



**Universidad Nacional Autónoma de México.  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.**

**“Empleo de un Herpesvirus aislado de delfín,  
como antígeno en una prueba de ELISA  
indirecta para diagnóstico del Herpesvirus  
canino”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

Médico Veterinario Zootecnista.

**PRESENTA:**

Alan Eduardo Mata Novellan.

**ASESOR:**

Dr. Guillermo Valdivia Anda.

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTEZ FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
Cuaautitlán.

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

"Empleo de un Herpesvirus aislado de delfín, como antígeno en una prueba de ELISA indirecta para diagnóstico del Herpesvirus canino"

Que presenta el pasante: ALAN EDUARDO MATA NOVELLAN

Con número de cuenta: 41103142-4 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"

Cuaautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Septiembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo	
VOCAL	Dr. Guillermo Valdivia Anda	
SECRETARIO	Dr. Enrique Salas Téllez	
1er. SUPLENTE	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Alma Noemi Montes de Oca Chávez	

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

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS:**

**Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)**

**IT 201218** “Desarrollo de un modelo en cultivos celulares para estudiar la latencia de Herpesvirus canino”. En su primera etapa

**IT-202114** “Evaluación de la enfermedad de Herpesvirus canino en México y Desarrollo de posibles medidas para su control y prevención. En su tercera etapa

**Becario de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) dentro del Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)**

**El trabajo fue realizado con el equipo e instalación del:**

**Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-3) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC, Campo 4**

**Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-2) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la FESC, Campo 4**

**Se agradece al**

**M en C César Cuenca Verde por el apoyo técnico prestado para la adecuada realización del trabajo**

**Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®) por proporcionar parte de las muestras empleadas en este trabajo**

## **DEDICATORIA.**

Con dedicación y agradecimiento a mi mamá Angélica por llevarme de la mano hasta donde pudo y brindarme las armas para desenvolverme en el camino. Por inculcarme el cariño y la convivencia con perros, gatos, aves y demás mascotas que me permitieron tener un respeto por la vida. Por tenerme paciencia y seguir apoyándome. Te quiero mucho.

Para mi abuela Francisca y mi abuelo Nicolás, que representan la calidez, el afecto y el trabajo entre muchas cosas más. Ellos que también tuvieron que aguantarme y me consentían.

A Nico, a Ernesto, a Iván y a Mane, porque les aprendí todo lo que tuve al alcance, por ser como mis hermanos y brindarme lecciones que tendré presentes en todo momento.

A toda mi familia, que aunque no es extensa, se le quiere de corazón.

A mi Adriana hermosa que la admiro tanto, sin duda ha sido parte de mi inspiración y motivación en este tiempo que hemos podido convivir, mi compañera de aventuras soy tu fan N° 1.

A mi escuela y profesores durante estos años, a los buenos y no tan buenos, de todo se aprende.

A la Sra. Ángela, Adrián, Srita. Cortés, Lulú, Jessy y los demás compañeros de trabajo que no me acuerdo de tantos que han pasado por ahí, que me han tenido que soportar así como yo a ustedes (risas).

A todos aquellos animales (comestibles y no comestibles) que involucré en estos procesos de aprendizaje.

A Palomo, Canela, Greñas, Heidi, Bruno, Merlina, Negra, gatos y más gatos, tortugas, peces...

A esas personas que han estado presentes en mi vida.

De todos he obtenido algo para ser la persona que soy. Muchas gracias y a seguir aprendiendo.

## ÍNDICE

1.-Resumen	6
2.-Introducción	7
3.-Marco teórico	8
• Generalidades del Herpesvirus	8
○ Ciclo replicativo del Herpesvirus	9
○ Familias del Herpesvirus	10
• Herpesvirus de delfín (HVD)	11
• Herpesvirus canino 1 (HVC-1)	11
○ Transmisión	12
○ Lesiones	13
○ Signos	14
○ Diagnóstico	14
○ Prevención y tratamiento	15
• Técnicas de ELISA	16
4.- Antecedentes	19
5.- Justificación	22
6.- Hipótesis	23
7.- Objetivos	23
8.- Metodología	24
9.- Resultados	29
10.- Discusión	37
11.- Conclusiones	41
12.- Anexos y materiales	42
13.- Bibliografía	44

## 1.-RESUMEN.

El Herpesvirus canino tipo 1, un alphaherpesvirus, se ha asociado con una mortalidad de hasta el 100% en las camadas de perros, provocando abortos y muerte neonatal, lesiones genitales en perros adultos, además de estar involucrado en la traqueobronquitis infecciosa canina. Se ha encontrado una prevalencia que va desde el 6% hasta el 100% en distintos países; en México se ha demostrado una prevalencia del 87% en una población de 100 perros.

En el presente trabajo se utilizó la cepa 001 del Herpesvirus de delfín (HVD) aislado en México y cultivado en células de la línea MDBK (Ortuño, 2014), como antígeno para la sensibilización en una prueba de ELISA indirecta en fase líquida para detectar anticuerpos contra Herpesvirus canino tipo 1 en perros; la decisión de usar al HVD se fundamenta en base a estudios previos que demostraron un cruce antigénico entre el Herpesvirus de delfín y el conjugado inmunofluorescente para Herpesvirus canino tipo 1 (HVC-1). Se estandarizaron todos los pasos: la concentración de proteína del antígeno HVD la cual fue de 2.39 mg/ml, y la de un cultivo de células de la línea MDBK utilizado como antígeno de control para la sensibilización, la cual fue de 2.46 mg/ml; el bloqueo de la placa se dio con albúmina sérica de bovino (BSA) al 3%; la dilución del suero fue de 1:30; y la dilución del conjugado 1:10000. La prueba desarrollada fue confrontada con muestras de suero previamente identificadas como positivas y negativas a anticuerpos contra HVC-1. Se logró obtener una sensibilidad del 52.9 % y una especificidad del 89 %, comparándola con la prueba de ELISA comercial EVL (The Netherlands), para detección de anticuerpos contra Herpesvirus Canino tipo 1, así como un índice kappa de concordancia de 0.23554. Los resultados permiten establecer que la prueba no discriminó una reacción ante la sensibilización con la cepa 001 del HVD y el cultivo MDBK como control.

## 2.-INTRODUCCIÓN.

El Herpesvirus canino 1 (HVC-1), perteneciente a la familia de los Alfa herpesvirus, es un virus que se replica y se disemina rápidamente, destruyendo las células del hospedador, estableciéndose frecuentemente como una infección latente en los ganglios sensitivos (Quinn *et al.*, 2011; Donald, Zachary 2007). Fue reconocido en la mitad de los años 60, asociándose con la muerte y retraso en el desarrollo de los cachorros de los perros domésticos (Barr, 2014), y se han identificado un solo serotipo (McVey *et al.*, 2013). La infección no tratada en neonatos, puede causar mortalidad hasta del 100% en la camada (Quinn *et al.*, 2011).

Este virus se replica con mayor eficacia por debajo de la temperatura normal de un perro adulto (Quinn *et al.*, 2011). Los animales que se recuperan de la enfermedad permanecen con una infección latente de por vida, con reactivaciones periódicas asociadas a cuadros de estrés o inmunosupresión, tal como el hacinamiento o la preñez (Barr, 2014), e incluso puede inducirse un recrudescimiento viral por el uso de corticoides (Jubb *et al.*, 2013). El predecir un comportamiento clínico es difícil y complejo (Ronsse *et al.* 2005), siendo un problema de mayor importancia en los criaderos (Nöthling *et al.*, 2008).

El diagnóstico de la infección por HVC -1 en neonatos es complicado, la necropsia de los cachorros usualmente es requerida (Barr, 2014). El diagnóstico de la infección subclínica es serológico, mediante ensayos de suero neutralización o ELISA, los cuales han mostrado alta sensibilidad a la detección de anticuerpos para HVC-1 (Côte *et al.*, 2010). La especificidad de la prueba de ELISA es subestimada; la seroneutralización detecta sólo anticuerpos neutralizantes mientras que una prueba de ELISA es capaz de detectar anticuerpos específicos no neutralizantes (Côte *et al.*, 2010). Como método de diagnóstico, ELISA tiene ventajas importantes sobre otras pruebas serológicas, como el proveer resultados fácilmente cuantificables, ser fácil de realizar y de estandarizar (Daltro *et al.*, 2011), no depender del manejo de un cultivo celular y ser menos afectado por la contaminación bacteriana de las muestras (Yeşilbağ *et al.*, 2012). Es considerado uno de los métodos serológicos de elección para diagnóstico del HVC-1 y es ampliamente usado en otros países (Pratelli *et al.*, 2014). El diagnóstico definitivo es a través del aislamiento viral, por inmunofluorescencia o la detección del ADN genómico por PCR de los tejidos afectados (Jubb *et al.*, 1991).



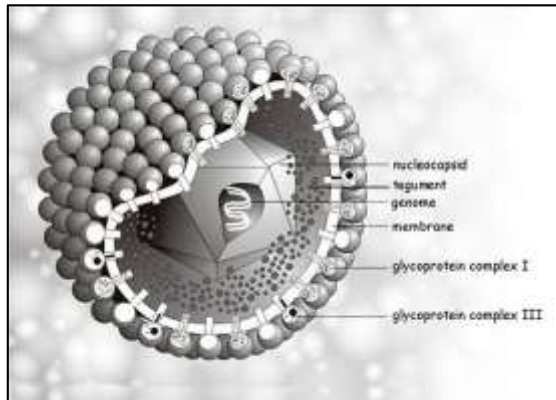
El HVC-1 está presente en muchos países y la prevalencia de anticuerpos contra este virus varía desde un 6% hasta un 90% (Nöthling et al., 2008). Recientemente se han realizado estudios respecto al HVC-1 que demuestran su presencia en México, llegando a encontrar una seropositividad del 87% en una población de perros, por medio una prueba comercial de ELISA sólo disponible en Europa, implicando altos costos de tiempo y dinero para su importación legal al País (Valdivia, 2015).

La transmisión del HVC-1 entre perros infectados y susceptibles generalmente ocurre por la ruta oro-nasal y está favorecido por el hacinamiento de colonias de animales (Ronsse y col. 2002). Animales mantenidos individualmente que limiten el contacto cercano es poco usual en los criaderos (Yeşilbağ y col. 2012).

### **3.-MARCO TEÓRICO.**

#### **Generalidades del Herpesvirus.**

Los Herpesvirus han sido encontrados en diversas especies de animales domésticos (Wilkes *et al.*, 2013). El nombre Herpesvirus (del griego *herpein*, arrastrarse) se refiere a la apariencia y extensión local de las lesiones de la infección en humanos (Quinn *et al.*, 2011). Dentro de este grupo de virus hay una gran variación en las propiedades biológicas incluyendo el potencial patógeno y oncogénico. Los Herpesvirus son morfológicamente similares, con una doble cadena de DNA y una cápside icosaédrica con 162 capsómeros, rodeada de una zona granular compuesta de proteínas globulares (tegumento) y por una envoltura lipídica que presenta espículas, muchas de las cuales son las responsables de inducir la respuesta inmune en el hospedador (Wilkes *et al.*, 2013). Por la pleomorficidad de esta envoltura, el diámetro de la partícula viral oscila entre 150 y 200 nm (Galosi, 2007). Su genoma es grande (125-290 kilobases) y codifica diferentes proteínas con varias funciones incluyendo la replicación del virus, proteínas estructurales y una variedad de proteínas que regulan el crecimiento celular y modulan la respuesta antiviral del hospedador (Wilkes *et al.*, 2013). Los viriones del Herpesvirus son frágiles y sensibles a los detergentes y solventes lipídicos, e inestables en el ambiente (Quinn *et al.*, 2011). La presencia de la envoltura, constituida por lipoproteínas y glicoproteínas, hace que sea sensible a la acción de agentes físicos (calor) y químicos como el éter, el cloroformo y los desinfectantes comunes (Pierson *et al.*, 1998).



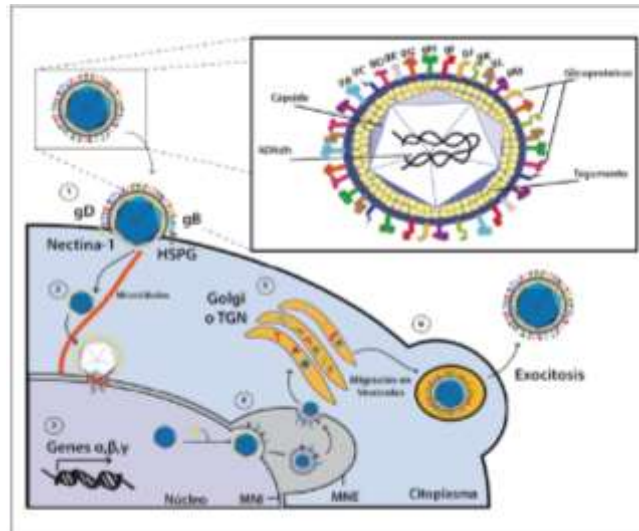
**Figura 1. Estructura del Herpesvirus**  
([http://www.losmicrobios.com.ar/microbios/?page\\_id=1349](http://www.losmicrobios.com.ar/microbios/?page_id=1349)).

### **Ciclo replicativo del Herpesvirus.**

Los Herpesvirus entran en las células, fusionándose con la membrana plasmática. Su replicación y su encapsidación ocurren dentro de la célula, obteniendo su envoltura por gemación, a través de la capa interior de la envoltura nuclear. Los cuerpos de inclusión intranucleares son una característica de la infección (Quinn *et al.*, 2011; Wilkes, 2013; Retamal *et al.*; 2014). Sin embargo, está poco claro si esta envoltura es retenida o si la fusión con el exterior de la membrana nuclear causa una pérdida de ésta, con una subsecuente re envoltura que ocurre en el compartimiento de Golgi o posterior a éste (Quinn *et al.*, 2011). La envoltura induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Ortuño, 2014).

En la actualidad se han postulado varios modelos para la salida del Herpesvirus desde el interior de células infectadas. Uno de ellos menciona que la cápside, recubierta con algunas proteínas del tegumento, saldría del núcleo mediante un proceso de envoltura y desenvoltura a través de las membranas internas (MNI) y externas (MNE) del mismo (Retamal y col. 2014). Una vez en el núcleo, los genes virales se expresan secuencialmente con la transcripción de genes inmediatamente tempranos ( $\alpha$ ), tempranos ( $\beta$ ) y tardíos ( $\gamma$ ). La producción del virus a su vez requiere la replicación del material genético viral el cual se encapsida en el núcleo y se recubre parcialmente por proteínas del tegumento que median su salida hacia el espacio perinuclear a través de la MNI y la MNE. Luego se libera al citoplasma donde es re-invaginado en el aparato de

Golgi, adquiriendo sus glicoproteínas de la superficie. Finalmente, el virión abandona la célula por exocitosis (Retamal *et al.*, 2014).



**Figura 2. Ciclo y estructura del Herpesvirus** (Retamal *et al.*, 2014).

La muerte de la célula infectada se da con la salida del virus de la misma. La extensión de la infección ocurre a través de puntos en los que las células no están en contacto con los anticuerpos neutralizantes en la sangre o en el fluido intersticial. Es característico que ocurra una infección latente de por vida con el recrudescimiento posterior y excreción intermitente o continua del virus (Wilkes *et al.*, 2013).

Los Herpesvirus no sobreviven fuera del hospedador. Su transmisión requiere contacto cercano, aunque puede darse por esparcimiento de secreciones respiratorias en las instalaciones de poblaciones confinadas. El virus puede sobrevivir más tiempo en congelación y en ambientes húmedos, pero los animales con infección latente sirven como reservorio para la transmisión (Wilkes *et al.*, 2013).

### **Familias de los Herpesvirus.**

Los Herpesvirus han sido asignados en tres familias: **Herpesviridae**, con más de 100 virus, que incluye a los herpes de las aves, de los mamíferos y de los reptiles; **Alloherpesviridae**, incluye a los herpes de los peces y las ranas; y **Malacoherpesviridae**, que contiene un solo virus, aislado de las ostras.

La familia Herpesviridae consiste en tres subfamilias:

- A. Alfaherpesvirinae. Virus altamente citopáticos en cultivo celular, ciclo reproductivo corto (24 horas generalmente), infecciones latentes frecuentes en los ganglios sensoriales.
- B. Betaherpesvirinae. Virus con ciclo de replicación largo, causan citomegalia celular (citomegalovirus) y se establecen en varios tejidos, incluyendo glándulas secretoras y tejido linfocítico.
- C. Gammaherpesvirinae. Virus linfotrópicos (linfocitos T), se replican en células linfoblastoides, crean infecciones líticas en células epiteliales y fibroblásticas, y la latencia se establece frecuentemente en tejido linfoide (Quinn *et al.*, 2011; Wilkes *et al.*, 2013).

Todos los miembros Herpesvirus comparten características antigénicas, aunque no de especificidad de hospedador (Ortuño, 2014; Craig, 2012).

#### **Herpesvirus de delfín (HVD).**

Los Herpesvirus están ampliamente diseminados en la naturaleza. Se han encontrado cetáceos infectados con el virus a través de distintas técnicas, presentando lesiones que varían de localización y severidad. Se han observado partículas virales por medio de microscopía electrónica obtenidas de lesiones en piel de belugas (*Delphinapterus leucas*), en delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) y en delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*), también se ha asociado a encefalitis purulenta en marsopas (*Phocoena phocoena*). Por medio de PCR se ha concluido que las lesiones genitales y orales de estas especies contienen DNA de Herpesvirus clasificado como un alphaherpesvirus, aunque también pertenecientes a la subfamilia gammaherpesvirinae. La transmisión del virus en estas especies está asociada al contacto sexual, aunque puede darse por el contacto directo y en el canal de parto. Se han observado lesiones necrotizantes y cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en múltiples órganos de delfines nariz de botella (Van Elk, 2009; Valdivia *et al.*, 2015).

#### **Herpesvirus canino 1 (HVC-1).**

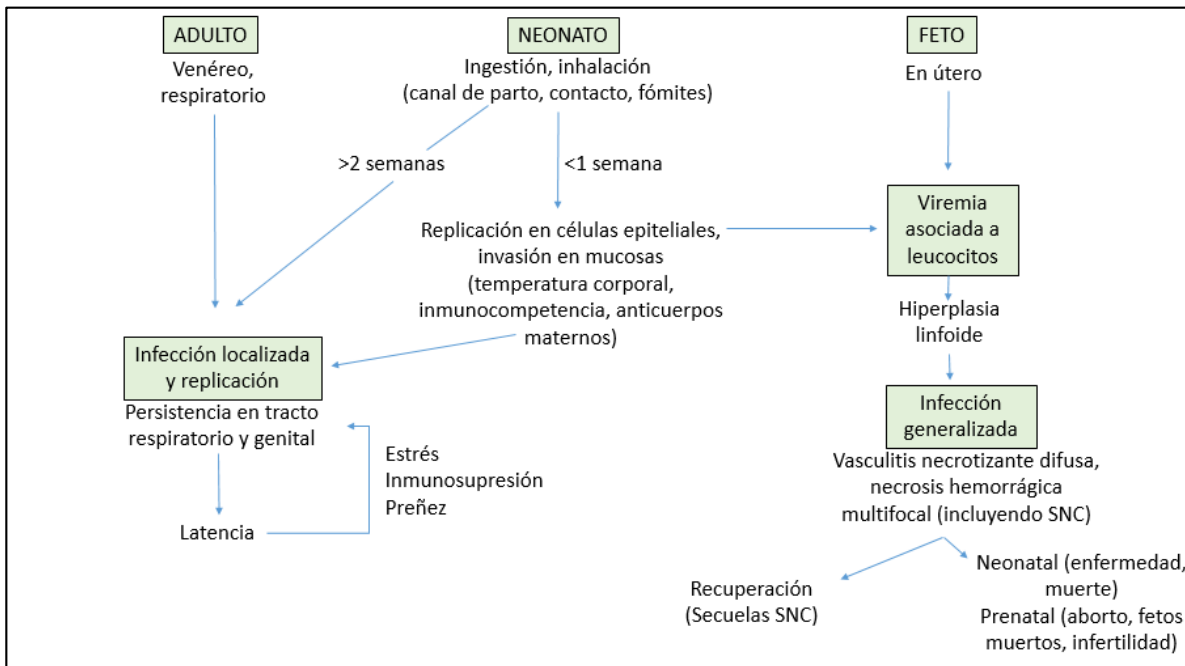
El Herpesvirus canino 1 (HVC-1) fue diagnosticado por Carmichael y sus colaboradores en 1946 (Varela, 2017). Es un alphaherpesvirus cuyo rango de hospedadores está restringido a perros domésticos y salvajes, teniendo una distribución mundial, y alta seroprevalencia en los primeros. Causa una infección sistémica fatal en los cachorros y una leve infección en los perros adultos, los

cuales pueden aparentar ser saludables pero frecuentemente presentan infertilidad e incluso lesiones genitales (tanto en machos como en hembras). Ha sido aislado de perros a partir de enfermedades respiratorias y está involucrado en el síndrome de la Traqueobronquitis infecciosa canina. También se ha asociado con brotes de infecciones oculares altamente contagiosas en perros adultos (Wilkes *et al.*, 2014).

No hay neutralización cruzada entre el HVC-1 y los virus del Herpes simplex (HVS), virus de la Pseudorabia (PRV) o con el virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), sin embargo, aparentemente tiene relación antigénica con los virus Herpes simplex. Solo un serotipo del HVC-1 es reconocido, aunque se han detectado diferencias genotípicas entre virus (Wilkes *et al.*, 2014).

**Transmisión.**

Los perros pueden ser infectados mediante secreciones nasales, oculares o por diseminación venérea (Wilkes *et al.*, 2014).

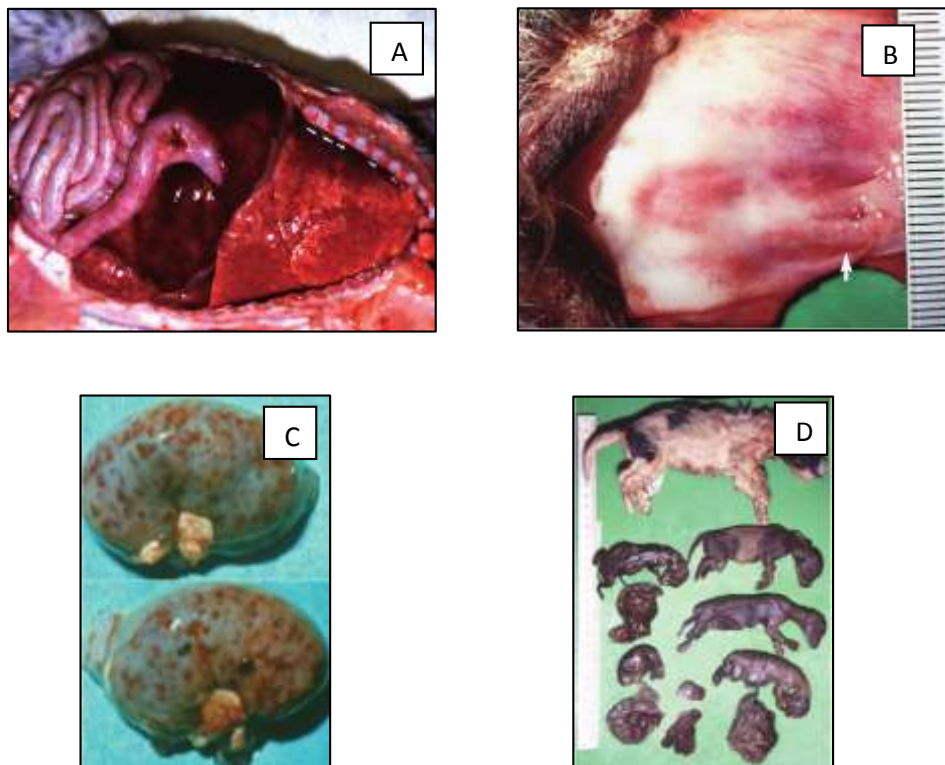


**Figura 3. Patogénesis de la infección por HVC-1 (Craig, 2012).**

Los Herpesvirus son altamente específicos de especie; el perro no se puede infectar naturalmente con cepas de los humanos y el herpes del perro no puede infectar al humano. (Craig, 2012).

## Lesiones.

Los cachorros menores de 4 semanas de edad pueden tener una enfermedad generalizada debido a la propagación hematogena del virus, produciendo vasculitis necrotizante principalmente en riñones, hígado y pulmones. Puede haber congestión pulmonar y edema, esplenomegalia, linfadenitis y meningoencefalitis no supurativa. Hay hemorragias petequiales y equimóticas dispersas en el tejido subseroso, las cuales generalmente constituyen la característica macroscópica más notoria de la enfermedad (Jubb *et al.*, 1991). Existen cuerpos de inclusión intranucleares basofílicos y algunos son levemente acidofílicos; pueden estar presentes en células de las áreas adyacentes a las lesiones necróticas, especialmente en el hígado (Jubb *et al.*, 1991; Wilkes *et al.*, 2014). Las lesiones vasculares varían desde la tumefacción endotelial a la infiltración mononuclear (Jubb *et al.*, 1991). Se han descubierto lesiones menos severas en el estómago, páncreas, glándulas adrenales, omento, retina y miocardio. Los linfonodos y el bazo han mostrado hiperplasia reactiva de los elementos fagocíticos mononucleares. Han sido descritas lesiones necróticas multifocales en la placenta y en los cachorros que adquieren la infección in útero (Craig, 2012).



**Figura 4. A) Lesiones por HVC en un cachorro que murió 11 días después del nacimiento ; B) vaginitis por HVC; C) Riñón de cachorro inoculado con HVC; C) cachorros obtenidos por cesárea 31 días después de la infección IV experimental con HVC-1 (Craig, 2012).**

## **Signos.**

Los cachorros afectados dejan de alimentarse, muestran signos de dolor abdominal y mueren a los pocos días (Jubb *et al.* 1991; Quinn *et al.* 2011). Los cachorros que reciben anticuerpos del calostro pueden estar infectados sin desarrollar signos clínicos (Quinn *et al.* 2011; Wilkes *et al.* 2014).

La infección primaria en perros adultos por HVC-1 es frecuentemente subclínica o resulta en enfermedad del tracto respiratorio, de la mucosa genital y ocular (conjuntivitis, queratitis) (Quinn *et al.*, 2011; Wilkes *et al.*, 2014), teniendo el virus un mejor tropismo hacia los genitales que hacia el tejido respiratorio (Ronse *et al.*, 2005). La infección primaria en perras puede ocasionar abortos, mortinatos e infertilidad. Perras que han tenido cachorros afectados llegan a parir camadas saludables posteriormente (Quinn *et al.*, 2011).

La viremia no es típica en perros adultos inmunocompetentes. Los anticuerpos neutralizantes se desarrollan en perros inoculados con HVC-1 y son detectables después del día 7 pos inoculación, mismos que van decayendo y persisten durante 8 meses, registrando títulos pico al día 21. La reactivación del HVC-1 en cachorros experimentalmente infectados, ha sido demostrada con la administración de corticosteroides. La latencia se establece en neuronas de los ganglios sensoriales (Wilkes *et al.*, 2014).

## **Diagnóstico.**

Más del 75% de las muertes de los cachorros ocurre antes de la tercera semana de vida, y la mayoría se producen durante la primera semana. Las causas que pueden llevar a esto son muy variadas, pero en general, hay falta de diagnóstico de cuáles son las verdaderas causas de las enfermedades o muertes neonatales (Valera, 2017).

La determinación de la infección por HVC-1 en cachorros depende de la información obtenida en la historia clínica, la exploración física y los cambios patológicos. Las anomalías hematológicas y bioquímicas no son específicas (Galosi, 2007).

El aislamiento viral es la técnica considerada “de oro” y se realiza inoculando material proveniente de órganos infectados con el virus, obtenidos durante la necropsia y /o hisopados genitales o nasales, sobre células de línea MDCK o cultivos primarios de origen canino. Se observan diariamente los cultivos inoculados hasta confirmar la aparición de efectos citopáticos (ECP). El aislamiento viral comúnmente se obtiene de glándulas adrenales, riñones, pulmones, bazo,

linfonodos e hígado. En animales que se han recuperado de la enfermedad o son adultos, el crecimiento del HVC-1 se restringe a la mucosa oral, tracto respiratorio anterior y genitales externos (Galosi, 2007; Quinn *et al.*, 2011; Wilkes *et al.*, 2014; Valdivia, 2015).

En caso de aislarse el virus, la identificación del agente se realiza por inmunofluorescencia, por técnicas inmunohistoquímicas o por sus patrones de restricción de ADN. La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aplica en la detección de ADN viral a partir de los órganos afectados. La determinación serológica de anticuerpos por la técnica de neutralización es considerada de referencia para la virosis aunque en algunos países se utiliza también la inhibición de la hemaglutinación y la técnica de ELISA (Galosi, 2007).

Diversas posturas se han presentado en relación al diagnóstico del HVC-1 utilizando una prueba de ELISA. Puesto que los variantes serológicos no han sido estandarizados, pueden esperarse variaciones en el nivel y prevalencia de resultados positivos entre los diferentes laboratorios (Craig, 2012). Los resultados falsos-negativos han sido observados en diferentes laboratorios o con diferente metodología de muestreo y reduciendo la carga viral durante la latencia: los resultados falsos positivos pueden ocurrir por la alta prevalencia de perros clínicamente saludables que son portadores del virus (Craig, 2012). Las pruebas de ELISA son flexibles a su automatización y tiene una sensibilidad superior, pero su validez en los resultados es altamente dependiente de la presencia de controles apropiados antes de la estandarización (Reading, Field, 1999).

### **Prevención y tratamiento.**

La imagen mixta, clínica y subclínica, ha demostrado que el HVC-1 tiene un comportamiento complejo y difícil de predecir (Ronsse *et al.*, 2005). La temperatura óptima de la replicación viral es aproximadamente de 33°C (Wilkes *et al.*, 2013), por lo que se debe considerar el remover o separar a los animales infectados, además de proveer un ambiente cálido a los cachorros (Ronsse *et al.*, 2005), aunque esto último resulta poco efectivo una vez adquirida la enfermedad. Bajo condiciones experimentales en las que su temperatura ha sido elevada artificialmente antes de la exposición al virus, los cachorros han reducido su mortalidad, existen signos clínicos menos severos y mínimos cambios patológicos (Craig, 2012).

Una vez que se ha diagnosticado la enfermedad por HVC-1, el tratamiento de los cachorros con signos sistémicos es poco gratificante. El tratamiento de la infección sistémica con antivirales ha



sido poco exitoso (Craig, 2012). En perros adultos ha sido observado el decrecimiento de lesiones genitales después de 2 días con tratamiento de Aciclovir (De Palma *et al.*, 2010).

Estudios rigurosos son necesarios para determinar la prevalencia de la infección por HVC-1. La vacunación de rutina fue propuesta para tomar control de la infección, especialmente en criaderos (Acar y col. 2009); la inmunización pasiva ha demostrado reducir la mortalidad en perros expuestos o afectados. Vacunas con virus vivo presuntamente atenuado pueden llegar a establecer una infección latente. La inmunización con una vacuna comercial inactivada en Europa ha demostrado provocar el incremento cuádruple en los títulos neutralizantes del virus en muchos de los perros vacunados, pero no parece proveer una protección larga (Craig, 2012). La baja prevalencia de los brotes clínicos y la pobre inmunogenicidad del HVC reducen el incentivo de producir una vacuna comercial para esta enfermedad. Reportes de Europa y Estados Unidos han demostrado la prevalencia de anticuerpos anti HVC del 6% de una población aleatoria de perros, mientras que también puede llegar a ser tan alta como el 100% en algunos criaderos (Craig, 2012).

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas, ante la presencia de casos clínicos las acciones a realizar se conducen a aliviar la sintomatología y a tomar medidas de prevención en los criaderos utilizando un correcto manejo sanitario y minimizando las condiciones de estrés (Galosi, 2007).

### **Técnica de ELISA.**

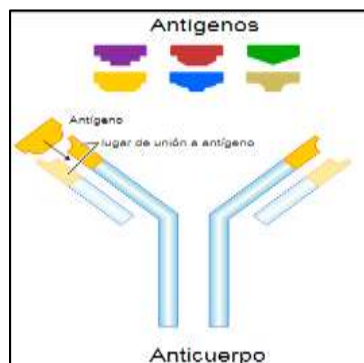
ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) es una técnica para detectar y cuantificar sustancias tales como péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. En un ELISA, un antígeno debe ser inmovilizado en una superficie sólida y luego un complejo con un anticuerpo que está unido a una enzima lo reconocerá. La detección se lleva a cabo mediante la evaluación de la actividad de la enzima conjugada a través de la incubación con un sustrato para producir un producto medible. El elemento más importante de la estrategia de detección es una interacción altamente específica antígeno-anticuerpo (Thermo Scientific, 2016). Los conjugados enzimáticos son antígenos o anticuerpos unidos en forma covalente a la enzima de elección (Barrera, 2014).

El diagnóstico definitivo de una enfermedad infecciosa es completado a través de la demostración e identificación del agente causal, mediante procedimientos de cultivo y aislamiento. Sin embargo, se han logrado diagnósticos adecuados cuando las técnicas serológicas son utilizadas en combinación con la observación clínica y la historia epidemiológica (Wright *et al.*, 1993). Los

inmunoensayos se han convertido en uno de los métodos más comunes en el diagnóstico clínico y en la investigación (Yeşilbağ *et al.*, 2012).

Dentro de los procedimientos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que se basan en la especificidad de la unión entre el antígeno (Ag) y el anticuerpo (Ac). La propiedad que tienen las inmunoglobulinas de unirse a un Ag, la especificidad de esta unión y el hecho de que puedan ser visualizados por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hacen que estos métodos sean empleados ampliamente. El principio básico de cualquier técnica inmunoquímica es el que un anticuerpo específico se unirá con un antígeno específico, para dar un complejo anticuerpo-antígeno exclusivo (Calderon, 2007).

Los antígenos y anticuerpos interactúan por complementariedad espacial y no por uniones covalentes. La asociación específica del antígeno y el anticuerpo es dependiente de los puentes de hidrogeno, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de van der Waals; por lo general solo son efectivas en distancias cortas. Los antígenos pueden ser reconocidos por múltiples anticuerpos. Las interacciones que involucran multivalencias pueden producir mayor estabilidad a los complejos, sin embargo la multivalencia puede también resultar en dificultades estéricas, por lo tanto, reducen la posibilidad de unión. Pero por otro lado, hay que considerar que los antígenos naturales suelen tener más de un tipo de determinante antigénico (Calderón, 2007).



**Figura 5. Unión Ag-Ac por complementariedad**  
([http://media.opencurriculum.org/articles\\_manual/ck12\\_biology/immune-response/4.png](http://media.opencurriculum.org/articles_manual/ck12_biology/immune-response/4.png)).

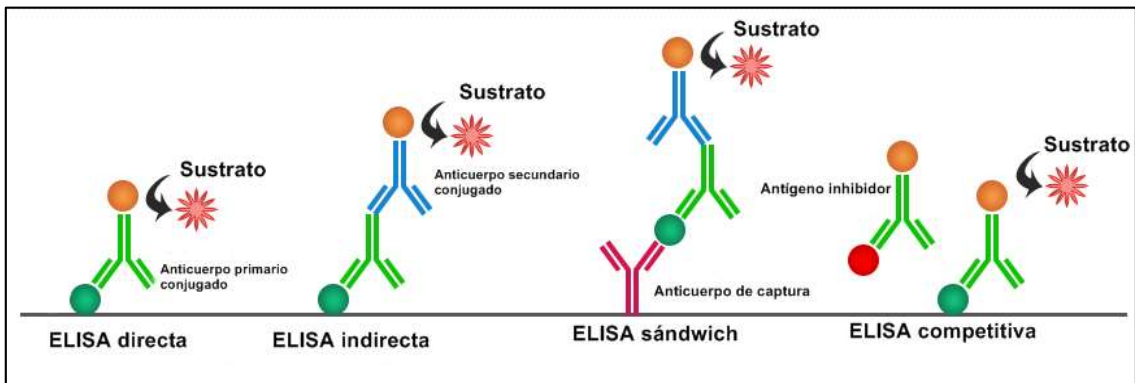
Los marcadores enzimáticos más comúnmente utilizados son la peroxidasa de rábano (HRP) y la fosfatasa alcalina (AP). La elección del sustrato depende de la sensibilidad del ensayo requerida y la instrumentación disponible para la señal de detección (espectrofotómetro, fluorímetro o

luminómetro), aunque se puede convertir en un ensayo tanto cualitativo como cuantitativo, de acuerdo al propósito del estudio (Thermo Scientific, 2016). La técnica se lleva a cabo típicamente en placas de poliestireno de 96 pozos, en las que pasivamente se unen anticuerpos y proteínas. El poliestireno es el material ideal debido a que su estructura química lo hace un material naturalmente hidrofóbico, lo que permite la adsorción pasiva de un gran número de biomoléculas por enganche covalente (Barrera, 2014).

Para controlar la actividad de los anticuerpos en los inmunoanálisis, es importante tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas que estabilizan la estructura proteica, parámetros como pH, fuerza iónica, temperatura y adición de agentes deshidratantes o disolventes orgánicos. Se utilizan soluciones amortiguadoras para diluir las muestras o como diluyente, esto mantiene el pH de la reacción y la concentración iónica apropiada (Barrera, 2014).

Es esta unión y la inmovilización de los reactivos, que hace a una prueba de ELISA tan fácil de diseñar y llevar a cabo. Aunque la técnica también se puede realizar en una fase sólida en la cual se inmoviliza el antígeno o el anticuerpo que va a ser detectado. En un ELISA de fase líquida, se pueden emplear varias técnicas dependiendo del objetivo del ensayo y de los materiales con los que se cuente:

- ELISA directo. El anticuerpo marcado reconoce al antígeno adherido a la placa.
- ELISA indirecto. El anticuerpo marcado reconoce al anticuerpo que se ha unido al antígeno adherido a la placa.
- ELISA sándwich. El anticuerpo marcado se une al antígeno que se inmovilizó por su unión al anticuerpo adherido a la placa.
- ELISA competitiva. Se adhiere un anticuerpo a la placa y luego se añaden diferentes antígenos (marcados y no marcados) para que se de la unión competitiva hacia el anticuerpo.



**Figura 6. Tipos de ELISA**

(<https://www.linkedin.com/pulse/all-you-need-know-elisa-learn-buy-experiment-innovate-biotech-kart>).

Algo importante en cualquier ensayo serológico es la determinación del límite diagnóstico. El punto de corte determina un estado reactor positivo o negativo, y dependerá de la aplicación intentada. Las mismas muestras positivas y negativas utilizadas para el punto de corte en la prueba de ELISA deben ser usadas para comparar la sensibilidad y especificidad diagnóstica con otros ensayos. Donde se conoce que pueden ocurrir reacciones serológicas cruzadas entre organismos, debe proveerse evidencia para indicar el grado el cual la nueva técnica es propensa a reacciones falsas-positivas (Wright *et al.*, 1993).

#### **4.-ANTECEDENTES.**

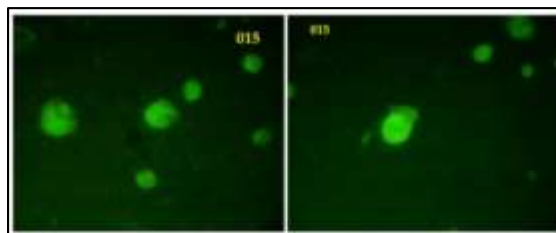
A partir del descubrimiento del Herpesvirus canino tipo 1 (HVC-1), se han realizado numerosos estudios serológicos para demostrar su prevalencia en diferentes países del mundo (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1. Seroprevalencias del HVC-1 encontradas en diferentes países (Valdivia, 2012).**

AÑO	REFERENCIA	PAÍS	POBLACIÓN	SEROPREVALENCIA
1969	Lundgreen y Clapper	USA	Muestreo aleatorio	12.8%
1974	Fulton et al.	USA	Muestreo aleatorio	6%
1975	Bibrack y Schaudinn	Alemania	1-Muestreo aleatorio. 2- Caninos con problemas reproductivos.	1-12% 2-39.1%
1977	Osterhaus et al.	Holanda	1-Caninos particulares. 2-Caninos con problemas reproductivos.	1-2.8% 2-12%
1979	Dellsie 1982	Francia	1-Caninos particulares. 2-Caninos de criadero.	1-0.5% 2-28.4%
1980	Engels et al.1980.	Suiza	Muestreo aleatorio	6.3%
1980	Schers et al.1980.	Bélgica	Muestreo aleatorio	1%
1990	Takumi et al. 1990	Japón	Muestreo aleatorio	26.2%
1989-1991	Poulet y Dubourget 1993	Francia	Caninos de criadero	15.5%
1994	Seo et al. 1994.	Corea	1-Caninos particulares. 2-Caninos de criadero.	1-28% 2-58%
1997-1998	Rijsewijk et al. 1999.	Holanda	Caninos particulares	39.3%
1998	Reading y Field 1998.	Reino Unido	Caninos particulares	88%
1998	Lacheretz y Cognard 1998.	Francia	Caninos con problemas reproductivos	43%
2000	Ronsse et al. 2002.	Bélgica	Caninos con problemas reproductivos	46.1%
2000	Gulgat et al. 2002.	Francia	Caninos en criadero	30.6%
2001	Van Gucht et al. 2001.	Bélgica	Caninos en criadero	49.5%
2005	Góngora 2005	Perú	Muestreo aleatorio	32%
2007	Dahlbom 2007	Finlandia	1-Caninos con problemas reproductivos. 2- Caninos sin problemas reproductivos.	1-100% 2-65%
2008	Nôthling et al.2008	Sudáfrica	Caninos de criadero	22%
2009	Engelbrecht 2009	Dinamarca	Población específica	26.4%
2009	Abuzer 2009	Turquía	Raza Kangal	71.8%
2010	Babael 2010	Irán	1-Caninos particulares 2-Caninos de criadero	1-19.1% 2-22.9%
2012	Yesilbag 2012.	Turquía	Muestreo aleatorio	62.1%
2013	Musayeba 2013	Lituania	1-Caninos particulares. 2-Caninos de criadero.	1-11% 2-85%

En México también se han realizado estudios respecto al HVC-1. En el 2014, se obtuvieron amplificados de un producto entre 285 a 292 pares de bases (pb), en 12 de las 13 muestras de animales que de acuerdo al diagnóstico morfo-patológico e histopatológico sugirieron infección por Herpesvirus canino (Briones, 2014). En ese mismo año, otro estudio realizó la identificación de las partículas virales empleando conjugados inmunofluorescentes desarrollados para canino. La reacción positiva y negativa en los controles, confirmaron que se trataba de un Herpesvirus. Se determinó que el HVD cruza antigénicamente con el HVC-1, observando inmunofluorescencia positiva al infectar células de la línea MDBK con Herpesvirus aislados de delfín (48 horas post infección), utilizando un conjugado inmunofluorescente para HVC-1 (Ortuño, 2014) **(Figura 7)**.

Para el 2015 se obtuvo un 87% de positividad serológica de anticuerpos de la clase IgG contra HVC-1 (mediante la técnica de ELISA), en una población muestreada de 100 caninos de criaderos cercanos a la FES-C, empleando una prueba comercial sólo disponible en Europa. Además, se logró el aislamiento de cuatro cepas virales de HVC-1, así como su identificación por medio de reacción en cadena de la polimerasa, inmunofluorescencia directa y microscopia electrónica de transmisión (Valdivia, 2015).



**Figura 7. Inmunofluorescencia directa con conjugado de Herpesvirus canino. (Ortuño, 2014).**

Al comparar las propiedades de crecimiento en cultivos celulares entre el HVC-1 y HVD, se observó una alta frecuencia de lisis en el virus de delfín, pero en el virus de canino la lisis es muy baja y el ciclo de latencia es aparentemente muy alto. Por ello la obtención de partículas virales de HVC-1 es muy baja impidiendo su adecuado uso para sensibilizar las placas de ELISA.

## **5. -JUSTIFICACIÓN.**

El HVC-1 se ha asociado a la muerte de cachorros de perros de compañía a temprana edad, teniendo un mayor impacto en los criaderos, donde las pérdidas económicas suelen ser elevadas dependiendo de la raza que se maneje; sin embargo pocas veces se realizan pruebas de laboratorio para confirmar la causa del problema. Actualmente en México son escasos los reportes que han demostrado la presencia del virus en el país y no se cuenta con pruebas diagnósticas accesibles, teniendo como única opción la importación de las mismas desde Europa, lo que implica altos costos. Para desarrollar pruebas diagnósticas de esta enfermedad puede llegar a ser requerida la experimentación en perros para la obtención de controles que apoyen la realización de las mismas. En este trabajo se propone el desarrollo de una prueba de ELISA para HVC-1 como herramienta diagnóstica, utilizando como alternativa una cepa de Herpesvirus de delfín aislado en México a partir de lesiones encontradas en delfines en vida libre (Ortuño, 2014).

## **6.-HIPÓTESIS.**

- La cepa 001 de Herpesvirus de delfín (HVD), aislado en México, puede utilizarse para sensibilizar una prueba de ELISA indirecta en fase líquida para el diagnóstico del Herpesvirus canino 1 en perros.

## **7.-OBJETIVOS.**

### **GENERAL:**

- Estandarizar una prueba de ELISA indirecta en fase líquida, empleando un Herpesvirus de delfín (HVD) aislado en México, para el diagnóstico del Herpesvirus canino 1.

### **PARTICULARES:**

- Comparar la reacción de los sueros de perro en contra del antígeno Herpesvirus de delfín (HVD) en la prueba de ELISA indirecta.
- Correlacionar los resultados obtenidos en dos pruebas de ELISA contra Herpesvirus canino: la prueba estandarizada en este trabajo y la prueba de ELISA comercial (EVL®).



## 8.-METODOLOGÍA.

El siguiente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-3) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC Campo 4, y en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-2) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la FESC, Campo 4.

### Antígeno para la sensibilización.

Como antígeno se utilizó la cepa 001 del Herpesvirus de delfín (HVD) aislado en México, cultivado en células de riñón de bovino (MDBK); se usó también un cultivo de células MDBK sin infectar como control, el cual fue lisado por medio de congelación y descongelación; ambos fueron proporcionados por el Dr. Guillermo Valdivia Anda.

Se determinó la concentración de proteínas del cultivo infectado y del cultivo sin infectar; mediante una micro técnica con el método de Bradford, realizando soluciones de albúmina sérica de bovino (BSA) diluida en PBS 1X, en diferentes concentraciones (5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.315 mg/ml, 0.156 mg/ml y 0.078 mg/ml).

### Dilución para el antígeno.

Se sensibilizó la placa con 50 µl de HVD y MDBK en diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, en PBS 1X (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Sensibilización de la placa.

Pozo	Dilución del antígeno											
	(1:1)		(1:2)		(1:4)		(1:8)		(1:16)		(1:32)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HVD											
B	MDBK											
C	HVD											
D	MDBK											
E	HVD											
F	MDBK											
G	HVD											
H	MDBK											

HVD.-Herpesvirus de delfín, MDBK.-lisado de células de riñón de bovino.

Se agregó a todos los pozos 50 µl del buffer de carbonatos y se incubó la placa a 4°C durante toda la noche; después se lavó la placa dos veces con 300 µl de la solución de lavado por 5 minutos; posteriormente se lavó con 300 µl de agua destilada por 5 minutos.

Se bloqueó la placa con 150 µl de BSA al 3% y 150 µl de buffer de carbonatos, a 4°C durante toda la noche; finalmente la placa se lavó como fue descrito anteriormente, se secó y se guardó a 4°C hasta su posterior uso.

Se agregaron 100 µl del suero A (mezcla de sueros de perro, 4 individuos clínicamente sanos): sin diluir, a las filas A y B; diluido 1:10, a las filas C y D; diluido 1:20, a las filas E y F; y diluido 1:40, a las filas G y H. Se incubó la placa a 37°C durante 1 hora y luego se lavó. Se agregaron a todos los pozos 100 µl del conjugado (Anti IgG de perro (molécula completa) – anticuerpo peroxidado producido en conejo, SIGMA®) diluido 1:5000 en PBS 1X. Se incubó la placa a 37°C durante 1 hora y luego se lavó.

A todos los pozos se les agregó 100 µl del cromógeno (2.5 ml solución reguladora de citratos + 5 mg O-fenilenediamina + 20 µl peróxido de hidrógeno) y se incubó la placa a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl de la solución de paro. La lectura de la placa se realizó a 490 nm en lector de ELISA (Multiscan Ascent, Labsystems®).

#### **Dilución para el conjugado.**

Se bloqueó una placa con 150 µl de buffer de carbonatos y 150 µl de BSA al 3%; de los pozos A1-B1 hasta los pozos A5-B5; 150 µl de PBS 1X y 150 µl de buffer de carbonatos, de los pozos A6-B6 hasta los pozos A12-B12. La placa fue incubada a 4°C durante toda la noche y después se lavó dos veces con 300 µl de la solución de lavado por 5 minutos; posteriormente se lavó con 300 µl de agua destilada por 5 minutos. Se agregó a todos los pozos 100 µl del suero A diluido 1:40 en PBS 1X. Se incubó la placa a 37°C durante 1 hora y luego se lavó como se describió anteriormente, se secó y se guardó a 4°C hasta su posterior uso.

Se agregó a todos los pozos 100 µl del conjugado (Anti IgG de perro (molécula completa) – anticuerpo peroxidado producido en conejo, SIGMA®) diluido 1:5000, 1:10000, 1:15000, 1:20000 y 1:25000 en PBS 1X (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Distribución del conjugado en la placa.

Pozo	Dilución del conjugado											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:5000	1:10000	1:15000	1:20000	1:25000	1:5000	1:10000	1:15000	1:20000	1:25000	Sólo PBS 1X	
B												

**PBS.-Buffer Salino de Fosfatos.**

Se incubó la placa a 37°C durante 1 hora y luego se lavó. Se agregaron 100 µl del cromógeno (2.5 ml solución reguladora de citratos + 5 mg O-fenilenediamina + 20 µl peróxido de hidrógeno) y la placa fue incubada a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos, deteniendo la reacción con 50 µl de la solución de paro. Se realizó la lectura de la placa a 490 nm en lector de ELISA (Multiscan Ascent, Labsystems®).

#### **Dilución para el suero.**

Se sensibilizó una placa con 50 µl de PBS 1X y 50 µl del suero A diluido 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 en PBS 1X: del pozo A9 al pozo A12 sólo se agregó 100 µl de PBS 1X (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4.** Distribución de las diluciones del suero en la placa.

Pozo	Dilución del suero											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:10	1:20	1:40	1:80	1:10	1:20	1:40	1:80	Sólo PBS 1X			

Se incubó la placa a 4°C durante toda la noche y después se lavó dos veces con 300 µl de la solución de lavado por 5 minutos; posteriormente se lavó con 300 µl de agua destilada por 5 minutos. Se bloquearon todos los pozos con 150 µl de BSA al 3% y 150 µl de buffer de carbonatos. Se incubó la placa a 4°C durante toda la noche. Se lavó como se describió anteriormente, se secó y se guardó a 4°C hasta su posterior uso.

Se agregó 100 µl del conjugado (Anti IgG de perro (molécula completa) – anticuerpo peroxidado producido en conejo, SIGMA®) diluido 1:10000 en PBS 1X a todos los pozos y se incubó la placa a 37°C durante 1 hora. Se lavó la placa como se describió anteriormente y se agregó a todos los pozos 100 µl del cromógeno (2.5 ml solución reguladora de citratos + 5 mg O-fenilenediamina + 20 µl peróxido de hidrógeno). La placa fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Se detuvo la reacción agregando 50 µl de la solución de paro. Se realizó la lectura de la placa a 490 nm en lector de (Multiscan Ascent, Labsystems®).

### **Dilución antígeno-suero.**

Se sensibilizó una placa con 50 µl de HVD y MDBK en diluciones 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 en PBS 1X, distribuidas de la columna 1 a la 6. Se agregó 50 µl de buffer de carbonatos a todos los pozos y se incubó la placa a 4°C durante toda la noche. Después se lavó la placa dos veces con 300 µl de la solución de lavado por 5 minutos; posteriormente se lavó con 300 µl de agua destilada por 5 minutos. Se bloqueó con 150 µl de BSA al 3% y 150 µl de buffer de carbonatos, seguido de una incubación a 4°C durante toda la noche; se lavó la placa como se describió anteriormente, se secó y se guardó a 4°C hasta su posterior uso.

Se agregó 100 µl del suero A: a las filas A y B, diluido 1:20; a las filas C y D, diluido 1:40; a las filas E y F, diluido 1:80; y a las filas G y H, diluido 1:160. Se dejó incubar la placa a 37°C durante 1 hora y luego se lavó como se describió anteriormente. Se agregó a todos los pozos 100 µl del conjugado (Anti IgG de perro (molécula completa) – anticuerpo peroxidado producido en conejo, SIGMA®) diluido 1:10000 en PBS 1X y la placa fue incubada a 37°C durante 1 hora. Se lavó la placa y se agregó a todos los pozos 100 µl del cromógeno (2.5 ml solución reguladora de citratos + 5 mg O-fenilenediamina + 20 µl peróxido de hidrógeno). Se incubó la placa a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos, y se detuvo la reacción agregando 50 µl de la solución de paro. Se realizó la lectura de la placa a 490 nm en lector de ELISA (Multiscan Ascent, Labsystems®).

### **Dilución antígeno-suero-conjugado.**

Se sensibilizó una placa con 50 µl de HVD y MDBK, diluidos 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 en PBS 1X; iniciando de la columna 1 a la 6, alternando cada uno entre filas, desde la fila "A" hasta llegar a la fila "F". De la fila G a la fila H, desde la columna 1 a la 12, únicamente se agregaron 50 µl de PBS 1X. A todos los pozos se les agregó 50 µl de buffer de carbonatos, y la placa fue incubada a 4°C durante toda la noche. Después se lavó la placa dos veces con 300 µl de la solución de lavado por 5 minutos; posteriormente se lavó con 300 µl de agua destilada por 5 minutos. Se bloqueó con 150 µl de BSA al 3% y 150 µl de buffer de carbonatos, excepto de las filas G9 y H9 hasta G12 y H12, a las que únicamente se les agregó 150 µl de PBS 1X y 150 µl de buffer de carbonatos. La placa fue incubada a 4°C durante toda la noche y después se lavó como se describió anteriormente, se secó y se guardó a 4°C hasta su posterior uso. Se agregó 100 µl del suero A diluido 1:30, 1:60 y 1:120 en PBS 1X (**Cuadro 5**).

**Cuadro 5.** Distribución de las diluciones del suero en la placa.

Pozo	Dilución del suero											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:30											
B												
C	1:60											
D												
E	1:120											
F												
G	1:30	1:60	1:120	PBS 1X								
H												

**PBS.-Buffer Salino de Fosfatos.**

La placa se incubó a 37°C durante 1 hora y luego se lavó. Se agregó a todos los pozos 100 µl del conjugado (Anti IgG de perro (molécula completa) – anticuerpo peroxidado producido en conejo, SIGMA®) diluido 1:10000 en PBS 1X, excepto a las filas G11, G12, H11 y H12, a las que sólo se les agregó PBS 1X. Se incubó la placa a 37°C durante 1 hora y después se lavó. Se agregó 100 µl del cromógeno (2.5 ml solución reguladora de citratos + 5 mg O-fenilenediamina + 20 µl peróxido de hidrógeno) a todos los pozos. La placa se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos en la oscuridad, deteniendo la reacción con 50 µl de la solución de paro. La lectura fue realizada a 490 nm en lector de ELISA (Multiscan Ascent, Labsystems®).

**Prueba de ELISA utilizando los sueros de control.**

La placa se sensibilizó con 50 µl de HVD y MDBK diluidos 1:20, de la columna 1 a la 12, de la fila A hasta la H alternando cada uno entre filas. Se agregó a todos los pozos 50 µl del buffer de carbonatos y la placa fue incubada a 4°C toda la noche. Después se lavó la placa dos veces con 300 µl de la solución de lavado por 5 minutos; posteriormente se lavó con 300 µl de agua destilada por 5 minutos. Se bloqueó con 150 µl de BSA al 3% más 150 µl de buffer de carbonatos, dejando la placa en incubación a 4°C toda la noche. Se lavó la placa como se describió anteriormente, se secó y se guardó a 4°C hasta su posterior uso.

Se agregó a todos los pozos, 100 µl de 42 de los sueros utilizados en la prueba de ELISA comercial EVL (Valdivia Lara, 2005), en dilución 1:30 y usando PBS 1X como testigo en 2 de los pozos; también se utilizaron los sueros de control (positivo y negativo) provistos por el kit comercial de ELISA EVL (**Cuadro 6**).

**Cuadro 6. Distribución de los sueros control.**

Pozo	Suero utilizado (Número de identificación)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	5	9	13	17	21	25	29	34	39	45	Control + 1:30
B												
C	2	6	10	14	PBS 1X	22	26	30	35	40	46	Control – 1:30
D												
E	3	7	11	15	PBS 1X	23	27	31	36	41	47	Control + 1:90
F												
G	4	8	12	16	20	24	28	32	37	42	48	Control – 1:90
H												

PBS.- Buffer Salino de Fosfatos.

Se dejó incubar la placa a 37°C por 1 hora y se lavó como se describió anteriormente. Se agregaron a todos los pozos, 100 µl del conjugado (Anti IgG de perro (molécula completa) – anticuerpo peroxidado producido en conejo, SIGMA®) diluido 1:10000 en PBS 1X, y la placa fue incubada a 37°C por 1 hora. Se lavó la placa y se agregó a todos los pozos 100 µl del cromógeno (2.5 ml solución reguladora de citratos + 5 mg O-fenilenediamina + 20 µl peróxido de hidrógeno), dejando la placa en incubación a temperatura ambiente por 15 minutos en la oscuridad, deteniendo la reacción con 50 µl de la solución de paro. Se realizó la lectura a 490 nm en lector de ELISA (Multiscan Ascent, Labsystems®).

## 9.-RESULTADOS.

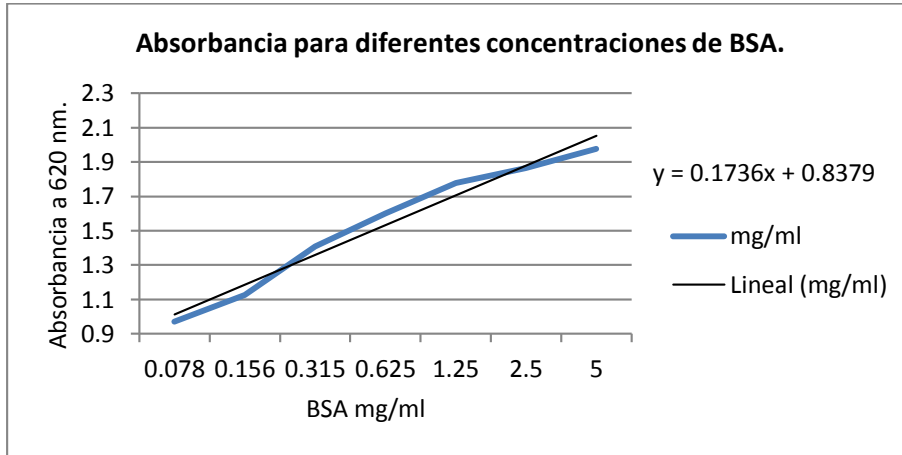
**Resultados: antígeno para la sensibilización.**

**Cuadro 7. Absorbancia para los antígenos.**

	Antígenos	
	HVD	MDBK
Absorbancia	1.791	1.81

Valor de absorbancia en D.O.

**Gráfica 1.** Curva para determinación de proteínas.



Se muestra ecuación para la curva.

Con base en la gráfica obtenida de las diluciones de BSA, se calculó la concentración de proteínas; para HVD se calculó **2.39 mg/ ml** de proteínas; para el cultivo MDBK se calculó **2.46 mg/ml** de proteínas totales.

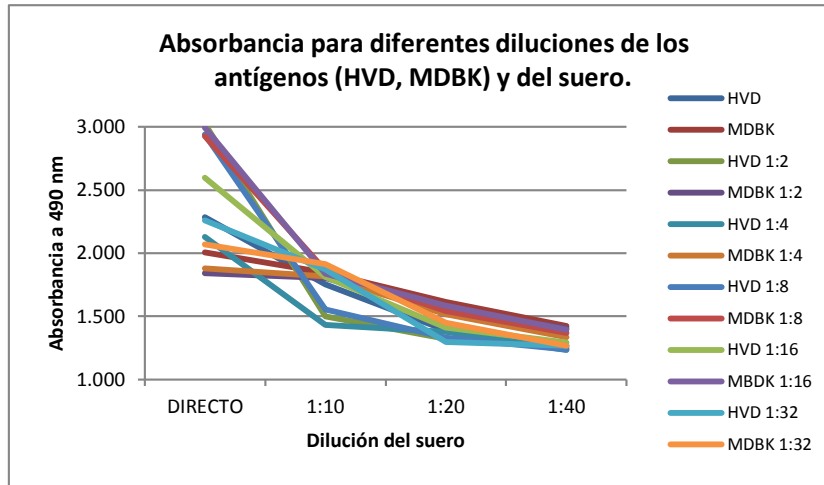
**Resultados: dilución para el antígeno.**

**Cuadro 8.** Absorbancias para diferentes diluciones de los antígenos.

	Dilución del antígeno						Dilución del suero
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
HVD	2.288	3.026	2.129	2.940	2.598	2.262	1:1
MDBK	2.009	1.841	1.880	2.930	2.996	2.068	
HVD	1.752	1.501	1.432	1.553	1.812	1.870	1:10
MDBK	1.845	1.802	1.818	1.864	1.839	1.912	
HVD	1.390	1.321	1.377	1.332	1.410	1.295	1:20
MDBK	1.615	1.536	1.518	1.541	1.585	1.447	
HVD	1.251	1.267	1.235	1.239	1.294	1.266	1:40
MDBK	1.424	1.405	1.336	1.370	1.395	1.269	

HVD.- Herpesvirus de delfín, MDBK.- lisado de células de riñón de bovino.

**Gráfica 2.** Relación de la absorbancia con la dilución del antígeno.



Para análisis de los resultados, se calcularon correlaciones de las absorbancias obtenidas, con base en la dilución ascendente del suero; 1:1, HVD  $c = -0.26$  y MDCK  $c = 0.21$ ; 1:10, HVC  $c = 0.70$  y MDBK  $c = 0.83$ ; 1:20, HVD  $c = 0.42$  y MDBK  $c = 0.67$ ; y 1:40, HVD  $c = 0.43$  y MDBK  $c = 0.78$ . Se observó una mayor correlación positiva con dilución 1:10 del suero, indicando que la dilución del antígeno es proporcional a la dilución del suero. La mayor diferencia encontrada entre absorbancias de virus y células, se dio cuando la dilución del suero fue de 1:1 y la del antígeno 1:2.

Se determinaron las correlaciones con base en la dilución ascendente de los antígenos: para HVD, fueron de  $-0.90$ ,  $-0.74$ ,  $-0.81$ ,  $-0.77$ ,  $-0.87$  y  $-0.88$ ; para MDBK, fueron de  $-0.98$ ,  $-0.96$ ,  $-0.97$ ,  $-0.84$ ,  $-0.83$  y  $-0.95$ . Esto indicó que la absorbancia es inversamente proporcional a la dilución realizada del suero, al existir una fuerte correlación negativa.

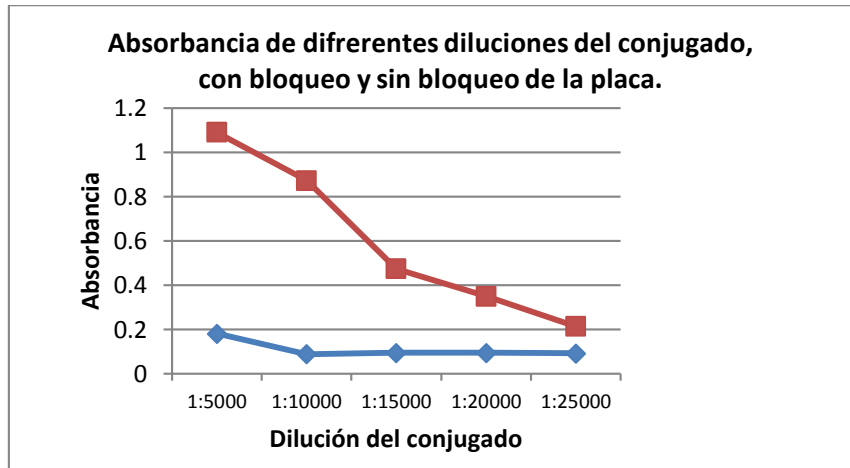
**Resultados: dilución para el conjugado.**

**Cuadro 9.** Absorbancias para diferentes diluciones del conjugado.

	Dilución del conjugado										
	1:5000	1:10000	1:15000	1:20000	1:25000	1:5000	1:10000	1:15000	1:20000	1:25000	PBS 1X
Absorbancia	0.182	0.090	0.096	0.096	0.093	1.090	0.873	0.474	0.351	0.215	0.78



**Gráfica 3.** Relación entre el bloqueo de la placa y la dilución del conjugado.



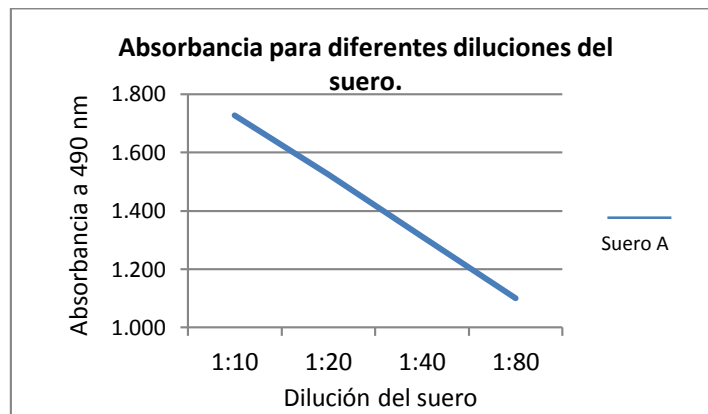
Se calcularon correlaciones de los resultados obtenidos: cuando se usó bloqueo,  $c = -0.687$ ; y cuando no se usó el bloqueo,  $c = -0.977$ . Sin bloqueo la absorbancia fue inversamente proporcional a la dilución del suero, mientras que con bloqueo se muestra mayor efectividad comenzando con una dilución 1:10000 del conjugado, siendo mayor la reacción y absorbancia con ésta.

**Resultados: dilución para el suero.**

**Cuadro 10.** Absorbancias para diferentes diluciones del suero.

	Dilución del suero				Sólo conjugado	Cromógeno
	1:10	1:20	1:40	1:80		
Absorbancia	1.728	1.525	1.312	1.100	0.122	0.070

**Gráfica 4.** Relación entre absorbancia y la dilución del suero.



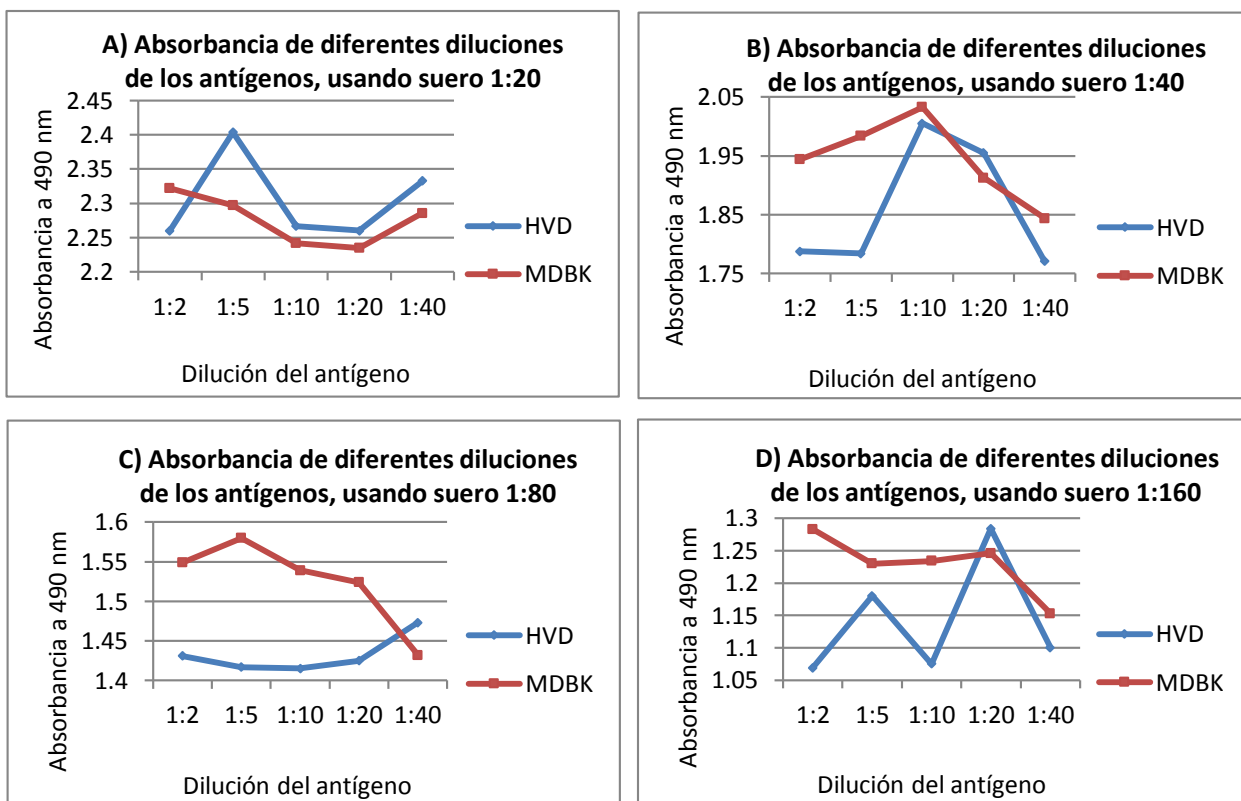
Para el análisis de resultados se calculó una correlación  $c = -0.96$ , indicando que la absorbancia fue inversamente proporcional a la dilución del suero. El bloqueo de la placa continuó siendo efectivo.

**Resultados: dilución antígeno-suero.**

**Cuadro 11.** Absorbancias para diferentes diluciones del antígeno y del suero.

		Dilución del antígeno							
		Dilución del suero	1:2	1:5	1:10	1:20	1:40		1:80
Absorbancia	1:20		2.260	2.404	2.267	2.260	2.333	1.481	HVD
			2.322	2.297	2.242	2.235	2.286	1.451	MDBK
	1:40		1.788	1.784	2.005	1.955	1.771	1.703	HVD
			1.944	1.984	2.033	1.913	1.844	1.867	MDBK
	1:80		1.431	1.417	1.415	1.425	1.473	1.589	HVD
			1.549	1.580	1.539	1.524	1.432	1.610	MDBK
	1:160		1.069	1.180	1.075	1.284	1.100	1.190	HVD
			1.283	1.230	1.234	1.246	1.153	1.340	MDBK

**Gráfica 5 (A, B, C y D).** Relación entre la dilución del antígeno y la dilución del suero.



Se calcularon correlaciones de los resultados, con base en la dilución del antígeno; para HVD fue de  $c = 0.07, -0.11, 0.85$  y  $0.10$  respectivamente; la correlación obtenida para MDBK, fue de  $c = -0.26, -0.80, -0.95$  y  $-0.88$  respectivamente. Existió mayor diferencia de absorbancias entre la

sensibilización con HVD y con MDBK, cuando el antígeno se diluyó 1:5 y el suero 1: 20. Con esta dilución del suero se obtuvieron absorbancias por arriba de 2.2 de D.O., y disminuyó la misma cuando la dilución del suero fue ascendente.

**Resultados: dilución antígeno-suero-conjugado.**

**Cuadro 12. Absorbancias para diferentes diluciones del antígeno, del suero y del conjugado.**

Dilución del suero	Dilución del antígeno					
	HVD y MDBK					
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
1:30	1.270	1.062	1.146	1.152	1.029	1.052
	1.229	0.708	1.200	0.972	1.163	0.955
1:60	1.099	0.925	0.981	0.893	0.945	0.998
	1.164	1.041	1.099	1.033	0.971	0.900
1:120	0.891	0.829	0.782	0.937	0.739	0.714
	1.011	0.913	0.834	0.904	0.686	0.662

**Cuadro 13. Absorbancia de los pozos testigo.**

Antígeno	Pozos testigo											
	PBS 1X											
Bloqueador	BSA al 3%						PBS 1X					
Suero	1:30		1:60		1:120		PBS 1X					
Conjugado	1:10000										PBS 1X	
Absorbancia	0.318	0.386	0.337	0.386	0.268	0.289	0.102	0.116	1.613	1.645	0.52	0.61
	0.764	0.397	0.312	0.354	0.262	0.254	0.132	0.108	1.589	1.621	0.053	0.56

La diferencia más notable (0.354 D.O.) entre HVD y MDBK, fue cuando estos se diluyeron 1:20 y el suero 1:30. Además se obtuvieron absorbancias menores a 2 DO, siendo inversamente proporcionales a las diluciones del antígeno y del suero. El bloqueo siguió siendo efectivo cuando se utilizó únicamente conjugado, apreciando mayor absorbancia cuando se utiliza suero y conjugado.

**Resultados: prueba de ELISA utilizando los sueros control.**

Para determinar el punto de corte se calculó la media ( $\bar{X}$ ) de los resultados considerados como negativos con la prueba de ELISA EVL:

$\bar{X} = 0.672$ ; la desviación estándar ( $\delta$ ).

$\delta = 0.154$

Después se obtuvo la media de los valores negativos más dos desviaciones estándar para tener una confianza del 95 %:

$\bar{X} + 2\delta = 0.980$ . Las absorbancias por encima de este resultado fueron consideradas como positivas.

**Cuadro 14. Absorbancias para los sueros de control, diferencia de absorbancias entre pozos con virus y lisado celular, y su diagnóstico con la prueba de ELISA comercial y la prueba de ELISA estandarizada.**

Identificación del suero control	Absorbancia		Diferencia entre absorbancias	Diagnóstico con ELISA EVL	Diagnóstico con ELISA estandarizada
	HVD	MDBK			
1	1.217	0.75	0.467	+	+
2	1.577	1.467	0.11	+	+
3	0.354	0.531	-0.177	+	-
4	1.368	1.067	0.301	+	+
5	1.069	0.945	0.124	+	+
6	0.667	0.577	0.09	+	-
7	2.315	1.992	0.323	+	+
8	0.976	0.951	0.025	+	-
9	0.985	0.982	0.027	-	+
10	0.895	0.821	0.074	-	-
11	0.798	0.836	-0.038	+	-
12	1.325	1.171	0.154	+	+
13	2.604	2.481	0.123	+	+
14	0.631	0.508	0.123	-	-
15	0.439	0.481	-0.042	-	-
16	0.805	0.845	-0.04	-	-
17	0.766	0.522	0.244	-	-
PBS 1X	0.379	0.267	0.112	C	C
PBS 1X	0.279	0.233	0.046	C	C
20	0.863	0.983	-0.12	+	-
21	0.909	0.432	0.477	+	-
22	0.479	0.347	0.132	+	-
23	0.34	0.379	-0.039	+	-
24	0.494	0.548	-0.054	-	-
25	1.974	1.796	0.178	+	+
26	1.221	1.12	0.101	+	+
27	0.472	0.467	0.005	+	-
28	1.709	1.815	-0.106	+	+
29	0.613	0.725	-0.112	-	-
30	1.144	1.008	0.136	+	+

31	1.401	1.479	-0.078	+	+
32	0.736	0.712	0.024	+	-
34	1.02	0.767	0.253	+	+
35	0.647	0.75	-0.103	+	-
36	0.649	0.525	0.124	+	-
37	0.739	0.698	0.041	+	-
39	0.789	0.378	0.411	+	-
40	0.627	0.508	0.119	+	-
41	1.289	1.401	-0.112	+	+
42	1.973	1.88	0.093	+	+
45	1.796	1.617	0.179	+	+
46	2.503	2.486	0.017	+	+
47	0.845	0.756	0.089	+	-
48	2.454	2.157	0.297	+	+
C (-) 1:30	0.737	0.828	-0.091		
C (+) 1:30	2.526	2.478	0.048		
C (-) 1:90	0.669	0.520	0.149		
C (+) 1:90	2.431	2.424	0.007		
(+ ) Positivo; (-) negativo; (C) control.					

Con la prueba de ELISA EVL se obtuvieron 34 muestras positivas a anticuerpos contra Herpesvirus canino, mientras que 8 muestras resultaron negativas.

Con la prueba de ELISA estandarizada en este trabajo se obtuvieron 19 muestras positivas a anticuerpos contra Herpesvirus canino, mientras que 23 muestras resultaron como negativas.

**Tabla 1. Tabla de contingencia para las prueba de ELISA (comercial y la estandarizada en este trabajo).**

ELISA ESTANDARIZADA	ELISA EVL		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	a= 18	b= 1	19
NEGATIVO	c= 16	d= 7	23
TOTAL	34	8	n= 42

Con la tabla anterior se calculó el coeficiente de concordancia Kappa, el cual es una medida estadística que ajusta el efecto del azar en la proporción de una concordancia observada; eliminando el efecto del azar.

Para calcularlo se utilizó la siguiente fórmula:

$$K = \frac{Co - Ce}{1 - Ce}$$

Donde:

Co: Concordancia observada:

$$\frac{(a + d)}{n}$$

Ce: Concordancia esperada:

$$\frac{(a + b)(a + c)}{n^2} + \frac{(c + d)(b + d)}{n^2}$$

El cálculo resultó en un coeficiente de concordancia de 0.23554 que, de acuerdo a Landis y Koch (tabla 2) es una fuerza de concordancia aceptable.

**Tabla 2. Valoración del índice kappa.**

Coeficiente kappa	Fuerza de la concordancia
0.00	Pobre
0.01-0.020	Leve
0.021-0.40	Aceptable
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Considerable
0.81-1.00	Casi perfecta

También se calculó la sensibilidad y especificidad, tomando como referencia la prueba de ELISA EVL.

Sensibilidad= a/ a+b

La **sensibilidad** obtenida fue del **52.9%**.

Especificidad= d/ b+d

La **especificidad** obtenida fue de **87 %**.

## **9.-DISCUSIÓN.**

Se desarrolló una prueba de ELISA indirecta con el fin de detectar anticuerpos de la clase IgG contra el HVC-1 en suero; la cual en varias de las pruebas realizadas no discriminaba el hecho de haber sensibilizado los pozos con cultivo celular MDBK sin infectar como control, de aquellos

sensibilizados con la cepa 001 de HVD aislado en México. Al haber sensibilizado con este virus, se esperaba una mayor absorbancia con respecto a la sensibilización con el cultivo celular MDBK sin infectar; sin embargo los resultados no reflejan este hecho, al no existir una diferencia significativa. El factor dilución del suero es el más influyente puesto que cuando la dilución asciende la absorbancia desciende, sin importar que la sensibilización se haya realizado con el virus o con el cultivo sin infectar. El antígeno HVD y el cultivo celular MDBK sin infectar; ambos fueron sometidos a un proceso físico de lisis mediante la congelación y descongelación, para obtener mayor cantidad de partículas virales y sumarlas a las que se encontraban libres en el medio del cultivo.

Una prueba diagnóstica de alta sensibilidad es útil en contextos clínicos donde el hecho de no diagnosticar la enfermedad (falsos negativos) genera más problemas que el exceso de diagnóstico (falsos positivos) (Briones, 2014). La sensibilidad obtenida se basó en la comparación con la prueba de ELISA comercial, dando como resultado un 52.9 %, el cual es un porcentaje bajo además de que existió una indiscriminación con los pozos que contenían el cultivo celular sin infectar. Quedó demostrado que el bloqueo de la placa es efectivo y que la absorbancia se incrementa cuando se utiliza la sensibilización tanto con HVD como con MDBK, sugiriendo una reacción ante estos dos elementos antigénicos.

La partícula madura del Herpesvirus consta de nucleocápside que contiene el genoma viral y las proteínas asociadas (core), el tegumento que rodea la nucleocápside y la envoltura viral, la cual es derivada de la membrana de la célula del hospedero y en la que están incorporadas las glicoproteínas de membrana codificadas por el virus (Ortuño, 2014). La unión del anticuerpo del hospedero se da a la partícula viral con una envoltura de procedencia celular, por tal motivo, al utilizar un cultivo celular como control, los anticuerpos pudieran interactuar con una unión con elementos propios de una célula como lo puede ser el aparato de Golgi. Este efecto no se presenta cuando la placa no ha sido sensibilizada con ninguno de los antígenos utilizados en este trabajo. Así mismo, al utilizar los sueros proporcionados por el kit comercial de ELISA (EVL, The Netherlands), se evidenció que el control positivo reacciona con los pozos sensibilizados tanto con el virus como con el cultivo celular MDBK sin infectar, observando una absorbancia mayor de 2.5 D.O; el suero de control negativo registró una absorbancia menor de 1.0 D.O., siendo 2.5 veces menor a la del control positivo, por lo que se consideró no presentó reacción con ninguno de los antígenos utilizados en este trabajo. Este hecho llega a causar controversia, debido a que se

esperaría que ninguno de los controles tuviera reacción. Los anticuerpos protectores son usualmente dirigidos en contra de las glicoproteínas de la envoltura (Wilkes y col. 2013).

Los resultados de la prueba ELISA comercial (EVL, The Netherlands) mostraron seroprevalencia, dentro de los individuos muestreados, del 87%, la cual es alta, de acuerdo a las reportadas en otros países. Durante la evaluación estadística únicamente se encontró relación con el factor de raza y criadero, siendo la raza dependiente del criadero en que se muestreaba. Ninguno de los factores de presentación clínica (historia de haber presentado traqueo bronquitis infecciosa, lesiones cutáneas u oculares, o de haber padecido problemas reproductivos) tuvo una relación estadísticamente significativa con el título calculado (Valdivia, 2015). Este argumento sugiere que la mayor parte de la población viral diseminada se encuentra en estado de latencia, o que las presentaciones clínicas se encuentren ocasionadas por otras etiologías.

El aislamiento a partir de las muestras provenientes de cachorros muertos con lesiones sugestivas de HVC-1 permitiría contar con un control positivo, debido a que esta enfermedad actualmente no está reconocida en México (SAGARPA-SENASICA) y por ello es imposible importar el virus en cualquier forma para poder usarlo como control positivo (Briones, 2014). Se requiere producir una gran cantidad de abasto viral de HVC-1 a partir de medios de cultivo para poder contar con este control y llevar a cabo más pruebas; sólo entonces se podrían realizar estudios que ofrezcan mayores evidencias sobre la prevalencia del virus en el país. La prueba de ELISA, por su sensibilidad, necesita contar con antígenos purificados que aseguren una reproducibilidad aceptable (Thermo Scientific, 2016). En este trabajo se utilizó una cepa 001 de HVD aislado en México, la cual se obtuvo directamente de un cultivo sin haber sido purificada la partícula viral, teniendo como precedente un cruce antigénico con el conjugado inmunofluorescente (Antisuero anti-HVC 1 policlonal conjugado a Isotiocianato de fluoresceína marca VMRD), y partiendo de la premisa de que el HVD tiene un mejor manejo de replicación en cultivos celulares de la línea MDBK, lo que facilita su obtención.

La concentración de proteínas calculada para HVD fue de 2.39 mg/ ml y para el cultivo MDBK se calculó 2.46 mg/ml, teniendo como consideración que no fue verificado que la confluencia celular en el cultivo MDBK fuera la misma que en el cultivo el cual fue infectado con la cepa 001 de HVD; así mismo la técnica de Bradford considera el total de proteínas presente en la muestra estudiada, sin embargo no diferencia el origen de las mismas, pudiendo proceder de elementos celulares como los propios del virus.



Cuando se utiliza al HVC-1 en la inoculación de cultivos celulares, se logran efectos citopáticos y citolíticos en células de origen canino (MDCK); los efectos citopáticos se observan desde las 48 horas post infección, mientras que las alteraciones citolíticas se encuentran a partir de las 72 horas (Valdivia, 2015). Durante el lapso en que las células sufren un daño el virus se encuentra replicándose, sin embargo no se logran obtener los mismos efectos en las células con pases subsecuentes a nuevos cultivos celulares, por lo que se sospecha de que el HVC 1 entra en un estado de latencia y su replicación se detiene, mermando la producción de un abasto viral para nuevos estudios.

La técnica de inmunofluorescencia, la cual emplea el conjugado policlonal en contra de HVC-1, mostró un marcaje fluorescente en el núcleo y la membrana citoplasmática, congruente con la evolución del ciclo viral, el cual se replica en el núcleo, donde adquiere las proteínas de nucleocápside y tegumento; mientras que las proteínas de envoltura las adquiere por medio de vesículas provenientes del aparato de Golgi (Maurer y col. 2009). Cabe resaltar que el fabricante del reactivo utilizado para inmunofluorescencia (VMRD) menciona que tiene cierta reacción con el virus de distemper canino (CDV) y el virus de parainfluenza tipo 2 (CPI-2), por lo que no debe tomarse como único método diagnóstico, debe apoyarse en técnicas como la PCR para su confirmación (Valdivia, 2015). Con base en el argumento anterior, es necesario el uso de más pruebas de laboratorio, como lo son la seroneutralización y Western-Blot, para mostrar evidencias más precisas sobre el cruce antigénico que se presenta con la cepa 001 de HVD, de esta forma continuar los trabajos con el uso de este virus como alternativa para el diagnóstico del HVC 1.

Con la prueba de ELISA EVL desarrollada en trabajos previos de investigación, se observó una sensibilidad del 100% con respecto a la seroneutralización, pero la especificidad fue del 15.4%, esto puede deberse al cruce antigénico o reacciones inespecíficas por parte de los anticuerpos. Además, la cantidad de anticuerpos no neutralizantes y neutralizantes, mayor a los que puede detectar la seroneutralización (Valdivia, 2015). La prueba de ELISA para diagnóstico del HVC-1 que se desarrolló en este trabajo obtuvo baja sensibilidad y una buena especificidad, aunque no discrimina entre la sensibilización con virus y con el cultivo celular sin infectar; los resultados obtenidos muestran que los anticuerpos de la clase IgG están siendo reconocidos después de todo el desarrollo de la prueba, pero como lo mencionó el autor anterior, se desconoce si se tratan de anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes, además de no haber encontrado una correlación

significativa entre la técnica de ELISA y seroneutralización, por lo que tampoco se puede comparar la prueba desarrollada con la prueba comercial de una forma efectiva.

Un estudio demostró una relación inmunológica entre HVC 1 y otros cuatro Herpesvirus. Hubo un cruce neutralizante recíproco entre HVC y HSV-1, HSV-2 y PRV. El antisuero para HSV-1 gD también neutralizó al CHV, lo que sugiere que el CHV comparte epitopes con esta glicoproteína (Manning y col. 1998).

## **10.-CONCLUSIONES.**

Se estandarizó una prueba de ELISA indirecta, logrando una buena sensibilización y un efectivo bloqueo de la placa, así como un buen desarrollo de la reacción final con el cromógeno.

Al utilizar la cepa 001 del HVD aislado en México como agente en la sensibilización de la placa de ELISA, se observó una reacción positiva con los sueros de perro utilizados.

La prueba de ELISA desarrollada no discrimina la reacción positiva de los sueros al haber sensibilizado con la cepa 001 del HVD como con el cultivo MDBK sin infectar como control.

Al comparar la prueba comercial EVL con la prueba desarrollada en este trabajo, se obtuvo un coeficiente de concordancia de 0.23554 de acuerdo al índice kappa, una especificidad del 87% y una sensibilidad del 52.9%.

Se requieren más evidencias del cruce antigénico entre la cepa 001 del HVD aislado en México y el HVC-1, para poder hacer uso del primero en pruebas diagnósticas que ayuden a la detección del Herpesvirus canino.

## 11.-ANEXO DE MATERIALES Y SOLUCIONES.

- Placas de poli estireno de 96 pozos fondo plano (®Costar).

### Solución de Carbonato/Bicarbonato 0.05 M

- Carbonato de sodio ,1.5 g
- Bicarbonato de sodio, 2.93 g
- Agua destilada
- Neutralizar pH a 9.6 con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.

### Solución de lavado para ELISA.

- Solución reguladora de fosfatos a 10X (PBS 10X) 100 ml
- Tween 20, 0.5 ml.
- Agua destilada, 900 ml.

### Solución reguladora de fosfatos 10 X (PBS 10X)

- Cloruro de sodio, 8 g.
- Cloruro de potasio, 0.2 g.
- Fosfato de sodio dibásico, 1.44 g.
- Fosfato de potasio monobásico, 0.24 g.
- Para preparar solución reguladora de fosfatos 1X (PBS 1X) se diluyen 100 ml de PBS 10 X con 900 ml de agua destilada.

### Solución de albúmina sérica bovina al 3%.

- Albúmina sérica bovina, 3 g.
- Agua destilada 97 ml.

### Solución reguladora de citratos.

- Ácido cítrico al 0.1 M, 24.3 ml
- Fosfato de sodio dibásico al 0.2 M, 25.7 ml
- Agua destilada, 50 ml

#### Ácido cítrico al 0.1 M

- Ácido cítrico, 2.1 g
- Agua destilada, 100 ml

#### Fosfato de sodio dibásico al 0.2 M.

- Fosfato de sodio dibásico, 5.36 g
- Agua destilada, 100 ml

#### Cromógeno.

- Solución reguladora de citratos, 2.5 ml
- OPD (O- phenylenediamine), 5 mg
- Peróxido de hidrógeno concentrado, 20  $\mu$ l

La solución se preparó al momento de su uso.

#### Solución de paro.

- Ácido ortofosfórico, 0.6 ml
- Agua destilada, 10 ml

## 12.-BIBLIOGRAFÍA.

1. Acar A, Gur S, Dogan I, Akca Y. A serologic investigation of canine herpesvirus type 1 infection in Kangal dogs. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2009; 7:1377-1380.
2. Barr SC, Bennett M, Birkenheuer AJ, et al. *Canine and feline infectious diseases*. 1 Title. Autumn P D. Chapter 16- Canine herpesvirus infection. Missouri: Elsevier, 2014: 166-169.
3. Barrera DH. Estandarización de la técnica de ELISA para cuantificar cortisol en saliva, elaborando los reactivos biológicos (tesis de licenciatura). México, DF: UNAM, 2014.
4. BIORAD. Mini-PROTEAN II, Electrophoresis Cell, Instruction Manual. USA, 2000.
5. Briones JCV. Detección de herpesvirus canino mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tejidos de cadáveres remitidos para diagnóstico (tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2014.
6. Calderón RVP. Cursos de métodos fisicoquímicos en biotecnología. UNAM, Cuernava Morelos. 2007:53 pag.  
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunquimica.pdf>
7. Côte E, editor. *El consultor en la Clínica Veterinaria. Perros y gatos*. 1ª ed. Buenos Aires; Inter-Médica, 2010: 653-654.
8. Craig EG. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Fourth edition. 2012. Edited by Craig E. Greene. Pp 49-54.
9. Daltro MZO, Vale V, Keid L, Menezes SF, Meyer R, Wagner RP, et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due *Brucella canis*. *Veterinary Science* (2011); 90: 425-431.

10. De Palma VE, Ayala MA, Gobello C, Echeverria MG, Galosi CM. An atypical clinical presentation for the first isolation of Canid herpesvirus 1 in Argentina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* . 2010; 62 (5): 1267-1270.
11. Donald MM, Zachary JF. *Pathologic basis of veterinary disease*. Fourth edition. USA: Elsevier, 2007: 372.
12. Galosi CM. Herpesvirus canino 1: agente etiológico y enfermedad. Buenos Aires, Argentina; 2007: 27 (2): 31-35.
13. <https://www.linkedin.com/pulse/all-you-need-know-elisa-learn-buy-experiment-innovate-biotech-kart>. Última visita el 6 de marzo del 2017.
14. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. *Patología de los animales domésticos*. Primera edición. Uruguay, Ed hemisferio sur. 1991: 402-404.
15. Manning A, Buchan A, Skinner GRB, Durham J, Thompson H. The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesviruses. *Gen Virol* 1998; 69: 1601-1608.
16. Maurer UE, Zeev-ben-mordehai T, Pandurangan A, Cairns T, Hannah B, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH, Topf M, Huiskonen JT. The structure of herpesvirus fusion glycoprotein B-Bilayer complex reveals the protein membrane and lateral protein-protein interaction. *Cell structure*, 2009; 21:1396-1405.
17. McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, Editors. *Veterinary microbiology*. Third edition. USA: Wiley-Blackwell, 2013:372-381.
18. Nöthling JO, Hüßy D, Steckler D, Ackermann M. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. *Theriogenology* (2008); 69: 276-282.
19. Ortuño De La O EN. Identificación por microscopía electrónica de transmisión de aislamientos de Herpesvirus de delfines (*Tursiopatrucantus*) de vida libre, en la región marina de Campeche (tesis de licenciatura). FES Cuautitlán: UNAM, 2014.

20. Pierson P, Moraillon R, Remond M. L'Herpès-virose en élevage canin : aspects cliniques et diagnostic. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 1998; 174: 87-94.
21. Pratelli A., Colao V., Losurdo M. Serological and virological detection of canine herpesvirus-1 in adult dogs with and without reproductive disorders. *The Veterinary Journal* (2014), doi: 10.1016/j.tvjl.2014.03.001. En prensa.
22. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Second edition, Dublin: Wiley-Blackwell, 2011: 567-577.
23. Reading MJ, Field HJ. Detection of high levels of canine herpes virus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. *Research in Veterinary Science*, 1999; 66: 273-275.
24. Retamal ARD, Suazo PA, Garrido I, Kalergis AM, González PA. Evasión de la respuesta inmune por herpes simplex. *Revista Chilena de Infectología* 2014: 84-96.
25. Ronsse V, Verstegen, J, Onclin, K. Seroprevalance of canine herpesvirus -1 in the Belgian dog population. *Reproduction in Domestic Animals*, 2002; 37: 299–304.
26. Ronsse V, Verstegen J, Thiry E, Onclin K, Aeberle C, Brunet S, Poulet H. Canine herpesvirus-1(CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology* 2005; 64: 61-74.
27. Thermo Scientific. Overview of ELISA. Proteinbiologyresource library. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>. Última consulta el 03 de noviembre del 2016.
28. Valdivia EGL. Aislamiento, identificación y primer estudio de seroprevalencia de herpesvirus canino (chv-1) en México (tesis de maestría). Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2015.

29. Valdivia EGL, Delgado AE, Ángeles JIS, Ortuño ENO, González SG, Lara GER, Cuenca CV, Valdivia GA. Isolation and identification of Herpesvirus in the bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) of Terminos lagoon, Campeche, Mexico. *THERYA*, 2015; Vol. 6 (2): 495-504.
30. Van Elk CE, Van de Bildt MWG, de Jong AAW, Osterhaus ADME, Kuiken T. Genital Herpesvirus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): cultivation, epidemiology, and associated pathology. *Journal of wildlife diseases*, 2009; 45 (4): 895-906.
31. Varela DF. Herpesvirus canino ¿problema de reproductores o mito de criadores? (Ejercicio liberal). Universidad de la República, Montevideo (Uruguay), Agroveterinaria Don Quijote-Veterinaria Cassinoni, 2017.
32. Wilkes RP. Herpesviridae. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, editors. *Veterinary Microbiology*. USA, Ed Wiley-Blackwell. 2013: 372-382.
33. Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EMA, Leleanta M, Jeggo MH. Standardisation and validation of enzymelinked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. sci.tech.off.int.epiz* 1993; 12:435-450.
34. YeŞilbağ K, Yalçın E, Tuncer P, Yilmaz Z. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Veterinary Science* 2012; 92:36-39.
35. Yewei Li, Haileleul N , Yu Qiu, Vishwanatha R.A.P. R, BartMateusenb, Hans JN. Early events of canine herpesvirus 1 infections in canine respiratory and genital mucosae by the use of ex vivo models. *Research in Veterinary Science*, 2016; 105:205-208.