



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Uso de la técnica de ELISA indirecta basada en péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina

T E S I S

Para obtener el título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Carlos Morales González

Asesor:

Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez

Co-asesor:

Dr. Hugo Ramírez Álvarez

Cuautilán Izcalli, Estado de México. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES CUAUTITLÁN.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Uso de la técnica de ELISA indirecta basada en péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina

Que presenta el pasante: **CARLOS MORALES GONZÁLEZ**

Con número de cuenta: **30231029-8** para obtener el Título de la carrera: **Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Julio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	M.V.Z. José Antonio Licea Vega	
SECRETARIO	M. en C. Gerardo Arcila López Tello	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Alma Noemi Montes de Oca Chávez	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Wilfrido Ramírez Valadez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Dedicatoria

Agradezco el apoyo de mi familia, a mi padre Carlos a mi madre Margarita que con su paciencia, consejos y amor hicieron posible la realización de este trabajo los quiero mucho, a mi hermana Estrellita y mi cuñado Lalo que me mostraron como seguir adelante y no quedarme atrás.

A mis profesores que con sus conocimientos y consejos conseguí realizar este trabajo, al doctor Humberto quien me aconsejo y me sigue aconsejando lo mejor para mí, al doctor Hugo quien estuvo al pendiente de mi trabajo y me ayudo a terminar, a la maestra Martha que me enseñó de la mejor manera los procedimientos de laboratorio con el cuidado y delicadeza que se requiere para las técnicas, a los demás profesores del laboratorio de Virología Fito, Gerardo Alma, Yesi, Marce, Lulú que siempre me brindaron su confianza, consejos y experiencia e hicieron que estar en el laboratorio de Virología sea una gran experiencia.

A mis amigos que durante la carrera estuvieron siempre conmigo, a Eloy, José Luis (Panque), Octavio (Tavito), Liz que hicieron muy agradable el ir a la FESC y estuvieron conmigo en momentos importantes.

Al módulo de equinos por proporcionarme el apoyo para la realización de este trabajo con muestras de equinos, a la maestra Ana María y la maestra Elizabeth quienes están a cargo del módulo y me facilitaron la obtención de las muestras de los animales y que también me animaban a seguir adelante hasta terminar este trabajo.

Y por último a todas las personas que me permitieron tomar muestras de sus caballos y realizar esta tesis.

Índice

1. Introducción	4
1.1. Definición de la enfermedad	4
1.2. Sinónimos de la enfermedad	4
1.3. Historia de la enfermedad	4
1.4. Etiología	5
1.5. Características del virus	5
1.6. Replicación viral	6
1.7. Patogenia	9
1.8. Patología clínica	11
1.9. Signos clínicos	11
1.10. Transmisión	12
1.11. Diagnóstico clínico	14
1.12. Diagnóstico de laboratorio	14
1.13. Diagnóstico diferencial	17
1.14. Prevención y control	17
1.14.1. Medidas protectoras en territorios limpios	18
1.14.2. Medidas en territorios con la enfermedad enzoótica	19
1.14.3. Procedimientos en predios rurales	20
1.14.4. Medidas para los ingresos	20
1.14.5. Procedimientos en los eventos hípicas	21
1.14.6. Procedimientos en las ferias	21
1.15. Desinfección	22
1.16. Situación de la enfermedad de AIE en México	22
1.17. Vacunación	26
1.18. Problemas de salud pública	26
1.20. Historia de los péptidos sintéticos	27
1.21. Diseño de los péptidos sintéticos	28
1.22. Glicoproteína gp90	32
1.23. Unión de los péptidos	36
2. Justificación	37

3. Hipótesis	38
4. Objetivos	39
4.1. General	39
4.2. Particulares	39
5. Material y métodos	40
5.1. Muestreo	40
5.2. Diseño del péptido sintético	40
5.3. Técnica de ELISA indirecta	43
5.4. Técnica de Inmunodifusión en Gel de Agar (Coggins)	44
6. Resultados	45
7. Discusión	50
8. Conclusiones	54
9. Apéndice	55
10. Bibliografía	56

Índice de figuras

Figura 1. Figura donde se muestra la interpretación gráfica del Virus de la Anemia Infecciosa Equina y sus principales proteínas. _____	5
Figura 2. Figura que muestra los principales genes de los retrovirus. _____	6
Figura 3. Esquema representativo de la replicación viral desde la entrada del virus a la célula hasta la salida. _____	9
Figura 4. En esta figura se puede apreciar las diferentes formas de transmisión del Virus de Anemia Infecciosa Equina. _____	14
Figura 5. Mapa de la República Mexicana donde se muestra el porcentaje de seropositividad encontrado en diferentes estudios que identifican la infección del virus de Anemia Infecciosa Equina. _____	24
Figura 6. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína Gp90 de Virus de Anemia Infecciosa Equina disponibles en el GenBank. _____	42
Figura 7. Se observa la placa de ELISA de péptidos donde las columnas 1, 4, 7 y 10 son pozos de referencia (no se adicionó antígeno) y cada muestra se trabajó por triplicado. Ejemplo A1, A2 y A3 suero control negativo y B1, B2 y B3 suero control positivo, El tono azul evidencia una reacción positiva. _____	45
Figura 8. En esta figura se observa un ejemplo de los resultados en la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar, donde hay 7 pozos, uno central y seis periféricos, en uno de los pozos periféricos se adicionó el suero control positivo y entre el pozo central (antígeno) se visualiza una línea de identidad. _____	47
Figura 9. Mapa de la república Mexicana donde se indica el Estado y el número de muestras evaluadas (n=140). _____	49

Índice de tablas

Tabla 1. Pruebas comerciales donde se muestra que la base de su diseño es la detección de anticuerpos contra la proteína P26. _____	16
Tabla 2. Reporte histórico de equinos evaluado para la identificación del Virus de la Anemia Infecciosa Equina en distintos lugares del país. _____	25
Tabla 3. Número de pruebas realizadas para la detección de Anemia Infecciosa Equina anualmente en algunos países. _____	27
Tabla 4. Diferentes características de los péptidos sintéticos. _____	29
Tabla 5. Enfermedades diagnosticadas usando péptidos sintéticos. _____	31
Tabla 6. Trabajos realizados utilizando péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos contra el Virus de Anemia Infecciosa Equina. _____	35
Tabla 7. Densidades ópticas obtenidas en muestras de sueros de equinos evaluados en la prueba de ELISA de péptidos para identificar anticuerpos contra el VAIE. _____	46
Tabla 8. Resultados obtenidos en diferentes técnicas para la detección de anticuerpos contra el Virus de Anemia Infecciosa Equina. _____	47
Tabla 9. Muestras seropositivas al virus de anemia infecciosa equina evaluados con un ELISA de péptidos, mostrados según región geográfica, fin zootécnico, sexo, edad y raza	48

Resumen

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es una enfermedad infecto-contagiosa retroviral de los équidos, se caracteriza por generar signos clínicos agudos y/o crónicos recurrentes. El diagnóstico de la enfermedad se realiza rutinariamente con la técnica de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) la cual es la prueba oficial en el pasaporte internacional, cuya técnica está basada para detectar anticuerpos contra la proteína P26 de la cápside del virus. Se ha comprobado que la técnica de ELISA es más sensible, por lo que en el presente estudio se optó por diseñar un péptido sintético derivado de la región de superficie del virus de AIE; Dicha región se expone en el momento de la infección del virus al sistema inmunológico y por lo cual es posible la generación de anticuerpos específicos en etapas tempranas. Estos péptidos fueron diseñados basados en epítomos lineales inmunodominantes de la proteína Gp90 de la envoltura viral. El objetivo del estudio fue el diseño de un péptido sintético para utilizarse como antígeno en una prueba de ELISA indirecta (ELISAI) que detecte anticuerpos contra el virus de AIE en plasmas de equinos. Para el diseño del péptido se utilizaron programas bioinformáticos y se consultaron bases de datos tales como: GenBank, BioEdit y Antibody Epitope Prediction utilizando el algoritmo Kolaskar y Tongaonkar antigenicity. Los resultados obtenidos con el ELISAI estandarizado fue que de un total de 140 muestras de plasmas de equinos se identificaron 15 muestras seropositivas (10.71%) que fueron evaluadas también con la prueba de Coggins para comparar los resultados y en esta última prueba ninguno de los 15 positivos a ELISAI se confirmó.

1. Introducción

1.1. Definición de la enfermedad

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es una enfermedad retroviral de los équidos (burros, mulas, burdéganos, cebras y cebroides) que se caracteriza por signos clínicos agudos y/o crónicos recurrentes, que pueden incluir fiebre, anemia, edema y caquexia en algunos animales. Muchos caballos presentan signos leves o inaparentes en una primera exposición y son portadores subclínicos del virus. Es probable que los propietarios no se den cuenta de infección de sus animales, a menos que se realicen pruebas diagnósticas. Todos los caballos infectados, incluidos los asintomáticos, se convierten en portadores y son fuente de infección durante toda su vida. Los animales infectados deben ser sacrificados o deben permanecer aislados permanentemente de los otros équidos para evitar la transmisión (Blaha, 1995; OIE, 2009; Augusto, 2014).

1.2. Sinónimos de la enfermedad

La enfermedad tiene como sinónimo principal fiebre de los pantanos, pero también se conocen: sida equino, fiebre malaria, malaria equina, fiebre de la montaña, fiebre lenta, fiebre baja, fiebre tifoidea de los caballos, anemia perniciosa de los equinos, zurra americana (Blaha, 1995; Leroux, 2004).

1.3. Historia de la enfermedad

La AIE fue descrita por primera vez en Francia por Ligné en 1843. Posteriormente en 1904, Carré y Vallé atribuyeron su origen a un “agente filtrable”, tal como eran denominados los virus a principios de siglo XX, este hallazgo contribuyó a dilucidar la causa de la AIE, siendo ésta la primera enfermedad en ser descubierta que era ocasionada por un agente viral. Años más tarde fue el primer retrovirus identificado dentro de la subfamilia de los lentivirus (Clements y Zink, 1996; Leroux y cols., 2004).

1.4. Etiología

El virus causal de la AIE pertenece a la familia: *Retroviridae*, subfamilia: *Orthoretrovirinae*, género: *Lentivirus*. Son virus ARN envueltos, con cápside icosaédrica. El Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) posee la habilidad de transcribir ADN a partir de ARN viral, mediante la enzima transcriptasa reversa (polimerasa de ADN dependiente de ARN), ver figura 1. Este retrovirus de equinos está incluido en el género *lentivirus* los cuales se caracterizan por generar infecciones de evolución lenta con largos períodos asintomáticos. Por otra parte, los lentivirus infectan monocitos y/o linfocitos, los que al madurar o activarse en tejidos activan su replicación en los órganos afectados (Fidalgo, 2003; Soutullo, 2008).

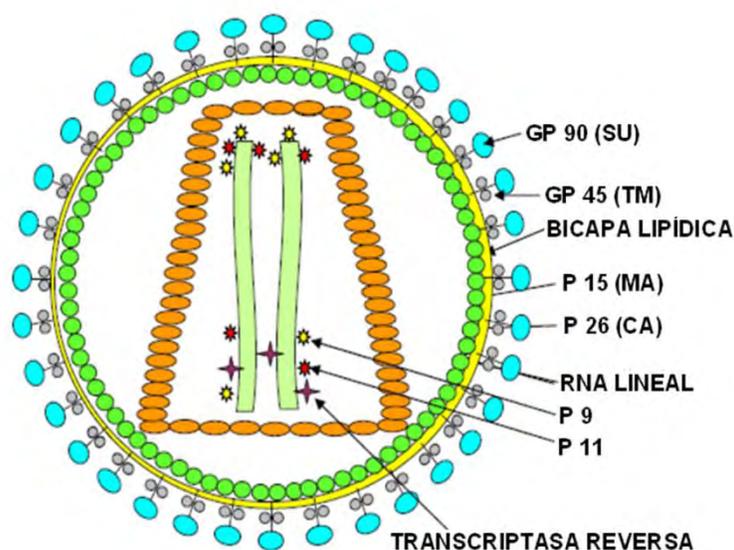


Figura 1. Figura donde se muestra la interpretación gráfica del Virus de la Anemia Infecciosa Equina y sus principales proteínas (Soutullo, 2001).

1.5. Características del virus

Visto al microscopio electrónico el VAIE es de forma oval con un diámetro de 100 nm, presentando 72 espículas (6-8 nm) en su superficie. Cada espícula, denominada peplómero (peplo=envoltura), está compuesta por dos glicoproteínas oligoméricas, gp90, denominada proteína de superficie (SU) y gp45, denominada proteína de transmembrana (TM), ambas están insertas en una bicapa lipídica derivada de las membranas de las células infectadas.

Estas proteínas son responsables de la adherencia viral a la membrana citoplasmática de las células huésped (Fidalgo, 2003).

En la superficie interna de la envoltura viral subyacente y en íntimo contacto con la bicapa lipídica, se encuentra una fosfoproteína periférica de la nucleocápside, denominada p15 o antígeno de matriz (MA), que participa en los estadios iniciales del ciclo de replicación. Esta proteína envuelve al núcleo, constituido por el genoma viral encapsidado por la proteína estructural de la cápside, p26 o antígeno de la cápside (CA) (Grund y cols., 1994; Birkett y cols., 1997; Leroux y cols., 2004; Chen y cols., 2007).

En su interior se encuentran las proteínas estructurales internas (nucleoproteínas), tales como la proteína básica p11, que se une al ácido nucleico, y la proteína ácida p9, única en los lentivirus, además de la proteína enzimática retrotranscriptasa reversa (RTasa) (Clements y Zink, 1996; Murphy y cols., 1999).

El genoma viral está constituido por dos subunidades de ARN lineales asociadas a la enzima transcriptasa reversa. Esta enzima presenta cuatro actividades diferentes: ADN polimerasa dependiente de ARN, ADN polimerasa dependiente de ADN, integrasa y ARNasa. Cada molécula de ARN consta de tres genes principales, ver figura 2, en sentido 5'-3': *gag* (antígeno específico de grupo), *pol* (polimerasa) y *env* (envoltura) (Beisel, 1993; Soutullo, 2008).

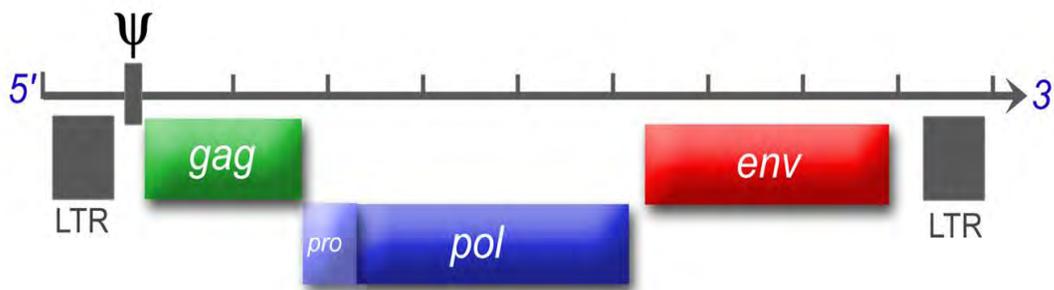


Figura 2. Figura que muestra los principales genes de los retrovirus (Belshan, 2001).

1.6. Replicación viral

Se ha demostrado en numerosas infecciones experimentales que el virus infecta y se replica principalmente en macrófagos tisulares, por lo que estará presente en todos los órganos

durante la fase aguda, donde la replicación es activa. Cuando ésta se encuentra restringida, durante las fases subclínicas, el virus continúa replicándose en menor medida preferentemente en macrófagos de bazo, hígado, pulmones, linfonodos y riñón. *In vivo* se ha detectado que el virus también es capaz de infectar células endoteliales y renales, además de replicarse en cultivos primarios de monocitos sanguíneos, puede hacerlo en células dendríticas y fibroblastos dérmicos de los equinos (Leroux y cols., 2004; Rivera y McGuire, 2005).

El VAIE ingresa a la célula huésped por un mecanismo de fusión donde las glicoproteínas de superficie interactúan con el receptor celular. Si bien éste aún no ha sido perfectamente definido, estudios realizados por Zhang y colaboradores, describieron a un receptor ELR1 (Equine Lentivirus Receptor 1) presente, en niveles elevados, en células susceptibles a la infección viral (Zhang y cols., 2005).

Uno de los mecanismos de fusión propuesto sostiene que cuando la proteína Gp90 se une al ELR1, habría cambios conformacionales en la proteína Gp45, que permite la fusión del virus con la membrana citoplasmática de la célula a infectar (Flint y cols., 2000).

Cuando el virus entra a la célula es parcialmente descubierto y liberando el genoma en el citoplasma de la célula huésped. El ARN viral es copiado, a través de la transcriptasa reversa, en una doble cadena de ADN. En la etapa inicial existen factores celulares que juegan un rol esencial en la replicación (Zink, 1996). Ese ADN viral se dirige al núcleo integrándose al ADN celular como ADN proviral a través de los LTR, mediante la acción de las integrasas (Clements y Zink, 1996).

Una vez que el ADN viral se integra en el genoma de los monocitos presentes en médula ósea o en circulación, el virus puede permanecer en forma latente sin expresarse, por lo que en este estadio estas células actuarían como verdaderos “caballos de Troya” ya que transportarían al virus silenciosamente (Leroux y col., 2004).

Luego de la maduración y diferenciación de los monocitos infectados, tanto en tejido como en cultivo, sus factores celulares transcripcionales tal como el factor específico de macrófagos, inician la transcripción viral por la acción de los genes *rev*, con la consecuente producción de proteínas virales *gag*, *pol* y *env*. Finalmente se produce la liberación de viriones por gemación de los macrófagos tisulares, observándose un aumento brusco del ARN viral plasmático y de ADN viral en casi todos los tejidos, aunque preferentemente en

bazo e hígado, ver figura 3 (Maury, 1994; Clements y Zink, 1996, Oaks y cols., 1998; Murphy y cols., 1999; Hammond y cols., 2000, Cook y cols., 2001).

Los lentivirus tienen mecanismos complejos por los cuales logran su persistencia mediante la regulación tanto de sus niveles de replicación como de su expresión génica. La replicación y por ende la expresión génica, puede alterarse por variaciones en los elementos regulatorios *LTR* y *Rev* (Carpenter y cols., 1991; Maury y cols., 1997; Belshan y cols., 2001).

En virtud de la elevada tasa replicativa en cada pico febril se producen errores en la transcripción del ARN a ADN, mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. Estas alteraciones ocurren principalmente en segmentos génicos que codifican a los sitios glicosilados de las proteínas de envoltura, generando, en tan solo 14 días variantes virales que reemplazan a las cepas anteriores con características fenotípicas diferentes (Ball y cols., 1992; Greene y cols., 1993; Kim y Casey, 1994; Suarez y Whestone, 1997, Leroux y cols., 1997; Leroux y cols., 2001). Se ha demostrado que en animales persistentemente infectados, en períodos con bajos niveles de viremia, debajo de 10⁷-10⁸ copias/ml de RNA, se generan también variantes virales, lo que contribuye a la persistencia de este lentivirus (Hammond y cols., 2000; Leroux y cols., 2001, Belshan y cols., 2001; Leroux y cols., 2004; Craig y cols., 2005).

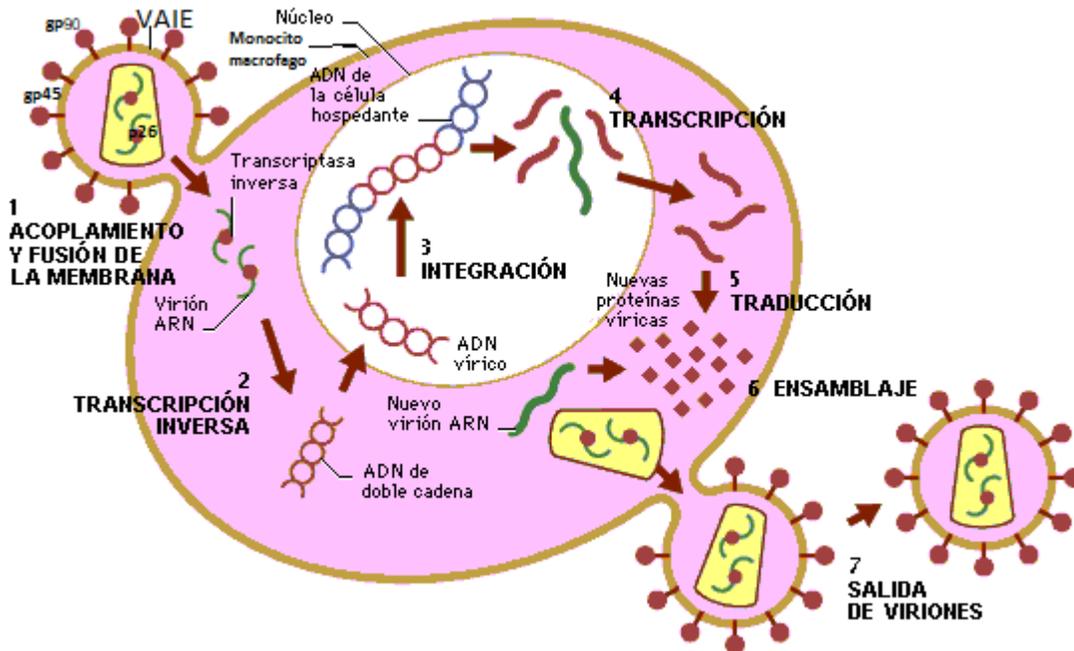


Figura 3. Esquema representativo de la replicación viral desde la entrada del virus a la célula hasta la salida (Vázquez, 2014).

1.7. Patogenia

Una de las principales características que distinguen al VAIE de otros lentivirus es la naturaleza de la enfermedad clínica. Mientras que muchas de las infecciones por lentivirus tienen un curso lento, crónico y progresivo, la infección por VAIE, en sus fases iniciales, resulta rápida, variable y dinámica con episodios agudos, causados por una replicación viral agresiva, acompañada de picos febriles intensos. A esta fase inicial le sigue una fase crónica donde aparecen episodios febriles recurrentes, sin otros signos clínicos detectables. Luego se alcanza un estado asintomático donde los animales, si bien logran controlar la replicación viral, se comportan como portadores virales durante el resto de sus vidas manteniendo su capacidad infectiva (Hammond y cols., 1997; Leroux y cols., 2004).

Si bien estas fases son las que generalmente son descritas, el curso de la enfermedad difiere no sólo de la cepa infectante, sino de cada animal, aún infectados en iguales condiciones y con las mismas cepas (Cook y col., 2001; Leroux y col., 2001). Es así que mientras muchos animales cursan la enfermedad con las fases bien diferenciadas (animales de evolución

progresiva), otros al infectarse, solo presentan una fase aguda y luego son portadores asintomático de por vida, sin atravesar previamente por la fase crónica (animales con infección no progresiva). Solo unos pocos animales no logran sobrevivir y mueren durante la primera fase virémica (fase subaguda) (Hammond y cols., 2000; Leroux y cols., 2001; Cook y cols., 2003). La diferencia clínica entre los animales que cursan con evolución progresiva de la no progresiva tiene su correlación con la viremia. Los primeros presentan elevados niveles de ARN viral plasmático, en cambio los segundos presentan niveles muy bajos de carga viral, pudiendo aún no ser detectables (Hammond y cols., 2000; Leroux y cols., 2001; Mealey y cols., 2003; Leroux y cols., 2004).

Durante la fase inicial aguda, los equinos infectados presentan un pico febril (hasta 41°C) que dura de 3 a 5 días, coincidente con trombocitopenia y anemia debida a la lisis de glóbulos rojos, asociada en un principio, a la formación de complejos inmunes, aunque se ha observado que animales con Síndrome de Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID) infectados también cursan el pico febril con anemia y trombocitopenia (Russell y cols., 1999; Mealey y cols., 2001; Leroux y cols., 2004).

Luego de resolverse el primer episodio virémico febril, la mayoría de los animales progresan a una fase crónica, caracterizada por ciclos recurrentes e irregulares de ascensos y descensos bruscos de temperatura y viremia, asociados a una variante viral antigénicamente diferente de la aislada en el pico anterior. Entre estos picos febriles se ha podido detectar en plasma, ARN viral (Clements y Zink, 1996; Hammond y cols., 1997; McGuire y cols., 1997; Hammond y cols., 2000).

En aquellos animales con evolución progresiva, los signos clásicos de esta enfermedad son pérdida de peso, anemia y edema, se presentan en la fase crónica durante el primer año de la enfermedad (Montelaro y cols., 1984). Los episodios agudos, presentes en fase crónica, se suceden cuando hay causas asociadas a estrés, a otras enfermedades, a ciertas drogas como esteroides o bien por mutación del virus a cepas más virulentas. Como signos complementarios se suele observar un cuadro hepatorenal, diarrea sanguinolenta y retención urinaria, a veces seguida de poliuria. Estos episodios agudos se tornan menos frecuentes y severos, y son típicamente resueltos dentro de los 8 a 12 meses post infección, momento en que los animales son considerados “portadores virales asintomáticos”

(Langemeier y cols., 1996; Hammond y cols., 1997; McGuire y cols., 1997; Hammond y cols., 2000; Cook y cols., 2001).

Tanto en los animales de evolución progresiva como en los de evolución no progresiva, el estado de portador asintomático perdurará el resto de sus vidas. En esta etapa los niveles de carga viral son muy bajos o casi nulos, lo que indicaría que existe un control efectivo de la replicación viral y por ende de la enfermedad. Evidencias de la permanencia de su poder infectivo, es que es posible infectar animales sanos inoculándolos con sangre extraída de equinos “portadores virales asintomáticos”. Por otra parte, aquellos animales infectados asintomáticos que son expuestos a situaciones de estrés o a la administración de inmunosupresores, presentan episodios febriles similares a los sucedidos en la fase crónica de la enfermedad (Hammond y cols., 2000). Esto sugiere que la respuesta inmune innata sería la responsable de mantener una baja replicación viral (Hammond y cols., 1997; McGuire y cols., 1997).

1.8. Patología clínica

El tipo de anemia que ocasiona la infección con el VAIE es macrocítica hipocrómica regenerativa, adicionalmente se presenta una hemólisis infecciosa extravascular como resultado de la inducción de producción de anticuerpos anti-eritrocíticos, dando como resultado una respuesta de hipersensibilidad de tipo III o de complejos inmunes (Fidalgo, 2003).

1.9. Signos clínicos

Estos pueden ser: anemia, fiebre, adelgazamiento, anorexia, letargia, debilitamiento rápido y progresivo, epistaxis, astenia, marcha insegura y debilidad de miembros posteriores. También se pueden encontrar petequias en la conjuntiva ocular, mucosa lingual y vulvar, hemorragias pericorneales y lagrimeo con secreción ocular espesa lo que otorga un aspecto aceitoso en la superficie de la córnea (Cook, 2001; Leroux y Cols., 2004). Aunque en ocasiones estos signos no son aparentes (Blaha, 1995).

Los signos clínicos de la forma aguda de la AIE generalmente son inespecíficos. En algunos casos, en caballos, el único signo es la fiebre que a veces va acompañada de inapetencia transitoria. En los casos leves, la fiebre puede durar menos de 24 horas. Los caballos más severamente afectados pueden debilitarse, deprimirse y permanecer inapetentes, con signos adicionales tales como ictericia, taquipnea, taquicardia, edema con fóvea ventral, trombocitopenia, petequias en las membranas mucosas, epistaxis o heces sanguinolentas. Puede producirse anemia, aunque es más probable que sea grave en los animales crónicamente afectados. En ocasiones, los caballos se enferman gravemente y pueden morir durante la fase aguda. Después de la enfermedad inicial, la mayoría de los caballos se pueden convertir en portadores asintomáticos; sin embargo, algunos animales desarrollan signos clínicos recurrentes como: fiebre, depresión, hemorragias petequiales en las membranas mucosas, pérdida de peso, anemia y edema dependiente. Las infecciones inaparentes pueden convertirse en sintomáticas cuando ocurren otras enfermedades simultáneamente, estrés severo o trabajo intenso. Es posible que ocurra la muerte durante estos episodios febriles. En caballos con infección crónica, se han informado casos de lesiones oftálmicas, caracterizadas por despigmentación con vasos coroidales prominentes (Fidalgo, 2003; OIE, 2009).

Es menos probable que los burros y las mulas desarrollen signos clínicos. Las mulas pueden infectarse asintomáticamente, pero se han informado casos con signos típicos de AIE en algunos animales infectados en forma natural o experimental. En un experimento reciente, burros inoculados con 2 cepas adaptadas a caballos se infectaron pero no presentaron signos. En China, se informó que burros inoculados con una cepa adaptada mediante pasajes seriados, en burros, desarrollaron signos clínicos (Blaha, 1995; OIE, 2009).

1.10. Transmisión

El VAIE se transmite mecánicamente desde las piezas bucales de insectos picadores. En los caballos, este virus permanece en los monocitos durante toda la vida, y también está presente en el plasma durante los episodios febriles. Los caballos con signología son más propensos a transmitir la enfermedad que aquellos con infección inaparente. Ya que sólo 1 de cada 6 millones de moscas se convierte en un vector. También se han informado altos niveles de viremia en mulas, durante los estadios tempranos de la infección. Se ha obtenido títulos

significativamente más bajos en burros inoculados con ciertas cepas adaptadas a los caballos (Blaha, 1995; SENASA, 2005; OIE, 2013).

Aunque otros insectos, incluidas las moscas de los establos (*Stomoxys calcitrans*) pueden transmitir el VAIE, los vectores más efectivos son las moscas picadoras de la familia *Tabanidae*, especialmente las moscas de los caballos (*Tabanus* e *Hybomitra*) y las moscas de los ciervos (*Chrysops*). Las picaduras de estas moscas son dolorosas y la reacción del animal es interrumpir la alimentación. La mosca intenta continuar alimentándose inmediatamente, en el mismo animal o en otro huésped que esté cerca, produciendo la transmisión de sangre infectada. El VAIE sobrevive durante un período de tiempo limitado en el aparato bucal de los insectos y tiene menos probabilidad de propagarse a huéspedes que están más lejos. El virus también puede transmitirse por transfusiones de sangre o mediante agujas, instrumentos quirúrgicos y flotadores dentales contaminados. Se ha informado que persiste durante 96 horas en agujas hipodérmicas. El VAIE también puede transmitirse de una yegua a su potrillo *in útero* (Blaha, 1995; Leroux, 2004; OIE, 2013).

Podrían ser posibles otras vías menores de transmisión. El VAIE no parece excretarse por saliva u orina, sin embargo, se puede encontrar en la leche y el semen, y los caballos pueden infectarse mediante la lactancia o en la reproducción respectivamente. Se ha informado que es posible la transmisión a través de la leche en algunos potrillos lactantes. Aunque la transmisión venérea parece no ser la vía principal de propagación, un semental puede transmitir el virus si se lesiona el tejido durante el apareamiento. Ver figura 4. A partir de un brote epidémico en el 2006 en Irlanda, se planteó la posibilidad de transmisión por aerosoles provenientes de material infeccioso, durante el contacto cercano (Leroux, 2004; SENASA, 2005; OIE, 2009). Las características clínicas de la infección son: periodo de incubación de 5 a 90 días dependiendo de la cantidad de virus infectante (Hammond y cols., 1997; Leroux y cols., 2004). Curso de 3 a 8 días, morbilidad variable dependerá de la cantidad de mosquitos en relación a la estación del año ya que en lluvias hay más mosquitos, mortalidad, los animales infectados en una fase aguda o subaguda mueren el 100% de estos, los que cursen en una fase aguda-crónica o la fase inaparente quedaran como portadores de por vida (Blaha, 1995; Leroux, 2004).

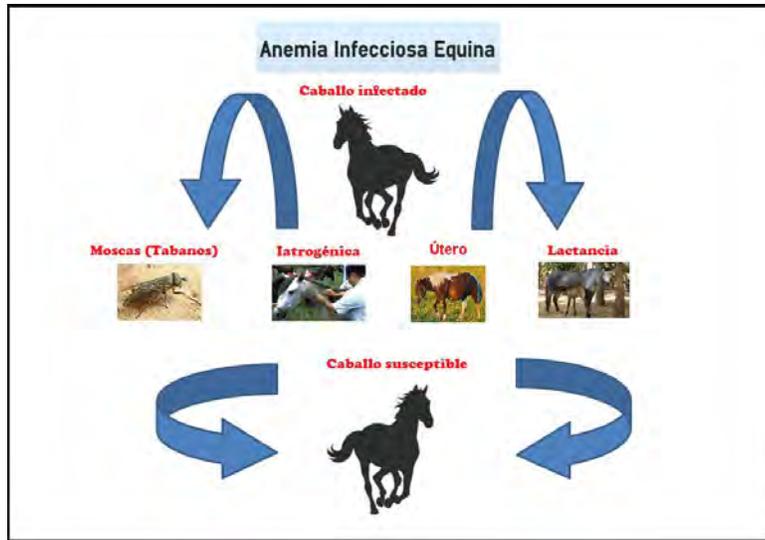


Figura 4. En esta figura se puede apreciar las diferentes formas de transmisión del Virus de Anemia Infecciosa Equina.

1.11. Diagnóstico clínico

La AIE es una enfermedad que debe estar entre las diferenciales, en casos particulares de caballos que presentan pérdida de peso, edema y fiebre intermitente. También se debe considerar cuando varios caballos padecen fiebre, anemia, edema, debilidad progresiva o pérdida de peso, especialmente cuando se han incorporado nuevos animales a la manada o ha muerto un integrante de la misma (Blaha, 1995; Leroux, 2004; Barajas, 2006; OIE, 2009).

1.12. Diagnóstico de laboratorio

En la mayoría de las infecciones virales, los anticuerpos en animales positivos contra las proteínas de cápside se detectan después de 45 días de exposición al virus; sin embargo, la prueba de ELISA ha mostrado una mejor eficiencia en la detección de animales positivos utilizando antígenos de cápside del VAIE (Issel, 1999; Fidalgo, 2003).

- Aislamiento e identificación del virus. Generalmente no es necesario el aislamiento del virus para realizar un diagnóstico. Se puede aislar el virus en caballos sospechosos inoculando su sangre en cultivos de leucocitos preparados a partir de caballos no infectados. No es frecuente que se intente el aislamiento del virus debido a la dificultad para obtener cultivos de leucocitos de caballos (Issel, 1993).
- Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) (Coggins). Prueba utilizada para el comercio internacional. Los anticuerpos precipitantes se producen rápidamente como resultado de la infección del VAIE y se pueden detectar mediante esta prueba, sin embargo, en las primeras 2-3 semanas después de la infección los caballos presentaran reacciones serológicas negativas, en algunos casos el tiempo posterior a la infección previo a la aparición de anticuerpos detectables puede durar hasta 60 días (OIE, 2009).
- Ensayo por Inmunoabsorción Ligada a Enzimas indirecta (ELISAI). Un resultado positivo obtenido mediante el ELISAI debe comprobarse de nuevo utilizando la prueba de IDGA para confirmar el diagnóstico debido a que se han detectado algunos resultados falsos positivos con esta técnica, aunque ambas detectan la proteína P26, ver tabla 1. Una de las mayores ventajas en lo que respecta a la prueba de ELISAI es la capacidad de obtener resultados rápidos y precisos. Todo lo que se requiere para llevar a cabo una prueba de ELISAI es una simple muestra de sangre. Esta muestra se obtiene en poco tiempo y no se necesita sedar al animal. Una de las razones del uso de esta técnica es la sensibilidad para comprobar la presencia de anticuerpos, lo que puede permitir que un médico se sienta seguro en su diagnóstico (Burki, 1992).
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utiliza cuando: los resultados de las pruebas serológicas son contradictorias, y/o sospechosas a serología, con esta técnica podemos confirmar los resultados de serología y también se puede diagnosticar la infección precoz antes de la producción de anticuerpos. Además puede apoyar el garantizar que los caballos utilizados para la producción de antisueros, vacunas o donantes de sangre no estén infectados, adicionalmente, puede confirmar el status de un potro nacido de una yegua infectada. Se ha descrito el uso de la PCR anidada para

detectar el ADN provírico del VAIE en la sangre periférica de los caballos (Nagarajan y Simard, 2001). El método de la PCR anidada está basado en las secuencias de cebadores en la región correspondiente al gen *gag* del genoma provírico. Ha resultado ser una técnica sensible para detectar diferentes cepas del VAIE en leucocitos de sangre de caballos infectados por el virus; lo normal es que el límite inferior de detección se sitúe en torno a 10 copias genómicas del ADN diana (Nagarajan y Simard, 2001). También se ha descrito la PCR con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real (Cook y col, 2002). Para confirmar los resultados de esas pruebas tan sensibles se recomienda procesar duplicados de las muestras de cada espécimen de diagnóstico (Soutullo, 2001).

- PCR con un paso previo de retro-transcripción (RT-PCR) para detectar virus libre (Blaha, 1995; Bermúdez, 2014; Augusto, 2014).

Las pruebas antes mencionadas presentan diferentes valores de sensibilidad y especificidad (Issel, 1993; Blaha, 1995).

Tabla 1. Pruebas comerciales donde se muestra que la base de su diseño es la detección de anticuerpos contra la proteína P26.

Marca	Tipo de ELISA	Antígeno viral
VMRD	Sándwich modificado	P26
INDEXX	Competitivo	P26
Agrobiotek	Sándwich	P26
Livexlab	Sándwich	P26

1.13. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial incluye otras enfermedades febriles como:

- Arteritis viral equina
- Púrpura hemorrágica
- Leptospirosis
- Babesiosis
- Estrongiloidosis
- Fasciolosis grave
- Intoxicación con fenotiazina
- Anemia hemolítica autoinmune

Y otras enfermedades que causan fiebre, edema y/o anemia (Blaha, 1995; Leroux, 2004; OIE, 2013).

1.14. Prevención y control

Basado en las características de la enfermedad, todas las medidas preventivas de lucha y control que se aplican en los distintos países del mundo, se concentran en:

- a) La detección de los portadores mediante pruebas de diagnóstico de laboratorio.
- b) La eliminación de los equinos infectados, mediante sacrificio.

El sostenimiento de este sistema permite en algunos casos y regiones, que en condiciones ecológicas favorables y con la participación responsable, y activa de todos los actores ligados al caballo se evite la difusión territorial del virus y el incremento de equinos portadores (Blaha, 1995; Leroux, 2004; SENASA, 2005).

Durante un brote epidémico, la fumigación para controlar los vectores, el uso de repelentes de insectos y de establos protegidos de insectos, puede facilitar la interrupción de la transmisión. La ubicación de los animales en grupos pequeños, separados por al menos 180 metros puede ser beneficiosa como barrera de contención física de la infección. Se debe tener cuidado para evitar la transmisión iatrogénica. En los países donde la AIE no está presente, se contienen los brotes mediante cuarentenas y controles de movimiento, seguimiento de los casos y vigilancia. Los virus envueltos como el de AIE son destruidos

rápidamente por los desinfectantes más comunes. El virus no persiste en los insectos que son vectores mecánicos por más de 4 horas (Blaha, 1995; Craigo, 2005; SENASA, 2005).

Puede decirse de manera general que respecto a la implementación de estas medidas, las acciones de control están más relacionadas con la aceptación y aplicación de las reglamentaciones establecidas por la autoridad sanitaria, y las acciones de prevención recaen en manos de productores y propietarios (SENASA, 2005; Castillo, 2013; Bermúdez, 2014).

En este sentido, para el éxito en el control de la enfermedad debe sumarse el accionar de las entidades oficiales, la participación imprescindible del usuario mediante el conocimiento y cumplimiento de las normas, el requerimiento de asesoramiento técnico profesional y la aceptación y aplicación responsable de las medidas y recomendaciones que son de su exclusiva competencia (Leroux, 2004; Castillo, 2013).

1.14.1. Medidas protectoras en territorios limpios

Cada importación o ingreso de equinos al país o región libre exigirá en origen un certificado oficial en el que se haga constar que no más de 5 días antes de efectuar el embarque o transporte:

1. Los animales no presentaron signos clínicos de la enfermedad.
2. Los animales permanecieron como mínimo durante los 3 meses últimos en su establecimiento de origen.
3. Los animales arrojaron resultado negativo a la prueba de Coggins realizado 30 días antes de su embarque o egreso.
4. Los animales que ingresan para permanecer corto tiempo en el país o región (exposiciones y concursos hípicas) también cumplirán los tres requisitos precedentes.
5. Los que vayan a quedarse definitivamente en el país o región limpia se someterán posteriormente a su arribo, a una cuarentena de 30 días como mínimo, debiendo presentar un segunda evaluación diagnóstica negativa realizada a los 60 días posteriores para que se autorice su ingreso definitivo (SENASA, 2005; Barajas, 2006).

1.14.2. Medidas en territorios con la enfermedad enzoótica

Además de la denuncia obligatoria, es necesario la certificación oficial con una prueba negativa no sólo a todos los équidos que traspasen las fronteras del país y a los destinados a la producción de sueros, sino también, a todo équido que se traslade o que ingrese y/o permanezca en concentraciones a los que asisten equinos desde diversos orígenes (Blaha, 1995; Barajas, 2006).

Si bien, la legislación no contempla la obligatoriedad de realizar pruebas de control dentro de los predios en la medida que no se registren egresos desde los mismos, para mantener predios controlados las recomendaciones técnicas establecidas desde los comienzos de la campaña de lucha y de aplicación voluntaria, son los mismos:

1. Realizar una o dos evaluaciones anuales en poblaciones estables de manera sistemática, en especial en zonas o luego de temporadas de alta carga de insectos.
2. Establecer cuarentenas internas para los ingresos de nuevos equinos, reconfirmando la condición de negativos de los ingresantes a los 30-60 días posteriores y recién allí incorporarlos definitivamente al predio.
3. Garantizar el buen manejo de las posibles fuentes de transmisión descritas anteriormente (material descartable, intercambio de enseres, desinfección, etc.), la realización de la prueba solo puede ser efectuada en laboratorios oficiales (CENASA), quienes para su habilitación y mantenimiento, son previamente entrenados y luego evaluados periódicamente por el servicio oficial (SENASA, 2005; OIE, 2009).

Medidas a adoptar ante brotes o hallazgos de reactores positivos a la prueba diagnóstica.

Es única responsabilidad del propietario o responsable que ante animales clínicamente enfermos o inaparentes con resultado positivo a la prueba de Coggins, proceda a:

- 1) Separarlos inmediatamente del resto.
- 2) Efectuar la denuncia y eliminarlos, por sacrificio inmediato en el lugar.

Una vez confirmado el diagnóstico está contraindicado todo tipo de tratamiento, ya que vale recordar que el animal positivo es un animal infectado, y se convierte en portador y reservorio del virus toda su vida, convirtiéndose en una potencial fuente de diseminación de la infección sino se evitan las vías mecánicas de transmisión (Blaha, 1995; SENASA, 2005; Barajas, 2006; Bermúdez, 2014).

Todo equino que estuvo en contacto con un caso infeccioso de una forma tal que se considera que ha estado considerablemente expuesto y por consiguiente corre el riesgo de contraer la infección, se debe aislar de los demás caballos y ser sometido a control clínico y serológico (Augusto, 2014).

Siempre que se presente esta enfermedad, se llevará a cabo una adecuada lucha contra los insectos y se acentuará la prevención de diseminación descrita para las formas de transmisión iatrogénicas (SENASA, 2005; Augusto, 2014).

1.14.3. Procedimientos en predios rurales

En zonas de baja infección, al ocurrir en los predios hallazgos ocasionales de portadores, se deben eliminar de la población todos los equinos con prueba positiva, y de manera inmediata los que presenten además manifestaciones clínicas, el resto de los equinos del predio que contactaron con los positivos (sean negativos a la prueba o no evaluados) deben ser aislados y remuestreados a los 60 días para su confirmación diagnóstica. De verificarse nuevos hallazgos en éstos lotes, se repetirá el procedimiento tantas veces como sea necesario hasta asegurarse que toda la población es negativa al VAIE (Leroux, 2004).

En los territorios con alta presencia de la infección se irán constituyendo paulatinamente efectivos de equinos seronegativos, los que deben ser mantenidos a la distancia indicada de 180 metros de la población infectada; estos lotes se protegerán del ingreso del virus con una continua lucha contra los insectos y un adecuado manejo diferencial de material de cirugía y punzocortantes (Leroux, 2004; Bermúdez, 2014).

Mediante la eliminación progresiva de los équidos seropositivos de la población remanente, combinada con el aislamiento y anterior control de los animales en contacto, se irá reduciendo continuamente el número de équidos infectados presentes en el territorio y con ellos los reservorios del virus. Posteriormente, estos predios se manejarán como fue descrito para zonas de baja infección (Castillo, 2013).

1.14.4. Medidas para los ingresos

En forma similar a otras enfermedades infecciosas que afectan a los animales, la responsabilidad de los ingresos de équidos a establecimientos o predios de cualquier índole

es exclusivamente de la entidad, del propietario o responsable de los mismos, por lo tanto, para prevenir el ingreso del VAIE a una población, todo equino que ingrese debiera hacerlo bajo las siguientes condiciones:

- 1) Con diagnóstico y certificado negativo de origen.
- 2) Aislamiento del resto de la población estable, un mínimo de 180 metros de distancia (50 metros pueden ser efectivos en épocas o regiones sin tábanos).
- 3) Verificación de ser seronegativo mediante dos pruebas consecutivas, separadas una de otra por un intervalo de 30 días entre ambas o al menos una prueba confirmatoria a los 60 días de la fecha de realización de una prueba anterior.
- 4) Durante la cuarentena, se garantizará el control y el buen manejo de las posibles fuentes de transmisión mecánica descritas (Leroux, 2004; SENASA, 2005).

1.14.5. Procedimientos en los eventos hípicos

La adaptación de las medidas recién descritas, dada la gran dinámica de movimiento y estabulación de equinos debe centrarse en:

- 1) Diagnóstico y certificado negativo de origen.
- 2) Verificación de la negatividad. Se podrá disponer al ingreso de la utilización de la prueba rápida de ELISA para los equinos de corta permanencia.
- 3) Los equinos que arrojen resultado positivo a ELISA se aislarán de inmediato en una caballeriza con protección contra insectos, hasta confirmar por la técnica de Inmunodifusión.
- 4) Hasta conocer el estado serológico de los ingresantes, se garantizará el control y el buen manejo de las posibles fuentes de transmisión mecánica (Issel, 1993; SENASA, 2005).

1.14.6. Procedimientos en las ferias

Los certificados de AIE deberán ser presentados al ingreso de los equinos a las autoridades sanitarias para su verificación y siempre con anterioridad a la realización de la subasta.

Los équidos que arriben al predio ferial y que no se encuentren amparados por la mencionada certificación, serán considerados de riesgo sanitario (Blaha, 1995; SENASA, 2005; Vázquez, 2014).

Los certificados que no den cumplimiento a las normas establecidas al respecto, quedarán intervenidos y retenidos por la autoridad oficial independientemente del tiempo que reste para su vencimiento, labrándose las actuaciones correspondientes a efectos de determinar las responsabilidades del caso (SENASA, 2005; Barajas, 2006).

Los equinos que arriben a la feria con estas certificaciones intervenidas, quedarán aislados en el predio hasta la realización de una prueba oficial a cargo del remitente.

Los licenciarios, propietarios o responsables de los mercados de concentración o de ferias regionales serán responsables de que los equinos que se encuentren o presten servicio en las instalaciones de los mismos cuenten con la certificación de anemia infecciosa equina con diagnóstico negativo con una antigüedad no mayor a sesenta (60) días (Blaha, 1995; SENASA, 2005; OIE, 2013).

1.15. Desinfección

Limpieza y desinfección escrupulosamente efectuada con un desinfectante en concentración suficiente permiten la destrucción del virus de AIE (Blaha, 1995; Leroux, 2004).

Para la desinfección química de los instrumentos, primero se debe remover todo resto de suciedad mediante lavado y cepillado y luego sumergirlos en desinfectantes fenólicos por 10 minutos. Cuando la materia orgánica no es removida puede utilizarse clorhexidina o compuestos fenólicos combinados con un detergente. Para la desinfección personal se indica hipoclorito de sodio o compuestos yodados (SENASA, 2005; OIE, 2013).

1.16. Situación de la enfermedad de AIE en México

La AIE se encuentra ubicada en el grupo 2 del listado oficial de enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas en los Estados Unidos Mexicanos (diario oficial de la federación, 2016), integrado por las enfermedades y plagas endémicas transmisibles que se encuentran en el territorio nacional, y que por sus efectos significativos en la producción

pecuaria, comercio internacional, salud pública y por su importancia estratégica para las acciones de salud animal y sanidad en el país, son consideradas de notificación inmediata obligatoria a las dependencias oficiales de sanidad animal del país (OIE, 2009).

En México, Notimex en 2014 reportó, La Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA) detectó en Campeche este año 23 casos del VAIE, por lo que recomendó a las asociaciones de charros tomar medidas preventivas, ver tabla 2, informó el delegado en el estado de la dependencia federal, Víctor Salinas Balam (Notimex, 2014).

Trabajos de identificación del VAIE realizados en el país (figura 5) incluyen los reportados en Chiapas en el año del 2006, en el cual realizaron un estudio sero-epidemiológico para determinar anticuerpos contra el VAIE, utilizando las técnicas de ELISA y Coggins. En total se evaluaron 180 equinos de los cuales el 21.11% y 13.88% resultaron positivos con la técnica de ELISA y Coggins respectivamente (Barajas y cols, 2006). En un estudio realizado en equinos del Distrito Federal no se encontraron animales seropositivos utilizando la prueba de Coggins (Martínez, 2010). En Colima se realizó un estudio serológico (ELISA comercial) que incluyó a 548 equinos de 8 municipios, destinados a espectáculos ecuestres y de trabajo; obteniendo una seropositividad del 8.94% (Castillo y cols, 2013). En Baja California, se realizaron dos estudios, en el primero se determinó una prevalencia de 0.7% en una población de 423 equinos utilizando la prueba de Coggins. En el segundo estudio utilizando la misma prueba de diagnóstico y adicionalmente la técnica de RT-PCR se detectó una prevalencia del 13%, no obstante, en este estudio solo se incluyeron 23 equinos (Bermúdez y col., 2014). En el Estado de Zacatecas realizaron un estudio en caballos de rastro donde se analizaron sueros de 963 equinos, de los cuales el 5.55% (26/963) fueron detectados como positivos (Vázquez, 2014).



Figura 5. Mapa de la República Mexicana donde se muestra el porcentaje de seropositividad encontrado en diferentes estudios que identifican la infección del virus de Anemia Infecciosa Equina.

Tabla 2. Reporte histórico de equinos evaluado para la identificación del Virus de la Anemia Infecciosa Equina en distintos lugares del país.

Lugar	Muestras	Positivos	Porcentaje	Año
Rastro	1751	37	2.1%	1995
CENASA	7513	342	4.5%	1995-2000
CENASA	1200	18	1.5%	2001
CENASA	1081	13	1.2%	2002
CENASA	1464	23	1.5%	2003
CENASA	1013	31	3.0%	2004
CENASA	1829	55	3.0%	2005
CENASA	1640	13	0.7%	2006
CENASA	824	29	3.5%	2007
Hospital Equinos de la FESC	300	5	1.7%	2015
S.D.N.	2000	0	0%	-

CENASA = Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal; FESC = Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM; SDN = Centro Hospitalario del Estado Mayor Presidencial, Delgadillo, 2018

1.17. Vacunación

Se han probado vacunas contra el VAIE inactivadas y de subunidad en distintos laboratorios y han mostrado capacidad de protección solo contra infecciones de cepas prototipo homólogas. Entre 1975 y 1990, en China se utilizó mucho una vacuna activa atenuada que se había desarrollado a principios de los años 1970, y resultó eficaz para el control de la prevalencia del VAIE. Con datos de prevalencia baja desde 1990, la estrategia de control del VAIE ha pasado de la vacunación a la cuarentena, para evitar que los anticuerpos contra la vacuna interfieran con las pruebas de diagnóstico (OIE, 2013).

Aunque en China no han surgido preocupaciones relativas a la seguridad con el uso de la vacuna atenuada contra el VAIE, es importante destacar que como ocurre con otros lentivirus, el VAIE es altamente mutable. Si se utiliza una vacuna activa contra el VAIE, debe hacerse con mucha cautela y con una cuidadosa evaluación (OIE, 2013).

1.18. Problemas de salud pública

Hasta la fecha no se han identificado casos de infección por anemia infecciosa equina en humanos (Augusto, 2014).

La AIE tiene una alta relevancia para el país por lo que se realizó el primer foro internacional de AIE de México incluido dentro del congreso anual de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Equinos (AMMVEE), Chihuahua 2014. Integrada principalmente por el Dr. Jorge Augusto Murga donde también estuvieron presentes la unión ganadera regional del Estado de Chihuahua y epidemiólogos tanto nacionales como internacionales, así como representantes de secretarías de gobernación (SAGARPA, CENASA, CENASICA). En este foro se habló de la enfermedad y la importancia de conocerla y poder diagnosticarla, ver tabla 3, mediante pruebas de laboratorio (Augusto, 2014).

Tabla 3. Número de pruebas realizadas para la detección de Anemia Infecciosa Equina anualmente en algunos países.

País	Número de pruebas / año *	Número de Equinos **
Estados Unidos	1,800,000	10,350,000
Argentina	450,000	3,620,000
Brasil	440,000	5,312,076
Chile	200,000	310,500
Colombia	100,000	1,553,157
México	1,200	6,356,000

* (Estadística del censo de ganado caballar y de equinos de México) FAO, 2013.

** Instituto Nacional de Estadística INE, 2013.

1.20. Historia de los péptidos sintéticos

La historia de la síntesis de péptidos comienza con Emil Fisher, quien al establecer la química de las proteínas obtuvo la síntesis del di péptido glicil-glicina en 1901, comprobando de esta manera su hipótesis de que los aminoácidos estaban unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. A partir de ahí continuó sintetizando tri péptidos, tetra péptidos, etc., hasta finalmente alcanzar la síntesis un polipéptido de 18 residuos de aminoácidos. Después de esto, la evolución de la técnica fue lenta, los primeros polipéptidos sintetizados fueron homopolímeros ya que se presentaba un problema al momento de combinar aminoácidos: debía protegerse el grupo amino de un tipo para evitar que se uniera con un aminoácido de su misma especie e impedir contaminaciones de péptidos distintos. Encontrar un compuesto químico capaz de bloquear el grupo amino, pero que además fuera removido fácilmente después de la formación del enlace peptídico deseado, no fue logrado hasta 1932 por Max Bergmann y Leonidas Zervas, el grupo carbobenzoxilo. A partir de esto los grupos protectores fueron perfeccionándose y en 1953 Vincent du Vigneaud fue capaz de

sintetizar el primer polipéptido funcional, la hormona oxitocina, lo que le llevó a ganar el premio Nobel de química en 1955. Sin embargo, aislar y purificar un nuevo péptido significaba invertir muchísimo tiempo para obtener una cantidad ínfima de producto, por lo que Bruce Merrifield pensó que el método podía mejorarse. En 1963 dio a conocer la síntesis del tetra péptido y en 1969 Merrifield anunció la síntesis de la enzima ribonucleasa pancreática bovina A de 124 residuos en 6 semanas, mediante la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, de sus siglas en inglés), técnica por la que recibió el premio Nobel de química en 1984 (Brown, 1994; Regenmortel, 1999; Tonarelli, 2000).

1.21. Diseño de los péptidos sintéticos

El uso de antígenos peptídicos sintéticos para la generación de anticuerpos personalizados ha aumentado marcadamente en los últimos años como una alternativa viable al uso de proteínas de longitud completa como inmunógenos. El uso de péptidos relativamente cortos imitan partes específicas de una proteína y esto ha demostrado tener varias ventajas en diversas situaciones (Harper, 1998).

Existe diferentes tipos de péptidos sintéticos y cada uno presenta diferentes características las cuales se expresan en la tabla 4.

Tabla 4. Diferentes características de los péptidos sintéticos.

Enfoque	lineal	discontinuo	Disperso	Post-transicional
Predicción de la secuencia de aminoácidos	+	+ -	+ -	-
Predicción de cálculos de estructura proteica	++	+	+ -	+ -
Inmunoensayo de fragmentos proteolíticos	+++	+	-	++
Inmunoensayo de clones parciales	+++	+	-	- o ++
Utilización de péptidos sintéticos	+++	-	-	-
Cristalografía del complejo antígeno-anticuerpo	+++	+++	+++	+++

- Característica no aprovechada, + característica poco aprovechada, ++ característica medianamente aprovechada, +++ característica altamente aprovechada.

La metodología para la síntesis de péptidos se ha comenzado a mejorar a partir de la década de 1980 y 1990, esta tecnología ha logrado ser rápidamente asimilada en estudios dirigidos a la comprensión del plegamiento de los péptidos y proteínas, ver tabla 5. Es particularmente común la “disección de péptidos” que consiste en un análisis donde a partir de secuencias de péptidos relativamente cortas, se reconocen como proteínas nativas al tener una estructura secundaria definida. Estos análisis han logrado proveer de información valiosa para el diseño *de novo* o bien para innovar los péptidos con un plegamiento deseable. La aproximación al uso de péptidos sintéticos, comparado con la clonación molecular, se ha expandido rápidamente en los campos especializados debido al hecho de que pueden sintetizarse más fácilmente y que pueden ser purificados en los niveles requeridos. Esto es especialmente cierto en los casos de péptidos cortos y lineales, y en aquellos en los que para su diseño fueron utilizados aminoácidos no naturales. La unión química y la reacción químico selectiva de regiones no protegidas del péptido, conforman una posibilidad

innovadora que ha permitido la síntesis completa de polipéptidos (proteínas) inclusive en agua, a un pH de 7. Para el caso de algunas proteínas, la síntesis química de estas es la forma más efectiva para obtener proteínas funcionales directamente de secuencias genómicas. Por otro lado, para realizar un diseño en el cual se mejore la estabilidad en su plegamientos para algunos péptidos, la conformación deseada puede estabilizarse mediante la inserción de algunos residuos de cisteínas en un puente di sulfuro constrictor, esto en sí, no es ningún concepto nuevo, el problema radica en que cuándo se presentan más de dos cisteínas sería posible que se formen más de 16 diferentes combinaciones para puentes di sulfuro. Los péptidos sintéticos pueden prepararse en una forma altamente pura, un diseño adecuado del antígeno puede evitar errores que podrían derivar en la generación de reacciones cruzadas y resultados engañosos (Ball, 1994; Brown, 1994; Robinson, 1995; Boudet, 1996).

La longitud de un péptido antigénico es un asunto controversial, la mayoría de los péptidos antigénicos que se solicitan para síntesis poseen una longitud de 12 a 16 aminoácidos, los cuales son relativamente fáciles de sintetizar. Los péptidos compuestos por 9 aminoácidos o menos han resultado ser antígenos efectivos, pero los péptidos de mayor longitud como los de 12 a 16 aminoácidos pueden contener varios epítomos. Los péptidos constituidos por grupos de 18 a 20 aminoácidos o mayores comienzan a presentar retos y dificultades para su síntesis (Brown, 1994; Herrera, 2004).

Tabla 5. Enfermedades diagnosticadas usando péptidos sintéticos.

Enfermedad	Referencia	Año	País
Rotavirus humano	Hernández M.M.	2003	Cuba
SIDA bovino	Scobie L.	1999	Inglaterra
SIDA felino	Pierre Sibile	1994	Suiza
Leucemia viral felina	Boenzli E.	2014	Suiza
Listeria	Shabu Shoukat	2013	India
Rabia	Simone Niederhäuser	2008	Suiza
Lentivirus de peq. Rum.	Leticia San José	2015	España
Hepatitis G	María Teresa Pérez	2007	Suiza
<i>Plasmodium falciparum</i>	Raúl Isea	2013	Venezuela
Fiebre Hemorrágica del Congo	Arafat Rahman	2015	Bangladesh
<i>Brucella abortus</i>	Louisa B.	1994	U.S.A.
Rotavirus bovino	M. K. Ijaz	1995	Gran Bretaña
<i>Taenia solium</i>	M. Huerta	2000	México
<i>Streptococco</i>	M. Bruner	2003	U.S.A.
<i>Bordetella pertussis</i>	Jan Fagerberg	1999	Suiza
Fiebre del valle de Rift	Janusz T. Paweska	2007	Sudáfrica
<i>Plasmodium vivax</i>	Sócrates Herrera	2004	Australia
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Milenen Hernández	2002	Cuba

1.22. Glicoproteína gp90

La proteína gp90 se caracteriza por ser una proteína que tiene 17 sitios de glicosilación, uniéndose a las moléculas de los hidratos de carbono mediante el nitrógeno de las asparaginas principalmente y por el oxígeno de las serinas y/o treoninas en menor proporción (Murphy y cols, 1999). Esta proteína superficial presenta regiones conservadas entre regiones variables. Al igual que las glicoproteínas de otros lentivirus como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de Inmunodeficiencia Bovina (VIB) y Virus de Inmunodeficiencia Felina (VIF), está expuesta a permanentes modificaciones, asociadas a las sucesivas replicaciones y mutaciones que sufre el virus (Leroux y cols, 1997). Se han descrito dos regiones constantes ubicadas una en el extremo amino terminal (N-terminal), entre los aminoácidos (aa.) 1-110, y otra, en el extremo carboxilo terminal (C-terminal), aa. 370-444. Entre ambos extremos se ubica una región central variable, aa. 111- 370, que a su vez presenta una región de hipervariabilidad (HVR) (306- 336). Se han definido 8 dominios variables: V1 aa. (26-41), V2 aa. (145-149), V3 aa. (186-200), V4 aa. (233-237), V5 aa. (275-285), V6 aa. (307-316), V7 aa. (366-376) y V8 aa. (393-402). El dominio V3 aa. (186-200) es el que presenta mayor variabilidad, que junto al V4 aa. (233-237) son los más extensamente estudiados por adoptar la misma topología que las regiones V1 y V2 de la proteína gp120 del virus VIH (Zheng y cols., 1997; Leroux y cols., 1997; Leroux y cols., 2001; Howe y cols., 2002; Dai y cols., 2003; Mealey y col., 2004; Sponseller y cols., 2007; Li y cols., 2005).

Dado que la glicoproteína gp90 presenta, en el curso de la enfermedad un elevado poder inmunogénico, varios investigadores han buscado definir los epítopes T y B más relevantes, ver tabla 6 (Perryman y cols., 1990; Ball y cols., 1992; Grund y cols., 1996; Zheng y cols., 1997; Mc Guire y cols., 2002; McGuire y cols., 2003; Mealey y cols., 2004; Leroux y cols., 2004). Los epítopes B ubicados en las regiones más conservadas son reconocidos por anticuerpos no neutralizantes, en tanto que los ubicados en regiones variables son reconocidos por anticuerpos neutralizantes (Grund y cols., 1996; Zheng y cols., 1997). Mediante el empleo de péptidos sintéticos y anticuerpos monoclonales, en el extremo N-terminal, Ball y colaboradores (1992) identificaron 5 regiones (región 1, 4, 5A, 5B y 6) reconocidas por anticuerpos presentes en al menos el 70% de los equinos persistentemente infectados. Se ha observado que además, un anticuerpo monoclonal no neutralizante

reconocería al epítoto lineal KEARDQEMN (50-58), denominado Gp90-A, reconocido además por anticuerpos equinos presentes en el 30% de los animales analizados (Ball y cols., 1992). Dentro de la región variable central de la Gp90 se ha identificado una región denominada Dominio Neutralizante Principal (PND) aa. (175-213), reconocida tanto por anticuerpos presentes en el 75% de los equinos persistentemente infectados como por anticuerpos generados en la fase aguda de las infecciones experimentales (Ball y cols., 1992; Zheng y col., 1997). En ella se distingue una secuencia peptídica, denominada región V1 aa. (187-216), que ha sido reconocida por el 70% de los sueros analizados (Ball y cols., 1992). Dentro de la región PND se han identificado además dos epítotos denominadas Gp90-ENT (SNSRVEDVT) aa. (191-200) y Gp90-DNT (NTAEYWGFK) aa. (201-209) reconocidos por anticuerpos monoclonales con capacidad para neutralizar al virus *in vitro* (Ball y cols., 1992; Zheng y col., 1997). Ambos fueron también reconocidos por anticuerpos equinos presentes en el 40% y 15% respectivamente de los animales analizados (Ball y cols., 1992). Por otra parte, en la región de estos epítotos B se encontró un epítoto T, denominado *Env* RW12 RVEDVTNTAEYW aa. (195-206), reconocido por linfocitos T citotóxicos (LTc) en restricción al haplotipo ELA-A1 (Ridgely y McGuire, 2002; Mealey y cols., 2003; Ridgely y cols., 2003). McGuire y colaboradores han hallado que este epítoto fue reconocido por LTc provenientes de todos los animales analizados (McGuire y col., 2003). Por otra parte, Fraser y colaboradores encontraron que una variante de este epítoto (RVEDVMNTTEYW) aa. (195-206), que fue reconocida por linfocitos T provenientes de 6 de los 15 equinos analizados, cuyos haplotipos fueron A5/A6, A1/W11, A1, A6, A1/A5 (Fraser y col., 2003). Si bien se ha encontrado que dicho epítoto T es inmunodominante por persistir durante 127 días posteriores a la infección experimental, también se observó que no había correlación entre las células CD8⁺ específicas del epítoto T *Env* RW12, con la elevada avidéz de anticuerpos y el control de la carga viral en dos animales con haplotipo ELA-A1 infectados experimentalmente con el virus (Mealey y cols., 2003; Mealey y cols., 2005). Otra información obtenida fue que ambos epítotos B y T, al estar ubicados en una región de elevada tasa de mutación (V3) aa. (186-200), perdían la capacidad de ser reconocidos por los LTc y por los anticuerpos específicos presentes en la etapa crónica de la infección. Esto ocasionaría que las cuasiespecies virales evolucionen hacia fenotipos resistentes a los mecanismos efectores inmunológicos (Mealey y cols., 2003). Este fenómeno también

documentado en VIH-1, sería consecuencia de una acción selectiva del sistema inmune (Howe y cols., 2002). Esto fue posteriormente comprobado al observar que el grado de mutación viral en las regiones V3 aa. (186-200)/V4 aa. (233-237), era significativamente superior en animales inmunocompetentes infectados que el observado en equinos SCID infectados (Mealey y col., 2004). En efecto, en animales inmunocompetentes infectados experimentalmente el 68% de las cuasiespecies tenían mutaciones a nivel de V3 (186-200) y el 50% en el epítipo Env RW12 (195-206). En animales con SCID infectados las variaciones fueron significativamente menores, encontrándose que sólo un 8,5 % de las cuasiespecies tuvieron mutaciones en V3 aa. (186-200) y un 6,4% en Env RW12 aa. (195-206). Al reconstituir en estos animales su sistema inmune mediante transferencia de LB y LT derivados de animales inmunocompetentes, el 100 % de las cuasiespecies virales sufrieron cambios en V3 aa. (186-200)/V4 aa. (233-237) y Env RW12 aa. (195-206), así como también a nivel de las regiones variables V5 aa. (275-285), V6 aa. (307-316) y V7 aa. (366-376) (Mealey y col., 2003; Mealey y col., 2004). Dentro de la región variable central no incluida en PND (175-213), Ball y colaboradores (1992) encontraron otras cinco regiones, denominadas V8 aa. (138-160), V3 aa. (241-269), V4A aa. (265-285), V4B aa. (281-301) y V5B aa. (313-331), reconocidas por anticuerpos presentes en al menos el 70 % de los animales persistentemente infectados. Entre las regiones V8 aa. (138-160) y V3 aa. (241-269), mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal no neutralizante se identificó un epítipo B, denominado Gp90-B, cuya secuencia es NINDTDTWIP aa. (231-240). Dentro de la región V4A (265-285) con el empleo de un anticuerpo monoclonal neutralizante, se definió un epítipo Gp90- CNT (PPFFLVQEKGI) aa. (270-280). Ambos epítipos son reconocidas por anticuerpos presentes en el 45% de los animales persistentemente infectados (Ball y col., 1992). Finalmente, en el extremo C-terminal se han definido dos regiones reconocidas por anticuerpos provenientes de la mayoría de los equinos infectados. La mejor reconocida identificada como región 12 aa. (416-441), no sólo fue reconocida por los anticuerpos presentes en el 100% de los animales infectados, sino también por aquellos generados en infecciones experimentales durante las tres fases de la enfermedad. Por su naturaleza anfipática se propone que esta región, además, podría ser reconocida por los TCR. Con menor reconocimiento también se ha determinado una

segunda secuencia, identificada como región 11 aa. (395-420) reconocidas por sueros proveniente del 85% de los animales en estudio (Ball y cols., 1992).

Tabla 6. Trabajos realizados utilizando péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos contra el Virus de Anemia Infecciosa Equina.

PÉPTIDO	REGIÓN	OBJETIVO	AÑO	AUTOR	PAÍS
Múltiples	Todo el gen <i>env</i>	Mapeo	1991	Judoth M. Balll	U.S.A.
523-547(25 aa.)	Gp45	Dx	2000	Soutullo Adriana	Argentina
1-20 (20 aa.)					
523-547(25 aa.)	Gp90				
(No mostrado)	-	Profilaxis	2005	Darrilyn G. Frases	U.S.A.
(No mostrado)	-	Profilaxis	2005	H. Mealey Robert	U.S.A.
523-547(25 aa.)	Gp45	Dx	2008	S. Bailat Alejandra	Argentina
523-547(25 aa.)	Gp90	Dx			
(No mostrado)	Gp90	Dx	2014	Liu Chong	U.S.A.
(No mostrado)	Gp45	Profilaxis	2016	Liangwei Duran	China

1.23. Unión de los péptidos

Entre las fases sólidas que se utilizan para las pruebas de ELISA, la más utilizada es la placa de plástico, concretamente el poli-estireno con 96 pozos. Las fuerzas de unión que se dan entre el antígeno y la fase sólida son hidrofóbicas. El poli-estireno también puede encontrarse irradiado o tener tratada la superficie, lo cual permite la unión covalente del antígeno a la fase sólida, además de la participación de las uniones por adsorción física. Cuando los péptidos sintéticos se colocan directamente sobre la superficie de una microplaca y reaccionan con los anticuerpos, puede ser difícil verificar si un resultado negativo se debe a la falta de unión inicial entre el péptido y el anticuerpo, o la falta de unión inicial entre el péptido y la superficie de la microplaca. Una manera de determinar si la unión del péptido y la superficie de la microplaca es homogénea, tras la etapa de tapizado se añade un colorante proteico, cuya lectura demostrará la unión del péptido a la superficie (Burki, 1992; Ijaz, 1995; Fagerberg, 1999).

2. Justificación

La prueba de Coggins que es la prueba oficial para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Anemia Infecciosa Equina, sin embargo, diversos estudios han demostrado que tiene una baja sensibilidad en comparación con la prueba de ELISA. Por otro lado, la mayoría de las pruebas comerciales tipo ELISA están diseñadas con base al uso de la proteína viral p26 de cápside, no obstante, la exploración de otros antígenos virales que están más expuestos como la proteína Gp90 de superficie, podrían ser más adecuados en la estimulación temprana y constante para la generación de anticuerpos. En México, no se ha identificado el genotipo viral de la AIE que prevalece en equinos infectados, además, el diagnóstico de esta infección solo se realiza con el uso de pruebas de manufactura extranjera, por lo que es necesario desarrollar alternativas diagnósticas que puedan ser eficientes y a menor costo.

3. Hipótesis

Si en una población de equinos heterogénea se encuentran individuos infectados con el VAIE, es factible identificarlos mediante el uso de un ELISAⁱ usando péptidos sintéticos como antígeno y si estos contienen epítomos conservados de la región de la envoltura Gp90 del VAIE será posible la detección de equinos asintomáticos a partir de muestras de suero y/o plasma.

4. Objetivos

4.1. General

Detectar la presencia de anticuerpos contra el Virus de Anemia Infecciosa Equina (VAIE) con una prueba de ELISA indirecto (ELISAI) utilizando péptidos sintéticos como antígeno.

4.2. Particulares

- Diseñar un péptido sintético utilizando un algoritmo que identifica epítomos lineales para linfocitos B.
- Estandarizar la prueba de ELISAI basada en el uso de un péptido sintético con muestras de plasma y/o suero de equinos de diferentes regiones del país.
- Evaluar las muestras de plasma y/o suero con la prueba de Coggins y comparar los resultados obtenidos con el ELISAI de péptidos.

5. Material y métodos

El grupo de estudio consistió en una población de 140 equinos colectados a través de un muestro no probabilístico por conveniencia con criadores cooperantes, sin distinción de sexo, raza, edad, ni fin zootécnico, de 6 Estados de la República Mexicana los cuales fueron, Estado de México (n=93), Hidalgo (n=18), Ciudad de México (n=15), Yucatán (n=7), San Luis Potosí (n=5) y Tamaulipas (n=2) Inicialmente se evaluaron 90 muestras para la obtención de los controles (positivo y negativo) y de esta forma estandarizar la prueba de ELISAi con péptidos.

5.1. Muestreo

Para la obtención de sangre se utilizaron tubos sin anticoagulante y con anticoagulante (heparina o EDTA) y agujas (BD vacutainer®, USA) estériles por cada animal. Las muestras se obtuvieron por venopunción de la yugular de equinos, los cuales no presentaban signos clínicos específicos relacionados a la infección por el VAIE. Una vez colectadas las muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Las muestras sin anticoagulante se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min para separar el suero. Las muestras con anticoagulante para la obtención de plasma y de leucocitos de sangre periférica se separaron por centrifugaciones y soluciones de lisis, al finalizar las muestras se conservaron a -20° C para estudios posteriores.

5.2. Diseño del péptido sintético

Inicialmente se eligió la longitud del péptido de trabajo y se estableció que este fuera igual o mayor a 15 aminoácidos ya que basado en la literatura estos pueden contener más de dos epítomos, y un segundo criterio que se estableció fue diseñarlo a partir de la proteína de envoltura del VAIE, ya que se sabe que el reconocimiento antigénico al inicio de la infección sucede con las proteínas más superficiales del virus, con esto presente se recopiló información de artículos científicos y se utilizaron programas bioinformáticos como BioEdit, para la comparación de secuencias de aminoácidos y determinar las regiones más conservadas. Todas las secuencias se descargaron del GenBank, donde se encontraron

secuencias disponibles de países como Japón, China, Italia y Estados Unidos. La predicción de epítomos de péptidos lineales para linfocitos B se realizó con el programa Antibody Epitope Prediction utilizando el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar, este algoritmo muestra péptidos que tienen tres grandes características: la primera antigenicidad, lo cual nos permite hipotetizar que este péptido favorecerá la unión con los anticuerpos que se forman en la infección por el VAIE, la segunda característica es la flexibilidad, que permite suponer que no habrá rupturas entre la unión péptido-anticuerpo y la tercer característica es la hidrofiliidad, que predice la preservación de la unión péptido-anticuerpo en un entorno líquido. Se dispusieron de 22 secuencias de aminoácidos de la proteína de envoltura de diferentes cepas virales de VAIE reportadas, se alinearon las secuencias encontradas con el programa BioEdit y se observó una conservación adecuada entre cada secuencia y una vez generada una propuesta de péptidos que cumplieran las diferentes características que previamente fueron descritas y que se ubicaran en una región conservada entre las 22 secuencias (figura 6) y que adicionalmente, el péptido incluyera la presencia de dos cisteínas lo cual nos supone la posible formación de loops lo que expone los epítomos y mejora la sensibilidad en el diagnóstico.

Una vez seleccionado el péptido de trabajo se solicitó a la empresa Peptide 2.0 en Estados Unidos la síntesis con una pureza del 75%

5.3. Técnica de ELISA indirecta

La técnica de ELISA se realizó en el Centro Médico Siglo XXI, en el laboratorio de inmunovirología del hospital de pediatría, con el apoyo de la M en C. María Martha García Flores. Una vez identificados los sueros equinos positivos y negativos que se usarían de controles utilizando un ELISA comercial (ViraCHEK/EIA, USA) se estandarizó la técnica de ELISA indirecta. Se utilizaron placas de 96 pozos previamente sensibilizadas con el péptido diseñado, evaluando diferentes concentraciones de antígeno (300, 600 y 1200 ng.), una vez hecho esto se bloquearon los sitios no cubiertos por el antígeno, utilizando caseína al 3% en PBS con un pH = 7 incubando la placa a 37° C por una hora. Enseguida se realizaron 5 lavados utilizando 250 µl de solución de lavado. Posteriormente se evaluaron diferentes diluciones del suero (1:10, 1:20 y 1:40) por duplicado e incluyendo un pozo blanco el cual no se le adicionó antígeno (péptido), se incubó por 60 minutos a temperatura de 37° C, después se lavó la placa con 5 repeticiones con 250µl de buffer de lavado, enseguida se colocó la proteína G peroxidada a diferentes diluciones (1:625, 1:1250, 1:2500 y 1:5000), se volvió a incubar por 60 minutos a 37° C, al concluir este paso se volvió a lavar con 5 repeticiones con 250µl y por último, se colocó el cromógeno, incubando a temperatura ambiente (20, 30 y 40 minutos), y finalmente, se realizó la lectura de la densidad óptica de cada muestra en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405nm. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por de Andrés y cols., 2013. La densidad óptica neta se calculó mediante la diferencia entre la densidad óptica del pozo sin antígeno y la media de las densidades ópticas de los dos pozos con antígeno, se determinó el valor de corte con los sueros sin reactividad, se calculó el valor obteniendo la desviación estándar (γ^2) y se triplicó este valor y se restó la media (\bar{X}), a este resultado se le dio un 10% de confianza por lo que se le restó un 10% para confirmar los resultados negativos y se le sumó un 10% para confirmar los resultados positivos.

*No se establecen las condiciones precisas del protocolo de trabajo por requisitos para una probable solicitud de patente.

5.4. Técnica de Inmunodifusión en Gel de Agar (Coggins)

Esta técnica se realizó en el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular siguiendo las instrucciones del fabricante (VMRD, USA), brevemente: se preparó un buffer de boratos (2g NaOH y 9g de ácido bórico) en un litro de agua destilada (pH = 8.6) el cual se utilizó para la preparación del agar noble al 0.8% (0.064g.). La solución se calentó para disolver el agar, se vertió 8 ml en una caja de petri de 5 cm x 1.8 cm se dejó gelificar y posteriormente se perforo el gel con un sacabocados quedando un pozo central y seis pozos periféricos, en el pozo central se agregó 50 µl de antígeno y en un pozo periférico el suero control positivo, y en los demás pozos se agregaron 50 µl desueros problema dejando incubar a temperatura ambiente en cámara húmeda por 48 a 72 horas (apéndice 1).

6. Resultados

Se obtuvieron los siguientes resultados en una población de 90 muestras evaluadas inicialmente con un ELISA comercial identificando 6 casos positivos (6.7%) y 84 negativos (93.3%). Por otro lado, en la prueba de ELISA basada en péptidos evaluando la población completa de estudio de 140 muestras, ver figura 7, se obtuvieron 15 (10.7%) sueros positivos y 125 (89.3%) negativos.

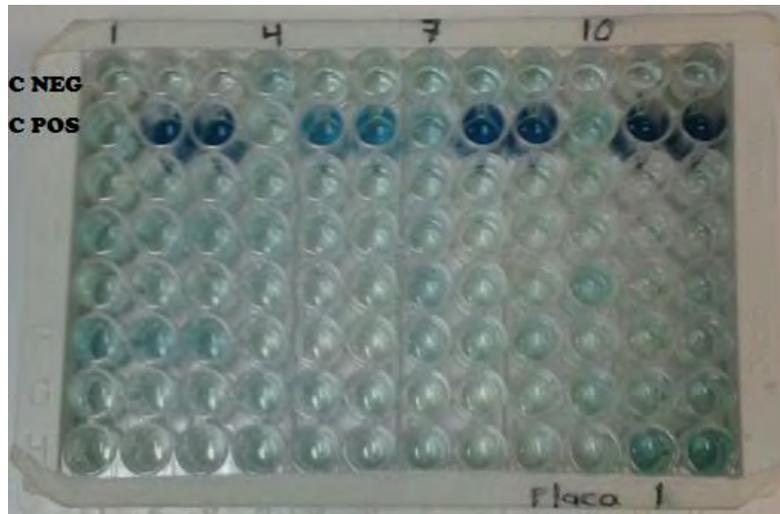


Figura 7. Se observa la placa de ELISA de péptidos donde las columnas 1, 4, 7 y 10 son pozos de referencia (no se adicionó antígeno) y cada muestra se trabajó por triplicado. Ejemplo A1, A2 y A3 suero control negativo y B1, B2 y B3 suero control positivo, El tono azul evidencia una reacción positiva.

Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular el valor de corte realizándolo de la siguiente manera:

$$\bar{X} \text{ Media} = 0.0196$$

$$\gamma^2 \text{ Desviación estándar} = 0.04924$$

$$\text{Y aplicando la formula la cual es } VC = 3 \gamma^2 - \bar{X}$$

$$\text{Valor de corte es igual a } 3(0.04924) - 0.0196 = 0.128$$

Con el 10% de confianza para resultados positivos (0.1408 o mayor) y para resultados negativos (0.1152 o menor), ver tabla 7, los valores intermedios se consideran indeterminados y el criterio fue el siguiente:

Un valor igual o superior a 0.1408 se consideró como un suero positivo a la presencia de anticuerpos contra el VAIE (n=15).

Un valor igual o menor a 0.1152 se consideró como un suero negativo a la presencia de anticuerpos contra el VAIE (n=125).

Y por último los valores que estuvieran entre 0.1152 y 0.1408 se consideraron como suero indeterminado a anticuerpos contra el VAIE. (n=0).

Tabla 7. Densidades ópticas obtenidas en muestras de sueros de equinos evaluados en la prueba de ELISA de péptidos para identificar anticuerpos contra el VAIE.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.215	0.153	0.151	0.267	0.175	0.173	0.564	0.263	0.237	0.321	0.203	0.163
B	0.402	Over	Over	0.057	0.250	0.220	0.266	0.151	0.153	1.651	0.491	0.337
C	0.335	0.245	0.242	0.253	0.166	0.171	0.316	0.155	0.123	0.226	0.175	0.101
D	0.343	0.231	1.043	0.623	0.400	0.322	0.331	0.073	0.340	0.332	0.332	0.231
E	0.461	0.459	0.441	0.304	0.142	0.133	0.724	0.260	0.234	0.296	0.160	0.147
F	0.417	0.216	0.104	0.201	0.171	0.164	0.136	0.130	0.122	0.330	0.237	0.543
G	0.267	0.107	0.150	0.200	0.133	0.147	0.130	0.144	0.147	0.462	0.191	0.193
H	0.255	0.223	0.226	0.210	0.140	0.135	0.464	0.121	0.137	1.013	0.335	0.362

Suero control negativo está en los espacios A1, A2 y A3 y el suero control positivo está en los espacios B1, B2 y B3; el resultado over significa una valor por arriba de 2.5 en la lectura

En los resultados obtenidos a la prueba de IDAG, ver figura 8, todos los casos fueron negativos (100%).

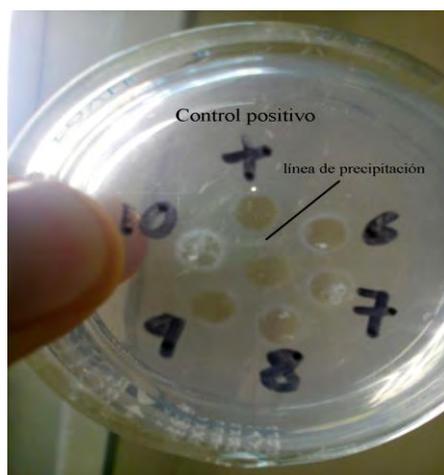


Figura 8. En esta figura se observa un ejemplo de los resultados en la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar, donde hay 7 pozos, uno central y seis periféricos, en uno de los pozos periféricos se adicionó el suero control positivo y entre el pozo central (antígeno) se visualiza una línea de identidad.

Tabla 8. Resultados obtenidos en diferentes técnicas para la detección de anticuerpos contra el Virus de Anemia Infecciosa Equina.

Técnica serológica		ELISA Péptidos		ELISA Comercial		Coggins IDAG	
Estado	Equinos	Casos (-)	Casos (+)	Casos (-)	Casos (+)	Casos (-)	Casos (+)
Estado de México	93	79	14	37	6	93	0
Hidalgo	18	18	0	18	0	18	0
Tamaulipas	2	2	0	2	0	2	0
Yucatán	7	6	1	6	1	7	0
San Luis Potosí	5	5	0	5	0	5	0
Ciudad de México	15	15	0	15	0	15	0
TOTAL	140	125	15	83	7	140	0

*El objetivo inicial con la prueba de ELISA comercial fue identificar sueros controles positivos y negativos, por lo que no se analizaron el total de las muestras del estudio.

Cabe destacar que la coincidencia entre los casos seropositivos a ELISA comercial y ELISA péptidos solo fueron dos, por lo tanto los otros cuatro casos positivos a ELISA comercial a ELISA péptidos fueron negativos.

Tabla 9. Muestras seropositivas al virus de anemia infecciosa equina evaluados con un ELISA de péptidos, mostrados según región geográfica, fin zootécnico, sexo, edad y raza

Estado/Muestras	Fin zootécnico/ seropositivos		Sexo/seropositivos		Edad (años)/ seropositivos			Raza/seropositivos		
	Trabajo	Carreras	Machos	Hembras	1-5	6-10	11 ≤	Criollo	P.S.I.	Q.M.
Estado de México/93	70/8	23/7	60/9	33/5	37/7	21/4	35/4	67/8	14/3	12/4
Hidalgo/18	-	18	12	6	7	7	4	-	-	18
Tamaulipas/2	-	2	1	1	2	-	-	-	2	-
Yucatán/7	-	7/1	5/1	2	7/1	-	-	-	2/1	5
San Luis Potosí/5	-	5	2	3	5	-	-	-	2	3
Ciudad de México/15	-	-	14	1	11	4	-	-	7	8

P.S.I. = Pura Sangre Ingles, Q.M. = Cuarto de Milla

En el siguiente mapa se muestran los Estados de la República donde se colectaron las muestras y la cantidad que apporto cada lugar para este trabajo.



Figura 9. Mapa de la república Mexicana donde se indica el Estado y el número de muestras evaluadas (n=140).

7. Discusión

La anemia infecciosa equina se encuentra ubicada en el grupo 2 del listado oficial de enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, el cual incluye enfermedades de alto riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, y son de notificación obligatoria (Diario oficial de la federación, 2016).

En el presente estudio se identificó 6.7% de equinos seropositivos al virus de anemia infecciosa equina en un muestreo realizado completamente al azar en seis Estados de la República Mexicana, este porcentaje de animales seropositivos fue muy similar a lo descrito en Colima por Castillo y cols, en el 2013, y también al estudio realizado en Zacatecas por Vázquez en 2014, pero fue inferior a lo descrito en Chiapas por Barajas y cols, en el 2006, y por lo encontrado por Bermúdez en Baja California en 2014, en ambos estudios también se utilizaron pruebas de ELISA comerciales. La OIE describe que la técnica oficial para el diagnóstico de AIE es la prueba de Coggins (OIE, 2013), sin embargo se conoce que existen otras alternativas diagnósticas que tienen una mayor sensibilidad y por lo tanto, mejoran la detección de animales infectados (Vázquez, 2014).

Se han realizado estudios en diferentes Estados de la República Mexicana utilizando kits de diagnóstico para la identificación de AIE, como en Baja California donde evaluaron 423 muestras, Zacatecas con 963 muestras, Colima con 548 muestras, Chiapas 180 muestras, no obstante, no hay reportes que describan muestreos completos de la población equina existente en algún Estado, lo que no permite conocer con certeza la seroprevalencia real del lugar. En el presente estudio se diseñó un péptido sintético para utilizarlo como antígeno en pruebas de ELISA, siendo importante resalta que este antígeno derivó de la proteína gp90 (envoltura) del virus y que a diferencia de la mayoría de las pruebas de ELISA comerciales que utilizan como antígeno la proteína p26 (cápside), lo que en principio se consideró que con la prueba propuesta es el presente estudio se podrían detectar anticuerpos en etapas iniciales de infección, así como, anticuerpos en el caso de infecciones de mucho mayor tiempo, ya que el antígeno está expuesto, lo que favorece el estímulo y reconocimiento inmunológico. Por otro lado, el número de muestras evaluadas no representan el número real de frecuencia de infección para cada Estado, sin embargo, si es indicativo de la importancia que puede tener la AIE en los lugares donde se detectó. El número de muestras

fue diferente por región de estudio, siendo mayor para el Estado de México con 93 muestras y menor para las demás regiones Hidalgo con 18 muestras, Ciudad de México con 15 muestras, Yucatán con 7 muestras, San Luis Potosí con 5 muestras y Tamaulipas con 2 muestras. La condición fundamental para emplear péptidos sintéticos como antígenos es la de demostrar primeramente si son capaces de imitar a los sitios antigénicos correspondientes a las proteínas nativas, y por ende, ser reconocidos por las células y moléculas producidas en respuesta a la infección viral (Van Regenmortel, 1999; Van Regenmortel y Muller, 1999).

Si bien hasta el presente hay pocos reportes de la presencia de epitopes del gen *env* se han identificado regiones antigénicas, en coincidencia con los resultados del presente estudio (Ball y col., 1992). Dado que el gen *env* tiene regiones conservadas, se considera de interés realizar oportunamente un estudio más exhaustivo de este gen, con el objetivo de realizar una caracterización antigénica e inmunogénica más completa (Burki, 1992).

Inicialmente fueron descritas dos regiones conservadas en la proteína Env del VAIE, ubicadas una en el extremo amino terminal (N-terminal), entre los aminoácidos (aa.) 1-110, y otra, en el extremo carboxilo terminal (C-terminal), aa. 370-444. Así mismo, se han definido 8 dominios variables: V1 aa. (26-41), V2 aa. (145-149), V3 aa. (186-200), V4 aa. (233-237), V5 aa. (275-285), V6 aa. (307-316), V7 aa. (366-376) y V8 aa. (393-402). En este trabajo el péptido diseñado no se ubicó en ninguna de estas regiones, por lo que se puede creer que se identificó una zona que puede ser de gran importancia desde el punto de vista de conservación viral, así como, de región inmunodominante.

En otros trabajos se han realizado mapeos en la proteína Env, obteniendo una serie de péptidos con resultados variables en 20 muestras positivas al VAIE, además, se compararon con 25 péptidos donde solo 2 de ellos reaccionaron al 100%, 2 al 85%, 2 al 80%, 1 al 70%, 2 al 60%, 1 al 45% y 1 al 10% de reactividad, esta variación demuestra que cada péptido tiene diferente reactividad. Los resultados de este trabajo son considerados de una alta reactividad al péptido estudiado, al compararlo con los resultados negativos de todas las muestras a Coggins (Ball J. M., 2006), sin embargo, es necesario evaluar su reactividad con una población mas grande.

En otro trabajo donde se analizaron 3 péptidos, uno derivado de la región Gp45 y dos de la región Gp90 con 64 muestras, los péptidos Gp45 y Gp90 II fueron los más reactivos ya que

el péptido Gp90 I no identificó ninguna muestra como positiva, mientras que 28 muestras ya sea al péptido Gp 90 II o Gp 45 resultaron positivas (43.75%) a diferencia de lo obtenido en este estudio, donde solo el 10.7% de las muestras tuvieron resultado positivo (Soutullo, 2001), no obstante, la sensibilidad de la ELISA comercial fue mucho menor.

Los péptidos sintéticos de las regiones Gp90 y Gp45 han sido sumamente estudiados como antígeno y se ha demostrado buenos resultados, por ejemplo, en un estudio de 10 equinos 5 fueron positivos a IDAG y 5 fueron negativos, ambos tipos de sueros fueron analizados con un ELISA a base de péptidos derivados de la Gp90 y Gp45, y el péptido derivado de la Gp90 identificó las 5 muestra positivas, y el péptido de la Gp45 solo 3 muestras positivas, cabe mencionar que en ningún trabajo se ha estudiado el péptido usado en el presente estudio (Bailat, 2008).

El uso de péptidos sintéticos tienen grandes ventajas como son:

- Alta calidad al precio más competitivo: desde \$2.0 por residuo de aminoácido (aa.).
- Alta tasa de éxito: > 99%.
- Tiempo de entrega rápido: 2 semanas para péptidos no purificados y 3 semanas para péptidos purificados.
- Síntesis: se pueden sintetizar péptidos de hasta 121 aminoácidos.
- Cantidad: desde 1 mg hasta kilogramos.
- Purezas: de crudo a > 98% de pureza.

Sin embargo, para lograr la generación de un péptido reactivo se recomienda sintetizar secuencias peptídicas específicas, que deben incluir residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, y es favorable que el péptido incorpore aminoácidos que promueven la inmunogenicidad como aminoácidos básicos (Lisina (K), Arginina (R) e Histidina (H)) y aromáticos (Fenilalanina, (F) Tirosina (Y) y Triptófano (W)). El contenido de aminoácidos hidrofobos (alanina, (A) leucina, (L) isoleucina, (I) valina, (V) prolina, (P) fenilalanina, (F) triptófano (W) y metionina (M)) se debe mantener por debajo del 50% y preferiblemente se deben evitar

cadenas largas de residuos hidrófobos. Para la solubilidad del péptido, se debe incorporar al menos un residuo cargado (arginina, (R) ácido aspártico, (D) histidina, (H) ácido glutámico (E) o lisina (K)) dentro de cada cinco aminoácidos. La solubilidad de los péptidos también se puede mejorar a través de reemplazos conservadores o adición de residuos polares al extremo N o C terminales. Para la mayoría de los proyectos de generación de anticuerpos, se recomienda una pureza de al menos 85% para cualquier antígeno peptídico (Brown, 1994). Sin embargo, en el péptido de este trabajo se conto con 3 aminoácidos que promovian la inmunogenicidad, un contenido de 43% de hidrofobicidad y se incorporo 1 aminoácido con carga dentro de cada 8 aminoácidos y por último se conto con una pureza del 75%.

8. Conclusiones

1. Se detectó con la prueba de ELISA basada en un péptido sintético derivado de la proteína de envoltura (Gp90) anticuerpos en sueros contra el virus de Anemia Infecciosa Equina.
2. La prueba de ELISA-péptido fue aparentemente más sensible que otras pruebas comerciales.
3. Es una técnica de diagnóstico más segura para el laboratorista ya que no ocupa antígenos derivados de cultivos celulares infectados con el virus de AIE.
4. El algoritmo utilizado para el diseño del péptido generó una buena predicción de un péptido sintético que presentó epítomos reconocidos por anticuerpos de equinos infectados con el VAIE.

9. Apéndice

Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) para el diagnóstico de anemia infecciosa equina.

Se realizó según las instrucciones del fabricante (VMRD, USA)

1. Preparar un buffer de boratos (2g. de NaOH y 9g. de ácido bórico en un litro de agua destilada) con un pH = 8.6.
2. Preparar una solución al 0.8 % de agar noble (Becton Dickison, Francia) en buffer de boratos.
3. Transferir 8 ml. a la caja petri (5 cm x 1.2 cm) asegurando un grosor de 0.6 cm del gel.
4. Una vez gelificado, cortar los pozos con un sacabocados de un diámetro de 2.4 mm. La distancia entre cada pozo deberá ser de 5.3 mm.
5. Colocar 50 µl de antígeno en el pozo central, 50 µl de control positivo y 50 µl de los sueros problema en los pozos periféricos
6. Dejar incubar por al menos 48 hrs en cámara húmeda.
7. Observa e interpretar el resultado.

10. Bibliografía

1. Abada, P., Noble, B., Cannon, P.M., 2005. Functional domains within the human immunodeficiency virus type 2-envelope protein required to enhance virus production. *Journal of Virology* 79, 3627–3638.
2. Abada, Amores-Sánchez, I.; Gómez- Cordero, I.; Balujad-Conde, I.; Acosta-Bas, C.; Brittos-Moreno, D. & Hernández-Martin, M. (2000). Evaluación de la respuesta inmune contra péptidos sintéticos representativos del *Treponema pallidum* en la línea de ratones BALB/c. *Bioqca*, 25(4):95-99.
3. Álvarez, I.; Gutiérrez, G.; Vissani, A.; Rodríguez, S.; Barrandeguy, M. & Trono, K. (2007). Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Vet Microbiol*, 125(3-4):344-351.
4. Augusto, D.J. (2014). El virus de la anemia infecciosa equina, no afecta a humanos, ni es contagioso para los humanos. <http://caballosyopinion.com/?p=3781>
5. Autorino, G.L., Eleni, C., Manna, G., Frontoso, R., Nardini, R., Cocumelli, C., Rosone, F., Caprioli, A., Alfieri, L., Scicluna, M.T., 2016. Evolution of equine infectious anemia in naturally infected mules with different serological reactivity patterns prior and after immune suppression. *Vet. Microbiol.* 189, 15–23.
6. Barajas, J. A., R. I. Orea y G. C. Juárez. 2006. Epidemiología de Virus de Anemia Infecciosa Equina en el Estado de Chiapas, México, Frontera con Guatemala. *Memorias PANVET*, Santiago de Chile, del 13 al 16 de Noviembre de 2006.
7. Ball, J. M.; Rushlow, K. E. Issel, C. & Montelaro, R. C. (1992). Detailed Mapping of the Antigenicity of the Surface Unit Glycoprotein of Equine Infectious Anemia Virus by Using Synthetic Peptide Strategies. *J Virol*, 66(2): 732-742.
8. Ball, J.M.; Henry, N.L.; Montelaro, R.C. & Newman, N.J. (1994). A versatile synthetic peptide-based ELISA for identifying antibody epitopes. *J Immunological Methods*, 171: 37-44.
9. Beissel C. E.; Edwards, J. F.; Dunn, L. L. & Rice, N. R. (1993). Analysis of Multiple mRNAs from Pathogenic Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) in a Acutely Infected Horse Reveals a Novel Protein, Ttm, Derived from the Carboxyl Terminus of the EIAV Transmembrane Protein. *J Virol*, 67 (2): 832-842

10. Bermúdez F. López G. (2014). Detección de anemia infecciosa, Influenza A, Herpes y Encefalitis del oeste del Nilo en equinos de Baja California por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, UABC. Mexicali, B.C.
11. Belshan, M.; Baccam, P.; Oaks, L.; Sponseller, B.A.; Murphy, S.C.; Cornette, J. & Carpenter, S. (2001). Genetic and Biological Variation in Equine Infectious Anemia Virus Rev Correlates with Variable Stage of Clinical Disease in an Experimentally Infected Pony. *Virology*, 279:185-200.
12. Ben-Yididia, T. & Arnon, R. (1997). Design of peptide and polypeptide vaccines. *Curr Opin Biotechnol*, 8:442-448.
13. Blaha, T. (1995). Epidemiología especial veterinaria. Zaragoza. España. Editorial Acribia pag. 253-256
14. Birkett, A. J.; Yélamos, B.; Rodríguez-Crespo, I.; Gavilanes, F. & Peterson, D.L. (1997). Cloning, expression, purification, and characterization of the major core protein (p26) from Equine Infectious Anemia Virus. *Biochim Biophys Acta*, 1339: 62-72.
15. Boudet, F.; Lasarte, J.J.; Sarobe, P.; Borrás-Cuesta, F. & Theze, J. (1996). Fine analysis of immunoreactivity of V3 peptides: antibodies specific for V3 domain of laboratory HIV type 1 strains recognize multiple V3 sequences synthesized from field HIV type 1 isolates. *Aids Res Hum Retroviruses*, 12(18):1671- 1679.
16. Brown, F. (1994). Synthetic peptides and purified antigens as vaccines. *Int J Technol Assessment Health Care*. 10 (1):161-166.
17. Brown, F. (1994). Peptide vaccines: dream or reality?. The Leeuwenhoek Lecture, *Phil Trans R Soc Lond B*, 344:213-219. Burroughs Tencza. S; Islam, K. R.; Kalia, V.; Nasir, M.S.; Jolley, M.E. & Montelaro, R.C. (2000). Development of a Florescence Polarization-Based diagnostic Assay for Equine Infectious Anemia Virus. *J Clin Microbiol*, 38(5): 1854-1859.
18. Bruner, M.; Beall, J.B.; Carlone, G.M.; Ades, F.; Guarner, J. & Sampson, J. (2003). Evaluation of synthetic M type-specific peptides as antigens in a multivalent group a streptococcal vaccine. *Vaccine*, 21:2698-2703.

19. Burki, F.; Rossmanith, W. & Rossmanith, E. (1992). Equine lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anemia. *Vet Microbiol*, 33:353-360.
20. Castillo V D, García R C O, Carreón F. V.G, y Verduzco B R. (2013). Prevalencia del virus de anemia infecciosa equina en el estado de Colima. *Memorias del XXXV Congreso Anual, AMMVEE, Querétaro 16 al 19 de Octubre.*
21. Chong, Y.H., Ball, J.M., Issel, C.J., Montelaro, R.C., Rushlow, K.E., 1991. Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp45) of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 65, 1013–1018
22. Chung, C., Wilson, C., Timoney, P., Balasuriya, U., Adams, E., Adams, D.S., Evermann, J.F., Clavijo, A., Shuck, K., Rodgers, S., Lee, S.S., McGuire, T.C., 2013. Validation of an improved competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect Equine arteritis virus antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 727–735
23. Chong, Y-H.; Payne, S. L.; Issel, C. J.; Montelaro, R. C. & Rushlow, K. E. (1991). Characterization of the antigenic domains of the major core protein (p26) of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 65(2): 1007- 1012.
24. Colling, A., Morrissy, C., Barr, J., Meehan, G., Wright, L., Goff, W., Gleeson, L.J., van der Heide, B., Riddell, S., Yu, M., Eagles, D., Lunt, R., Khounsy, S., Than Long, N.G., Phong Vu, P., Than Phuong, N., Tung, N., Linchongsubongkoch, W., Hammond, J., Johnson, M., Johnson, W.O., Unger, H., Daniels, P., Crowther, J.R., 2014. Development and validation of a 3ABC antibody ELISA in Australia for foot and mouth disease. *Aust. Vet. J.* 92, 192–199.
25. Cook R.F., Leroux, C., Issel, C.J., 2013. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. *Vet. Microbiol.* 167 (1–2), 181–204
26. Cook S.J.; Cook, R.F.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (2001). Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of Equine Infectious Anemia Virus. *Vet Microbiol*, 79: 93-109.
27. Craigo, J.K.; Li, F.; Steckberck, J.D.; Durkin, S.; Howe, L.; Cook, S.J.; Issel, C. & Montelaro, R.C. (2005). Discerning an effective balance between Equine Infectious Anemia Virus attenuation and vaccine efficacy. *J Virol*, 79(5): 2666-2677.

28. Craig, J.K., Durkin, S., Sturgeon, T.J., Tagmyer, T., Cook, S.J., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 2007. Immunosuppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. *Vaccine* 25, 834–845.
29. Egberink, H.F., Ederveen, J., Montelaro, R.C., Pedersen, N.C., Horzinek, M.C., Koolen, M.J.M., 1990. Intracellular proteins of feline immunodeficiency virus and their antigenic relationship with equine infectious anemia virus proteins. *J. Gen. Virol.* 71, 739–743.
30. Elliot, S. E.; Pye, S.; Le, T.; Mateo L.; Cox, J.; Mac Donald, L.; Scalzo, A. A.; Forbes, C. A. & Suhrbier, A. (1999). Peptide based cytotoxic T-cell vaccines; delivery of multiple epitopes, help, memory and problems. *Vaccine*, 17: 2009-2019
31. Fagerberg, J.; Askelof, P.; Wigzel, H. & Mellstedt, H. (1999). Induction of CD4+ and CD8+ Bordetella pertussis toxin subunit S1 specific T cells by immunization with synthetic peptides. *Cell Immunol*, 196:110-121.
32. Fidalgo Álvarez L. E. (2003), *Patología médica veterinaria, Enfermedades eritrocíticas*, Kadmos, 163-165
33. Fields, G. & Noble, R. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9 fluorenylmethoxycarbonyl aminoacids. *Int J Pept Protein Res*, 35: 161-214.
34. Fraser, D.G.; Leib, S. R.; Zhan, B. S.; Mealey, H. R.; Brown W. C. & McGuire, T. C. (2005). Lymphocyte proliferation responses induced to broadly reactive Th peptides did not protect against Equine Infectious Anemia Virus challenge. *Clin Diag Lab Immunol*, 12 (8): 983-993.
35. Grund, C. H.; Lechman, E. R.; Pezzuolo, N. A.; Issel, C. J. & Montelaro, R. C. (1996) Fine specificity of equine infectious anemia virus gp90-specific antibodies associated with protective and enhancing immune responses in experimentally infected and immunized ponies. Short communication. *J Gen Virol*, 77: 435-442.
36. Grund, C.H., Lechman, E.R., Issel, C.J., Montelaro, R.C., Rushlow, K.E., 1994. Lentivirus cross-reactive determinants present in the capsid protein of equine infectious anemia virus. *J. Gen. Virol.* 75, 657–662.
37. Hammond, S.A.; Cook, S.J.; Lichtenstein, D.L.; Issel, S.J. & Montelaro, R.C. (1997). Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in

- horses by Equine Infectious Anemia Virus is a complex and lengthy process. *J Virol*, 71: 3852-3870.
38. Herrera, S.; Banelo, A.; Perlazza, B.L.; Valencia, A.Z.; Cifuentes, C.; Hurtado, S. Quintero, G.; López, J.A.; Corradin, G. & Arévalo-Herrera, M. (2004). Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein. *Int J Parasitol*, 34:1535-1546.
39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.003>.
40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.002>.
41. Hines, R., Maury, W., 2001. DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus. *J. Virol. Methods* 95, 47–56.
42. Huerta, M.; De Aluja, A. S.; Frangoso, G.; Toledo, A.; Villalobos, N.; Hernández, M.; Gevorkian, G.; Acero, G.; Díaz, A.; Álvarez, I.; Ávila, R.; Beltrán, C.; García, G.; Martínez, J. J.; Larralde, C. & Sciutto, E. (2002). Synthetic peptide vaccine against Taenia solium pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine*, 20:262-266.
43. Ijaz, M.K.; Alkarmi, T.O.; El-Mekki, A.W.; Galadari, S.H.I.; Dar, F.K. & Babiuk, L.A. (1995). Priming and induction of anti-rotavirus antibody response by synthetic peptides derived from VP7 and VP4. *Vaccine*, 13(4):331-338.
44. Issel, C.J., Cook, S.J., Cook, R.F., Corde, T.R., 1999. Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Equine Vet. Sci.* 19, 728–732.
45. Issel, C.J., Cook, R.F., Mealey, R.H., Horohov, D.W., 2014. Equine infectious anemia in 2014: live with it or eradicate it? *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 30, 561–577. Lew, A.M., Thomas, L.M., Huntington, P.J., 1993. A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anemia virus. *Vet. Microbiol.* 34, 1–5.
46. Issel, C.J., Cook, R.F., 1993. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 137–141.
47. Issel, C.J., Scicluna, M.T., Cook, S.J., Cook, R.F., Caprioli, A., Ricci, I., Rosone, F., Craigo, J.K., Montelaro, R.C., Autorino, G.L., 2013. Challenges and proposed

- solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anemia. *Vet. Rec.* 172, 210.
48. Jiang, S.; Song, R.; Popov, S.; Mirshahidi, S. & Ruprecht, R.M. (2006). Overlapping synthetic peptides as vaccines. *Vaccine*, 24:6356-6365.
 49. Kolaskar ASTPC. http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input, 2014.
 50. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 1990.
 51. Leroux, C., Cadoré, J.L., Montelaro, R.C., 2004. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 35, 485–512.
 52. Lottersberger, J.; Salvetti, J.L.; Beltramini, L.M. & Tonarelli G. (2004). Antibody recognition of synthetic peptides mimicking immunodominant regions of HIV-1 p24 and p17 proteins. *Rev Argent Microbiol*, 36: 151–157.
 53. Martínez J., Cortés F., García A. y López B. (2010). Determinación de la Prevalencia del virus de la anemia infecciosa equina en caballos del campo deportivo del Estado Mayor Presidencial. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores, UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. De México.
 54. Nardini, R., Autorino, G.L., Ricci, I., Frontoso, R., Rosone, F., Simula, M., Scicluna, M.T., 2016. Validation according to OIE criteria of a monoclonal, recombinant p26-based, serologic competitive enzyme-linked immunosorbent assay as screening method in surveillance programs for the detection of Equine infectious anemia virus antibodies.
 55. Nardini, R., Autorino, G.L., Issel, C.J., Cook, R.F., Ricci, I., Frontoso, R., Rosone, F., Scicluna, M.T., 2017. Evaluation of six serological ELISA kits available in Italy as screening tests for equine infectious anemia surveillance. *BMC Vet. Res.* 13, 105.
 56. Nehete, P.N.; Casement, K.S.; Arlinghaus, R.B. & Sastry, K.J. (1995). Studies on in vivo induction of HIV-1 envelope-specific cytotoxic T lymphocytes by synthetic peptides from the V3 loop region of HIV-1 IIIB Gp120. *Cell Immunol*, 160.
 57. Obeid, O.E.; Partidos, C.D.; Howard, C.R. & Steward, M.W. (1995). Protection against Morbillivirus-Induced Encephalitis by immunization with a rationally designed synthetic peptide vaccine containing B- and T-cell epitopes from the fusion protein of Measles Virus. *J Virol*; 69(3):1420-8.

58. OIE. (2009). Anemia Infecciosa Equina. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/equine_infectious_anemia-es.pdf
59. OIE. A.M. (2013) Anemia Infecciosa Equina http://wahis2-devt.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.05.06_EIA.pdf
60. Paré, J., Simard, C., 2004. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Can. J. Vet. Res.* 68.
61. Paweska, J.T., Jansen van Vuren, P., Swanepoel, R., 2007. Validation of an indirect ELISA based on a recombinant nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus for the detection of IgG antibody in humans. *J. Virol. Methods* 146.
62. Rice, N.R.; Henderson, L.E.; Sowder, R.C.; Copeland, T.D.; Oroszlan, S. & Edwards, J.F. (1990). Synthesis and processing of the transmembrane envelope protein of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 64:3770-3778.
63. Robinson, K.; Mostratos, A. & Grecis, K. R. (1995). Generation of Rubeola Virus-neutralizing antibodies by vaccination with synthetic peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 10.
64. Rosati, S., Profiti, M., Lorenzetti, R., Bandecchi, P., Mannelli, A., Ortoffi, M., Tolari, F., Ciabatti, I.M., 2004. Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. *J.Virol. Methods* 121.<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.001>.
65. SENASA. (2005). Manual de procedimientos para la anemia infecciosa equina http://web.fvet.uba.ar/equinos/normativas_para_anemia_infecciosa_equina.pdf
66. Scicluna, M.T., Issel, C.J., Cook, F.R., Manna, G., Cersini, A., Rosone, F., Frontoso, R., Caprioli, A., Antognetti, V., Autorino, G.L., 2013. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anemia? *Vet. Microbiol.* 165, 123–134.
67. Soutullo, A. R. (2008). “Estudio de la capacidad antigénica e inmunogénica de péptidos sintéticos correspondiente a epitopes conservados de las proteínas estructurales del virus de la Anemia Infecciosa Equina

68. Soutullo, A.; Verwimp, V.; Riveros, M.; Pauli, R. & Tonarelli, G. (2001). Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic antigens. *Vet Microbiol*, 79:111-121.
69. Tabatabai, L.B. & Pugh, G.W. Jr. (1994). Modulation of immune responses in BALB/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine*, 12(10): 919-24.
70. Tonarelli, G.G.; Lottersberger, J., Salvetti, J.L.; Jacchieri, S.; Silva-Lucca, R.A. & Beltramini, L.M. (2000). Secondary structure improved bioaffinity correlation in elongated and modified synthetic epitope peptides from p24 HIV-1 core protein. *Lett Pept Sci*, 5: 1–8.
71. Van Houten, N.E.; Zwick, M.B.; Menendez, A. & Scott, J.K. (2006). Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine*, 24: 4188-4200.
72. Van Regenmortel, M.H.V. & Muller, S. (1999). *Synthetic Peptides as Antigens. Immunization with peptides.* (Ed. P.C. van der Vliet). Elsevier Sci B.V. Amsterdam. The Netherlands, 133-178.
73. Vázquez Sánchez J.J. (2014) experiencias con anemia infecciosa equina en el estado de Baja California *Revisión médica equina* vol. 7, 21-29
74. X. de Andrés (2013). An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 152, 277–288.