



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

*ESTANDARIZACIÓN, EVALUACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA
MULTIPLEX DE LUMINEX PARA LA DETERMINACIÓN DE ARTRITIS
ENCEFALITIS CAPRINA Y PARATUBERCULOSIS CAPRINA*

TESIS

que para obtener el Título de:
Médico Veterinario Zootecnista

PRESENTA

Héctor Daniel Nájera Rivera

ASESORAS:

Dra. Laura Cobos Marín

M.C. Ana Delia Rodríguez Cortez

Ciudad Universitaria, CDMX. 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mis papás.

Por todo lo que me han dado,

por su apoyo

y por hacerme la persona que soy ahora.

Gracias

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi segunda casa, por haberme formado y dejarme ser parte de esta institución. A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme permitido lograr mis sueños.

A los departamentos de Reproducción y Microbiología e Inmunología por permitirme realizar este proyecto.

Al proyecto PAPIIT IT-201816 “Estandarización, evaluación y validación de la técnica multiplex de Luminex para el diagnóstico serológico de paratuberculosis, brucelosis, artritis encefalitis y herpesvirus en cabras” Por el financiamiento otorgado para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

A la Dra. Ana Rodríguez por su enseñanza, apoyo, confianza y paciencia, por ser parte fundamental y guía de esta etapa de mi vida.

A la Dra. Laura Cobos por sus enseñanzas, por la confianza y todo el apoyo brindado.

Al Dr. Alberto Balcázar por los regaños y consejos. Por haber sido participe en mi formación profesional.

Al CEPIPSA en particular a la Dra. Bertha Angulo y a la Dra. Yazmín Arriaga y al CEIE-PAA en especial al Dr. Ángel Pulido, al Dr. Antonio Rodríguez y a la Dra. Yesmín Domínguez por apoyarme en la realización de la tesis y permitirme hacer uso de las instalaciones de estos centros.

Al Dr. Juan Heberth y al proyecto CONACYT 247539 “Evaluación de pools de muestras séricas como herramienta para el monitoreo sero-epidemiológico de *Diarrea Viral Bovina* y *Paratuberculosis* en ganado de regiones tropicales” por su apoyo para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

Al Dr. Alejandro De Las Peñas y a MC. Norma Vázquez por haber donado la proteína recombinante P16 para utilizarla como antígeno en este proyecto.

Al CENASA y al Dr. Juan Antonio Montaña Hirose por su colaboración y por haber donado el control positivo de paratuberculosis.

Al Dr. Efrén Díaz, la Dra. Beatriz Arellano y a José Luis Gutiérrez por su colaboración, por haber donado sueros positivos y negativos a paratuberculosis caprina, y facilitar la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, Dr. Andrés Ducoing, Dr. Francisco Basurto, Dr. Bruno Alberti y Dr. Alberto Cano por todas sus aportaciones, para que este trabajo pudiera ser terminado con calidad y pueda formar parte del acervo de la Universidad.

A mis hermanos Beto, Gaby y Edgar y a mi prima Viviana por siempre estar ahí, por ayudarme cuando lo necesité, no sería yo sin ustedes.

A mis amigos de reproducción: Adriana, Angie, Dafne, Dalia, Fer, Jocy, Liz, Lupita, Pablo, Pao, Reynaldo y Toño por apoyarme durante esta etapa de mi vida.

A mis amigos de virología: Ara, Ari, Hugo, Irlanda Lalo, Laurita, Marion y Pablo por apoyarme en todo lo que necesité para la realización de este proyecto y por sus consejos.

A mis amigos Alma Andrade, Diana Ruiz, Enrique Castañeda, Gaby López, Gaby Reyes, Julián Vaillard y Luis Fernando Durán por estar conmigo durante todo este trayecto, por verme crecer y ser parte de mi vida. A Luismi Saucedo por siempre darme tu apoyo. A Olga Catalina por ser parte de una de mis pasiones y siempre apoyarme. A Alejandra Lugo y Andrea Sánchez, por estar conmigo desde CCH, por verme crecer y ser parte de lo que ahora soy. En especial a Belem Arias por estar cuando más se necesita a alguien, por escucharme y no dejarme caer. Por ser mi amiga.

A Hugo Quetzal por todo este tiempo que hemos estado juntos, en las buenas, en las malas y en las mejores. Por dejarme ser parte de tu vida y ser parte de la mía, por ayudarme a realizar mis sueños, porque siempre tienes una palabra de apoyo o de aliento y no dejarme rendir nunca. Te quiero.

A todas las personas que en mayor o menor medida aportaron para impulsarme a seguir adelante y nunca mirar hacia atrás.



*Estandarización, evaluación y validación
de la técnica MULTIPLEX de LUMINEX
para la determinación de artritis
encefalitis caprina y paratuberculosis caprina*
Héctor Daniel Nájera Rivera

Título original: *Estandarización, evaluación y validación de la técnica MULTIPLEX de LUMINEX para la determinación de artritis encefalitis caprina y paratuberculosis caprina*
Escrito por: Héctor Daniel Nájera Rivera

Diseño editorial por: *Thésika · Diseño de tesis*
© Derechos reservados (las imágenes usadas en el diseño de este documento fueron adquiridas legalmente por *Thésika.mx*. El autor conserva todos los derechos).
contacto@thesika.com.mx | www.thesika.mx
Impreso en la CDMX durante 2017.

Composición & Diseño editorial: E. Prado (*Thésika*)
Diseño de cubierta & Encuadernación: E. Prado (*Thésika*)
Corrección ortográfica: H. Nájera

Contenido

Resumen	01
Introducción	03
Artritis Encefalitis Caprina.	04
Etiología.	04
Patogenia	05
Distribución	06
Diagnóstico.	06
Paratuberculosis caprina	06
Etiología.	06
Patogenia	08
Distribución	08
Diagnóstico.	09
Problemática	11
Métodos diagnósticos	13
LUMINEX	14
Justificación	17
Hipótesis	19
Objetivo general	21
Objetivos específicos.	23
Material y Métodos	25
Estandarización ELISA indirecto casero	25
Artritis Encefalitis Caprina	25
Paratuberculosis caprina	26
Acoplamiento de los antígenos a esferas de poliestireno	26

Estandarización del sistema LUMINEX de forma independiente para cada enfermedad	26
Estandarización del sistema LUMINEX en forma multiplex	26
Validación del sistema LUMINEX	27
Punto de corte	27
Sensibilidad	28
Precisión	28
Repetibilidad	28
Reproducibilidad	28
Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación	28
Resultados	31
Estandarización de ELISA indirecto casero	31
Acoplamiento de los antígenos a esferas de poliestireno	31
Estandarización del sistema LUMINEX	31
Validación del sistema LUMINEX	31
Punto de corte	31
Sensibilidad	33
Precisión	37
Repetibilidad	37
Reproducibilidad	37
Estabilidad ciclos de congelación-descongelación	41
Discusión	47
Conclusión	55
Anexo 1. Soluciones	56
Anexo 2. Cuadros y figuras	58
Referencias	61

Resumen

NÁJERA RIVERA HÉCTOR DANIEL. Estandarización, evaluación y validación de la técnica multiplex de LUMINEX para la determinación de artritis encefalitis caprina y paratuberculosis caprina. (Bajo la dirección de: Dra. Laura Cobos Marín y MC. Ana Delia Rodríguez Cortez)

Las producciones caprinas intensivas presentan con mayor frecuencia enfermedades como la artritis encefalitis caprina (AEC) y paratuberculosis (PTB) caprina. Ambas se destacan por su importancia en el desarrollo productivo de la especie caprina y por su difícil diagnóstico. En este trabajo se estandarizó y validó la técnica multiplex de LUMINEX como prueba tamiz para detectar simultáneamente estas enfermedades, utilizando el antígeno P16 y PPA-3 para determinar anticuerpos en sueros positivos a AEC y PTB, respectivamente. La técnica se validó con los parámetros de punto de corte, sensibilidad y precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, además de someter la muestra a prueba de estabilidad. El punto de corte para AEC fue de 1149 intensidades medias de fluorescencia (IMF) con una sensibilidad de 97.78% y 98.89% de especificidad, para PTB el punto de corte fue de 623,5 IMF con sensibilidad y especificidad del 100%. La sensibilidad del ensayo fue de 1/1000 para AEC y 1/200 para PTB donde se encuentra positividad en las muestras y los datos no tienen diferencia estadística ($P > 0.05$). El coeficiente de variación (CV%) intra-ensayo fue de 10.86% y 5.88% para el control positivo y negativo de AEC y de 12.64% y 12.52% para el control positivo y negativo de PTB. En tanto para reproducibilidad el CV% inter-ensayo fue de 0.25% y 1.26% para el control positivo y negativo de AEC y de 0.27% y 0.90% para el control positivo y negativo de PTB. También se realizó una prueba de ANDEVA en la que se demostró que los datos se comportan de manera similar en los tres diferentes ensayos ($P > 0.05$). Se demostró que la muestra mantiene su estabilidad después de ser sometidas a 6 ciclos de congelación-descongelación. Se logró evidenciar que la técnica Luminex, es válida y confiable para determinar artritis encefalitis caprina y paratuberculosis caprina simultáneamente.





Introducción

LA CAPRINOCULTURA EN MÉXICO, es una actividad que se ha venido impulsando en los últimos años (Arechiga F et al. 2008), ya que genera una producción de 159,000 toneladas de leche y 40,000 toneladas de carne anualmente (SIAP-SAGARPA 2015); productos que satisfacen la creciente demanda de mercancías gourmet (Haenlein 2004) de una población grande de consumidores (Ribeiro & Ribeiro 2010). Pese a ello, la actividad caprícola se encuentra tradicionalmente relacionada con los sectores marginados de la población mexicana, para los cuales, representa uno de los principales medios de ingreso y de alimento familiar. Estas producciones se localizan en regiones áridas y semiáridas del país, así como en la sierra madre del sur entre los estados de Oaxaca, Puebla y Guerrero. (Guerrero Cruz 2010)

Por otro lado, existen sistemas intensivos de producción caprina bien integrados con buenos parámetros económicos, reproductivos (Guerra et al. 2011; Paramio & Izquierdo 2014) y de producción. Dichos sistemas se encuentran localizados en regiones como el bajío del país, que comprende los estados de Querétaro, Guanajuato, Aguascalientes y una parte de Jalisco; así como en la región de la comarca lagunera que incluye los estados de Coahuila y Durango (Guerrero Cruz 2010)

En estos sistemas de producción intensivos se presentan con mayor frecuencia enfermedades como la artritis encefalitis caprina (AEC) (Nazara et al. 1985; Daltabuit Test et al. 1999) y la paratuberculosis caprina (PTB) (Robbe-Austerman 2011; Fiorentino et al. 2012), debido a factores de riesgo como el hacinamiento, que favorecen el contagio por las diferentes vías de transmisión, siendo la fecal-oral la más común para PTB (Fiorentino et al. 2012; OIE 2014) y la digestiva, mediante el calostro y leche para el caso de AEC (OIE 2008; Leitner et al. 2010; Hernández Ruiz et al. 2011).

Artritis Encefalitis Caprina

Etiología

La artritis encefalitis caprina (AEC) es una enfermedad crónica causada por el virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) que pertenece a la familia *Retroviridae* y al género de los lentivirus. El genoma de estos virus es lineal, de sentido positivo, de cadena sencilla de ARN y contiene 3 genes estructurales: gag, pol y env que codifican para diferentes proteínas virales como se muestra en la figura 1 (Gilles & Robert 1999, Blacklaws 2012).

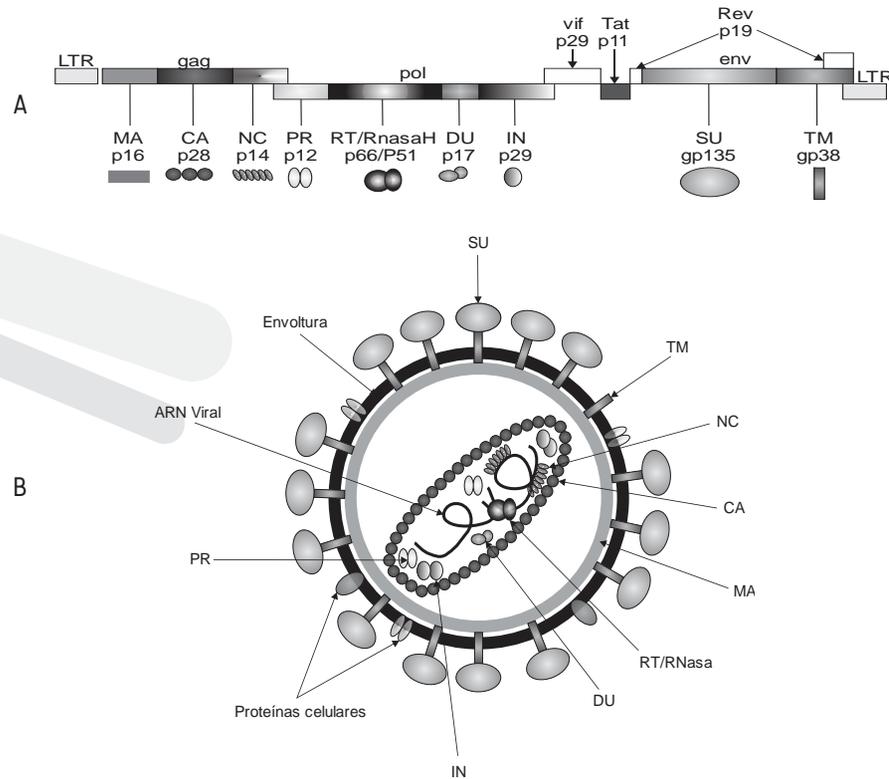


Figura 1. A) Organización genética. B) estructura del virus de Artritis-encefalitis caprina. SU: proteínas de superficie, TM: proteínas transmembranales, NC: nucleocápside, CA: cápside, MA: matriz, RT/Rnasa: transcriptasa reversa, DU: dUTPasa, IN: integrasa, Proteínas celulares, PR: proteasa, ARN viral,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

Patogenia

Las partículas virales ingresan al animal por medio del calostro o leche infectadas, en algunos casos puede ser mediante la saliva, heces o secreciones nasales (Leitner et al. 2010). El virus es captado en el intestino y llega a las células dendríticas y macrófagos, la proteína de superficie del virus gp135 interactúa con los receptores de estas células y se da la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Las células dendríticas migran hasta los linfonodos y transmiten el virus a los macrófagos, dentro de estas células ocurre la replicación viral. Los monocitos pueden ser infectados, pero no ocurre la replicación viral en estos, es hasta que alcanzan los tejidos y se vuelven macrófagos maduros cuando ocurre la replicación. Así, las partículas virales son liberadas por gemación y alcanzan el torrente sanguíneo y la infección se vuelve sistémica. Las partículas virales llegan hasta la médula ósea, donde infectan a las células precursoras de la línea mieloide, el provirus se integra a estas células, por lo que la infección se vuelve persistente y genera la enfermedad. (Blacklaws 2012)

La enfermedad de AEC puede causar leucoencefalomielitis y, por lo tanto, signos nerviosos en animales jóvenes y provocar la muerte en poco tiempo, en tanto que, en los animales adultos, mayores al año de edad, puede cursar con inflamación de las articulaciones carpiana y tarsiana, dificultando así el movimiento y, por ende, la capacidad de acceder al alimento. Lo anterior provoca una disminución en la condición corporal, con una consecuente disminución de la producción láctea, pudiendo llegar en poco tiempo la muerte por inanición. La mastitis indurativa es otra patología que puede estar asociada, aparece al parto y se caracteriza por causar ubres firmes e hinchadas con agalactia; así mismo, puede cursar con semiología respiratoria como intolerancia al ejercicio, disnea, tos y debilidad pudiendo llegar a la insuficiencia respiratoria y la muerte dentro de algunas semanas o meses. (Nazara et al. 1985; Daltabuit Test et al. 1999; Reséndiz Martínez et al. 2002; Hernández Ruiz et al. 2011; Kaba et al. 2012). De igual forma, se ha demostrado que las cabras seropositivas tienden a tener lactaciones más cortas, con menor producción de leche, de grasa, de lactosa y de materia seca, además de que el conteo de células somáticas es mayor en estas que en las cabras seronegativas (Leitner et al. 2010; Martínez-Navalón et al. 2013).

Distribución

La AEC es una enfermedad de distribución mundial que afecta principalmente a producciones intensivas, y a cabras especializadas en producción de leche. En Países como EU, Francia, Suiza, Inglaterra y Australia se han reportado prevalencias desde el 30 hasta el 81% (Nazara et al. 1985; Nord et al. 1998; Reséndiz Martínez et al. 2002; OIE 2008). La diferencia en los porcentajes reportados se debe al uso de antígenos incapaces de discriminar entre los lentivirus de los pequeños rumiantes (LvPR), AEC y *Maedi visna*. En México se han reportado prevalencias del 4 al 55% en producciones intensivas (Nazara et al. 1985; Daltabuit Test et al. 1999).

Diagnóstico

El diagnóstico para AEC se puede realizar por medio de técnicas como la inmunodifusión en gel agar (IDGA), el enzimoimmunoensayo (ELISA), el aislamiento viral o la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Es la IDGA la prueba recomendada por la OIE para el comercio internacional, ya que se considera específica, reproducible y fácil de realizar. Sin embargo, se requiere experiencia para interpretar los resultados, además de que utiliza el antígeno de *Maedi visna* para su determinación, por lo que particularmente refleja baja especificidad en esta prueba. Por otro lado, el tiempo de incubación va de las 48 a las 72 horas y se utilizan volúmenes de muestra de 25 a 50µl por pozo (OIE 2008).

Paratuberculosis caprina

Etiología

La paratuberculosis es causada por *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP), bacilo aerobio, intracelular, no móvil, ácido alcohol resistente, esta característica está dada por la pared celular que está formada principalmente por complejos ácidos micólicos-arabinogalactano y lipoarabinomanano, además de otras estructuras como se representan en la figura 2A. (Bai et al. 2015) La figura 2B representa el genoma completo de MAP. (Li et al. 2005) Se alberga principalmente en los macrófagos, evadiendo el sistema inmune, convirtiéndose así en una enfermedad crónica. (Sweeney 2011; Wisconsin 2016)

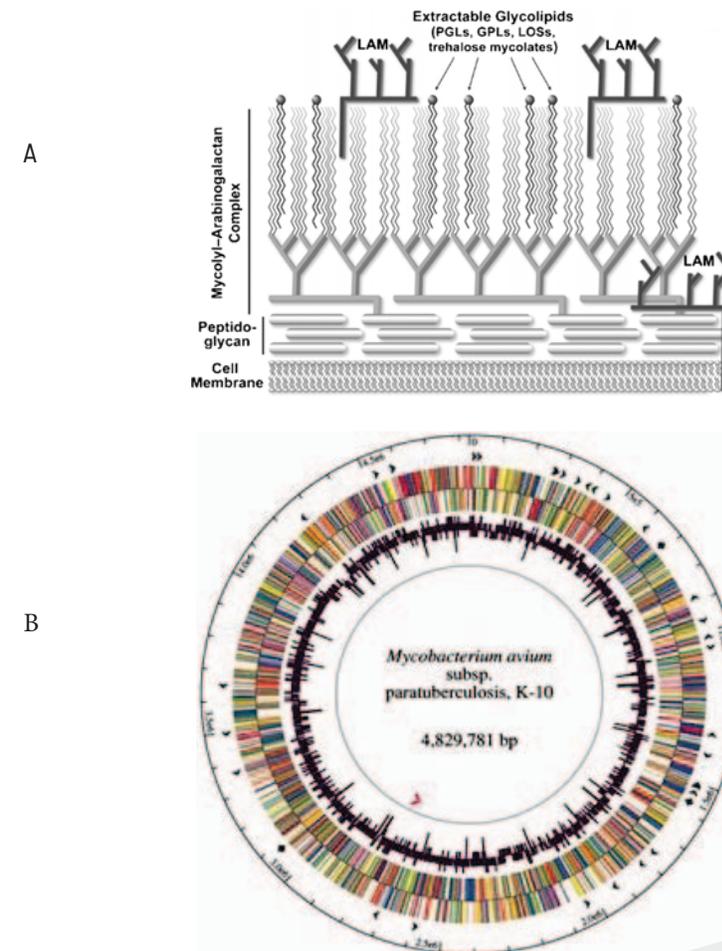


Figura 2. A) Estructura de la pared de las micobacterias. Membrana celular, Peptidoglicano, LAM: Lipoarabinomanano, Complejo ácido micólico-arabinogalactano, PGLs: glicolipidos fenolicos; GPLs=glicopeptidolipidos; LOSs=lipooligosacaridos. Tomado de Lipooligosaccharides from Mycobacteria: Structure, Function, and Synthesis. (Bai et al. 2015). B) Representación circular del genoma de la cepa K-10 de *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. Desde el interior: flecha roja: operón rRNA; Histograma púrpura oscuro: contenido de GC; Histograma multicolor: MAP ORF codificados según clasificación funcional; Flechas negras: 45 ARNt; Círculo exterior: escala. Tomado de The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. (Li et al. 2005)

Patogenia

Las bacterias ingresan al individuo vía fecal-oral, mediante leche o calostro infectado, así como por alimentos contaminados. Posteriormente llegan hasta el intestino donde logran pasar la barrera intestinal utilizando a las células M como portal de entrada, MAP es reconocido y fagocitado por los macrófagos y finalmente llegan a los linfonodos mesentéricos. MAP es capaz de evadir la respuesta de los macrófagos mediante dos vías, primero: la composición química de la pared celular evita su destrucción y segundo: evita la actividad de la H-ATPasa por lo que el fagolisosoma no se acidifica y así se evita su maduración. En intestino delgado se lleva a cabo su replicación, formando pequeñas lesiones hasta causar enteritis granulomatosa crónica.(Brogden et al. 2000; Sohal et al. 2008; Wisconsin 2016)

La enfermedad puede provocar disminución de la producción láctea así como pérdida de peso progresivo hasta la postración, emaciación y muerte entre los animales adultos, debido al pobre aprovechamiento de nutrientes (Estévez-Denaives et al. 2007; Kheirandish et al. 2009).

Distribución

Actualmente no se tienen datos exactos de la prevalencia de PTB en los caprinos de México. Sin embargo, se conoce que está ampliamente diseminada en países de Europa, así como en Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Estados Unidos y Canadá entre otros (Estévez-Denaives et al. 2007; Angelidou et al. 2014). En América latina, se han realizado estudios en Chile, Granada y México en los que se reportan prevalencias desde el 0.38% hasta el 16.8%, sin embargo, los datos obtenidos hasta ahora no determinan la exactitud de la prevalencia de la paratuberculosis.(Fernández-Silva et al. 2014)

Diagnóstico

El método más confiable para la identificación de PTB es el cultivo fecal (OIE 2008). Sin embargo, por la necesidad específica de micobactina para su aislamiento y los largos periodos de incubación, de al menos seis semanas, la convierten en una prueba muy complicada (Estévez-Denaives et al. 2007; OIE 2008). En México el diagnóstico aprobado por el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) es mediante la técnica de ELISA. (SENASICA 2013)





Problemática

LOS LARGOS PERIODOS DE INCUBACIÓN DE ESTOS AGENTES dificultan la detección oportuna de los animales verdaderamente positivos, por lo que no hay un manejo adecuado del rebaño, como la separación de los animales, o la crianza artificial de los cabritos con madres infectadas, permitiendo así que siga la diseminación de las enfermedades (Ramírez et al. 2011). Por otra parte, aun cuando los animales son detectados como positivos, no existen tratamientos confiables, causando que el rebaño se mantenga infectado (OIE 2008; Leitner et al. 2010; Robbe-Austerman 2011; OIE 2014).

En el año 2010 el consejo técnico consultivo de sanidad animal (CONASA) señaló a la artritis encefalitis caprina, la micoplasmosis, la brucelosis y la paratuberculosis como las principales enfermedades que afectan a los rebaños caprinos intensivos del país, destacando su importancia en el desarrollo productivo de esta especie y su difícil diagnóstico (CONASA 2011).

Las pérdidas económicas por estas enfermedades aún no han sido determinadas en México, ya que no existen estudios que demuestren su prevalencia, debido en gran medida a la falta de un sistema diagnóstico eficiente, la falta de tratamientos eficaces y la consecuente persistencia del agente etiológico en el rebaño. Sin embargo, se sabe que estas enfermedades pueden llegar a afectar por largos periodos de tiempo (Leitner et al. 2010).

Debe considerarse que las pruebas diagnósticas existentes en México para ambas enfermedades suelen ser tardadas, pudiendo llegar hasta los 50 días. Los reactivos empleados presentan baja sensibilidad, requieren experiencia para su lectura (OIE 2008) y para AEC, los kits comerciales son importados, por lo que su costo es alto. Por otro lado, para poder llevar a cabo estudios epidemiológicos, programas de control y erradicación de enfermedades es importante conocer las variantes antigénicas de cada país (Ramírez et al. 2011).





Métodos diagnósticos

TODOS LOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MENCIONADOS anteriormente se basan en técnicas monoplex, ya que permiten determinar un solo analito a la vez, haciéndolos menos eficientes cuando se requiere hacer un diagnóstico contra varias enfermedades que se encuentren relacionadas o no. Estos sistemas, tienen la gran desventaja de requerir grandes volúmenes de muestra y de reactivos, implican más horas hombre invertidas para poder realizarlas, y por ende, los costos se incrementan y el tiempo de resultados se alarga (Elshal & McCoy 2006; Lash et al. 2006; Anderson et al. 2011).

Es por ello, que resulta necesario el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, que ayuden a determinar la situación zoonosanitaria del país, utilizando mínimos volúmenes de muestra, con baja variabilidad, haciendo más eficiente el consumo de reactivos y del tiempo invertido. En los últimos años se han venido desarrollando técnicas multiplex, como el LUMINEX que permiten la detección de varios analitos simultáneamente.

La selección del método analítico se basa en tres condiciones: primero en la utilidad del mismo, refiriéndose al tiempo de respuesta y al interés clínico que pudiera tener, segundo, al rendimiento analítico, el cual se puede medir con la estimación de diferentes parámetros, tales como, exactitud, precisión, rango analítico, límite de detección, especificidad y sensibilidad del ensayo, entre otros, y que permiten conocer la calidad de la prueba y considerar aceptables los resultados. Tercero, el fundamento del ensayo, la composición de los reactivos y materiales a utilizar, requerimientos de estos, como espacio, temperatura, luz o humedad, así como estabilidad y tiempos de almacenamiento. Por otro lado, es necesario evaluar diferentes patrones en el técnico como precisión del pipeteo, arrastre de la muestra, del reactivo, manejo de las mismas, tiempos intra e inter-ensayo, así como para entrega de resultados entre otros. Finalmente deben considerarse las horas-hombre invertidas, habilidades prácticas, riesgos

y métodos de seguridad, tipo, cantidad y forma de eliminar los residuos, requerimientos de la muestra, costo beneficio, así como la disponibilidad de soporte técnico, suministros y servicios. (Burtis & Bruns 2015)

LUMINEX

El Luminex, es un sistema multiplex para la detección de varios analitos simultáneamente, que utiliza un sistema de microesferas de poliestireno con un sistema de identificación interna mediante la emisión de fluorescencia resultante de la combinación de dos proporciones de fluoróforos (rojo e infrarrojo). Estas combinaciones pueden dar hasta 100 poblaciones diferentes de esferas, denominadas regiones. A cada región o población de esferas, se le puede acoplar un analito diferente, es por esto que con esferas marcadas en diferentes regiones se pueden determinar diferentes analitos al mismo tiempo, en un mismo ensayo y con bajos volúmenes de muestra. La tecnología Luminex funciona básicamente como un citómetro de flujo de 2 láseres, un diodo laser de 635 nm que excita la combinación de fluoróforos en el interior de la esfera y que emite una longitud de onda entre 678 a 689nm lo que permite su identificación, y por tanto distingue las diferentes regiones de estas y el segundo láser con una longitud de onda de 532 nm, el cual excita la molécula reportera de ficoeritrina, y esta a su vez emite una señal de longitud de onda de 575nm que se detectará como la cantidad de fluorescencia presente en la superficie de la esfera (Ray et al. 2005; Elshal & McCoy 2006; Lash et al. 2006; Anderson et al. 2011; LUMINEX 2017).

La técnica luminex ha demostrado ser muy eficiente al determinar varios analitos simultáneamente, reduciendo los tiempos de trabajo y los volúmenes de muestra requeridos para su estudio. Adicionalmente es una prueba confiable, reproducible, sensible y específica, con buenos índices de exactitud y precisión demostrado en diferentes estudios, para la determinación de anticuerpos y citocinas en animales (Giavedoni 2005; Clavijo et al. 2006; Chen et al. 2013) y humanos (DuPont et al. 2005; Ray et al. 2005; Elshal & McCoy 2006; Lash et al. 2006; Chowdhury et al. 2009; Anderson et al. 2011).

En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una prueba diagnóstica para las enfermedades de AEC y PTB caprina, mediante el sistema Multiplex de Luminex debido a la importancia que tienen dichas enfermedades durante el desarrollo del rebaño, así como sus consecuencias de merma en la producción, y en los parámetros económicos. Para

la AEC se usará la proteína recombinante del antígeno P16 de matriz (MA), que se probó en un ELISA y mostró una buena concordancia con la ELISA comercial (Silíceo Cantero 2014). La P16 ha demostrado ser inmunogénica e inmunodominante y se presenta al inicio de la infección (Grego et al. 2005). Para la PTB se usó el antígeno comercial protoplasmático que corresponde a un lisado bacteriano de una cepa de *Mycobacterium Avium* (Laboratorio Allied monitor) que ha demostrado ser inmunogénico y con el que se han reportado sensibilidades del 40 al 80% y especificidades del 90 al 95% (Costanzo et al. 2012).

De igual forma, debe considerarse que no existen sistemas de diagnóstico eficientes para AEC ni PTB, ambas enfermedades representan un buen modelo tanto viral como bacteriano para la estandarización del sistema Multiplex de Luminex que posteriormente podrá servir para el diagnóstico del resto de las enfermedades de importancia en caprinos.





Justificación

ESTANDARIZAR Y VALIDAR UNA PRUEBA TAMIZ (técnica multiplex Luminex) que hace más eficiente el uso de reactivos, volumen de muestras y horas-hombre, mediante la detección de animales sero-positivos por determinación simultánea de las enfermedades de AEC y PTB caprina, que permitiría conocer el estatus sanitario de la población caprina en los rebaños de México.





Hipótesis

EL ANTÍGENO P16 DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA junto con el antígeno PPA-3 de Paratuberculosis serán reconocidos por sueros de cabras positivos a estas enfermedades mediante la técnica Luminex.





Objetivo general

ESTANDARIZAR Y VALIDAR LA TÉCNICA LUMINEX con los antígenos P16 y PPA-3 para determinar simultáneamente las enfermedades de AEC y PTB.





Objetivos específicos

1. Estandarizar la técnica de ELISA indirecta con el antígeno P16 de AEC para confirmar su inmunorreactividad.
2. Estandarizar la técnica de ELISA indirecta con el antígeno PPA-3 de PTB para confirmar su inmunorreactividad.
3. Realizar ensayos indirectos con la técnica Luminex para estandarizar el desempeño individual de cada antígeno por separado.
4. Realizar ensayo indirecto con la técnica Luminex con ambos antígenos al mismo tiempo.
5. Validar la técnica Luminex para ambas enfermedades.





Material y Métodos

Estandarización ELISA indirecto casero

Artritis Encefalitis Caprina

Se utilizó la proteína purificada P16 obtenida de una cepa de *E. coli* transformada que fue donada por Vázquez. (Vázquez Franco & Ducoing Watty 2011) como antígeno para la detección de anticuerpos presentes en sueros caprinos positivos a AEC, determinados previamente por un ensayo de ELISA comercial (Silíceo Cantero 2014). Se sensibilizaron placas de poliestireno para ELISA de 96 pozos Maxisorp Nunc (Thermo scientific, 439454) como fase sólida y se probaron diferentes concentraciones del antígeno por pozo, 1µg, 0.5µg y 0.25 µg en 50µl de solución de carbonatos pH 9.6 y se incubó al menos 18 horas a 4°C. Posteriormente se lavó la placa con 300µl de solución de lavado a cada pozo 4 veces durante 10 segundos cada vez.

Se utilizó un pool de 20 sueros caprinos positivos a AEC diluido 1/10 en buffer de fosfatos y se agregaron 50µl de la solución a cada pozo como testigo positivo, y 50µl de buffer de fosfatos a los pozos de unión no específica (UNE). Las placas se incubaron durante 1.5 horas a 32°C. Se repitió el proceso de lavado. Se utilizó proteína G unida a peroxidasa de rábano (HRP) (BioRad, 1706425) como conjugado, probando diferentes diluciones: 1/5000, 1/10000, 1/15000 y 1/20000 en buffer de fosfatos, y se adicionaron 50µl de la solución a los pozos correspondientes. Se incubó durante 1.5 horas a 32°C. Se repitió el proceso de lavado.

Se utilizó Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma, 860336-1G) como revelador de la reacción. Se adicionaron 100µl del sustrato a cada pozo y se incubó durante 15 min a 32°C.

Se utilizó como solución de paro ácido sulfúrico 2N (Sigma, 258105), se agregaron 50µl a cada pozo y se procedió a realizar la lectura. Se leyó en un lector de ELISA (Biotech) o espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

Paratuberculosis caprina

Para la estandarización de la ELISA para PTB, se siguió el mismo protocolo que para AEC. En este caso se utilizó el antígeno comercial protoplasmático PPA-3 (Allied Monitor, 65-0010 10mg) y se probaron diferentes concentraciones de este: 0.5µg, 1 µg y 5µg por pozo. Así mismo, se utilizó el testigo comercial positivo (Allied Monitor, 66-2001 1ml), agregando 50µl por pozo. Y finalmente se probaron diferentes diluciones del conjugado 1/5000, 1/10000, 1/15000 y 1/30000.

Acoplamiento de los antígenos a esferas de poliestireno

Una vez establecida la estandarización y confirmación de inmunorreactividad en el sistema ELISA, los antígenos de P16 para AEC y protoplasmático para PTB se acoplaron a microesferas magnéticas de poliestireno en la región 45 (Luminex, Magplex -C Microspheres, MC10045-01) para AEC y 33 (Luminex, Magplex -C Microspheres, MC10033-01) para PTB mediante la reacción de carbodimida de dos pasos. En la primera fase se activan las esferas con 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCL (EDC) (Thermo scientific, 22980). Este compuesto reacciona con los grupos carboxilo de las esferas y forma un intermediario inestable (o-acilsourea), el cual debe estabilizarse con N-Hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) (Thermo scientific, 24510). Durante la segunda fase se da el acoplamiento o unión covalente donde el intermediario estabilizado reacciona con las aminas primarias de la proteína a acoplar.

De un stock de esferas de estas regiones, se tomaron 100µl, que corresponden a 1.25×10^6 esferas para cada región, posteriormente se agregaron 5µg de proteína P16 para AEC y 10µg de PPA-3 para PTB. Una vez acopladas las esferas se calculó la concentración recuperada de estas mediante el contador de esferas (Scepter, Millipore, PHCC00000).

Estandarización del sistema LUMINEX de forma independiente para cada enfermedad

Se utilizó una placa magnética luminex (Millipore, MAG-PLATE) como base para la realización del ensayo, en esta se agregaron diferentes cantidades de esferas magnéticas acopladas, 100, 200 y 300 esferas por pozo en 50µl de PBS-Bloqueo, posteriormente se agregaron 50µl de un pool de 20 sueros de muestras positivas y negativas diluidas ½ en PBS- Bloqueo para

cada cantidad de esferas. Se incubó durante 2 horas a 34°C en agitación constante a 199 RPM, posteriormente se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween. Como conjugado se utilizó IgG anticaprino biotinado (Jackson ImmunoResearch, 305-065-003) a diferentes diluciones para cada cantidad de esferas y testigos positivos y negativos: 1/10000 y 1/20000 para AEC y 1/30000 y 1/60000 para PTB diluidos en PBS-Bloqueo. Se volvió a incubar como se menciona anteriormente y se repitió el paso de lavado. Después se agregaron 50µl de Estreptavidina-Ficoeritrina (R&D Systems) diluida 1/100 en PBS-Bloqueo a todos los pozos. Se incubó durante 30 minutos a 34°C en agitación constante a 199 RPM. Se repitió el paso de lavado y se agregaron 100µl de PBS tween para su lectura. Se leyó la placa en el sistema Luminex (Bio-plex 200 system). Todo esto se realizó por separado para cada enfermedad.

Se realizó otro ensayo independiente para cada enfermedad, pero en este caso se probaron diferentes diluciones de las muestras, 1/10, 1/50 y 1/100, el resto del protocolo se siguió de la misma manera con 200 esferas por pozo y 1/25000 el conjugado.

Estandarización del sistema LUMINEX en forma multiplex

Una vez establecidas las condiciones del ensayo y confirmada la reactividad en el luminex de forma independiente, se procedió a probarlo de forma conjunta. Para esto se agregaron 200 esferas de cada región al mismo pozo, se utilizaron muestras positivas solamente a AEC o a PTB y muestras positivas y negativas a ambas enfermedades, y el conjugado se diluyó 1/25000. El resto del ensayo se realizó con el protocolo descrito anteriormente.

Validación del sistema LUMINEX

El ensayo multiplex se validó empleando sueros positivos y negativos para AEC determinados previamente con una ELISA comercial y sueros positivos y negativos a PTB previamente determinados con las técnicas ELISA, PCR e IDGA, además, se utilizaron testigos positivos y negativos para AEC, así como, el testigo positivo del CENASA y positivo y negativo del laboratorio Allied monitor para PTB.

Punto de corte

Se realizó un ensayo luminex con las siguientes muestras: para AEC 90 muestras conocidas positivas y 90 negativas por duplicado, junto con un testigo positivo y uno negativo; mientras

que para PTB solamente se pudieron obtener 11 muestras positivas y 11 negativas, así como un testigo positivo del CENASA y un testigo positivo y uno negativo (Allied Monitor®, 68-2001 ml). Con los datos obtenidos del ensayo se realizó un análisis y curva ROC con el programa GraphPad Prism® y también se obtuvieron los datos de sensibilidad y especificidad del ensayo.

Sensibilidad

Se realizó un ensayo luminex con las muestras control positivas y negativas para cada enfermedad independientemente por triplicado, las cuales se diluyeron 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 y 1/1000 para determinar el punto mínimo de detección. Se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de ANDEVA para conocer si existe diferencia en la intensidad media de fluorescencia con respecto al grado de dilución de la muestra y se comprobó con la prueba de Tukey-Kramer.

Precisión

REPETIBILIDAD

Se realizó un ensayo Luminex para cada enfermedad independientemente, utilizando las muestras control positivas y negativas por quintuplicado. Se realizó la prueba de normalidad y se obtuvo el CV intra-ensayo.

REPRODUCIBILIDAD

Se realizaron tres ensayos Luminex para cada enfermedad independientemente, utilizando las muestras control positivas y negativas por quintuplicado en tres días. Así mismo se realizó la prueba de normalidad de los datos y posteriormente se realizó la prueba de ANDEVA para comprobar que los valores obtenidos no tienen una variación significativa con respecto de la media y se comprobó con la prueba de Tukey-Kramer, además se obtuvo el CV inter-ensayo.

Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación

Se evaluó la estabilidad de la reactividad de los analitos, con la técnica Luminex, utilizando las muestras testigo positiva y negativa para ambas enfermedades, diluidas 1/100 por triplicado y sometidas a 6 ciclos de congelación-descongelación. Se analizaron los datos mediante la

prueba de normalidad y posteriormente con la prueba de ANDEVA para identificar si existe diferencia significativa entre los datos con respecto al ciclo de congelación-descongelación y también se analizó con la prueba de Tukey-Kramer.





Resultados

Estandarización de ELISA indirecto casero

Para el ensayo de AEC, las condiciones resultantes fueron 0.5µg por pozo de la proteína P16 como antígeno para la prueba, y la dilución del conjugado fue de 1/10000, con las cuales se observó mayor diferencia entre los pozos de unión máxima y unión no específica.

Para el caso de PTB, las condiciones fueron de 1µg por pozo del antígeno, así como, 1/30000 para la dilución del conjugado, con las cuales se observa una mejor reacción en la prueba.

Acoplamiento de los antígenos a esferas de poliestireno

Se obtuvo un conteo de recuperación de 887 500/1 250 000 esferas acopladas en 250µl que corresponde al 71% para AEC y de 915 000/1 250 000 esferas acopladas que resulta en el 73.2% en 250µl para PTB.

Estandarización del sistema LUMINEX

Las condiciones que resultaron en una mejor lectura en los ensayos independientes fueron, 200 esferas acopladas por pozo para cada enfermedad, la dilución del conjugado para AEC fue de 1/20000 y para PTB fue de 1/30000 y la mejor dilución de la muestra fue de 1/100. Para el ensayo multiplex las condiciones fueron las mismas que de forma individual excepto para el conjugado, el cual se diluyó 1/25000.

Validación del sistema LUMINEX

Punto de corte

Se realizó el ensayo y curva ROC para ambas enfermedades, para AEC el punto de corte fue de 1149 intensidades medias de fluorescencia (IMF) con una sensibilidad de 97.78% y

98.89% de especificidad. Por otra parte, para PTB el punto de corte fue de 623.5 IMF con sensibilidad y especificidad del 100%. En las figuras 3 y 4 se muestra la distribución del total de las muestras positivas frente a las negativas (Eje de las X) y la IMF de cada una de ellas (Eje de las Y) para AEC y PTB, respectivamente.

Así mismo, se obtuvo un área bajo la curva de 0.99 lo que demuestra que la prueba detecta casi el 100% de casos verdaderos positivos para AEC como se muestra en la figura 5. Para PTB se obtuvo un área bajo la curva de 1 lo que demuestra que la prueba detecta el 100% de casos verdaderos positivos como se muestra en la figura 6.

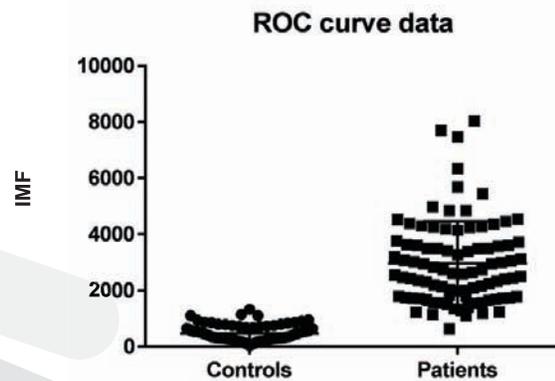


Figura 3. Distribución de las muestras negativas con respecto de las positivas para artritis encefalitis caprina

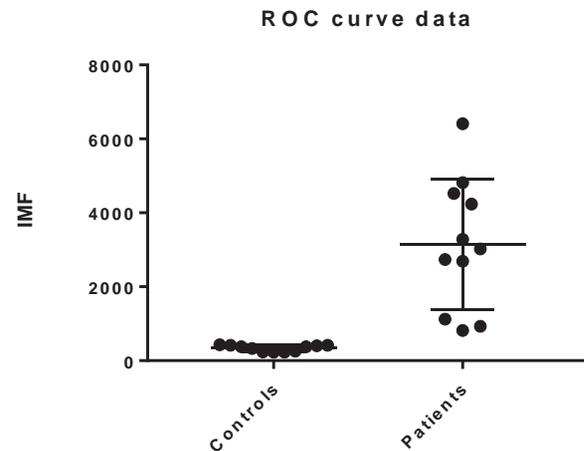


Figura 4. Distribución de las muestras negativas con respecto de las positivas para paratuberculosis caprina

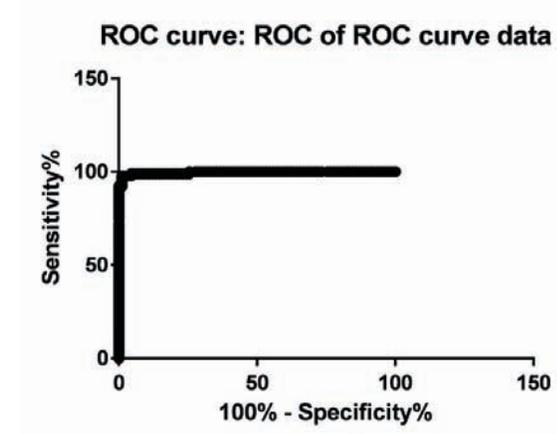


Figura 5. Curva ROC. Artritis encefalitis caprina. Área bajo la curva: 0.99

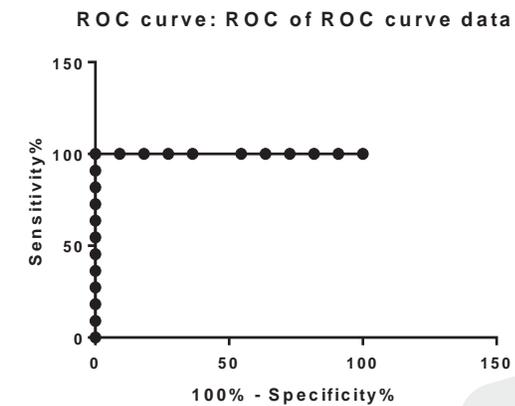


Figura 6. Curva ROC. Paratuberculosis caprina. Área bajo la curva: 1

Sensibilidad

Se comprobó que todos los datos para los controles positivos y negativos de ambas enfermedades se comportan de manera normal, por lo que se procedió a realizar la prueba de ANDEVA con un intervalo de confianza del 95% y α de 0.05.

Para los datos del testigo positivo de AEC no hubo diferencia estadística significativa entre ninguno de los grupos ($p=0.1166$). Así mismo se realizó el análisis de Tukey-Kramer en el que se comparan las medias de todos los datos y con el que se comprobó que no existe diferencia entre los grupos como se muestra en la figura 7.

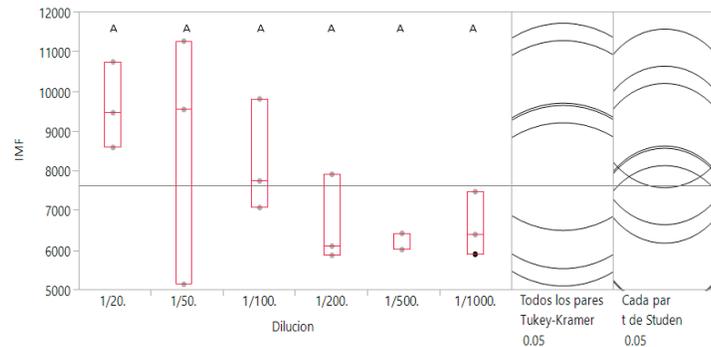


Figura 7. Análisis univariante de Intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

El testigo negativo de AEC mostró diferencia estadística significativa ($P=0.0001$) y se realizó el análisis de Tukey-Kramer en el que se demostró que la muestra con dilución 1/20 es la que muestra diferencia con el resto de los grupos, representado en la figura 8.

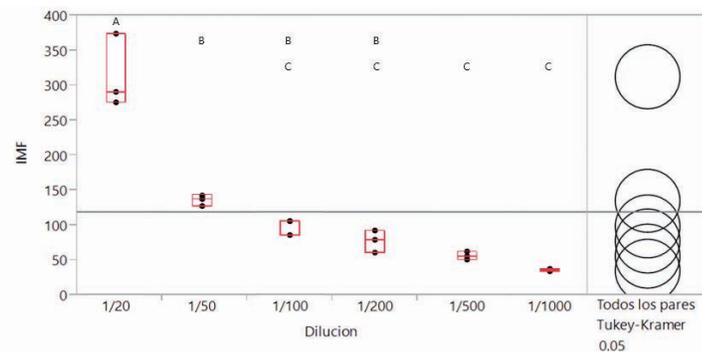


Figura 8. Análisis univariante de Intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Para el testigo positivo de PTB hubo diferencia estadística significativa ($P=0.0014$) y al realizar la prueba de Tukey-Kramer, se observó que hay diferencias a partir de la dilución 1/500 como se muestra en la figura 9.

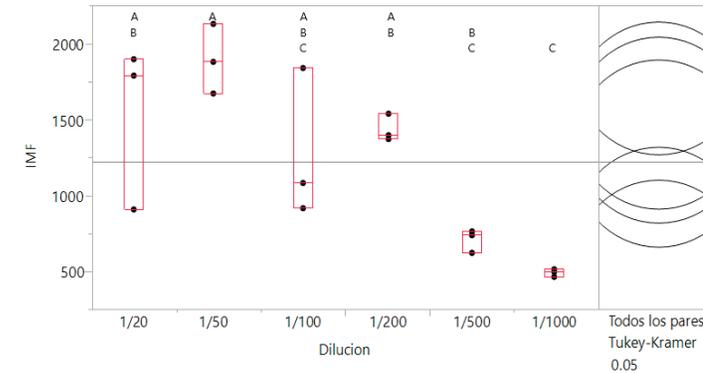


Figura 9. Análisis univariante de Intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Para el caso del testigo negativo de PTB hubo diferencia estadística significativa entre los grupos ($P=0.0003$) con respecto al grado de dilución, representado en la figura 10 y en el análisis de Tukey-Kramer se observa que la dilución 1/20 es la que muestra diferencia con el resto de las diluciones, excepto para la dilución 1/200.

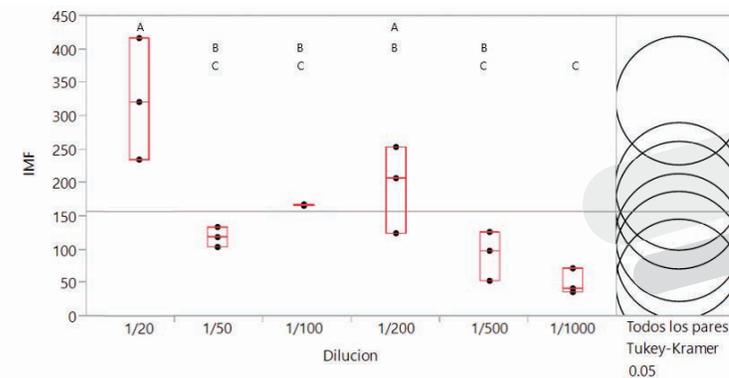


Figura 10. Análisis univariante de Intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Además de esto, los resultados mostraron estar por encima del punto de corte con una dilución de hasta 1/1000 para la muestra testigo positiva de AEC, del mismo modo, se obtuvieron lecturas con la dilución 1/1000 para la muestra testigo negativa como se muestra en la figura 11. En el caso de PTB se determinó la muestra testigo positiva con dilución de 1/500 y hasta 1/1000 para la muestra testigo negativa representado en la figura 12.

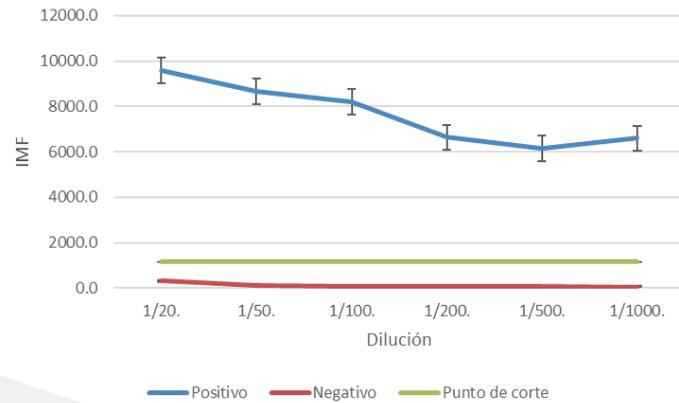


Figura 11. Promedios de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución de los testigos positivos y negativos para AEC comparados con el punto de corte

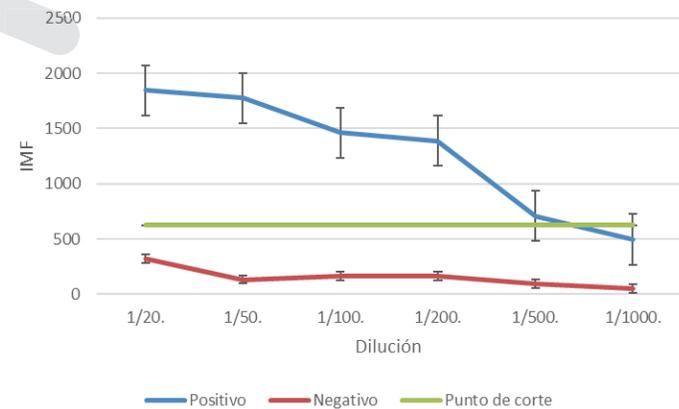


Figura 12. Promedios de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución de los testigos positivos y negativos para PTB comparados con el punto de corte

Precisión

REPETIBILIDAD

El coeficiente de variación (CV) intra-ensayo obtenido para AEC fue de 10.86% para el control positivo, en tanto que, para el control negativo, el CV fue de 5.88%. En el caso de paratuberculosis se obtuvo un CV para el control positivo de 12.64% y de 12.52% para el control negativo como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Intensidades medias de fluorescencia para los testigos positivo y negativo de AEC y PTB. Coeficiente de variación intra-ensayo

	AEC		PTB	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
	6025.5	99.0	1087.5	178.5
	6082.0	102.5	1144.5	198.0
	6401.5	106.0	1316.0	216.0
	7251.0	110.0	1431.0	235.5
	7637.0	115.0	1441.0	244.0
CV%	10.86	5.88	12.64	12.52

REPRODUCIBILIDAD

Se realizó la prueba de normalidad de los datos y se confirmó que estos se comportaban de manera normal. Se realizó la prueba de ANDEVA con un intervalo de confianza del 95% y α de 0.05.

No se observó diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) en ninguno de los testigos positivos y negativos de ambas enfermedades y para los tres ensayos. Esto se muestra en las figuras del análisis de varianza y prueba de Tukey-Kramer para cada testigo: Positivo de AEC (Figura 13), Negativo de AEC (Figura 14), Positivo de PTB (Figura 15) y negativo de PTB (Figura 16).

En los cuadros 2 y 3 se muestran los datos obtenidos para los testigos positivos y negativos para AEC y PTB, respectivamente, en los tres ensayos realizados, así como el promedio por grupo y general. Posteriormente se calculó el CV% inter-ensayo para AEC y PTB, los cuales resultaron de 0.25% y 1.26% para el control positivo y negativo de AEC, por otra parte, los CV% para PTB fueron de 0.27% y 0.90% para el control positivo y negativo como se muestra en los cuadros 4 y 5, así como el criterio de aceptación el cual es de $< 15\%$.

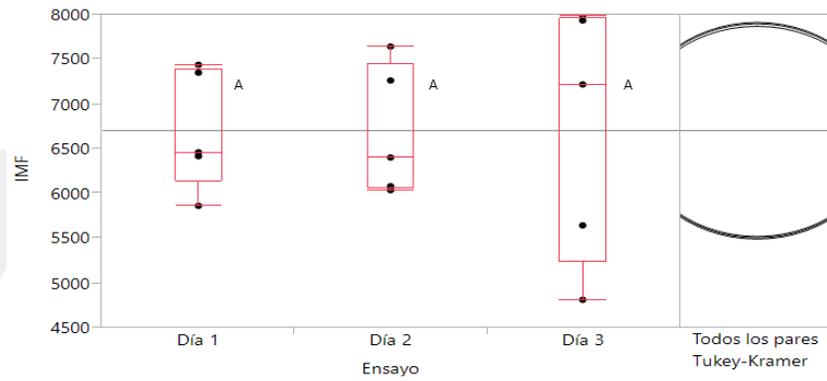


Figura 13. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a Ensayo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos. ($p=0.9987$)

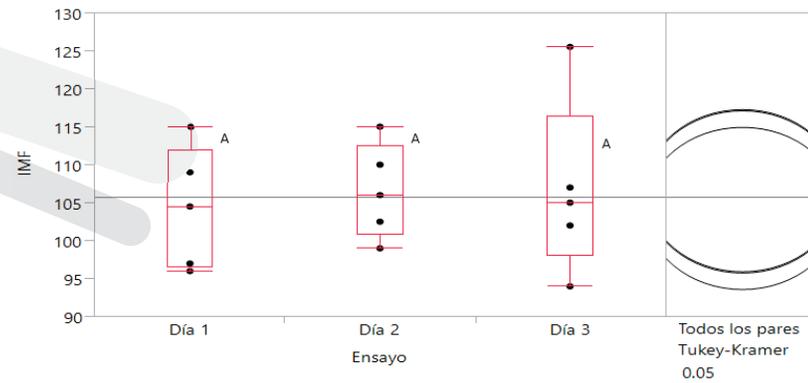


Figura 14. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a Ensayo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos. ($p=0.8955$)

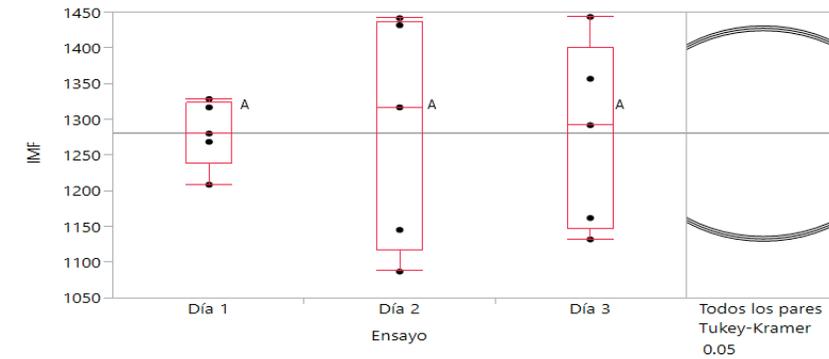


Figura 15. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a Ensayo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos. ($p=0.9961$)

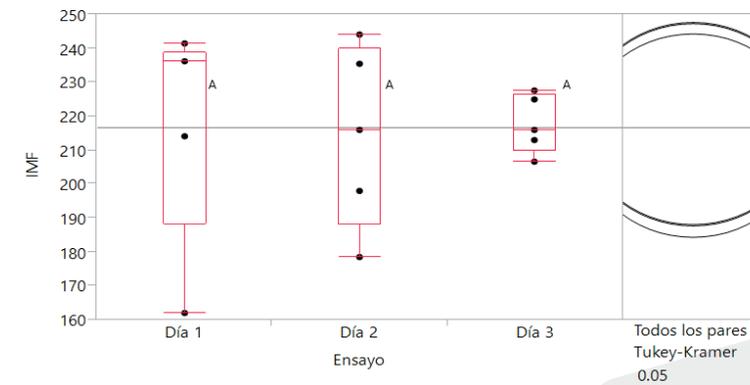


Figura 16. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a Ensayo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos. ($p=0.9705$)

Cuadro 2. Intensidades medias de fluorescencia y promedios para el testigo positivo y negativo de AEC

	AEC					
	Positivo			Negativo		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
	5850.0	6025.5	4811	96.0	99.0	94
	6406.0	6082.0	5636	97.0	102.5	102
	6451.0	6401.5	7206.5	104.5	106.0	105
	7344.0	7251.0	7925	109.0	110.0	107
	7432.5	7637.0	7983	115.0	115.0	125.5
Promedio Grupo	6696.70	6679.40	6712.30	104.30	106.50	106.70
Promedio general	6696.13			105.83		

Cuadro 3. Intensidades medias de fluorescencia y promedios para el testigo positivo y negativo de PTB

	PTB					
	Positivo			Negativo		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
	1208	1087.5	1131	162	178.5	206.5
	1269	1144.5	1162	214	198	213
	1280	1316	1292	236	216	216
	1316.5	1431	1356.5	236	235.5	225
	1329	1441	1444	241.5	244	227.5
Promedio grupo	1280.500	1284.000	1277.100	217.900	214.400	217.600
Promedio General	1280.533			216.633		

Cuadro 4. CV inter-ensayo para AEC

	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	DS	CV	CA
Positivo	6696.70	6679.40	6712.30	6696.13	16.46	0.25	<15%
Negativo	104.30	106.50	106.70	105.83	1.33	1.26	<15%

Cuadro 5. CV inter-ensayo para PTB

	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	DS	CV	CA
Positivo	1280.500	1284.000	1277.100	1280.53	3.450	0.27	<15%
Negativo	217.900	214.400	217.600	216.63	1.940	0.90	<15%

Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

Se determinó que las muestras testigo positiva y negativa para ambas enfermedades mostraron positividad o negatividad después de 6 ciclos de congelación-descongelación comparándolas con su respectivo punto de corte como se muestra en las figuras 17 y 18.

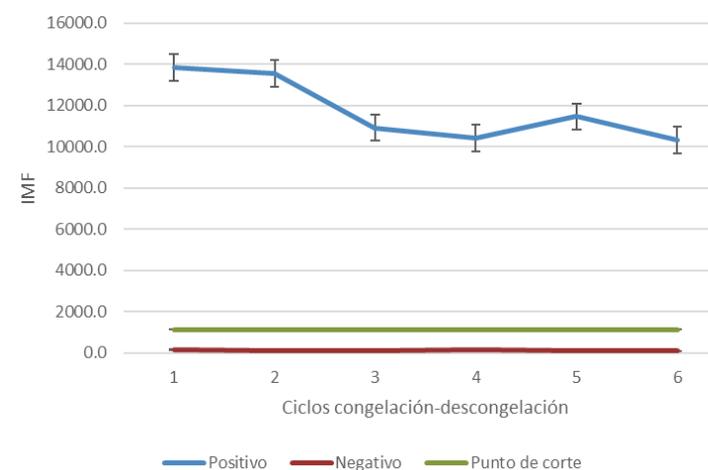


Figura 17. Promedios de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a los ciclos de congelación descongelación para los testigos positivo y negativo de AEC

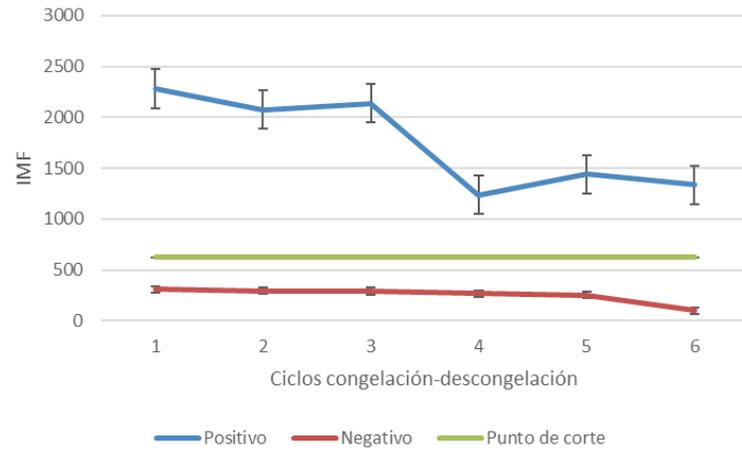


Figura 18. Promedios de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a los ciclos de congelación descongelación para los testigos positivo y negativo de PTB

Además, se evidenció que los datos tenían un comportamiento normal. Se realizó la prueba de ANDEVA con intervalo de confianza del 95% y α de 0.05 y se comprobó con la prueba de Tukey-Kramer.

Para el testigo positivo de AEC no hubo diferencia estadística significativa entre ninguno de los ciclos de congelación descongelación ($P=0.3987$) como se muestra en la figura 19.

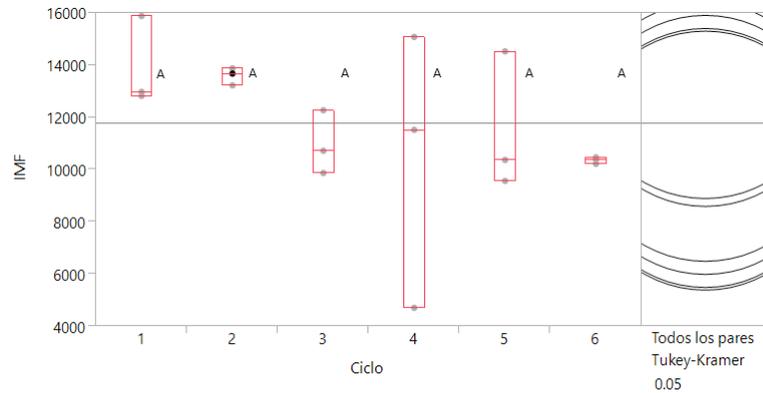


Figura 19. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a ciclo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

El testigo negativo de AEC tuvo diferencia estadística significativa con respecto a los ciclos de congelación descongelación ($P=0.0333$). En la prueba de Tukey-Kramer, se observó que el quinto ciclo fue el que tuvo diferencia comparado con el resto de los grupos como se muestra en la figura 20.

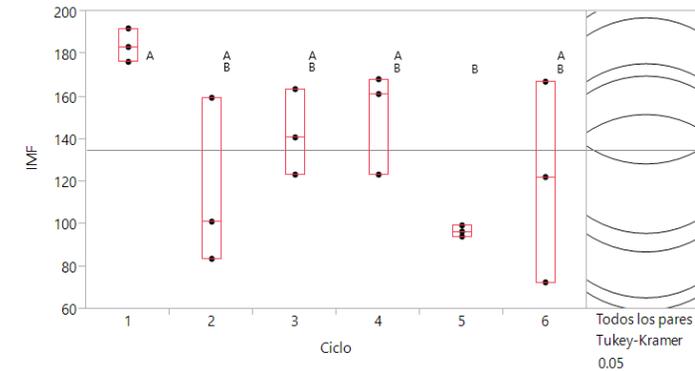


Figura 20. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a ciclo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

En el caso de PTB, al realizar el análisis de varianza para el testigo positivo, se observó diferencia estadística significativa ($P=0.0006$) y en la prueba de Tukey-Kramer se demostró que es el cuarto ciclo el que tiene diferencia estadística con el resto de los grupos como se representa en la figura 21.

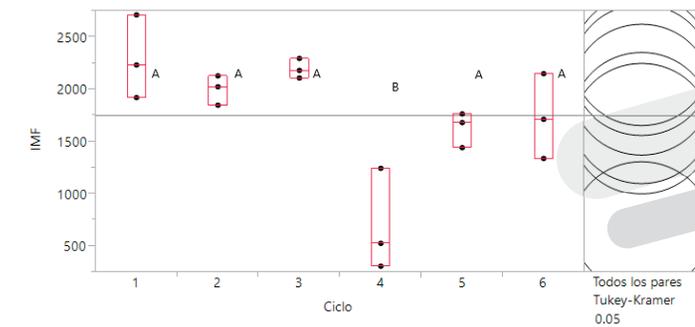


Figura 21. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a ciclo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

El testigo negativo de PTB mostró diferencia estadística significativa ($P=0.0120$) únicamente en el sexto ciclo comparado con el resto de los grupos mostrado en la figura 22.

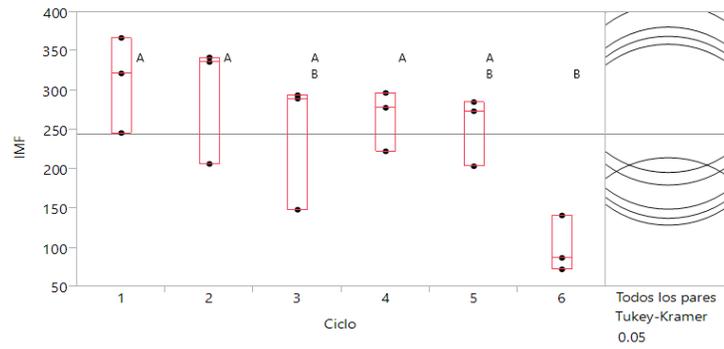


Figura 22. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a ciclo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.





Discusión

EL PRESENTE TRABAJO LOGRÓ POR PRIMERA VEZ el establecimiento de un panel diagnóstico para enfermedades en caprinos (AEC y PTB,) con el sistema LUMINEX, caracterizado por ser una plataforma de diagnóstico múltiple, altamente eficiente para la determinación de varios analitos de manera simultánea, con tiempo de respuesta menor al compararlo con otras técnicas diagnósticas como ELISA, que es capaz de determinar un analito por vez. Así mismo, es una prueba tamiz, que ha demostrado en diferentes estudios, para la determinación de anticuerpos y citocinas en animales (Giavedoni 2005; Clavijo et al. 2006; Chen et al. 2013) y humanos, cumplir con los diferentes parámetros de rendimiento analítico, entre los que se encuentran la reproducibilidad, repetibilidad, rango analítico, especificidad, sensibilidad, límite de detección y además de demostrar ser una prueba confiable y precisa (DuPont et al. 2005; Elshal & McCoy 2006; Lash et al. 2006; Chowdhury et al. 2009; Anderson et al. 2011).

De igual forma, al evaluar las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad según la NOM-177-SSA1-2013 para verificar la precisión del ensayo, se pudo confirmar que el técnico no es un factor que influya en la realización de la prueba. Aunque debe considerarse que el operador sea una persona capacitada en el conocimiento del funcionamiento de un laboratorio de diagnóstico, con un mínimo de riesgos de fallas en la operación técnica, tales como imprecisiones del pipeteo, arrastre de la muestra o de los reactivos. De igual forma, demostrar conocer el manejo de las muestras, la preparación de reactivos, almacenamiento y tiempo de vida de anaquel de muestras y reactivos.

El sistema de determinación múltiple funciona con el principio de unión antígeno-anticuerpo, y a diferencia de otros sistemas de diagnóstico inmunológico en donde la fase de la inmunorreacción ocurre sobre una fase sólida establecida o fija, en esta técnica la reacción

ocurre sobre esferas de poliestireno de 6.5µm lo que produce mayor independencia al realizar el ensayo, y es esta misma característica la que le confiere la capacidad de ser una técnica multiplex, ya que puede haber diferentes tipos de esferas en un mismo pozo que detecten analitos diversos; esto resulta a su vez en mayor eficiencia del uso de la muestra.

Esta técnica puede ser empleada como prueba tamiz para las enfermedades de artritis encefalitis caprina y la paratuberculosis caprina, dos enfermedades importantes por su relevancia en la producción de esta especie, así como por su difícil diagnóstico y falta de tratamientos. En el presente trabajo, se realizó la estandarización y la validación del sistema multiplex de Luminex para detectar estas enfermedades simultáneamente, creando un panel de enfermedades en caprinos y siendo una técnica tamiz de uso rápido para así poder conocer el estatus sanitario de los rebaños caprinos del país.

El ensayo se validó con los parámetros de punto de corte, sensibilidad, precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, también se evaluó la estabilidad de la muestra a ciclos de congelación-descongelación tal como lo establece la NOM-177-SSA1-2013. (Diario-Oficial 2013)

La técnica fue estandarizada y validada utilizando sueros testigos positivos y negativos a estas enfermedades, para AEC fueron determinadas con la técnica ELISA con un kit comercial y para PTB los sueros fueron confirmados por las pruebas de ELISA, IDGA y PCR. En la estandarización de la técnica de manera individual se confirmó la reactividad de los antígenos P16 y PPA-3 de AEC y PTB, respectivamente, con los sueros testigos a ambas enfermedades, lo que demostró que no existe reacción cruzada entre estas. En los ensayos multiplex se debe tener precaución de no crear paneles diagnósticos con enfermedades que pudieran generar reacción cruzada, para esto se deben validar cada una de las enfermedades o analitos de manera independiente con los controles para todas las enfermedades. Los fabricantes de kits comerciales han puesto suficiente cuidado en evitar o minimizar las reacciones cruzadas no esperadas. (Elshal & McCoy 2006)

En la estandarización del método de forma múltiple, se observó buena respuesta de fluorescencia y el equipo fue capaz de discriminar entre una u otra enfermedad en sueros positivos y negativos a ambas enfermedades, confirmando que no hay reacción cruzada entre ellas. Esto coincide con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Clavijo et al. (2006) quien demostró que el sistema Luminex es capaz de discriminar efectivamente

entre dos distintas poblaciones de analitos. Esto se debe a la especificidad demostrada en el ensayo mediante el análisis ROC, la cual fue de 98.89% para AEC y de 100% para PTB.

El acoplamiento tuvo un porcentaje de recuperación del 71 y 73.2% para AEC y PTB, respectivamente, esto se debe a que las esferas se encuentran en suspensiones no homogéneas todo el tiempo, por lo que se pudo haber obtenido un número menor de esferas del esperado (1,250,000) y esto podría resultar en un porcentaje de recuperación menor. Los viales de esferas deben ser mezclados en el vortex durante, al menos, 10 segundos y sonicados al menos otros 10 segundos y agitados durante 15 minutos para evitar acumulos o precipitación de esferas como se describe en el manual del usuario para el acoplamiento de anticuerpos de xMAP (LUMINEX 2011)

El punto de corte se realizó mediante el desarrollo de un análisis y curva ROC el cual es un método estadístico para un sistema de clasificación binario, este análisis tiene la capacidad de proporcionar la razón de verdaderos positivos frente a la razón de falsos positivos, así como un área bajo la curva (Fawcett 2006; Anderson et al. 2011). El punto de corte para AEC resultó en 1149 IMF, el área bajo la curva fue de 0.99 lo que sugiere que la prueba puede detectar hasta en un 99% los casos verdaderos positivos con una sensibilidad y especificidad del 97.78% y 98.89% respectivamente.

Las muestras utilizadas como positivas y negativas de AEC para este estudio, fueron determinadas por el ELISA comercial caprine arthritis-encephalitis virus antibody test kit cELISA del laboratorio VMRD (Silíceo Cantero 2014) con sensibilidad del 100% y especificidad del 99.6 pero la muestra no debe ser diluida como se describe en el instructivo de ensayo (VMRD n.d.). La técnica ELISA no es considerada el estándar de oro para la determinación de AEC por lo que algunas muestras pudieron ser diagnosticadas erróneamente. El luminex demostró ser una prueba más sensible al poder diluir las muestras hasta 1/200 sin diferencia estadística significativa entre los datos, por lo que es capaz de detectar verdaderos positivos con una menor concentración del analito en la muestra. (Elshal & McCoy 2006)

En el caso de PTB el punto de corte fue de 623.5 IMF y el área bajo la curva fue de 1 con una sensibilidad y especificidad del 100%, por lo que se puede decir que la prueba detecta al 100% de casos verdaderos positivos. Este valor se debe tomar con cautela ya que solo se analizaron 11 datos positivos y 11 datos negativos, debido a la dificultad de obtener sueros verdaderamente positivos a la enfermedad por lo que el análisis puede tener un sesgo.

La sensibilidad del ensayo se determinó como la cantidad mínima detectable del analito estudiado, para esto se realizaron diluciones de los testigos positivos y negativos para observar el comportamiento de estos. El sistema puede determinar al testigo positivo de AEC y testigos negativos de ambas enfermedades en una dilución de hasta 1/1000 y para el testigo positivo de PTB la dilución máxima donde se detectó positividad, por encima del punto de corte fue de 1/500.

En la prueba de ANDEVA, en la que se determina si hay diferencia o igualdad de las medias entre los grupos expuestos al mismo factor, en este caso, grado de dilución, se estableció que para el control positivo de AEC no hubo diferencia entre los grupos con respecto al factor de dilución, en tanto que el testigo negativo mostró diferencia después de la dilución 1/20 con el resto de los grupos. Para el testigo positivo de PTB hubo diferencia estadística significativa a partir de la dilución 1/500, esto se observa en la figura 10 como una caída abrupta de la intensidad media de fluorescencia reportada. Con respecto al testigo negativo de PTB también mostró diferencia después de la dilución 1/20.

En el caso de los testigos positivos, se demuestra de esta forma, que la muestra puede ser diluida hasta 1/1000 para AEC sin que difiera el resultado por efecto de dilución, en el caso de PTB, aunque se demuestra positividad aún con la dilución 1/500, el análisis estadístico demuestra que los datos para este grado de dilución si tienen diferencia con las diluciones iniciales, por lo que se recomienda utilizar como máximo la dilución 1/200, en la que los datos no tienen variaciones por efecto de dilución. Para los testigos negativos, todas las diluciones presentan diferencia significativa comparado con la dilución 1/20, esto se puede deber a factores presentes en el suero que produzcan interferencia. En el estudio de Shang et al. (2017) se demuestra que los anticuerpos con mayor afinidad por su antígeno, pueden tener un mayor grado de dilución. Las muestras positivas muestran una mayor afinidad al tener una mayor dilución en comparación con aquellas muestras que se diluyeron menos. En cambio, las muestras negativas tienen una menor respuesta analítica a mayor grado de dilución, por efecto de minimizar los factores que producen interferencia propios del suero.

El ensayo se realizó con dilución de 1/100 para todas las muestras, esto fue porque el sistema al ser multiplex, necesita las mismas condiciones de ensayo para todos los analitos. Aunque después de la dilución 1/100 se muestra positividad o negatividad en las muestras correspondientes, se nota una caída en los niveles de intensidades medias de fluorescencia.

En el trabajo de Anderson et al. (2011) se demuestra que la muestra para la determinación de diferentes enfermedades en bovinos mediante la búsqueda de anticuerpos, puede ser diluida hasta 1/8100 encontrando aún valores positivos, por encima del punto de corte.

La precisión se evaluó en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad siguiendo los criterios de la NOM-177-SSA1-2013, en la que se describen los métodos para la validación de métodos analíticos, y en donde se señala que, para los sistemas diagnósticos inmunológicos, los coeficientes de variación para aceptar la repetibilidad y reproducibilidad del ensayo deben ser menores al 20%, en este ensayo, la repetibilidad demostró CV de 10.86% y 5.88% para los testigos positivo y negativo de AEC. Así mismo, los CV para PTB fueron de 12.64% y 12.52% para los testigos positivo y negativo. En lo referente a reproducibilidad para AEC, el testigo positivo tuvo un CV de 0.25% y el negativo fue de 1.26%, para el caso de PTB fueron de 0.27% y 0.9% los CV para el testigo positivo y negativo. Con toda esta evidencia, se demuestra que, según los criterios de la norma, la prueba es altamente precisa en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, por lo que el ensayo es confiable a realizarse de la misma manera para estas dos enfermedades.

Además, se realizó una prueba de ANDEVA en la que se demostró que los datos no tenían diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) para ningún testigo, positivo o negativo, de ambas enfermedades en los tres ensayos analizados.

Una vez validado el sistema, sabiendo que es una técnica altamente sensible, y con altos parámetros de repetibilidad y reproducibilidad, se probó la estabilidad de la muestra a ciclos de congelación-descongelación para comprobar que el analito a estudiar es constante. La muestra al ser sometida a 6 ciclos de congelación descongelación para los testigos positivo y negativo de ambas enfermedades mostró buena reactividad en el ensayo, al no decrecer de manera abrupta las intensidades medias de fluorescencia. En el estudio de Boadella & Gortázar (2011) sugieren, como medida preventiva, no reutilizar la muestra después de tres ciclos de congelación descongelación, aunque los niveles de anticuerpos presentes en la muestra no disminuyen drásticamente. En la prueba de ANDEVA se obtuvo diferencia estadística ($P < 0.05$) para el testigo positivo de PTB y negativo de ambas enfermedades en un solo ciclo con respecto al resto de grupos. Esto pudo deberse a variaciones en el ensayo, ya que los últimos ciclos no muestran diferencia significativa con el primer ciclo, excepto para el testigo negativo de PTB, en el cual la muestra resultó no ser estable en el sexto ciclo. El testigo positivo de AEC no tuvo diferencia estadística ($P > 0.05$) entre ninguno de los grupos.

Las enfermedades utilizadas para este trabajo fueron seleccionadas por su difícil diagnóstico y para ser empleadas como modelo para la estandarización y validación de la técnica, sin embargo, estas enfermedades son sólo el inicio de un panel diagnóstico para diferentes patologías en caprinos, entre las que se pretende incluir a la brucelosis y herpesvirus caprino, entre otras.

Al mismo tiempo, sería importante continuar este estudio incluyendo un mayor número de muestras a las que se les haya realizado la prueba de oro (en ambas enfermedades esta podría ser una PCR, ya que el aislamiento es difícil). Esto le daría un mayor valor diagnóstico a la prueba de luminex.

El presente trabajo es el primero en demostrar que el sistema luminex es una técnica buena y confiable para la determinación de enfermedades de caprinos (AEC y PTB) con altos índices de precisión en condiciones de reproducibilidad y repetibilidad. De igual forma se observa que es una técnica con alta sensibilidad, elevada capacidad de eficiencia de la muestra al utilizar bajos volúmenes de esta (5µl de suero), además de que se pueden determinar múltiples analitos en el mismo tiempo que otras técnicas diagnósticas monoplex como ELISA y por ende hay una reducción de costos. La técnica ha demostrado ser eficiente y tiene la capacidad para soportar un panel de hasta cien analitos diferentes y por ello es candidata a ser una prueba para detección de múltiples enfermedades.





Conclusión

LOS ANTÍGENOS P16 DE AEC Y PPA-3 DE PTB FUERON RECONOCIDOS por sueros de cabras positivas a estas enfermedades mediante el sistema LUMINEX y considerando los parámetros de punto de corte, sensibilidad, y precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, la técnica multiplex de Luminex, fue válida y confiable para determinar artritis encefalitis caprina y paratuberculosis caprina, en tanto que la muestra demostró ser estable a ciclos de congelación-descongelación.



Anexo 1. Soluciones

ELISA

Solución de lavado:

Cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker, 3624-05) 1.5M	17.58g
Tween 20 (Sigma, P1379) 0.5%1 ml
Cbp agua destilada	200ml

Solución amortiguadora de carbonatos 0.05M pH 9.6

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) (J.T. Baker, 3602)	0.795g
Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) (J.T. Baker, 3506)	1.46 g
Azida de Na (NaN_3) (Sigma, S2002)0.1 g
Cbp agua destilada	500 ml

Ajustar pH con NaOH

Solución amortiguadora de fosfatos salinos 0.1M pH 7.0

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) (J.T. Baker, 3818-01) 0.2M	5.421g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) (J.T. Baker, 3828-01) 0.2M	8.662g
Cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker, 3624-05)	4.35g
Cbp agua destilada	500 ml

Ajustar pH con NaOH y luego

Agregar Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, A2153). 0.5g

Solución amortiguadora de citratos pH 6.0

Ácido cítrico (Sigma, C0759)4.8g
Cbp agua destilada	500ml

Sustrato (TMB)

Preparar: 0.0025 g TMB diluido en 250 μl DMSO

Tomar 125 μl de la solución anterior y agregar a

12.5 ml solución de conjugado o citratos

2.5 μl Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Sigma, 216763) 30%

NOTA: Almacenar en refrigeración excepto solución de lavado (a temperatura ambiente).

Las soluciones tienen un mes de caducidad.

ACOPLAMIENTO

MES (Sigma, M3671) 1X = 100mM pH6.0

EDC (Thermo scientific, 22980) 50mg/ml en MES 100mM pH 6.0

Almacenar a -20°C

S-NHS (Thermo scientific, 24510) 50mg/ml en MES 100mM pH 6.0

ENSAYO LUMINEX

PBS pH7.4 10mM (Sigma, P3813) en 1L de agua destilada

Solución de bloqueo

PBS 10mM	100ml
NaN_3	0.05g
BSA	1g

PBS-TWEEN PH 7.4

PBS 10mM	1000ml
Tween20 0.05%	500 μl

Anexo 2. Cuadros y figuras

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

Figura 2. A) Estructura de la pared de las micobacterias. Membrana celular, Peptidoglicano, LAM: Lipoarabinomanano, Complejo ácido micólico-arabinogalactano, PGLs: glicolipidos fenolicos; GPLs=glicopeptidolipidos; LOSs=lipooligosacaridos. Tomado de Lipooligosaccharides from Mycobacteria: Structure, Function, and Synthesis. (Bai et al. 2015). B) Representación circular del genoma de la cepa K-10 de *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*. Desde el interior: flecha roja: operón rRNA; Histograma púrpura oscuro: contenido de GC; Histograma multicolor: MAP ORF codificados según clasificación funcional; Flechas negras: 45 ARNt; Círculo exterior: escala. Tomado de The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. (Li et al. 2005)

Figura 3. Distribución de las muestras negativas con respecto de las positivas para artritis encefalitis caprina

Figura 4. Distribución de las muestras negativas con respecto de las positivas para paratuberculosis caprina

Figura 5. Curva ROC. Artritis encefalitis caprina. Área bajo la curva: 0.99

Figura 6. Curva ROC. Paratuberculosis caprina. Área bajo la curva: 1

Figura 7. Análisis univariante de Intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Figura 8. Análisis univariante de Intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Figura 9. Análisis univariante de Intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Figura 10. Análisis univariante de Intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Figura 11. Promedios de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución de los testigos positivos y negativos para AEC comparados con el punto de corte

Figura 12. Promedios de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a dilución de los testigos positivos y negativos para PTB comparados con el punto de corte

Figura 13. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a Ensayo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos. (p=0.9987)

Figura 14. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a Ensayo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos. (p=0.8955)

Figura 15. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a Ensayo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos. (p=0.9961)

Figura 16. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a Ensayo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos. (p=0.9705)

Figura 17. Promedios de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a los ciclos de congelación descongelación para los testigos positivo y negativo de AEC

Figura 18. Promedios de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a los ciclos de congelación descongelación para los testigos positivo y negativo de PTB

Figura 19. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a ciclo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Figura 20. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a ciclo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de AEC. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Figura 21. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a ciclo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo positivo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Figura 22. Análisis univariante de intensidades medias de fluorescencia (IMF) con respecto a ciclo y comparación de todas las medias mediante la prueba de Tukey-Kramer para el testigo negativo de PTB. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente distintos.

Cuadro 1. Intensidades medias de fluorescencia para los testigos positivo y negativo de AEC y PTB. Coeficiente de variación intra-ensayo

Cuadro 2. Intensidades medias de fluorescencia y promedios para el testigo positivo y negativo de AEC

Cuadro 3. Intensidades medias de fluorescencia y promedios para el testigo positivo y negativo de PTB

Cuadro 4. CV inter-ensayo para AEC

Cuadro 5. CV inter-ensayo para PTB



Referencias

- Anderson, S. et al., 2011. Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection method. *Journal of Immunological Methods*, 366(1–2), pp.79–88. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.010>.
- Angelidou, E., Kostoulas, P. & Leontides, L., 2014. Flock-level factors associated with the risk of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) infection in Greek dairy goat flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(1), pp.233–241. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587714002918>.
- Arechiga F, C. et al., 2008. Role and perspectives of goat production in a global world. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9, pp.1–14.
- Bai, B., Chu, C.J. & Lowary, T.L., 2015. Lipooligosaccharides from mycobacteria: Structure, function, and synthesis. *Israel Journal of Chemistry*, 55(3–4), pp.360–372.
- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(3), pp.259–269. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.003>.
- Boadella, M. & Gortázar, C., 2011. Effect of haemolysis and repeated freeze-thawing cycles on wild boar serum antibody testing by ELISA. *BMC Research Notes*, 4(1), pp.498–501. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3226466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brogden, K.A. et al., 2000. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* Third edit., Washington, D.C.: ASM Press.
- Burtis, C.A. & Brunis, D.E., 2015. *TIETZ Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* Seventh Ed., St. Louis, Missouri: Elsevier.

Chen, T.H. et al., 2013. Development of a Luminex assay for the detection of swine antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Immunological Methods*, 396(1–2), pp.87–95.

Chowdhury, F., Williams, A. & Johnson, P., 2009. Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex?? and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. *Journal of Immunological Methods*, 340(1), pp.55–64. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2008.10.002>.

Clavijo, A. et al., 2006. Simultaneous detection of antibodies to foot-and-mouth disease non-structural proteins 3ABC, 3D, 3A and 3B by a multiplexed Luminex assay to differentiate infected from vaccinated cattle. *Vaccine*, 24(10), pp.1693–1704.

CONASA, 2011. Encuentro sobre el Diagnóstico de las Principales Enfermedades de los Caprinos. , pp.1–16.

Costanzo, G. et al., 2012. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Veterinary Microbiology*, 156(1–2), pp.183–188.

Daltabuit Test, M. et al., 1999. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 63(3), pp.212–215.

Diario-Oficial, 2013. NOM-177-SSA1-2013.

DuPont, N.C. et al., 2005. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: Determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *Journal of Reproductive Immunology*, 66(2), pp.175–191.

Elshal, M.F. & McCoy, J.P., 2006. Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 38(4), pp.317–323.

Estévez-Denaives, I. et al., 2007. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in goat and sheep flocks in Mexico. *Small Ruminant Research*, 72(2–3), pp.209–213.

Fawcett, T., 2006. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*, 27(6), pp.861–874.

Fernández-Silva, J.A., Correa-Valencia, N.M. & Ramírez, N.F., 2014. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Tropical Animal Health and Production*, 46(8), pp.1321–1340. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11250-014-0656-8>.

Fiorentino, M. a. et al., 2012. First isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in a dairy goat in Argentina: Pathology and molecular characterization. *Small Ruminant Research*, 108(1–3), pp.133–136. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.06.010>.

Giavedoni, L.D., 2005. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. *Journal of Immunological Methods*, 301(1–2), pp.89–101.

Grego, E. et al., 2005. Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 106(3–4), pp.179–185.

Guerra, M.M.P. et al., 2011. Goat reproductive biotechnology in Brazil. *Small Ruminant Research*, 98(1–3), pp.157–163. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.03.033>.

Guerrero Cruz, M., 2010. La caprinocultura en México, una estrategia de desarrollo. *Revista Universitaria Digital de Ciencias Sociales*, 1(1), pp.1–8.

Haenlein, G.F.W., 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), pp.155–163.

Hernández Ruiz, S.G. et al., 2011. Estudio Epidemiológico de la Artritis-Encefalitis Caprina en Municipios de la Zona Centro de Veracruz. , pp.491–494.

Kaba, J. et al., 2012. Role Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) Infection in The Occurrence of Particular Clinical Symptoms in Adult Goats. *Veterinary Medicine/ Clinical sciences*.

Kheirandish, R., Tafti, a. K. & Hosseini, a., 2009. Classification of lesions and comparison of immunohistochemical and acid fast staining in diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. *Small Ruminant Research*, 87(1–3), pp.81–85.

Lash, G.E. et al., 2006. Comparison of three multiplex cytokine analysis systems: Luminex, SearchLight™ and FAST Quant®. *Journal of Immunological Methods*, 309(1–2), pp.205–208.

Leitner, G. et al., 2010. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Veterinary Journal*, 183(3), pp.328–331. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.12.001>.

Li, L. et al., 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *PNAS*, 102(35), pp.12344–12349. Available at: <http://www.pnas.org/content/102/35/12344.full.pdf> [Accessed April 5, 2017].

LUMINEX, 2011. Antibody Coupling Kit User Manual.

LUMINEX, 2017. *Luminex® 200™*,

Martínez-Navalón, B. et al., 2013. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 197(2), pp.311–317. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384438>.

Nazara, S. de J. et al., 1985. Estudio Serológico de la Artritis Encefalitis Caprina en México. *Técnica Pecuaria México*, pp.98–101.

Nord, K. et al., 1998. Prevalence of antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus in goat herds in Norway. *Small Ruminant Research*, 28(2), pp.115–121.

OIE, 2008. Artritis/Encefalitis Caprina y Maedi-Visna. In *Manual Terrestre de la OIE*. pp. 1070–1079. Available at: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.07.03-04_Artritis-Encefalitis_caprina_y_Maedi_Visna.pdf.

OIE, 2014. Paratuberculosis (Enfermedad de Johne). In *Manual Terrestre de la OIE*. pp. 1–17. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf.

Paramio, M.-T. & Izquierdo, D., 2014. Assisted reproduction technologies in goats. *Small Ruminant Research*, 121(1), pp.1–6. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448814000285>.

Ramírez, H. et al., 2011. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *Veterinary Journal*, 190(1), pp.169–172.

Ray, C. a. et al., 2005. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(5), pp.1037–1044.

Reséndiz Martínez, R. et al., 2002. Estudio clínico y serológico de la artritis encefalitis caprina en el estado de Puebla, México. *Revista producción animal*, 14(2), pp.53–55.

Ribeiro, a. C. & Ribeiro, S.D. a, 2010. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*, 89(2–3), pp.225–233. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.048>.

Robbe-Austerman, S., 2011. Control of paratuberculosis in small ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 27(3), pp.609–620. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072011000491> [Accessed August 28, 2015].

SENASICA, 2013. CENASA aprueba los ensayos de aptitud con Inglaterra | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | Gobierno | gob.mx. Available at: <http://www.gob.mx/senasica/prensa/cenasa-aprueba-los-ensayos-de-aptitud-con-inglesa> [Accessed April 5, 2017].

Shang, C., Wang, Z. & Liu, H., 2017. A terminal antibody method based on multiple factors that influence ELISA results for measurement of antibody affinity in clinical specimens. *Journal of Virological Methods*, 240, pp.42–48.

SIAP-SAGARPA, 2015. Resumen Nacional. Available at: http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/ResumenNacional.do?jsessionid=2541121F3D6915765CD22BF533768B15 [Accessed April 25, 2017].

Silíceo Cantero, I.J., 2014. *Evaluación de la proteína recombinante p16 del virus de artritis encefalitis caprina para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sohal, J.S. et al., 2008. Immunology of mycobacterial infections: With special reference to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Immunobiology*, 213(7), pp.585–598.

Sweeney, R.W., 2011. Pathogenesis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27(3), pp.537–546. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001>.

VMRD, *Small ruminant lentivirus antibody test kit, cELISA*, Available at: www.vmr.com [Accessed March 29, 2017].

Wisconsin, U. of, 2016. Johne's information center. *General Biology of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*. Available at: <http://www.johnes.org/biology/general.html#2> [Accessed January 10, 2017].

Vázquez Franco, N.C. & Ducoing Watty, A.E., 2011. Identificación de Lentivirus de Pequeños Rumiantes genotipo B1 y desarrollo de herramientas moleculares para su diagnóstico. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.

Este documento titulado,
*Estandarización, evaluación y validación
de la técnica MULTIPLEX de LUMINEX
para la determinación de artritis
encefalitis caprina y paratuberculosis caprina,*
fue escrito por Héctor Daniel Nájera Rivera
para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista,
por parte de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVYZ),
perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este libro fue impreso en la CDMX
en algún momento del año 2017.

