasma.

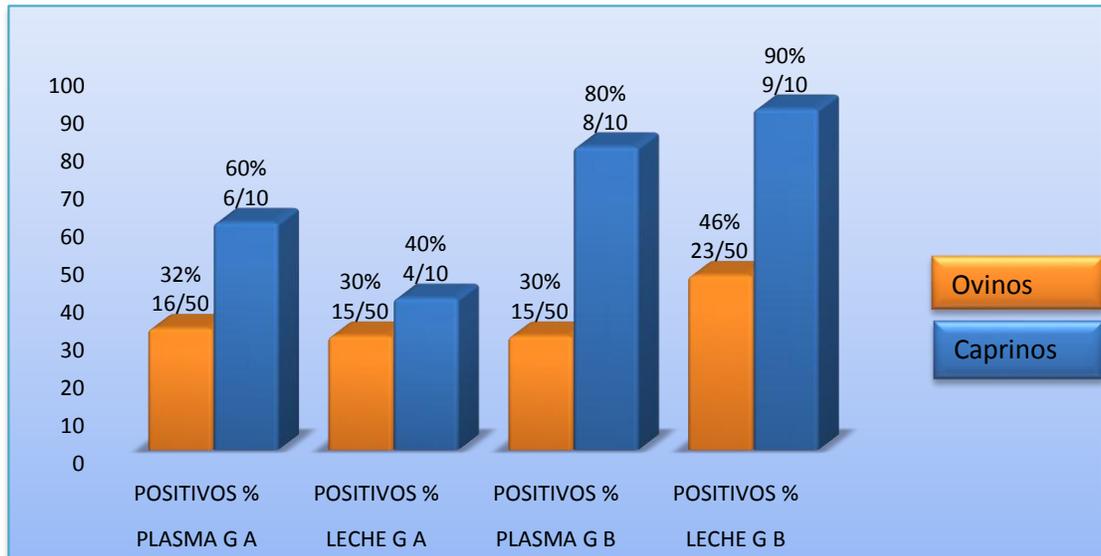
Gráfica 3.- Resultados en porcentaje obtenidos en los ELISAs de péptidos del genotipo A y B para la detección de anticuerpos contra LVPR en plasma y leche descremada de caprinos y ovinos para el primer muestreo.



GA= ELISAi de péptido de genotipo A; GB= ELISAi de péptido de genotipo B

Se puede observar en la gráfica 3 que en plasma ovino (color naranja) del ELISA del genotipo A se detectó un porcentaje mayor de positivos con respecto al ELISAi de péptido del genotipo B, sin embargo, en la leche disminuyó la detección en el ELISAi de péptido del genotipo A. En la evaluación del plasma caprino (color azul) utilizando el ELISAi de péptido del genotipo B se observó una alta detección de animales positivos (23% más) con respecto al ELISAi de péptido del genotipo A, además con el ELISAi de péptido del genotipo B la detección de anticuerpos en leche de caprinos fue altamente significativa (23% más que con el ELISAi de péptido del genotipo A).

Gráfica 4.- Resultados en porcentaje obtenidos en los ELISAs de péptidos del genotipo A y B para la detección de anticuerpos contra LVPR en plasma y leche descremada de caprinos y ovinos para el segundo muestreo.



GA= ELISA genotipo A; GB= ELISA genotipo B

Se puede observar en la gráfica 4 que en plasma ovino en color naranja en el ELISAi de péptido del genotipo A detectó un porcentaje semejante de positivos con respecto al ELISAi de péptido del genotipo B, además de que el ELISAi de péptido del genotipo B mostro un incremento en la detección de animales positivos en leche. En la evaluación del plasma y leche caprina la tendencia en la detección utilizando el ELISAi de péptido del genotipo B fue similar a la obtenida en el primer muestreo, mejorando la detección en la muestras de leche.

6.3. PCR

En total se identificaron 58 casos de resultados discordantes en serología entre comerciales y ELISAs de péptidos, para resolver estas diferencias se evaluaron 23 muestras de ADN células mononucleares de sangre periférica (14 de caprino y 9 de ovino) y 35 muestras de ADN de células propias de la leche (11 de caprino y 24 de ovino) por la técnica de PCR, obteniendo un total de 16 caprinos y 11 ovinos positivos en ambos tipos celulares y un total de 31 animales negativos (ver Figura 2).

FIGURA 2.- Resultados de PCR en la región LTR de LVPR a partir de ADN de CMSP y propias de la leche de ovinos y caprinos.



MPB= Marcador de pares de bases, CP= Control positivo, CN= Control negativo. En esta imagen se observan los resultados de las muestras positivas 7, 9, 14, 15, 16, 17 y las muestras negativas 1-6, 8, 10-13 y 18 (obtenidas en esta prueba).

Ejemplo de una tabla de 2x2 para calcular la sensibilidad y especificidad con los resultados obtenidos del plasma ovino utilizando los ELISAs genotipo A con respecto al estándar de oro.

		Nivel de confianza % : 95%	
		Estándar de oro	
		Enfermos	Sanos
ELISA	Positivos	23	3
Genotipo A	Negativos	13	32

Sensibilidad :	63.9%	(48.2%, 79.6%)
Especificidad :	91.4%	(82.2%, 100.7%)
Valor Predictivo Positivo :	88.5%	(76.2%, 100.7%)
Valor Predictivo Negativo :	71.1%	(57.9%, 84.4%)
Prevalencia real :	50.7%	(39.1%, 62.3%)
Prevalencia aparente :	36.6%	(25.4%, 47.8%)
J de Youden :	55.3%	(37.1%, 73.5%)
Fiabilidad :	77.5%	(67.7%, 87.2%)

Ejemplo de la evaluación de la concordancia entre los resultados obtenidos en plasma de ovinos en el ELISA del genotipo A con respecto al estándar de oro.

		Nivel de confianza % : 95%		
		Estándar de oro		
		-	+	Total
ELISA Genotipo A	-	32	13	45
	+	3	23	26
	Total	35	36	71

Coefficiente Kappa :	0.551
Intervalo de confianza Kappa se(0):	(0.328, 0.774)
Intervalo de confianza Kappa se(1):	(0.378, 0.724)
Proporción de conformidad observada :	77.5%
Proporción de conformidad esperada :	49.8%
Proporción de conformidad esperada menos azar :	27.7%
Máxima conformidad no debida al azar :	50.2%

Ejemplo de una tabla de 2x2 para calcular la sensibilidad y especificidad con los resultados obtenidos del plasma caprino utilizando los ELISAs genotipo B con respecto al estándar de oro.

		Nivel de confianza % : 95%	
		Prueba de oro	
		Enfermos	Sanos
Prueba evaluada	Positivos	30	0
	Negativos	0	5

Sensibilidad :	100.0% (100.0%, 100.0%)
Especificidad :	100.0% (100.0%, 100.0%)
Valor Predictivo Positivo :	100.0% (100.0%, 100.0%)
Valor Predictivo Negativo :	100.0% (100.0%, 100.0%)
Prevalencia real :	85.7% (74.1%, 97.3%)
Prevalencia aparente :	85.7% (74.1%, 97.3%)
J de Youden :	100.0% (100.0%, 100.0%)
Fiabilidad :	100.0% (100.0%, 100.0%)

Ejemplo de la evaluación de la concordancia entre los resultados obtenidos en plasma de caprinos en el ELISA del genotipo B con respecto al estándar de oro.

Nivel de confianza % : 95%

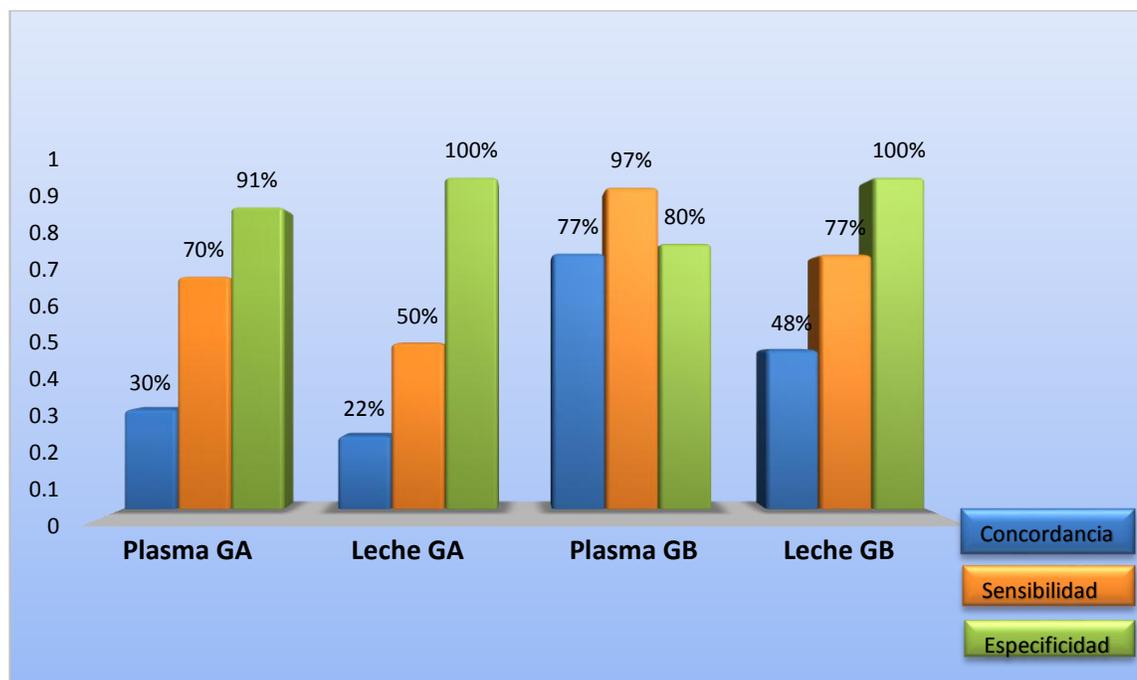
		Prueba A		
		-	+	Total
Prueba B	-	0	30	30
	+	5	0	5
	Total	5	30	35

Coefficiente Kappa :	-0.324
Intervalo de confianza Kappa se(0):	(-0.432, -0.217)
Intervalo de confianza Kappa se(1):	(-0.688, 0.040)
Proporción de conformidad observada :	0.000%
Proporción de conformidad esperada :	24.5%
Proporción de conformidad esperada menos azar :	-24.490%
Máxima conformidad no debida al azar :	75.5%

6.4. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y CONCORDANCIA

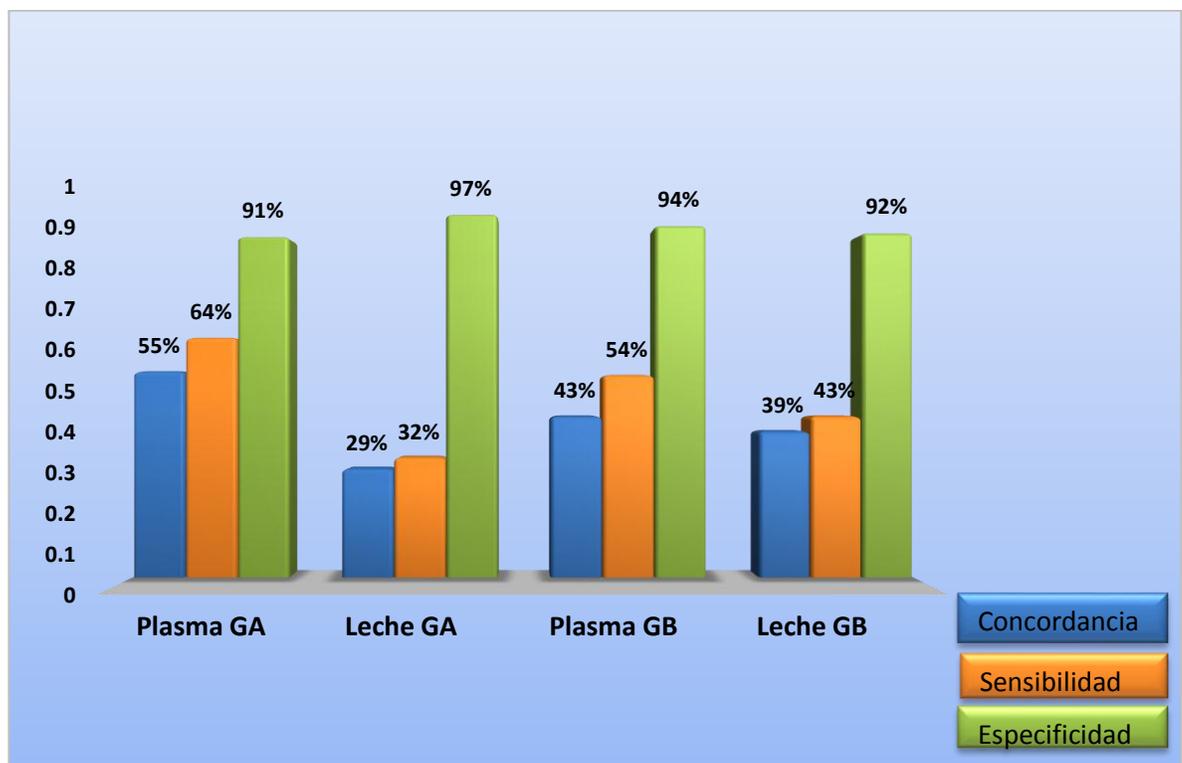
Los resultados de sensibilidad, especificidad y concordancia en plasma de caprinos evaluados con el ELISA del genotipo B fueron de 97%, 98% y 0.770 respectivamente. En la leche caprina se obtuvo una sensibilidad de 77%, una especificidad de 100% y un grado de concordancia débil (kappa 0.480) (gráfica 5).

GRÁFICA 5.- Valores de concordancia, sensibilidad y especificidad obtenidos en plasma y leche de caprinos evaluados con los ELISAs de péptidos del genotipo A y B.



Los valores obtenidos en el plasma ovino evaluados con el ELISA del genotipo A, comparado con el estándar de oro fueron 64% de sensibilidad, 91% de especificidad y un grado de concordancia moderado (kappa 0.550). En leche ovina la sensibilidad fue de 32%, la especificidad de 97% y la concordancia fue escasa (kappa 0.290) (gráfica 6).

GRÁFICA 6.- Valores de concordancia, sensibilidad y especificidad obtenidos en plasma y leche de ovinos evaluados con los ELISAs de péptidos del genotipo A y B.



Cuadro 3.- Valores de concordancia, sensibilidad y especificidad obtenidos en plasma y leche de ovinos y caprinos evaluados con los ELISAs de péptidos del genotipo A y B.

	Plasma ovino		Leche ovina		Plasma caprino		Leche caprina	
	Genotipo A	Genotipo B	Genotipo A	Genotipo B	Genotipo A	Genotipo B	Genotipo A	Genotipo B
Sensibilidad	64%	54%	32%	43%	70%	97%	50%	77%
Especificidad	91%	94%	97%	92%	91%	80%	100%	100%
Concordancia	0.550	0.430	0.290	0.390	0.300	0.770	0.220	0.480

Considerando lo descrito por Landis (1977) para la determinación del valor kappa, los valores son: de 0 a 0.20= concordancia ligera, de 0.21 a 0.40= concordancia razonable, de 0.41 a 0.60= concordancia moderada, de 0.61 a 0.80= concordancia considerable y de 0.81 a 0.99= concordancia casi perfecta. Se encontró una concordancia considerable ($\kappa= 0.770$) en el plasma caprino evaluado con el ELISA del péptido B y una concordancia moderada en el plasma ovino evaluado con los ELISAs del péptido A ($\kappa= 0.550$) y B ($\kappa= 0.430$). Para el caso de la leche el mejor resultado de concordancia se obtuvo cuando fue evaluada la leche caprina con el ELISA del péptido B, siendo esta concordancia moderada ($\kappa= 0.480$).

7. DISCUSIÓN

Las pruebas comerciales para el diagnóstico serológico de LVPR son usadas frecuentemente en México, todas son de importación por lo que deben pagar un costo arancelario elevado, además de que se requieren permisos de SAGARPA los cuales por lo general se otorgan por lo general solo a instituciones gubernamentales con fines de investigación, además al desconocer el genotipo prevaleciente en el grupo de animales de una región determinada se corre el riesgo de errar el diagnóstico y considerar como negativos a animales positivos (falsos negativos). En el diseño de las pruebas comerciales se ha considerado el uso de antígenos de virus completo (ELISA CHEKIT), proteínas recombinantes (ELISA VMRD) y la combinación de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos (ELISA ELITEST) (De Andrés 2005). Por otro lado en publicaciones científicas se ha evaluado el uso de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes para el diagnóstico serológico de LVPR. Kwang y cols (1993) evaluaron una proteína de transmembrana derivada de un virus del genotipo A, encontrando un 97.6% de sensibilidad, 100% de especificidad y una $\kappa=0.98$ en plasma de ovinos con respecto a IDAG. En el presente estudio los péptidos utilizados se encontraban ubicados en la proteína de transmembrana, sin embargo los valores de sensibilidad y el valor kappa fueron menores, vale la pena recalcar que esto puede estar relacionado al número de epítomos representados en el péptido comparado con la proteína completa de transmembrana, además de que las comparaciones de sensibilidad, especificidad y valor κ se realizaron con respecto a otras pruebas de ELISA y PCR, técnicas más sensibles que IDAG. No obstante los valores de especificidad fueron muy similares a los descritos por (Kwang *et al.*, 1993). Otro estudio utilizando péptidos sintéticos de las regiones de matriz y cápside del virus se evaluaron plasmas de ovinos y caprinos encontrando la mejor reactividad de ambos péptidos en caprinos (87.5%) y una pobre reactividad en ovinos (19%), con ELISAs elaborados con péptidos del genotipo B1 (Tolari *et al.*, 2013), lo que pone en manifiesto que la secuencia del péptido, que define los epítomos reconocidos por anticuerpos en cada especie (ovinos y caprinos) son muy importantes para la sensibilidad de las pruebas de ELISA. En el presente trabajo se encontraron diferencias similares en los péptidos utilizados, siendo el péptido del genotipo A

más frecuentemente reconocido por anticuerpos ovinos y por otro lado el péptido del genotipo B fue altamente reconocido por anticuerpos caprinos. Esta reactividad podría estar vinculada al genotipo de virus presente en los animales del estudio, lo que indicaría que los ovinos estarían infectados con LVPR del grupo A y los caprinos con LVPR del grupo B.

En estudios realizados con ELISAs elaboradas con cuatro péptidos sintéticos de la región de transmembrana y confrontados con sueros de 190 caprinos infectados con un virus del genotipo B, se encontraron reactividades con un rango de 64% a 92% (Bertoni *et al.*, 1994). El péptido más reactivo difirió en su secuencia con el utilizado en el presente trabajo en tres posiciones (QELDCWHYHQYCITS-T); con el péptido usado en el presente estudio en caprinos se encontró un 86% de animales seropositivos, lo cual es ligeramente menor al reportado por Bertoni *et al.* (1994). Esta diferencia podría radicar en la discrepancia entre las secuencias de aminoácidos de los péptidos, en el número de animales infectados (en el estudio de Bertoni el estatus de infección en los caprinos era conocido y en el presente estudio se desconocía el número de caprinos infectados) y el genotipo viral infectante en los animales, que no se determinó en el presente trabajo. En otra investigación fueron evaluados 78 péptidos de la proteína de superficie (SU) encontrando que 17 péptidos fueron los más inmunoreactivos. Uno de estos péptidos detectó 84% de sueros caprinos infectados (Valas *et al.*, 2000), resultado similar al obtenido con el péptido de genotipo B de la proteína de transmembrana en plasmas caprinos evaluados en el presente trabajo. Estudios realizados en España inicialmente evaluaron un grupo de 60 péptidos sintéticos de una longitud de 15 aminoácidos correspondientes a las proteínas de nucleocápside, matriz, cápside, envoltura y transmembrana de LVPR, obteniendo reactividades muy bajas a muy altas. Seis péptidos fueron los más altamente reactivos, con los cuales identificaron ovinos y caprinos infectados con el genotipo A y B (de Andrés *et al.*, 2013). Los péptidos elegidos para este trabajo derivaron del estudio realizado en España, aplicando los valores de corte que previamente ellos establecieron.

Como se muestra en los trabajos anteriormente descritos el uso de péptidos sintéticos o los expresados en vectores bacterianos ha cobrado una gran relevancia en los últimos años; principalmente debido a las ventajas que presentan con respecto a otras moléculas que se

utilizan como antígenos en pruebas de ELISA, resaltando la homogeneidad, pureza y facilidad de obtención si se compara con la obtención de antígenos usando los métodos convencionales de cultivo viral y posterior purificación de los mismos (Kwang *et al.*, 1993).

Los péptidos utilizados en el presente estudio fueron diseñados sobre la base proteica de dos secuencias virales causantes de brotes en ovinos españoles. Las secuencias a sintetizar fueron alineadas con base a secuencias disponibles en GeneBank para determinar su homología con los 5 genotipos principales identificados hasta el momento en LVPR. Aspectos importantes que se consideraron para elegirlos como antígenos para las pruebas de ELISA fueron la hidrofobicidad, flexibilidad, accesibilidad, estructuras terciarias, superficie expuesta, polaridad y propensión antigénica de las cadenas de polipéptidos correlacionados con la localización de epítomos (de Andrés *et al.*, 2013).

Otro elemento importante en el desarrollo de las técnicas de ELISA es el uso de anticuerpos secundarios (conjugados), que generalmente se producen en animales o cultivos de hibridomas de origen animal. Por ejemplo, un anticuerpo secundario (anti-ratón) es aquel capaz de reconocer casi todos los anticuerpos primarios obtenidos de ratones. Además se han creado anticuerpos anti-cabra, anti-conejo y su uso permite una única fuente de anticuerpos secundarios; dando resultados mucho más consistentes. También pueden emplearse proteínas derivadas de bacterias como la A y G. La proteína G es una proteína de superficie con capacidad de unión a inmunoglobulinas que expresan bacterias como el *Streptococcus* de los grupos C y G. La unión se produce con el dominio Fc de las IgG y su uso para la detección de Ac es frecuente tanto en especies domesticas como silvestres (Joely *et al.*, 2003). Aunque en el presente trabajo se decidió utilizar la proteína G peroxidada como lo describió De Andrés (2013), en estudios anteriores se determinó que con el uso de la proteína G respecto a conjugados monoclonales anti IgG de rumiantes se lograba una mayor reactividad de los animales infectados (de Andrés *et al.*, 2013)(resultados no mostrados).

El plasma es el elemento líquido de la sangre donde están en suspensión las células sanguíneas representando el 55% del volumen de la misma, como tal provee de una gran cantidad de sustancias proteínicas elaboradas por los Linfocitos B, las cuales se denominan anticuerpos los cuales son específicos a cada antígeno (Montalvo, 2000) y esta muestra es

frecuentemente utilizada en las pruebas serológicas. La obtención de muestras sanguíneas en el ganado lechero implica un manejo y estrés en el animal, esto ocasiona una baja o una suspensión temporal de la producción de leche, para este manejo también se requiere de un tiempo extra para la obtención de la muestra. Por otro lado, la leche es una secreción rica en nutrientes, los cuales son producidos en los alveolos conformados por tejido epitelial especializado del tipo exocrino. También se pueden encontrar factores humorales (inmunoglobulinas), citosinas, factor del complemento, sistema lactoperoxidasa-tiocinato-peróxido-hidrógeno, lactoferrina y lisosima (Wolter & Kloppert, 2004) y células somáticas, las cuales son entre otras células de defensa del organismo (polimorfo nucleares, granulocitos, macrófagos, natural killer, linfocitos T y B) que protegen contra patógenos los cuales pueden llegar a millones en conteos celulares en procesos inflamatorios (Hernández & Bedolla, 2008). La primera secreción de la glándula mamaria en una hembra recién parida se denomina calostro y su producción se limita a la primera semana (+/- dependiendo de la especie) y representa una fuente rica en anticuerpos y vitaminas. Posteriormente esta secreción es denominada leche, la cual es menos espesa y contiene una cantidad menor en cuanto a anticuerpos, pero que pueden ser detectados en pruebas serológicas encontrando hasta un 99.3% de concordancia entre el suero y la leche (Saman *et al.*, 1999). Una desventaja de la leche como muestra de laboratorio es que puede sufrir un deterioro rápido debido a la riqueza en proteínas y carbohidratos, que sufren procesos de fermentación láctica o la contaminación microbiana, lo cual interfiere en las pruebas de diagnóstico serológico (Hernández & Bedolla, 2008).

Los títulos de anticuerpos contra los LVPR en la leche son más bajos que en suero y es de esperarse una menor sensibilidad (OIE, 2008, Knowles, 1997). Si bien, los resultados obtenidos con los ELISAs basados en péptidos sintéticos del genotipo A y el genotipo B para detectar anticuerpos en plasma ovino contra LVPR no resultaron tan eficientes como con el uso de la prueba comercial ELITEST; los resultados obtenidos en el presente estudio utilizando leche en los ELISAs de péptidos, fueron mejores a los obtenidos por Barquero y cols (2013) en ovinos donde utilizando el ELITEST y muestras de plasma y leche, obtuvieron una $S = 28.35\%$, $E = 68.66\%$ y $\kappa = 0.024$ (ligera) y en caprinos una $S = 53.85\%$, $E = 73.33\%$ y

$\kappa = 0.124$ (ligera) (Barquero, 2013, Barquero *et al.*, 2013a). En contraste, Brinkhof *et al* (2010) describen una $S = 97\%$, $E = 98\%$ y $\kappa = 0.950$, en leche ovina y una $S = 98\%$ $E = 100\%$ y $\kappa = 0.980$ en leche caprina (Brinkhof *et al.*, 2010), valores muy buenos comparados con los resultados obtenidos en los ELISAs de péptidos obtenidos en el presente trabajo, esta variabilidad en los resultados podría estar relacionada al genotipo de LVPR infectante presente en los animales estudiados (Ramírez *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en el ELISA genotipo A con leche ovina fueron: $S = 32\%$, $E = 97\%$ y $\kappa = 0.290$ (razonable), resultados mejores que los obtenidos por Barquero *et al* (2013) utilizando ELISAs comerciales. Por otro lado, para el ELISA genotipo B se obtuvo en leche caprina una $S = 77\%$, $E = 100\%$ y $\kappa = 0.480$ (moderada), resultados adecuados, aunque menores a los descritos por (Brinkhof *et al.*, 2010). Sin embargo, para los pequeños rumiantes infectados con LVPR y ubicados en el centro del país, el uso de estos péptidos como antígenos en pruebas de ELISA generan resultados altamente específicos y que si bien en la leche no se detecta la misma cantidad de animales infectados que con el uso de plasma como muestra, es una opción eficiente para la detección de anticuerpos en caprinos, por lo que puede ser utilizada en pruebas tamiz con el fin de detectar la presencia de LVPR en rebaños. En otros estudios relacionados con el uso de leche como fuente de anticuerpos detectaron un descenso en la cantidad de los mismos en un periodo de 3 meses. En algunos animales su estatus de infección vario según la técnica utilizada, ELISA y PCR (resultados discordantes). Encontrando PCR- y ELISA – después PCR+ y ELISA+ 7.1% (Barquero *et al.*, 2013b), es decir animales negativos que después fueron positivos; resultados similares se encontraron en el presente estudio en ovinos (5.6%) y en caprinos fue más bajo (2.8%), este viraje en el estatus infeccioso en un animal es frecuentemente encontrado y se explica porque los animales recientemente infectados tienen títulos de anticuerpos bajos o nulos así como un número bajo de células infectadas que no son detectados por ELISA y PCR respectivamente (de Andrés *et al.*, 2005). También en Barquero *et al* (2013b) se describen resultados de un 3.6% de animales con PCR+ y ELISA+ después PCR- y ELISA-, un porcentaje similar (2.8%) tanto en ovinos como en caprinos se encontró en el presente trabajo, esto podría estar relacionado a una etapa de baja replicación del virus y estado de latencia y que a su vez estuviera

generando poco estímulo al sistema inmune decayendo la cantidad de anticuerpos y una mayor activación de la inmunidad celular (Herrmann-Hoeshing *et al.*, 2007).

Es importante resaltar que en general los resultados de la evaluación de plasma y leche de ambas especies y en ambos ELISAs de péptidos tuvieron valores muy altos de especificidad. Por otro lado, los mejores valores de sensibilidad se obtuvieron en plasma y leche caprina (97% y 77% para el plasma y leche respectivamente) evaluadas con el ELISA del genotipo B y en el caso del plasma ovino el mejor resultado se obtuvo en el ELISA del genotipo A (64%) (Landis & Koch, 1977a).

Es importante recalcar que el utilizar una prueba con el genotipo no prevalente en los animales de estudio, disminuye la detección de animales infectados, debido a que pudiera ser que los animales de un rebaño se encuentren infectados con un tipo antigénico diferente al de la prueba utilizada y por ello escapar a la detección con las consecuencias que acarrea el poseer animales infectados en el rebaño, por lo cual, se recomienda la utilización de al menos dos pruebas diferentes para con ello disminuir el impacto negativo que tienen los animales infectados que no son detectados.

Recapitulando, en un análisis por especie se encontró que los resultados obtenidos con el ELISAi del genotipo B en el plasma caprino del primer muestreo, (30 positivos) fueron muy similares a los ELISAs comerciales (ELITEST 30 positivos y VMRD 31 positivos) y en leche el ELISA del genotipo B fue el que tuvo un mejor desempeño, detectando 23 animales positivos de los 30 detectados en plasma lo que representa un 20 % menos. Por otro lado, en el plasma ovino del primer muestreo, los resultados obtenidos con el ELISAi de péptido del genotipo A (26 positivos) fueron mejores que con el ELISAi de péptido del genotipo B (23 positivos), no obstante la detección fue menor que con el uso de los ELISAs comerciales (ELITEST 51 positivos y VMRD 34 positivos). La detección de positivos con los ELISAs de péptidos disminuyó de forma importante con el uso de leche ovina.

8. CONCLUSIONES

Se estandarizó y detectó una técnica de ELISA indirecta utilizando péptidos sintéticos del genotipo A y B para el diagnóstico de Lentivirus de Pequeños Rumiantes en leche descremada de ovinos y caprinos.

La prueba de ELISA de péptidos del genotipo B generó resultados satisfactorios para la detección de anticuerpos a lentivirus de pequeños rumiantes en leche y pudiera ser utilizada como prueba tamiz en rebaños donde se sospeche de la infección por LVPR.

La técnica de ELISA basada en el péptido del genotipo A tuvo un desempeño más pobre que la prueba de ELISA con el genotipo B utilizando como fuente de anticuerpos la leche.

El uso de la técnica de PCR permitió definir algunas muestras con resultados discordantes entre las pruebas serológicas.

La prueba de ELISA para el genotipo B detectó un número semejante de animales infectados que la prueba comercial VMRD y ELITEST en plasma caprino.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. S., R. E. Oliver, E. Ameghino, J. C. DeMartini, D. W. Verwoerd, D. J. Houwers, S. Waghela, J. R. Gorham, B. Hyllseth, M. Dawson & et al., 1984: Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. Vet Rec, 115, 493-495.*
- Al Ahmad, M. Z., Y. Chebloune, G. Chatagnon, J. L. Pellerin & F. Fieni, 2012: Is caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) transmitted vertically to early embryo development stages (morulae or blastocyst) via in vitro infected frozen semen? Theriogenology, 77, 1673-1678.*
- Amorena, B., R. R., B. González, M. Pérez, L. Lujan & D. De Andres, 2003: Tropismo y respuesta inmune en infecciones por el virus de la artritis encefalitis caprina. Ovis ISSN 1130-4863, 87, 45-57.*
- Banks, K. L., D. S. Adams, T. C. McGuire & J. Carlson, 1983: Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. Am J Vet Res, 44, 2307-2311.*
- Barquero, N., 2013: Análisis epidemiológico de las infecciones por lentivirus de pequeños rumiantes (SRLVs) y su contribución al estudio de la patogenia por estos virus. Departamento de Sanidad Animal. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.*
- Barquero, N., A. A., D. A., T. C., d. I. H. A., F.-G. J. F., R.-S. Q. J. A. & G.-L. E., 2013a: Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. . veterinaryrecord.bmj.com.*
- Barquero, N., A. Domenech, A. Arjona, J. F. Fernandez-Garayzabal, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria & E. Gomez-Lucia, 2013b: Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. Research Veterinary Science, 94, 817-819.*
- Bertoni, G., 2007: Caprine Arthritis Encephalitis Complex. IVIS, A0902.0707.*
- Bertoni, G., M. L. Zahno, R. Zanoni, H. R. Vogt, E. Peterhans, G. Ruff, W. P. Cheevers, P. Sonigo & G. Pancino, 1994: Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. Journal Virology, 68, 7139-7147.*
- Brinkhof, J. M., D. J. Houwers, L. Moll, D. Dercksen & C. van Maanen, 2010: Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. Vet Microbiol, 142, 193-198.*
-

- Brinkhof, J. M., D. J. Houwers, L. Moll, D. Dercksen & C. van Maanen, 2013: Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet Microbiol*, 142, 193-198.**
- Carrozza, M. L., M. Mazzei, D. Lacerenza, L. Del Chiaro, M. Giammarioli, C. Marini, D. Rutili, S. Rosati & F. Tolari, 2009: Seroconversion against SU5 derived synthetic peptides in sheep experimentally infected with different SRLV genotypes. *Vet Microbiol*, 137, 369-374.**
- Castillo, V. Y. C. & F. S. Hernández, 2004: Prevalencia serológica del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) en los municipios del Rosal y Subachoque (Cundinamarca) mediante la Técnica de inmunodifusión en agar gel., Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Lasalle, Colombia.**
- Clavijo, A. & J. Thorsen, 1995: Serologic diagnosis of caprine arthritis-encephalitis by ELISA with two recombinant proteins in a parallel testing format. *J Immunoassay*, 16, 419-436.**
- Costa. S. K., R. Rinaldo P, Olivera S. D., Lomonte L. de B. R., de Souza R. A., Helena S. L., Olivera P. N. R., Aragao A. A., Saraiva C. J. F. & A. A., 2013: Transmission of the caprine arthritis encephalitis virus through artificial insemination. *Small Rum Res*, 109, 193-198.**
- Crawford, T. B. & D. S. Adams, 1981: Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J Am Vet Med Assoc*, 178, 713-719.**
- Cutlip, R. C., T. A. Jackson & H. D. Lehmkuhl, 1979: Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. *Am J Vet Res*, 40, 1370-1374.**
- Cutlip, R. C., H. D. Lehmkuhl, K. A. Brogden & J. M. Sacks, 1986: Breed susceptibility to ovine progressive pneumonia (maedi/visna) virus. *Vet Microbiol*, 12, 283-288.**
- Cutlip, R. C., H. D. Lehmkuhl, M. J. Schmerr & K. A. Brogden, 1988: Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet Microbiol*, 17, 237-250.**
- Cheevers, W. P., J. C. Beyer & D. P. Knowles, 1997: Type 1 and type 2 cytokine gene expression by viral gp135 surface protein-activated T lymphocytes in caprine arthritis-encephalitis lentivirus infection. *J Virol*, 71, 6259-6263.**
- Daltabuit, M. E., 2006: Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el estudio de la transmisión calostrual y horizontal del virus Maedi-Visna (VMV) en ovinos., Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza, Zaragoza España.**
-

- Daltabuit, M. T., L. E. L. D. I. Concha-Bermejillo, R. E. E. Loza & S. A. Aguilar, 1999: Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can. Vet. Res.*, 3, 212-215.**
- Database, G. B., 2015: Gen Bank Database.**
- Dawson, M., 1980: Maedi/visna: a review. *Vet Rec*, 106, 212-216.**
- de Andrés, D., D. Klein, N. J. Watt, E. Berriatua, S. Torsteinsdottir, B. A. Blacklaws & G. D. Harkiss, 2005: Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol*, 107, 49-62.**
- de Andrés, X., H. Ramírez, L. Bertolotti, B. San Román, I. Glaria, H. Crespo, P. Jauregui, E. Minguijon, R. Juste, I. Leginagoikoa, P. M., L. Luján, J. J. Badiola & L. Polledo, 2013: An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections.**
- De la Concha-Bermejillo, A., S. M. Corral, S. J. Brodie & D. M. J. C., 1996: Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *American Journal Veterinary*, 57, 284-688.**
- East, N. E., S. D. Rave, J. E. Dahlberg, G. H. Theilen & N. C. Pedersen, 1993: Modes of transmission of caprine arthritis encefalitis virus infection. *Small Rum Res*, 10, 251-262.**
- FAO & O. d. I. N. U. p. I. Alimentación, 2010: Censos Agroalimentarios. CIUDAD DE MÉXICO.**
- Greenwood, P. L., R. N. North & P. D. Kirkland, 1995: Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. *Aust Vet J*, 72, 341-345.**
- Henriques, A. M., M. Fevereiro, D. M. Prazeres & G. A. Monteiro, 2007: Development of a candidate DNA vaccine against Maedi-Visna virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 119, 222-232.**
- Hernández, R. J. M. & C. J. L. C. Bedolla, 2008: Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *REDVET*, IX.**
- Hernández, R. S. G., 2011: Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la presencia de artritis-encefalitis caprina en la zona centro del Estado de Veraacruz. Facultad de Medicina Veterinaria; Ciencia Animal. Universidad Veracruzana, Veracruz, México.**
- Herrmann-Hoeshing, L. M., g. H. Palmer & d. P. Knowles, 2007: Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovina lentivirus. *Virology*, 362, 226-234.**
-

- Herrmann-Hoesing, L. M., 2010: Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J Vet Diagn Invest*, 22, 843-855.**
- Homme, Y. L., L. A., A. J. & F. M., 2015: Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). *Virology*, 15, 159-171.**
- ICTV, 2015: International committee on Taxonomy of Viruses Ratification.**
- Jackson, M. K., D. P. Knowles, T. A. Stem, W. G. Harwood, M. M. Robinson & W. P. Cheevers, 1991: Genetic structure of the pol-env region of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus genome. *Virology*, 180, 389-394.**
- Joely, A., K. Elisabeth, M. J. B. & C. M. T., 2003: Protein G binding to enriched serum immunoglobulin from nondomestic hoofstock species. *Vet. Diagnosis Invest*, 15, 253-261.**
- Knowles, D. P., Jr., 1997: Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13, 1-11.**
- Kwang, J., J. Keen, R. C. Cutlip & E. T. Littledike, 1993: Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. *J Vet Diagn Invest*, 5, 189-193.**
- Lacerenza, D., M. Giammarioli, E. Grego, C. Marini, M. Profiti, D. Rutili & S. Rosati, 2006: Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol*, 112, 264-271.**
- Landis, J. R. & G. G. Koch, 1977a: An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics*, 33, 363-374.**
- Landis, J. R. & G. G. Koch, 1977b: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159-174.**
- Lazcano, R. M. Á., 2013: Detección de anticuerpos en sementales caprinos y ovinos a lentivirus de pequeños rumiantes en 7 estados del país., *Virología Genética y Biología Molecular. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli.***
- Leroux, C. & J. F. Mornex, 2008: Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Rum Res*, 76, 68-76.**
- Leyva, G. V. H., R. H. A. Martínez, R. M. G. González, C. M. A. Cornejo, F. G. Garrido, M. M. L. Rojas, P. S. González, C. J. A. Montaraz & M. E. Rosales, 1998: Identificación del virus de la artritis encefalitis caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México., *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 40.**
-

- Lira, N. E., 2007: Síntesis de péptidos. In: U. N. A. D. MÉXICO (ed.), Métodos Físico-Químicos en biotecnología. Instituto de Biotecnología, Cuernavaca Morelos.**
- Lujan, L., G. N., B. R., G. M. J. F. & V. R. V. A. B. J.J., 2001: Cuadro Clínico y Lesional. Ovis, 72, 41-57.**
- Martínez, R. H. A., 2003: Diseminación del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) a partir de machos caprinos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor. Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli Estado de México.**
- Martínez, R. H. A., T. J., a. A. G. G. & M. J., 2005: Efecto del Virus de Artritis Encefalitis Caprina en el Aparato Reproductor de Machos Caprinos. Vet Méx, 171-180.**
- Mattews, J. G., 1999: diseases of the goat. Blackwell Science, 2nd ed.**
- Montalvo, A. C. E., 2000: Tejido sanguíneo y hematopoyesis. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA MÉDICA. Universidad Nacional autónoma de México, Ciudad de México.**
- Mordasini, F., H. R. Vogt, M. L. Zahno, A. Maeschli, C. Nenci, R. Zaroni, E. Peterhans & G. Bertoni, 2006: Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. Journal Clinical Microbiology, 44, 981-991.**
- Murphy, F. A., G. E. P. J. & M. Horzinek, 1999: Veterinary Virology. In: A. Press (ed.). San Diego California.**
- Narayan, O. & L. C. Cork, 1985: Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. Rev Infect Dis, 7, 89-98.**
- Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Sheffer D., Griffin D. E. & C. J. E., 1983: Activation of Caprine Arthritis Encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. Infect. Immun., 41(1), 67-73.**
- OIE, 2008: Artritis/encefalitis caprina y Maedi-Visna. In: OIE (ed.), Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008.**
- Ortíz, S. O. R., 2011: Detección de Ac. a lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) en líquido seminal XXVI Reunión Nacional sobre Caprinocultura México.**
- Peluso, R., A. Haase, L. Stowring, M. Edwards & P. Ventura, 1985: A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. Virology, 147, 231-236.**
- Perdigones., B. M. N., 2004: Seguimiento de la infección por el virus de Maedi-Visna en una explotación de ganado ovino., Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense., Madrid España.**
-

- Pérez, S. A., R. H. A. Martínez & A. H. Ramírez, 2003: Identificación de Ac. Contra Proteínas de Lentivirus en machos ovinos por ELISA indirecta y WB Tulancingo Hgo. México.**
- Petursson, G., S. Matthiasdottir, V. Svansson, V. Andresdottir, G. Georgsson, A. H. Martin, G. Agnarsdottir, E. Gisladdottir, S. Arnadottir, S. Hognadottir, S. R. Jonsson, O. S. Andresson & S. Torsteinsdottir, 2005: Mucosal vaccination with an attenuated maedi-visna virus clone. *Vaccine*, 23, 3223-3228.**
- Ramírez, Á., H., 2013: Actualización sobre la infección de Lentivirus de Pequeños Rumiantes en México. . In: X. R. N. S. Caprinocultura. (ed.), Conferencia Temática. . Tlaxcala, Tlaxcala, México. .**
- Ramírez, A. H., R. Ramsés, B. Amorena, D. d. Andrés & R. H. A. Martínez, 2013: Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Journal Virology*, 5, 1175-1207.**
- Ramírez, C. & F. J. Trigo, 1983: Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la neumonía progresiva en México., México D.F.**
- Ramírez, H., I. Glaria, X. de Andres, H. A. Martinez, M. M. Hernandez, R. Reina, E. Iraizoz, H. Crespo, E. Berriatua, J. Vazquez, B. Amorena & D. de Andres, 2011: Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *Vet J*, 190, 169-172.**
- Ramírez, H. A., 2010: Contribución al Diagnóstico y a la Filogenia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España.**
- Ramsey, J. D. & F. H. Nicholas, 2015: Cell-Penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacology and Therapeutics*, 10.1016.**
- Reddy, P. G., W. J. Sapp & W. Heneine, 1993: Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 31, 3042-3043.**
- Reina, R., E. Berriatua, L. Lujan, R. Juste, A. Sanchez, D. de Andres & B. Amorena, 2009: Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet J*, 182, 31-37.**
- Rowe, J. D. & N. E. East, 1997: Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis -encephalitis virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13, 35-53.**
- Saman, E., V. e. Geertrui, L. Lujan, B. Extramiana, H. Gordon, F. Tolari, L. González, B. Amorena, N. Watt & J. Badiola, 1999: A New Sensitive Serological Assay for Detection of Lentivirus Infections in Small Ruminants. . p. . American Society for Microbiology. , Vol. 6, No.5, 734–740.**
- Shah, C., J. Boni, J. B. Huder, H. R. Vogt, J. Muhlherr, R. Zanoni, R. Miserez, H. Lutz & J. Schupbach, 2004a: Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and**

- ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. Virology, 319, 12-26.*
- Shah, C., J. B. Huder, J. Boni, M. Schonmann, J. Muhlherr, H. Lutz & J. Schupbach, 2004b:** *Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. J Virol, 78, 7518-7522.*
- Shi, N.-Q., X.-R. Qi, B. Xiang & Yong-Zang, 2014:** *A survey on "Trojan horse" peptides: Opportunities, issues and controlles entry to "Troy". Journal of controlled Release, 194, 53-70.*
- Siliceo, C. I. J., 2014:** *Evaluación de la proteína recombinante p16 del virus de Artritis Encefalitis Caprina para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta., Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.*
- Tesoro, C. E., G. R. Hernández, R. A. Martínez, Á. H. Ramírez, O. M. E. Trujillo, S. R. Kretschmer & S. Á. Aguilar, 2003:** *Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelctrotransferencia. Veterinaria México.*
- Tolari, F., W. Al-Ramadneh, M. Mazzei, M. L. Carrozza, M. Forzan, P. Bandecchi, E. Grego & S. Rosati, 2013:** *Small ruminant lentiviruses in Jordan: evaluation of sheep and goat serological response using recombinant and peptide antigens. Trop Anim Health Prod, 45, 1335-1340.*
- Torres-Acosta, J. F. J., V. Gutiérrez Ruiz, B. A., S. J., E. J., Babington, B. K., F. T., B. T., S. S., C. G. E. & L. J., 2003:** *Encuesta serológica de la artritis-encefalitis caprina virus en 83 rebaños de cabras de Yucatán. Rumin Small Reserch, 49, 207-211.*
- Travassos, C., C. Benoit, S. Valas, A. da Silva & G. Perrin, 1998:** *Detection of caprine arthritis encephalitis virus in sperm of experimentally infected bucks. Vet Res, 29, 579-584.*
- Trigo, T. F. J., 1991:** *La Artritis Encefalitis Caprina., Ciencia Veterinaria. 5.*
- Trujillo, J. D., K. J. Hotzel, K. R. Snekvik & W. P. Cheevers, 2004:** *Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. Virology, 325, 129-136.*
- Valas, S., C. Benoit, C. Baudry, G. Perrin & R. Z. Mamoun, 2000:** *Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. Journal of Virology, 74, 6178-6185.*
- Vázquez, F. N. C., 2011:** *Identificación de Lentivirus de Pequeños Rumiantes genotipo B1 y desarrollo de herramientas moleculares para su diagnóstico., Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Laboratorio*

de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

winepi.net & F. d. V. Universidad de Zaragoza, 2006: Winepi.net.

Wolter, W. & B. Kloppert, 2004: Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el diagnóstico y control de la Mastitis Bovina. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara México, 5.

APÉNDICE

POBLACIÓN DE MUESTRAS EVALUADAS CON LAS DIFERENTES TÉCNICAS

PRIMER MUESTREO								
Ovinos	ELITEST	VMRD	Gen A P	Gen B P	Gen A L	Gen B L	PCR P	PCR L
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
23	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		Negativo
45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
58	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		Positivo
83	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
89	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		Negativo
92	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
116	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		Negativo
117	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
121	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Negativo
122	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
138	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
157	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
159	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
169	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo		Positivo
173	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
182	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		
192	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
195	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
199	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		Positivo
202	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
204	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
213	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		
225	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
226	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
228	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
232	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		Positivo
242	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
244	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		Negativo
252	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
259	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		

263	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
266	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo		
276	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
309	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
310	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
338	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
412	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		
419	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
445	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
458	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
459	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
460	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo		
467	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
475	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
499	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
623	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		
661	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		
663	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
669	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
684	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
696	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		Negativo
1126	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		Negativo
1128	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		
1130	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
1148	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
1162	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo		
1170	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		Positivo
1184	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		Negativo
1190	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
1266	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo		
2665	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
2692	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		Negativo
7888	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
7892	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		
7980	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		Positivo
7983	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
9715	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
310835	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		
310857	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
381651	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		

SEGUNDO MUESTREO								
Ovinos	ELITEST	VMRD	Gen A P	Gen B P	Gen A L	Gen B L	PCR P	PCR L
7	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
23	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
58	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		Positivo
83	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	
121	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
122	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
138	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
159	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
169	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
173	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		
192	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
199	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
202	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
204	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
225	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo		Negativo
226	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
228	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
232	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		Positivo
242	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		
244	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		
252	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
259	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
263	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
276	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
309	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
310	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	
338	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
412	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
445	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
458	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
459	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		
460	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
467	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		
499	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
669	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		

1126	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		
1130	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo		Negativo
1148	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
1162	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
1170	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		
1184	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		Negativo
1190	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo		Negativo
2665	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
2692	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		Negativo
7888	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
7892	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		Positivo
7980	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
7983	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo		
310835	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		

PRIMER MUESTREO								
Caprinos	ELITEST	VMRD	Gen A P	Gen B P	Gen A L	Gen B L	PCR P	PCR L
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	
2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	
8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
9	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo		
26	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
32	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
34	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
36	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo		Positivo
37	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
39	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		
40	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
44	Negativo							
46	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		Positivo
49	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
52	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo		
53	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
67	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
77	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
80	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo		Positivo
82	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
83	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo		Negativo

89	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo		Negativo
90	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
91	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
96	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
101	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
104	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
395	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
448	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		Positivo
912	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
933	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
963	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
Gringa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
S/N C/2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
SEGUNDO MUESTREO								
Caprinos	ELITEST	VMRD	Gen A P	Gen B P	Gen A L	Gen B L	PCR P	PCR L
8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
32	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		Positivo
34	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo		
44	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	
49	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
67	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		Positivo
77	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
91	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		
104	Negativo	Negativo	Negativo	negativo	Negativo	Negativo		
933	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	