



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Evaluación de la proteína recombinante GP38
del virus de Artritis encefalitis caprina para el
desarrollo de una prueba diagnóstica tamiz.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

ARIADNA VERONICA RAMOS RODRÍGUEZ

ASESORES :

Dra. Laura Cobos Marín

MVZ. EDV. Liliana Manuela Valdés Vázquez

Ciudad Universitaria, CDMX. Diciembre, 2019





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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme y por brindarme esta vida maravillosa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme brindado la oportunidad de desarrollarme, intelectual, física y emocionalmente dentro de sus aulas.

A mi asesora la Dra. Laura Cobos Marín por aceptarme en su equipo de trabajo, por transmitirme sus conocimientos y contagiarme ese amor por la inmunología y este proyecto, siempre buscando ser productiva a la sociedad.

A mi asesora la Dra. Lilita Manuela Valdés Vázquez por cobijarme y compartir sus conocimientos conmigo, por siempre alentarme a seguir y por ser un ejemplo para todos los que pertenecemos al laboratorio de Virología. Sin ustedes jamás habría llegado hasta aquí.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología por permitirme formarme y desarrollar este trabajo en sus diferentes áreas y siempre apoyada por sus invaluable elementos tanto materiales como humanos.

Al proyecto PAPIIT IT -201816 “Estandarización, evaluación y validación de la técnica Múltiples de aluminio para el diagnóstico serológico de paratuberculosis, brucelosis, artritis encefalitis y herpesvirus en cabras” por otorgar los recursos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ana Delia Rodríguez Cortez se le agradece el apoyo técnico para la realización de esta tesis, en la estandarización de la prueba ELISA ; así también por las enseñanzas y todo el apoyo aunada a la paciencia depositada en mí y en el trabajo.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento y al Dr Alejandro Benítez por integrarme a sus equipos de trabajo y por resolver mis dudas siempre que lo necesite.

Al laboratorio de Virología y a todos sus integrantes por ser parte medular del desarrollo de esta tesis, siempre me sentí apoyada y alentada por todos ustedes.

Al Dr. Alejandro de las Peñas y la Dra. Norma Vázquez por donar la cepa utilizada en este trabajo.

A todos los seres que se han cruzado en mi camino, ya que son las experiencias vividas las que me han permitido ser...

DEDICATORIAS

A Rebeca por ser la mejor: amiga, confidente, maestra, compañera, Gracias por acompañarme a lo largo de este camino, por siempre tener las palabras de aliento que llegue a necesitar. Nada es mas valioso que aquel que ilumina tu camino en la oscuridad. Y tu eres el sol de mi vida.

A María Isabel por educarme para amar a todos los seres y demostrarme con acciones que venimos a este universo a ser felices y a contribuir en beneficio de la sociedad. Has sido el mejor ejemplo de vida que pude tener, tu eterna alegría ha llenado mi existir.

A Miguel Ángel por ser mi mayor maestro, por confiar en que podía lograrlo y transmitirme día a día gran parte de tu inagotable conocimiento, ojala algún día llegue a saber tanto como tú. Por mostrarme el amor a mi patria y a mi alma mater.

Todo lo que soy y hasta donde he llegado se los debo a ustedes. Los amo.

A mis abuelos que solo me dieron amor y forjaron gran parte de mi carácter con las experiencias vividas a su lado y sus historias llenas de sabiduría.

A mis tíos: Monsis, Lola, Fermín, Vero, Yuya y Quilla por ayudarme a formarme, y ser parte integral de mi desarrollo, jamas me he sentido sola por que se que cuento con ustedes.

A mis primos: Lupita, Saúl, Angie, Aimee, Bath, Jazmín, Azucena y Gael por crecer a mi lado y darme las mejores experiencias y aventuras, a su lado se que lo podemos todo.

A Ale porque la universidad no hubiese sido la misma sin ti. Porque iniciamos juntas y espero que nos queden muchos años por delante.

A Mar, Lu, Muciño, Gloria, Liz, Carlos, Fanny y Moontse por ser los mejores amigos y darme animos cuando tenia ganas de tirar la toalla, la escuela no hubiese sido lo mismo sin haberlos conocido.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Virología: Lau, Lalo, Marion, Pablo, Tere, Eri, Pepe, Hugo, Ara, Julia, Héctor e Irlanda que me entregaron su amistad, alegría, conocimientos y me apoyaron para que este trabajo hoy pueda ser una realidad.

A mis compañeros del hospital: Alma, Pao, Luis, Karlha, Rodo, Irving, Gaby y Ricardo porque a su lado aprendi a amar la clínica y la importancia de que la medicina veterinaria sea llevada a cabo por un equipo integral y con amor a la profesión y a nuestros pacientes.

A cada uno de mis maestros que me regaló lo mas valioso que tenían: sus conocimientos; esto es gracias a su esfuerzo y dedicacion, no los defraudare.

CONTENIDO	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
La Caprino cultura en México y el mundo	3
El Caprino y el ser humano	4
Sistemas de producción	5
Artritis Encefalitis Caprina	7
Taxonomía y Genoma	7
Replicación viral	10
Patogenia	11
ANTECEDENTES	14
JUSTIFICACIÓN	14
HIPOTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVO PARTICULAR	15
MATERIAL Y MÉTODOS	15
Inducción de la proteína recombinante transmembranal gp38	15
Determinación de la expresión de gp38 con Western Blot antihistidina	16
Reconocimiento Inmunológico de la proteína gp38	16
Purificación de la Proteína	17
Desarrollo de ELISA a partir de gp38	17
Estandarización	17
RESULTADOS	19
Inducción de la proteína recombinante transmembranal gp38	19

Determinación de la expresión de gp38 con Western Blot antihistidina	21
Reconocimiento Inmunológico de la proteína gp38	22
Purificación de la Proteína	23
Desarrollo de ELISA a partir de gp38	24
Estandarización	24
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	31
PROSPECTIVAS	31
ANEXO 1	32
ANEXO 2	34
ANEXO 3	37
BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

Evaluación de la proteína gp38 del Virus de Artritis Encefalitis Caprina para el Desarrollo de una prueba tamiz

La glicoproteína recombinante gp38 del virus de Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) fue evaluada como posible antígeno en una prueba diagnóstica de ELISA indirecta.

Se creció una colonia de bacterias *Escherichia coli* que contenían el plásmido que codifica para gp38 y posteriormente fue inducido con isopropil-b-d-tiogalactopiranosido para la proteína de interés. Su expresión fue probada a través de SDS-PAGE 12% y mediante la técnica de Western Blot (WB) con un anticuerpo anti histidina. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad y ésta se comprobó por WB usando anticuerpos anti histidina. La antigenicidad se detectó en una segunda prueba de WB usando un pool de 10 sueros positivos.

Finalmente, mediante la técnica de ELISA indirecta se analizaron 178 sueros de caprinos hembras y machos adultos. Estos sueros fueron obtenidos en un trabajo previo de tres hatos mexicanos que se localizan el estado de Querétaro y Guanajuato; dos de ellos tenían antecedentes de seropositividad al VAEC y el tercero tenía un estatus libre. Los sueros se clasificaron como positivos y negativos según el resultado que mostraron en una prueba de ELISA comercial Kit caprine arthritis encephalitis virus antibody test kit cELISA número de catálogo 289-5 laboratorio VMRD y un ELISA experimental acoplada con la proteína p16 de VAEC.

Se determinó el índice kappa y el valor obtenido fue de $K=0.966$. Esto indica que entre las ELISA con gp38 y la ELISA comercial existe una concordancia casi perfecta de 96%. Por lo tanto, este antígeno tiene un alto valor antigénico y es viable para su utilización en pruebas diagnósticas.

Palabras clave: Artritis Encefalitis Caprina, GP38, ELISA, Glicoproteína recombinante.

ABSTRACT

Evaluation of gp38 protein from Arthritis encephalitis goat virus to development of a screening test.

Recombinant membrane glycoprotein 38 of arthritis encephalitis goat virus (VAEC) was evaluated as a possible antigen in ELISA's diagnostic tests.

Seeded an induced a colony of bacteria *Escherichia coli* which contained plasmid encoding gp38, was induced by isopropyl-b-d-thiogalactopyranoside for overexpress DNA plasmidic, it was purified for corroborated that the plasmid has been functional. Its expression was tested by SDS-PAGE 12 % and its presence was confirmed by Western Blot against the histidine tag of the construction of plasmid and subsequently found by WB if it was recognized by positive sera.

Then by the indirect ELISA technique 178 animal sera, from males and females (>1 year) were analyzed. These sera were obtained from 3 semi-intensive dairy herds in the states of Queretaro and Guanajuato, two of them with sinology and antecedents of positive serological diagnosis, and third negative. The sera results were classified as positives or negatives by commercial ELISA caprine arthritis encephalitis virus antibody test kit cELISA catalog number 289-5 laboratory VMRD, and experimental indirect ELISA with p16 from VAEC.

Cohen's kappa coefficient was determined obtaining a value of $k=0.966$. This shows that exists an almost perfect concordance between gp38 ELISA and commercial ELISA test. This antigen has a high antigenic value so it is capable its utilization in diagnosis tests.

Keywords: Caprine Arthritis encephalitis, Gp38, ELISA, recombinant glycoprotein.

INTRODUCCIÓN

La Caprinocultura en México y el mundo

Se conoce como caprinocultura a todos los procesos que se encuentran encaminados a la explotación del ganado caprino, a través del cual obtendremos leche, carne, piel o estiércol.

Esta actividad ha ido en desarrollo a la par de la humanidad desde hace 7 mil años, siendo uno de los primeros animales domesticados en modelo productivo. (Gómez, 2009) y que actualmente cuenta con un inventario ganadero de 1000 millones de cabezas (FAO, 2019), localizados mayoritariamente en los trópicos. Los países con mayor número de animales son: China, India, Pakistán y Sudán, siendo México el 13vo en importancia a nivel mundial y el segundo en el continente americano, solo después de Brasil. (FAO, 2013, Gutierrez, 2015)

En nuestro país el consumo se da a través de leche y sus derivados: queso y cajeta, así como carne de cabrito en el norte. (Ducoing Watty, 2011)

México no cuenta con un modelo productivo adecuado ya que no existen los métodos de producción, infraestructura comercial o estructura organizacional que permitan que esta actividad pecuaria prospere en el territorio nacional (Ducoing Watty, 2015). Algunas de las variables que contribuyen a una pobre producción son:

- Deficiente organización de productores
- Deficiente aplicación de métodos de diagnóstico en enfermedades
- Baja riqueza en recursos genéticos con capacidad agroecológica
- Pobre intensificación de producción
- Inestabilidad al garantizar la calidad e inocuidad de la leche

- Déficit en el manejo sustentable de recursos forrajeros

Los principales estados productores son: Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Coahuila, Guerrero, Zacatecas, Nuevo León, Guanajuato y Michoacán.

La caprinocultura mantiene un importante lugar en la sociedad rural del país ya que el 98% de la producción se da a través de pequeñas unidades de crianza, muchas veces de autoconsumo; mientras que el 2% restante corresponde a producción urbana.

Una de las grandes limitantes en la producción caprina es la falta de recursos destinados a su explotación, ya que al contar con infraestructura especializada están altamente ligadas a las zonas marginadas y con mayor índice de pobreza en el país (FAO,2018).

Las cabras (muchas veces estigmatizadas) comprenden un papel importante para los 49 millones de personas que viven en pobreza o pobreza extrema, ya que al ser un animal estoico puede aprovechar recursos que otras producciones pecuarias no son capaces de aprovechar.

El Caprino y el ser humano

La relación cabra-hombre, permitió que este último aprovecharse leche y carne como alimento, pelo y piel como abrigo y su fuerza como animal de carga. (Pascual-Serrano, 2003).

En la antigüedad la cabra tomo tal importancia para el hombre que fue relacionada a deidades y a mitos relacionados tanto a la agricultura, ganadería y a la vida cotidiana en general. En el cuadro 1 observamos ejemplos de las principales culturas antiguas y su interpretación del caprino

Cuadro 1. La cabra a nivel cultural (Brizuela, 2004)

Cultura	Deidad	Relación
Tibetana	--	Protección de agricultura y ganadería
Griega	Amaltea	Maternidad / lactancia
Escandinava	Thor	Fertilidad
India	Agni	Señor del fuego creador

Sería hasta la edad media con el obscurantismo que la iglesia católica comienza a relacionarla con el diablo y lo maligno, generando la estigmatización que persiste hasta nuestros días: que están relacionadas a las desgracias y a la mala fortuna.

Posteriormente sería ligada a la erosión de la tierra al ser capaz de alimentarse y generar productos a partir de forrajes pobres.

Sistemas de producción

Las principales zonas en que se desarrolla la producción con caprinos en nuestro país son las siguientes (Ducoing- Watty 2011):

- Zona occidental: comprende principalmente los estados de Sinaloa y Baja California Sur, en donde se encuentra aproximadamente el 8% de la población caprina nacional.
- Zona norte: comprende las estepas desérticas de los estados de Nuevo León, Coahuila, Chihuahua, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí, con cerca de la mitad de la población caprina nacional.

- Zona centro: conformada básicamente por la región denominada bajo mexicano y en la que se encuentra aproximadamente el 10% de la población caprina del país.
- Zona sur: abarca las regiones montañosas y de sabanas arbustivas de los Estados De Oaxaca, Puebla, Guerrero e Hidalgo con aproximadamente el 28% de la población caprina de México. (Ducoing Watty, 2005). En la figura 1 observamos un mapa del país en donde se delimitan las principales zonas de producción caprina.

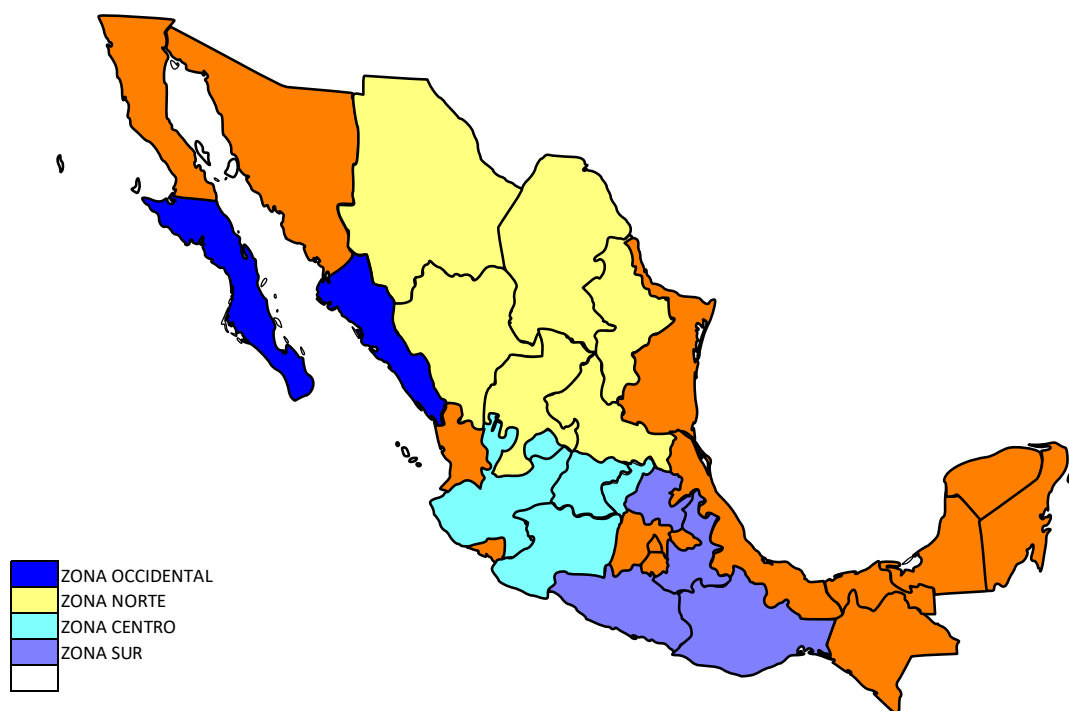


Figura 1: Mapa representativo de México en donde se muestran las principales regiones productoras de caprino y sus derivados (Ducoing Watty, 2005. INEGI, 2009)

Estas zonas son aprovechadas a través de diferentes sistemas de producción que se pueden resumir en tres: (Ducoing Watty, 2005, Gutiérrez, 2015)

- A. Sistema extensivo
 - a. Libre Pastoreo
 - b. Trashumancia
- B. Sistema mixto
- C. Sistema intensivo

A pesar de que se estima que más del 68.5% de la producción Nacional está en sistema extensivo (INEGI, 2009), que generalmente es de autoconsumo y que son reservorio de enfermedades infecciosas; la importancia de los sistemas intensivo y mixto es su desarrollo enfocado a generar productos para la venta. Es en éstos, en los que se llevan registros sobre producción, medicina preventiva e incidencia de enfermedades. (Gutiérrez, 2015)

Artritis Encefalitis Caprina

Es una enfermedad infecciosa que fue descrita por primera vez en 1974 en Estados Unidos (Cork, 1974). Se aisló el virus de membrana sinovial de un animal infectado y dado que el primer signo que se identificó en los enfermos fue encefalitis desmielinizante en cabritos y artritis en animales adultos se le dio el nombre de Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC). (Crawford, 1980)

Se describe en un hato mexicano por primera vez en 1983 (Nazara, 1985)

Taxonomía y genoma

Pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, genero de lentivirus. Actualmente se ha clasificado junto con el virus de Maedi Visna (VMV) en un solo grupo Lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR). (The Center for food security & public health, 2007).

El virus de AEC es una partícula envuelta de 80-120 nm, tiene espigas de superficie de 8 nm y un núcleo denso cuneiforme. Su estructura está compuesta por una doble membrana

externa, en la que se localizan las proteínas de superficie y transmembranales(Zanoni, 1998). La matriz proteica contiene la cápside, que a su vez aloja el genoma viral: una cadena simple de RNA en sentido positivo, no segmentado, y a la cual se asocia la proteína llamada nucleocápside (NC)(Schüpbach, 2004).

Análogo a otros lentivirus el genoma de VAEC está caracterizado por la presencia de genes reguladores-accesorios tales como: tat, rev y vif quienes complementan los genes retrovirales esenciales gag, pol y env. (Rosati, 1995)(Johnson, 1983).En la figura 2 se desglosa la estructura del virión de LVPR y en la figura 3 se describe su genoma. Estos se describen a continuación (Blacklaws, 2012)(Rimstad, 1994):

- Gen gag: codifica para tres proteínas
 - p28 de la cápside
 - p14 de nucleocápside, esencial para el ensamblaje
 - p16 de matriz, une a la cápside con la envoltura externa

Gen pol: Codifica proteínas víricas importantes para la replicación viral

- Transcriptasa reversa (RT, p66/p51)
- Integrasa (IN)
- Proteasa (PR) quien fragmenta los precursores de gag y pol
- dUTPasa (DU) que favorece la replicación en células que no se dividen y evita mutaciones en el ADN viral

Gen env: codifica para la glicoproteína precursora gp160 que se fragmenta en dos subunidades

- gp135 hidrofílica de superficie, responsable de la entrada del virus
- gp38 hidrofóbica transmembranal que está anclada en la envoltura y soporta a gp135

Gen vif: se localiza en el genoma y se requiere para la replicación completa del virus. Vif actúa modulando la infectividad del virión

Gen tat: incrementa la transcripción de los genes virales.

Gen rev: modula el procesamiento y transporte de los RNA mensajeros que codifican para los componentes del virión, indispensable para la replicación viral

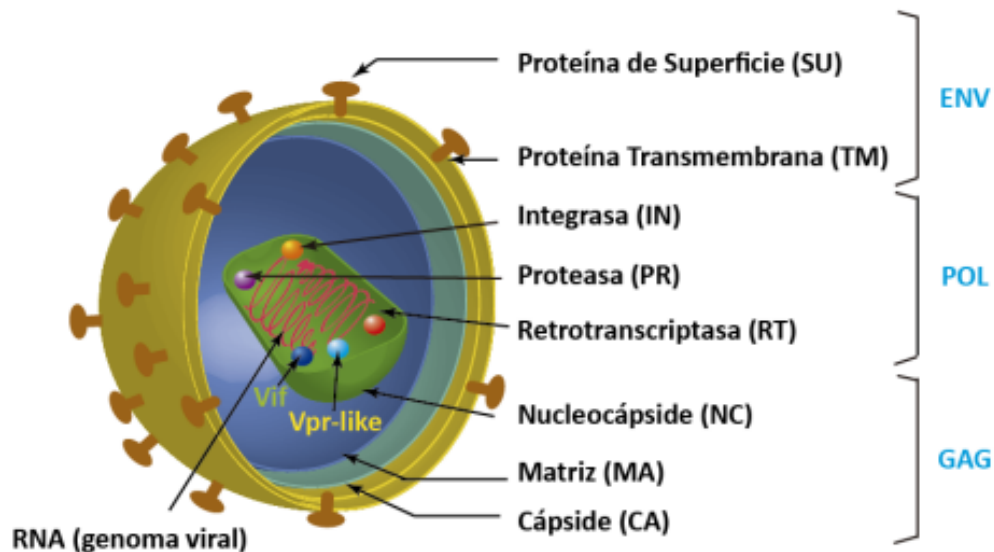


Figura 2. Virión de LVPR mostrando sus principales componentes, entre ellos las dos cadenas de RNA de sentido positivo, las proteínas estructurales de GAG (nucleocápside, NC; cápside, CA y matriz, MA), las proteínas POL (proteasa, PR, retrotranscriptasa, RT e integrasa, IN) y las glicoproteínas ENV (superficie, SU y transmembrana, TM) distribuidas en la envoltura lipídica de origen celular. (Glaría, 2015)

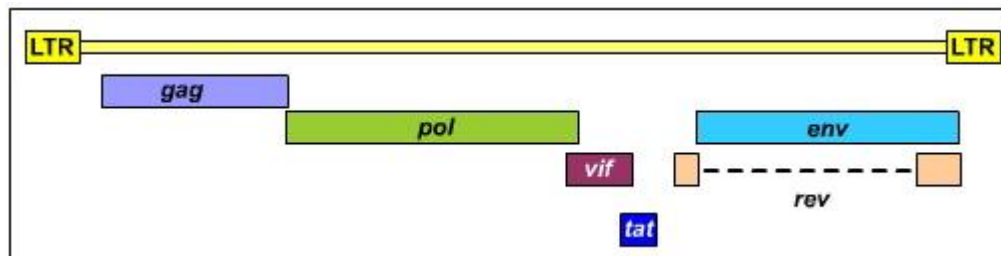


Figura 3. Genoma de los LVPR (LTRs, gag, pol, vif, tat, rev y env). Se han representado en distintos niveles los marcos de lectura (reading frames) que permiten al virus minimizar su longitud para producir todas las proteínas señaladas. (goatbiology)

Replicación viral.

Los LVPR's como AEC poseen un tropismo mayor por monocitos, macrófagos y células dendríticas(Narayan, 1983). Sin embargo, una vez en los tejidos pueden llegar a infectar otras células que servirán como reservorio para el virus. (Blacklaws, 2012)(Gilles, 1999)

La infección natural ocurre a través de una membrana mucosa, generalmente oro nasal por medio de partículas virales o células infectadas. Las células dendríticas en la mucosa se infectan y al migrar a linfonodos transmiten la infección a los macrófagos. El macrófago sale del linfonodo y genera una infección sistémica. El virus puede integrar su DNA en células estromales o precursores mieloides de médula ósea y permanecer persistente/latente con poca o nula expresión viral. Al entrar al torrente sanguíneo los monocitos permiten la transmisión de células infectadas a tejidos como pulmones, glándula mamaria, sistema nervioso central y articulaciones.(Narayan, 1985) En estos tejidos el monocito termina su maduración y cambia la replicación viral de restrictiva a productiva al transformarse en macrófagos. (Blacklaws, 2012) En la figura 4 se observan las generalidades de replicación viral de los Retrovirus.

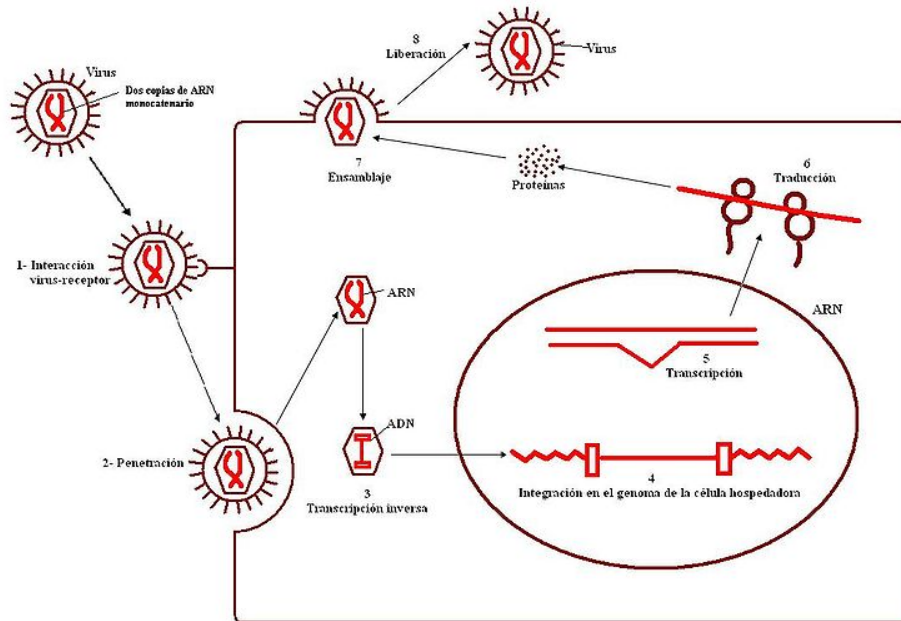


Figura 4. Fases del proceso de replicación de los retrovirus (Coffin et al., 1997)

La respuesta inmune a los antígenos virales genera infiltración de células inflamatorias en el tejido.(Perry, 1995)(Knowles, 1990)

Patogenia

Posterior a la infección de una célula, el virus entra en latencia (Haase, 1986) y la signología puede manifestarse en gran variedad de formas clínicas, dependiendo de la edad y el estado inmunológico.(East, 1993)

La artritis es la presentación clínica más observada, presentando una mayor afectación las articulaciones carpales. Sin embargo, hay evidencia histológica de infección en todas las articulaciones. (Crawford, 1980)

La expresión neurológica de la enfermedad es más común en casos de transmisión vertical y se manifiesta en cabritos de 2-6 meses de edad. La signología es progresiva e inicia generalmente con paresis; en el 50% de los casos pueden ocurrir otros signos como

ceguera, nistagmos, temblores cefálicos y otras alteraciones en la conciencia (Cork, 1974) (Crawford, 1980)

El virus también puede desarrollar una presentación en glándula mamaria, con infiltrado linfocitario que provoca inflamación y fibrosis del tejido ocasionando una ubre firme y en caso de cabras adultas hipogaláctica, mientras que en cabras jóvenes agalactea. (Kennedy, 1985)(Contreras, 2001)

Se han reportado algunos casos de neumonía intersticial crónica, dificultad respiratoria y pérdida de peso. (Smith y Sherman, 1994).

Diagnóstico

El diagnóstico se hace de manera clínica ya que a excepción de los cabritos quienes presentan un cuadro agudo que finaliza en la muerte, la presentación de signos rara vez se encuentra antes de los 2 años de edad.

Al igual que en cualquier enfermedad infecciosa la prueba confirmatoria es el aislamiento, pero por lo complicado que resulta, algunos autores han propuesto que las pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden utilizar para identificar al agente(Barquero, 2013). Sin embargo, en México no se realizan de forma rutinaria. Recientemente se han realizado pruebas para el diagnóstico de VAEC con la técnica de Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Balbin, Lertanantawong, Suraruengchai, & Mingala, 2017; Tu, Shiao, Lai, Yang, & Wang, 2017)

Los animales infectados producen anticuerpos tipo IgG contra las principales proteínas del virión entre las dos semanas y hasta los 48 meses posteriores a la infección (De Andrés et al., 2005,Blacklaws et al, 2004)(Leginagoikoa, 2010). En un inicio se observa un incremento progresivo de anticuerpos hasta alcanzar un pico máximo que desciende gradualmente hasta alcanzar niveles basales. (Tu et al., 2017) En algunos estudios se ha reportado

intermitencia en niveles séricos de anticuerpos, lo cual podría afectar a la prueba al arrojar falsos negativos. (Hanson et al,1996)(Reina, 2009).

Las pruebas serológicas son los métodos más difundidos y convenientes para identificar una infección por LVPR's. ya que detectan anticuerpos específicos contra proteínas inmunodominantes y han demostrado tener alta especificidad y sensibilidad, que oscilan entre un 90% y 98% (Hermann et al, 2003). Las pruebas serológicas más usadas son la difusión doble en agar (AGID), los ensayos inmunoenzimáticos ligados a enzimas (ELISA) (Torres, 2003), así como lá prueba Western blot (WB). Algunos autores proponen que se utilice esta última como confirmatoria; sin embargo, esta no es fácil de realizarse en un laboratorio convencional. El diagnóstico serológico más empleado en México es mediante el uso de kits de ELISA importados, que son caros, difíciles de obtener, y están basados en virus circulantes extranjeros; lo que los hace poco accesibles para los productores.(Saman, 1999)(Tu, 2017)(Zanoni, 1989)

Cuadro 2. Pruebas diagnósticas para LVPR

TIPO	NOMBRE	DETECTA	VENTAJAS	DESVENTAJA
SEROLOGICAS	AGID	AC's	Bajo costo	Proceso lento
	ELISA	AC's	Rápido Menor costo Fácil reproducibilidad	Repetibilidad
	WESTERN BLOT	AC's	Prueba de oro para LVPR	Se requiere equipo especializado y más tardado
MOLECULARES	PCR	ARN o provirus	Se podría identificar cepa circulante	Costoso Se requiere personal capacitado
	LAMP	ARN		Poca difusión

ANTECEDENTES

En un estudio previo se realizó un análisis bioinformático y filogenético de lentivirus de pequeños rumiantes y se identificó (a partir de una muestra de ADN proviral) el genotipo y el subtipo del virus circulante en algunos hatos mexicanos. Con los productos de PCR obtenidos se transformaron bacterias *E. coli* con plásmidos que contenían fragmentos que codifican para algunas proteínas estructurales de LVPR. (Vázquez, 2011)(Rimstad, 1994)

Para el presente trabajo se utilizó una clona cuyo plásmido contiene un fragmento codificante para la proteína transmembranal gp38, la cual ha sido reportada como inmunogénica en la literatura. (Peterhans et al, 1994)

JUSTIFICACIÓN

La caprinocultura en México abarca un importante segmento de la producción pecuaria y ofrece un medio de sustento para muchas familias de escasos recursos. Sin embargo, las

pruebas que se emplean actualmente para el diagnóstico son poco accesibles para los productores; quienes no encuentran la relación costo-beneficio que justifique realizarlas para determinar la presencia de una enfermedad crónica para la cual no hay tratamiento. Lo anterior no ha permitido hacer un diagnóstico oportuno de la enfermedad, que permita evaluar su estatus zoonosario y determinar las pérdidas económicas que representa para los productores.

Contar con pruebas serológicas que empleen antígenos de cepas mexicanas, abrirá la posibilidad de ofrecer un diagnóstico confiable y de bajo costo para los caprinocultores del país.

HIPÓTESIS

La proteína recombinante gp38 del virus de Artritis Encefalitis Caprina será reconocida por sueros de cabras identificadas como seropositivas la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Comprobar el reconocimiento de la proteína recombinante gp38 del virus de AEC por sueros de cabras seropositivas previamente identificadas por ELISA comercial y ELISA p16 y determinar la concordancia entre los resultados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener la proteína recombinante GP38 para probarla como antígeno en la técnica ELISA
- 2.- Realizar la técnica de ELISA indirecto con el antígeno GP38 de VAEC para confirmar su inmunorreactividad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inducción de la proteína recombinante transmembranal gp38.

Se tomó una colonia de bacterias y por agitación de asa se sembró en 4ml de medio líquido de LB Km y se incubó 37°C durante 18 h en agitación constante toda la noche. Posteriormente se indujo con isopropil-b-D-tiogalactosidasa (IPTG) 1mM y se volvió a incubar a 37°C durante 16 h en agitación constante. Se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante, se guardaron tres alícuotas y las pastillas se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su uso. Una alícuota de la pastilla, se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15 (PAGE) en condiciones desnaturalizantes con duodecil sulfato de sodio (SDS).

Determinación de la expresión de gp38 con Western Blot antihistidina.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 40 mA voltaje variable, 70 minutos con el extracto obtenido de la cepa de *E. coli* inducida. Posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF a 90 volts durante 70 minutos, en una cámara húmeda. Se bloqueó con leche semidescremada al 3% durante 60 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó cinco veces con solución de lavado y se agregó el primer anticuerpo (antihistidina) a una dilución 1:3000 en solución dilutora y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente se hicieron cinco lavados; se agregó el segundo anticuerpo Proteína G conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución de 1:3000 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron una serie de 15 lavados divididos en tres horas y se reveló mediante la técnica de quimioluminiscencia.

Reconocimiento inmunológico de la proteína gp38.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 40 mA voltaje variable, 70 minutos con el extracto obtenido de la cepa de *E. coli* inducida. Posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF a 90 volts durante 70 minutos en una cámara húmeda. Se bloqueó con leche semidescremada (svelty) al 3% durante 60 minutos en agitación constante a temperatura ambiente; después se lavó cinco veces con solución de lavado y se agregó el primer anticuerpo (Pool de sueros positivos AEC) a una dilución 1:50 en solución dilutora y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente se hicieron cinco lavados; se agregó el segundo anticuerpo Proteína G conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución de 1:5,000 incubando 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron una serie de 15 lavados divididos en 3 horas y se reveló mediante la técnica de quimioluminiscencia.

Se repitió el proceso con un pool de sueros negativos.

Purificación de la proteína.

Se purificó por cromatografía de afinidad, a la proteína con el kit Ni-NTA Fast Start Kit Qiagen^R de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Posteriormente se evaluó la purificación empleando un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 40 mA durante 70 minutos aproximadamente. Se realizó un Western Blot contra la cola de histidina de igual manera como se explicó previamente. Una vez purificada, la proteína se cuantificó mediante el equipo espectrofotómetro Ampliquant AQ 07 y se guardó a -20 hasta su uso en la prueba de ELISA.

Desarrollo de ELISA a partir de gp38.

Estandarización.

En una placa de noventa y seis pozos Maxisop[®] se fijó gp38 con el amortiguador de carbonatos (coating buffer) 3 pozos (1 µg /50 µl /pozo), 3 pozos (0.5 µg /50 µl /pozo), 3 pozos (0.1 µg /50 µl /pozo). Se dejaron pozos vacíos para determinar la unión inespecífica 18 (UNE) y se incubó tapado a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron 4 lavados de 15 segundos con 350 µl de solución de lavado. A continuación, se realizó una dilución 1:10 de los sueros testigos (un pool de sueros positivos) con amortiguador de fosfatos salinos (PBS) y se colocaron 50 µl en cada pozo y por triplicado. Se incubó a 32°C durante 1.5 h, se lavó 4 veces con solución de lavado. Se hicieron diluciones 1:5000, 1:10000, 1:20000 de la proteína G peroxidada con PBS, se incubó a 32°C durante 1.5 h, se lavó 4 veces, se adicionó 100 µl de sustrato por pozo, se incubó 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se adicionaron 50 µl de la solución de frenado y se leyó a 450 nm en el espectrofotómetro. Se analizaron las densidades ópticas obtenidas en todas las diluciones y los UNE para establecer las condiciones óptimas para el ensayo. Una vez obtenidas las diluciones adecuadas, se procedió a realizar un segundo ensayo, en este caso, se analizaron 5 sueros negativos y 5 sueros positivos previamente identificados por

la prueba de ELISA comercial, así como el pool de cada una para establecer un punto de corte.

Reconocimiento de la proteína por sueros de cabras positivas y negativas a la enfermedad.

Se evaluaron por duplicado 89 sueros positivos y 90 sueros negativos.

El antígeno gp38 se fijó a 4°C toda la noche y a una concentración de 0.1 µg/pozo en una placa de noventa y seis pozos Maxisorp® empleando 50 µl del amortiguador de carbonatos 0.05 Molar. Cada placa se lavó 4 veces con la solución de lavado durante 30 segundos, se hizo una dilución 1:10 de cada suero con la solución de fosfatos y se colocaron 50 µl en cada pozo, se incubó durante 1.5 h a 32°C. Se hizo un segundo lavado de la placa 4 veces durante 30 segundos, del conjugado se hizo una dilución 1:20000 con la solución de fosfatos salinos y se agregaron 50 µl a cada pozo, se incubó nuevamente durante 1.5 h a 32°C, se hizo un tercer lavado igual al descrito anteriormente. Finalmente se adicionan 100µl de sustrato, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y, por último, se hizo la lectura con espectrofotómetro a 450 nm previamente adicionando 50 µl de solución de frenado. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de curva ROC para establecer el punto de corte.

Coefficiente kappa de Cohen

Una vez establecido el punto de corte se determinó el número de sueros positivos y negativos y se utilizó el coeficiente kappa de Cohen (Cohen, 1968) para medir el nivel de concordancia entre los resultados de ELISA con gp38 y los resultados obtenidos con ELISA comercial y ELISA con p16.

El coeficiente kappa refleja la concordancia inter-observador y puede ser calculado en tablas de cualquier dimensión, siempre y cuando se contrasten dos observadores.

El coeficiente kappa puede tomar valores entre -1 y +1. Mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia inter-observador, por el contrario, mientras más cercano a -1, mayor es el grado de discordancia inter-observador. (Luis Carrasco, 2004)

RESULTADOS

Inducción de la proteína recombinante transmembranal gp38.

En la placa de Agar-LB se obtuvieron colonias de bacterias de forma redonda de entre 3 y 5 mm de diámetro, de coloración blanca. (Fig.5)



Figura 5. Cepa 23. E. coli transformada con plásmido que codifica para proteína TM gp38 de VAEC.

En el SDS PAGE 15% se observó una banda de aproximadamente 38 kDa significativamente más marcada. Coincide con el peso que se espera de la proteína recombinante. (Fig 6)

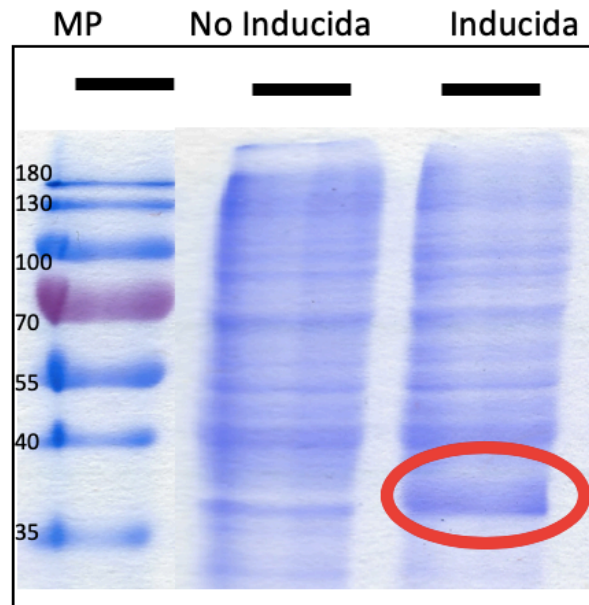


Figura 6. SDS PAGE 12% que expresa a la proteína gp38 teñido con Azul de Coomassie MP: Marcador de peso molecular en Kilodaltones; C23SI: Cepa sin inducir; C23I: Cepa inducida en donde se marca la banda que corresponde al peso esperado.

Determinación de la expresión de gp38 con Western Blot antihistidina. La proteína recombinante con cola de histidinas de peso molecular de 38 kDa fue reconocido por el anticuerpo antihistidina. En el revelado por Quimioluminiscencia se observa una banda a la altura de 38 kDa. (Fig. 7)

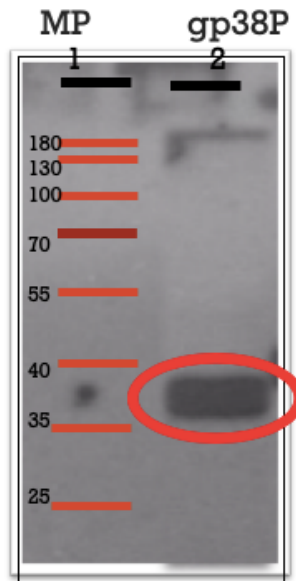


Figura 7. WB revelado por Quimioluminiscencia que reconoce la cola de histidinas que posee la proteína recombinante gp38. Carriles: 1.- Marcador de peso en kDa. 2.- Cepa inducida con IPTG. Se observa una banda en el peso esperado.

Reconocimiento inmunológico de la proteína gp38

Mediante la técnica de quimioluminiscencia y revelado con diaminobenzidina se observó una banda que marca el reconocimiento de la proteína recombinante por sueros positivos de cabra. (Fig. 8)

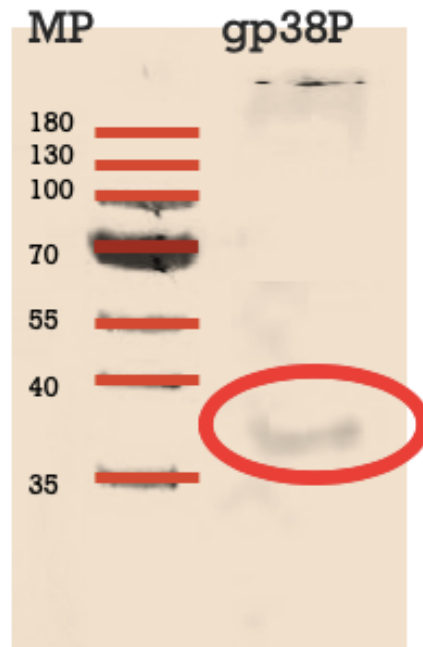


Figura 8. WB contra pool de sueros positivos. Carriles. 1.- Marcador de peso molecular en kDa. 2.-Cepa inducida con IPTG y revelada con un pool de sueros positivos. 3.- Pool de sueros negativos.

Purificación de la proteína.

Después de su purificación se obtuvo una concentración de 587 $\mu\text{g/ml}$ de gp38. En el gel de poliacridamida se observan las bandas correspondientes a la elución 1 y 2 (Fig. 9).

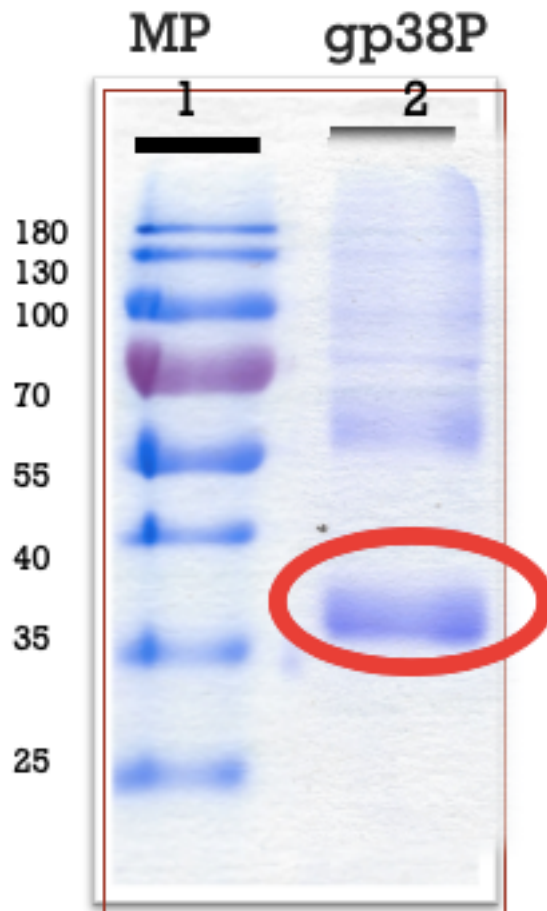


Figura 9 SDS PAGE 12% después de purificar la proteína. Carriles: 1. Marcador de peso molecular 2.- Elución 1 donde se observa una banda del peso esperado. 3.- Elución 2 donde se observa muy poco remanente.

Desarrollo de ELISA a partir de gp38.

Estandarización.

Se analizaron los resultados obtenidos con cada una de las concentraciones de gp38 y proteína G probados con el pool de sueros positivos (Cuadro 3)

Cuadro 2.- Se observa que para optimizar al máximo la prueba, y alcanzando una densidad óptica mínima de 1 a 450 nm, la concentración para sensibilizar la placa debe ser de 0.1 µg de proteína purificada gp38 y una dilución de la proteína G de 1/20000, contando que los sueros están a una concentración de 1/10

[] gp38	Dilución suero	Dilución proteína G	Densidad óptica	Dilución Proteína G	Densidad óptica	Dilución Proteína G	Densidad óptica
1 ug	1/10	1/10000	1.9	1/20000	1.45	1/40000	0.7
0.5 ug	1/10	1/10000	1.8	1/20000	1.4	1/40000	0.6
0.1 ug	1/10	1/10000	1.4	1/20000	1.05	1/40000	0.4

Reconocimiento de la proteína por sueros de cabras positivas y negativas a la enfermedad.

Una vez establecidos los parámetros a emplear en la prueba, se realizó el ELISA de 178 sueros pertenecientes a tres hatos y previamente identificados por ELISA comercial y la proteína P16. De estos sueros un total de 89 eran positivos a ambas proteínas, mientras que 89 eran negativos. De los 89 positivos 87 resultaron positivos a la gp38, mientras que de los 89 negativos solamente uno fue positivo a la gp38. Figura 10

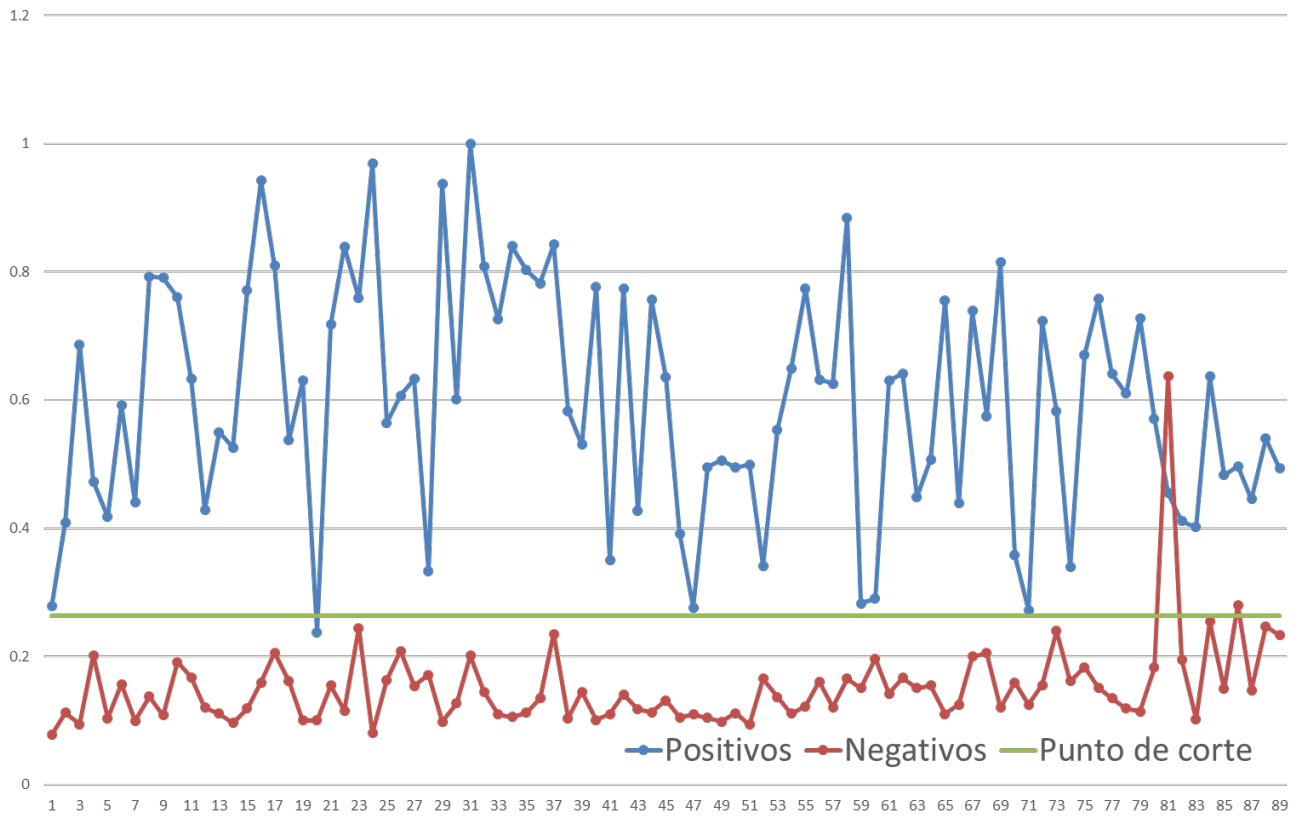


Figura 10 Grafica de los sueros positivos y sus densidades ópticas promedio

Los datos se analizaron mediante una curva ROC y se estableció el punto de corte a una densidad óptica de 0.2458 con una sensibilidad de 98.88% y una especificidad de 96.59%. Se obtuvo un área bajo la curva de 0.99 lo que demuestra que la muestra detecta casi al 100% de casos previamente identificados como positivos o negativos a la enfermedad. (Fig 11)

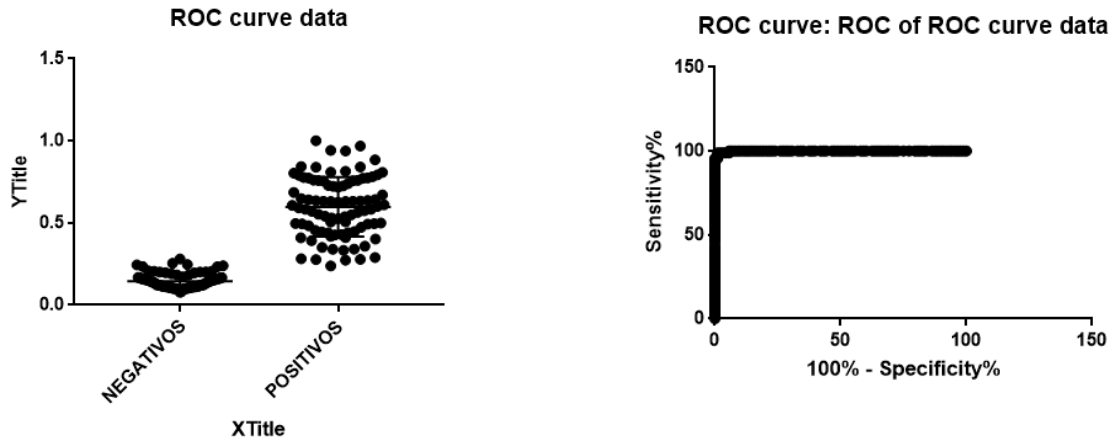


Figura 11 Izquierda: distribución de las muestras negativas con respecto a las positivas. Derecha: Curva ROC. Área bajo la curva 0.99

Análisis Kappa

Una vez obtenido el punto de corte se compararon los resultados obtenidos con ELISA-gp38 y la ELISA comercial como se muestra en el cuadro 4:

Cuadro 4 3.-

	ELISA gp38 +	ELISA gp38
ELISA comercial +	88	1
ELISA comercial -	2	87

Con estos datos se calculó el coeficiente kappa de Cohen, en el cual se obtuvo un valor $K=0.966$ con un IC 95% de 1.11 a 0.82. Esto indica que entre las ELISA existe una concordancia de 96%, una concordancia casi perfecta. Según se muestra en el cuadro 5:

Cuadro 5.- Coeficiente kappa(Cerda,2008)

Coeficiente kappa	Fuerza de la concordancia
0.00	Pobre (Poor)
0.01 – 1.20	Leve (Slight)
0.21 – 0.40	Aceptable (Fair)
0.41 – 0.60	Moderada (Moderate)
0.61 – 0.80	Substancial (Substantial)
0.81 – 1.00	Casi perfecta (Almost perfect)

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba ELISA acoplada con la proteína gp38 utilizando un panel de sueros previamente identificados como positivos y negativos (tanto por ELISA comercial, como con un ELISA experimental acoplada con la proteína de matriz (MA) p16), se demostró que la prueba tiene una concordancia en resultados casi perfecta (0.96 análisis k).

A pesar de que diversos estudios demuestran que esta proteína genera inmunogenicidad a partir de las 12 semanas post infección, el 96% de caprinos con signología de artritis presentan anticuerpos contra ella; lo que la hace un candidato idóneo para el diagnóstico. (L'Homme, Leboeuf, Arsenault, & Fras, 2015).

Se ha observado que el epítipo transmembranal (TM) inmunodominante de VAEC, posee la misma localización que los epítipos TM de otros lentivirus como VIH-1 o 2, virus de inmunodeficiencia en simios, sida felino y el virus de anemia infecciosa equina. Este epitope presenta poca variabilidad antigénica (Bertoni et al., 1994). Además, en otros lentivirus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha demostrado una alta concordancia (cerca o igual al 100%) entre la seropositividad a la gp38 y la obtenida hacia otras proteínas, sin reactividad cruzada en muestras seronegativas (Gnann, Nelson, & Oldstone, 1987). Estos hallazgos concuerdan con lo encontrado en el presente trabajo en el que se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad del 98.88% y 96.59% respectivamente. En la búsqueda bibliográfica realizada no se encontró ningún reporte sobre el uso de la gp38 para el diagnóstico de LVPRC, por lo que este sería el primer estudio en demostrar que es proteína un

antígeno con alto valor diagnóstico comparada con otras pruebas existentes similares.

El desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en serología ha demostrado ser de las estrategias más adecuadas si lo que se busca es encontrar la mayor cantidad de animales infectados.(Tu et al., 2017). En general para diagnóstico de lentivirus, en sus diferentes presentaciones, la técnica serológica más recomendada es el ELISA por ser mucho más sensible que la AGID (De Andrés et al., 2005) y han arrojado buenos niveles de sensibilidad y especificidad oscilando entre el 65 % y 98 % (De Andrés et al., 2005; Tu et al., 2017). En el presente trabajo se sientan las bases para el desarrollo de una prueba de ELISA con alta sensibilidad y especificidad, que podría ser de fácil acceso para los productores, al ser elaborada a partir de un antígeno recombinante de producción nacional, que proviene de un virus circulante en territorio nacional.

Los costos de una prueba de ELISA casera, aún no se han estimado, pero es evidente que el desarrollo de una prueba nacional, implicaría una reducción considerable de los recursos económicos necesarios, en comparación con los productos de importación. (Sánchez, 2001)

El desarrollo de una herramienta que pueda apoyar a los productores mexicanos a identificar a sus animales enfermos podría contribuir a un mejor manejo de la enfermedad, ya que los animales positivos podrían aislarse. Lo anterior permitiría que estos animales continúen con su ciclo productivo, evitando el riesgo de mantener la infección en el hato. De esta forma en un periodo de aproximadamente cinco años, los hatos pudiesen encontrarse libres de la infección.

Al ser la producción caprina un activo importante en la economía nacional, ofreciendo una derrama económica de casi 5700 millones de pesos anuales (SIAP, 2017), es conveniente ofrecer servicios diagnósticos de calidad y de fácil acceso al productor. Esto permitiría incrementar la producción, tanto cárnica como lechera, evitando pérdidas por mastitis subclínica para las hembras productoras y del cabrito en caso de carne en canal.

CONCLUSIONES

La proteína recombinante gp38 del Virus de Artritis Encefalitis Caprina fue reconocida por sueros positivos a la enfermedad (previamente identificados por dos pruebas serológicas).

La ELISA indirecta usando la proteína recombinante gp38 tiene concordancia casi perfecta con la ELISA comercial y la ELISA experimental con p16.

La proteína recombinante gp38 muestra evidencia sustancial de ser un antígeno con un alto valor diagnóstico comparado con las pruebas que ya existen en el mercado.

PROSPECTIVAS:

Si bien la prueba desarrollada mostró excelentes valores de sensibilidad y especificidad, con lo que podría considerarse altamente confiable. Se sugiere probar una población con mayor heterogenicidad, empleando mas muestras que hayan sido detectadas previamente como positivas o negativas por las pruebas llamadas de "Oro" (PCR en el caso de AEC). Además, como parte de la validación de la prueba de ELISA, deberían hacerse ensayos de estabilidad de la muestra (ciclos de congelación y descongelación), junto con pruebas de sensibilidad y precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

ANEXO 1

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

Solución Amortiguador de corrida

Glicina 0.192 M	14.4 g.
Tris Base 0.025 M	3 g.
SDS 0.1%	1 g
dH ₂ O	cbp 1 L

*En 300 ml de H₂O destilada agregar primero glicina, después adicionar el Tris Base y por último el SDS. Esperar la homogenización y aforar a 1 L.

Mantener a refrigeración 4°C

SDS 10%

SDS	1 g
dH ₂ O	cbp 10 ml

APS 10%

Persulfato de amonio	0.1 g
dH ₂ O	cbp 1 ml

*Una vez preparado se mantiene en congelación -20 °C

Amortiguador gel resoledor

Tris Base 1.5 M	18.2 g	9.085 g
SDS	0.40 g	0.20 g
dH ₂ O	100 ml	50 ml

*Ajustar pH a 8.8 con HCl y mantener a refrigeración 4°C

Amortiguador gel concentrador

Tris Base 1M	6.06 g	3.03 g
SDS	0.40 g	0.20 g
dH ₂ O	100 ml	50 ml

*Ajustar pH a 6.8 con HCl y mantener a refrigeración 4°C

Regulador de la muestra 5X

Tris HCL pH 8.4	500 mM
Sacarosa	0.5 M
EDTA pH 8.0	5 mM
Azul de bromofenol	0.03 %

Solución de tñido

Azul de Coomassie R-250	0.2%
Ácido Acético Glacial	10%
Metanol	20%
dH ₂ O	69.8%

Solución para desteñir

Metanol	10%
Ácido Acético Glacial	10%
dH ₂ O	80%

ANEXO 2

SOLUCIONES WESTERN BLOT

Solución Amortiguador de Transferencia +

Glicina	23 g
Tris Base	4.8 g
Metanol	320 ml
SDS 10 %	100 ul
dH ₂ O	cbp 2 L

PBS 10X +

Na ₂ HPO ₄	14.2 g
NaH ₂ PO ₄	6.9 g
NaCl	87.5 g
dH ₂ O	cbp 1 L

PBS 1X +

PBS 10X	100 ml
dH ₂ O	900 ml

*Ajustar pH a 7.2

PBS Tween

Tween 20	500 ul
PBS 1X	cbp 1 L

Solución de lavado de 2do ac. +

NaCl 1M	29.22 g
Tween 20	500 ul
PBS 1X	cbp 500 ml

Solución de bloqueo

Leche descremada en polvo 3 %	0.45 g
PBS 1X	cbp 15 ml

Solución dilutora ac's

Leche descremada en polvo 3 %	0.45 g
PBS Tween	cbp 15 ml

SOLUCIONES DE REVELADO

Solución de revelado 1

PBS 1X	10 ml
Diaminobenzidina	5 mg
H ₂ O ₂ 30%	10 ul

Solución de revelado 2

PBS 1X	40 ml
Metanol	10 ml
4-cloro-1-naftol	30 mg
H ₂ O ₂ 30%	30 ul

+Mantener en refrigeración 4°C

ANEXO 3

SOLUCIONES ELISA

Amortiguador de carbonatos

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g
dH ₂ O	cbp 1 L

*Ajustar pH con NaOH a 9.6 y almacenar a 4° C

Amortiguador de fosfatos salinos (PBS)

Na ₂ HPO ₄	17.32 g
NaH ₂ PO ₄	10.84 g
NaCl	8.7 g
BSA	1 g
dH ₂ O	cbp 1 L

*Antes de agregar BSA ajustar pH con NaOH a 7.0 y almacenar a 4° C

Solución de lavado

NaCl 1.5 M	87.66 g
Tween 20 0.05 %	5 ml
dH ₂ O	cbp 1 L

Solución de Citrato pH 6.0

C ₆ H ₈ O ₇	4.8 g
dH ₂ O	cbp 500 ml

*Mantener en refrigeración 4°C

TMB+ DMSO

TMB 0.0025 g

DMSO 250 ul

*Mantener en refrigeración 4° C

Solución Citrato-TMB

Sol. Citrato 12.5 ml

TMB-DMSO 125 ul

H₂O₂ 30% 2.5 ul

*Se prepara al momento de uso

BIBLIOGRAFÍA

Balbin, M. M., Lertanantawong, B., Suraruengchai, W., & Mingala, C. N. (2017). Colorimetric detection of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) through loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with gold nanoprobos. *Small Ruminant Research*, 147, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.021>

Barquero, N., Domenech, A. & Arjona, A., 2013. Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, 94, pp.817–819. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.004>.

Bertoni, G., Zahno, M. L., Zanoni, R., Vogt, H. R., Peterhans, E., Ruff, G., ... Pancino, G. (1994). Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *Journal of Virology*, 68(11), 7139–7147.

Bertoni, G., 2007. Caprine Arthritis Encephalitis Complex. *International Veterinary Information Service*, Tempesta M(Ithaca NY), p.www.ivis.org.

Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35, pp.259–269. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237012> [Accessed March 8, 2013].

Blacklaws, B.A. et al., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 101, pp.199–208.

Cerda L, J. & Villarroel Del P, L., 2008. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), pp.54–58.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Vogt VM. Retroviral Virions and Genomes. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19454/>

Cohen, J., 1968. Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychological bulletin*, 70(4), pp.213–220. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19586159>.

Contreras, A. et al., 2001. Etiología de la infección intramamaria caprina en relación con los programas de control. In *Congresos y jornadas. Seria Ganaderia Ovino-Caprino-Junta Andalucía*. Murcia, pp. 1 – 14. 36
Ducoing Watty, A.E. 2005 Introducción a la caprinocultura. Obtenido de http://www.fmzv.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_zoo/unidad_%205_zootecniadecaprin.pdf (consulta: Junio 2019)

Ducoing Watty. (Martes 25 de octubre de 2011). Conasamexico.org.mx. Obtenido de http://www.conasamexico.org.mx/conasa/2011_docs_19a_reunion/201110_25-martes/salon_LAS-NUBES/Ovinos-y-caprinos/comite_9/ANDRES_DUCOING_WATTY.pdf

De Andrés, D. et al., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*, 107, pp.49–62.

East, N.E. et al., 1993. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant Research*, 10, pp.251–262.

Ellis, T., Robinson, W. & Wilcox, G., 1983. Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Australian Veterinary Journal*, 60(11), pp.326–329.

Gilles, Q. & Robert, V., 1999. Caprine Arthritis Encephalitis Virus (Retroviridae). A. Granoff & R. G. Webster, eds. *Enciclopedia of Virology (second edition)*, pp.223–229.

Gnann, J., Nelson, J., & Oldstone, M. (1987). Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 61(8), 2639–2641.

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

Herrmann, L.M. et al., 2003. Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum Antibodies to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Diagnostic Tool for Successful Eradication. *Clinical and Diagnostic Labora*, 10(2), pp.267–271.

Herrmann-Hoesing, L.M. et al., 2010. Evaluation of a caprine arthritis-encephalitis virus/maedi-visna virus indirect enzyme-linked immunosorbent assay in the serological diagnosis of ovine progressive pneumonia virus in U.S. sheep. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 17(2), pp.307–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2815521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2013].

ICTVdB Management, 2006. 00.061.1.06.007. Caprine arthritis encephalitis virus. *ICTVdB - The Universal Virus Database 4 versión*, p.Columbia University, New York, USA.

INEGI, 2007. *Censo agropecuario 2007*, Mexico DF. 37

Johnson, G.C. et al., 1983. Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infection and immunity*, 41(2), pp.657–665. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=264693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Knowles, D. et al., 1990. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *Journal of virology*, 64(5), pp.2396–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=249403&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Leginagoikoa de la Arena, I., 2010. *Epidemiología y Diagnostico de la infección por el Virus Maedi Visna en Diferentes Sistemas de explotación ovinos españoles*. Tesis doctoral, Universidad de Leon.

Leroux, C. et al., 1997. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of virology*, 142(6), pp.1125–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9229003>.

L’Homme, Y., Leboeuf, A., Arsenault, J., & Fras, M. (2015). Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). *Virology*, 475, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.006>

Lluís Carrasco, J. & Jover, L., 2004. Métodos estadísticos para evaluar la concordancia. *Medicina Clínica*, 122(Supl.1), pp.28–34. Available at: <http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.fulltext?pidet=13057543>.

Narayan, O. et al., 1983. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and immunity*, 41(1), pp.67–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=264744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Narayan, O. & Cork, L.C., 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of infectious diseases*, 7(1), pp.89–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3885367>.

Nazara, S. de J. et al., 1985. Estudio Serologico de la Artritis-encefalitis Caprina en México. *Técnica Pecuaria Mexico*, (48), pp.98–101.

OIE, 2008. Artritis-Encefalitis caprina y Maedi-visna. In *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.07.03-04_Artritis-Encefalitis_caprina_Maedi_Visna.pdf, pp. 1–10.

OIE, 2013. Principios y Métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. In *Manual terrestre de la OIE 2013*. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf, pp. 1–18.

Pascual CA y Serrano SA. Diccionario de símbolos. Madrid-México. Diana-LIBSA. 2003.

Perry, L.L. et al., 1995. Depressed CD4+ T lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis. *The Journal of infectious diseases*, 171, pp.328–334. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844368>.

Peterhans, E. et al., 1994. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane proteins associates with the developments of arthritis. *Journal of Virology*, 68, pp.7139–7147. 39

Reina, R. et al., 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *The Veterinary Journal*, 182, pp.31–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755622> [Accessed March 3, 2014].

Reis, J.K.P. et al., 2012. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *Journal of Virological Methods*, 180, pp.62–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227617> [Accessed January 23, 2014].

Rimstad, E. & East, N., 1994. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Archives of Virology*, 134, pp.345–356.

Rosati, S. et al., 1995. Genetic and antigenic characterization of caev (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Veterinary microbiology*, 45(4), pp.363–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7483249>.

Saman, E. et al., 1999. A New Sensitive Serological Assay for Detection of Lentivirus Infections in Small Ruminants. , 6(5), pp.734–740.

Sánchez, B. et al., 2001. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Archives of medical research*, 32, pp.382–388. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578752>.

Schüpbach, J. et al., 2004. Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. , 78(14), pp.7518–7522.

Schüpbach, J. et al., 2004. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and 40 worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, 319(1), pp.12–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14967484> [Accessed July 8, 2013].

The center for food security & public healthsity, O., 2007. Artritis y encefalitis caprina. *Iowa State University*, (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/artritis-encefalitis-caprina.pdf>), pp.1–5.

Torres-Acosta, J.F.J. et al., 2003. Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small Ruminant Research*, 49, pp.207–211. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448803000932> [Accessed April 21, 2013].

Trigo Tavera, F.J., 1991. La Artritis encefalitis caprina. *Ciencia Veterinaria*, 5, pp.49–66.

Tu, P., Shiau, J., Lai, F., Yang, S., & Wang, P. (2017). Diagnostic tests for caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *Journal of Rare Diseases Research and Treatment*, 2(5), 13–17

Vázquez Franco, N.C., 2008. *Estudio sobre la Seroprevalencia de la Artritis-Encefalitis Caprina en Sistemas Lecheras Intensivos en la Región del Altiplano Mexicano*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Zanoni, R., Krieg, A. & Peterhans, E., 1989. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Journal of clinical microbiology*, 27(3), pp.580–582. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=267367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Zanoni, R.G. et al., 1994. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *Journal of veterinary medicine*, 41(10), pp.662–669. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7597859>.

Zanoni, R.G., 1998. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *Journal of General Virology*, 79, pp.1951–1961. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714243>.