



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LENTIVIRUS CAPRINOS UTILIZANDO  
ANTÍGENOS DERIVADOS DEL GEN GAG Y ENV DEL GENOTIPO B

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:  
ROSSELLI ZAMORA FERRER

TUTOR:  
DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ, FES-CUAUTITLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR:  
DRA. JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO, INIFAP  
DR. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCURT, FMVZ, UNAM

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO, 2020.



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.

## DEDICATORIAS

A Edgar mi esposo, por apoyarme a seguir adelante y creer en mí aun cuando yo no lo creía, al estar en las buenas y en las malas, por no dejarme caer cuando el pozo se veía sin fondo, al ser una luz en mis días más oscuros.

A mis padres, Andrea y Santiago, por darme las bases en mi vida, apoyarme, darme todo lo necesario y velar por mí hasta ahora, porque gracias a ustedes conozco un amor incondicional.

A mis hermanas Mahelet y Areli.

A mi sobrino.

A mis abuelos, Felix y Sotero, que aun que ellos no estén conmigo siempre estarán presentes en mis recuerdos.

Al Dr. Hugo por aceptarme en su equipo, por alentarme cada vez que los resultados no eran los esperados, me llevo muchas cosas buenas de usted además de las académicas, es un tutor estupendo y una persona ecuánime, es un ejemplo de persona; muchas gracias por todo.

A la futura Dra. Rocío, por su amistad, por estar en las buenas y en las malas, por molestarme en que hiciera la maestría y enseñarme estas cosas de la ciencia.

A mis mascotas: Tabata que fue una gran compañera que a su partida me dejo un gran dolor, pero una lección de vida. A Bastet y Maat por alegrar mis días cuando esto se volvió complicado, porque siempre esperaron mi llegada a casa.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por ser una entidad que apoya a la ciencia.

A mi comité tutor por sus aportaciones a este trabajo.

Dr. Laura Cobos Marín por proporcionarnos la proteína de matriz.

Al Dr. José Luis Cerriteño por su apoyo con comentarios y algunas metodologías.

A Eduardo y Ana por apoyarme en la realización de las PCR.

Al equipo del laboratorio de virología, genética y biología molecular, FES Cuautitlán.

A los proyectos PAPIIT:

“ELISAs basadas en el uso de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos para la detección serológica de lentivirus en caprinos” con clave IT201217.

“Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia* spp, *Brucella melitensis*, *Leptospira* spp y *Coxiella burneti*, en ovinos y caprinos” Proyecto financiado por Fondos Sectoriales SAGARPA CONACYT, No. 291311.

## RESUMEN

Los virus del Maedi-Visna (VMV) y Artritis encefalitis caprina (VAEC) pertenecen al grupo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR), que afectan principalmente a ovejas y cabras, causando infecciones persistentes y enfermedades crónicas. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de animales infectados presentan signos, por esta razón es necesario contar con herramientas diagnósticas que nos permitan reconocer a los animales infectados; así mismo, no se cuenta con vacunas eficientes para el control y erradicación de estos virus. Las pruebas serológicas son las más empleadas para el diagnóstico, actualmente existen pruebas de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) comerciales que tienen como antígenos proteínas recombinantes o péptidos codificado por los genes *gag* y *env*. El objetivo de este trabajo fue detectar anticuerpos contra lentivirus caprinos mediante dos ELISAs indirectos (ELISAI) el primero utilizando una proteína recombinante de matriz (codificada por el gen *gag*) y el segundo con un péptido sintético de 15 aa derivado de la proteína de transmembrana (codificada por el gen *env*). Se evaluaron 456 muestras de caprinos provenientes de diferentes Estados de la República Mexicana; los resultados obtenidos con el ELISAI de matriz muestran una sensibilidad del 98.8%, especificidad de 60.4% y un valor kappa de 0.567 (concordancia moderada); mientras que para el ELISAI con el péptido sintético se obtuvo una sensibilidad del 83.1%, especificidad del 93% y un valor kappa de 0.767 (concordancia considerable). El ELISAI basado en el uso del péptido de transmembrana mostró una mayor eficiencia respecto al ELISAI que utilizó la proteína de matriz.

## ABSTRACT

Maedi-Visna Virus (MVV) and Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) belong to the group of Small Ruminant Lentiviruses (SRLV), which mainly affect sheep and goats, causing persistent infections and chronic diseases. However, only a small percentage of infected animals show signs; for this reason, it is necessary to have diagnostic tools that allow us to recognize infected animals. In the same way, there are no efficient vaccines for the control and eradication of these viruses. Serological tests are the most used for diagnosis; currently, there are commercial ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) tests that have recombinant proteins or synthetic peptides encoded by the *gag* and *env* genes as antigens. The objective of this work was to detect antibodies against goat lentiviruses by means of two indirect ELISAs (ELISAI), the first using a recombinant matrix protein (encoded by the *gag* gene) and the second with a synthetic 15 aa peptide derived from the transmembrane protein (encoded by the *env* gene). In total, 456 goat samples from different states of the Mexican Republic were evaluated; the results obtained with the matrix ELISAI showed a 98.8% sensitivity, 60.4% specificity, and a 0.567 kappa value of (moderate agreement). Meanwhile, the ELISAI with the synthetic peptide showed 83.1% sensitivity, 93% specificity, and a 0.767 kappa value of (substantial agreement). The ELISAI based on the use of the transmembrane peptide showed a higher efficiency compared to the ELISAI that used the matrix protein.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. La producción caprina en México .....	1
1.2. Antecedentes de los lentivirus de pequeños rumiantes .....	1
1.3. Etiología .....	2
1.4. Genotipos .....	5
1.5. Transmisión .....	5
1.6. Tropismo .....	6
1.7. Ciclo de replicación.....	6
1.8. Patogenia.....	8
1.9. Signos clínicos.....	9
1.10. Respuesta inmune .....	10
1.11. Diagnóstico .....	11
1.11.1 Pruebas serológicas.....	11
1.11.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	12
1.12. Situación en México .....	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	15
4.1 GENERAL.....	15
4.2 ESPECÍFICOS.....	15
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
5.1 Muestras séricas .....	16
5.2 Pruebas de ELISA comerciales .....	16
5.3 Prueba de ELISAi para la proteína de matriz (p16).....	17
5.2. Optimización de la ELISAi-p16 .....	17
5.3. Diseño del péptido sintético .....	18
5.4. Prueba de ELISAi para el péptido TM2 .....	18
5.5. Línea de corte.....	19
5.6. Análisis estadístico .....	19
5.7. Extracción de ADN .....	20
5.8. Reacción en cadena de la polimerasa.....	20

5.9.	Western blot .....	22
6.	Resultados .....	23
6.1.	ELISAs comerciales .....	23
6.2.	ELISAI de la proteína recombinante de matriz (p16) .....	23
6.3.	Optimización del ELISA-p16.....	25
6.4.	ELISAI con péptido sintético (TM2).....	26
6.5.	Análisis estadístico .....	28
6.6.	Muestras discordantes .....	29
6.7.	Western Blot .....	31
7.	DISCUSIÓN.....	32
8.	CONCLUSIONES.....	36
9.	REFERENCIAS .....	37

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Proteínas codificadas por LVPR y características de cada una de ellas. ....	4
Cuadro 2. Pruebas serológicas comerciales y antígeno que contienen. ....	12
Cuadro 3. Resultados obtenidos en muestras de caprinos de diferentes Estados del país, evaluados con ELISAs comerciales para la detección de anticuerpos contra LVPR. ....	16
Cuadro 4. Valores de concordancia e interpretación utilizando el coeficiente kappa. ....	20
Cuadro 5. Iniciadores utilizados en la PCR anidada para amplificar un fragmento del gen gag de LVPR. ....	21
Cuadro 6. Condiciones de amplificación para la PCR anidada del gen gag de LVPR. ....	21
Cuadro 7. Resultados por Estados del país obtenidos en plasmas caprinos evaluados para la detección de anticuerpos contra LVPR utilizando un ELISAI basado en el uso de la proteína recombinante 16. ....	25
Cuadro 8. Resultados por Estados del país obtenidos en plasmas caprinos evaluados para la detección de anticuerpos contra LVPR utilizando un ELISAI basado en el péptido sintético TM2. ....	28
Cuadro 9. Muestras indeterminadas y discordantes en los ELISAsi basadas en el uso de la proteína p16 o el péptido sintético TM2. ....	29
Cuadro 10. Resultados obtenidos en la PCR para muestras discordantes en el ELISAI de p16 y TM2. ....	29
Cuadro 11. Resultados obtenidos en la PCR para muestras indeterminadas en el ELISAI de p16 y TM2. ....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la estructura y genes que componen a los lentivirus de pequeños rumiantes .....	2
Figura 2. Organización del genoma proviral de lentivirus de pequeños rumiantes, donde se observa la repetición de terminación larga (LTR) en los extremos, al gen gag que codifica para las proteínas de Matriz (MA), Cápside (CA) y Nucleocápside (NC), gen pol codifica a la Proteasa (PR), Transcriptasa reversa (TR), dUTPasa e Integrasa (IN) y al gen env codifica las proteínas de superficie (SU) y Transmembrana (TM). Además de los genes auxiliares como vif, vpr-like y rev. Figura modificada de [6]..	3
Figura 3. Ciclo de replicación de los LVPR. Modificada de J. Stoye .....	8
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR-gag genotipo B. Los productos esperados fueron de 529 pares de bases. Mpb= Marcador de pares de base, C+= control positivo, C-= control negativo, M1-M8= Muestras.....	30
Figura 5. Western blot de la proteína p16. Carril 1 se muestras el marcador de peso molecular (MkDa), carril 2-4 control positivo (+), carril 5,6 y 9,10 muestras y Carril 7,8 Control negativo (C-)......	31

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Distribución de los valores de absorbancia obtenidos en la ELISAi con p16.... 24

Gráfica 2. Densidades ópticas obtenidas con diferentes concentraciones de la proteína recombinante p16 y diferentes tiempos de lectura. .... 26

Gráfica 3. Distribución de los valores de densidad óptica obtenidos en la ELISAi-TM2. . 27

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La producción caprina en México

En México tradicionalmente los pequeños rumiantes han estado en mano de los productores más marginados, de bajos recursos económicos, y alejados de los beneficios de la asistencia técnica y de la tecnología. Las cabras son la especie doméstica que en menor medida contribuye en México al producto interno bruto. Sin embargo, el sector está presentando un repunte económico por su competitividad en el marco de los tratados de libre comercio que México ha suscrito con diversos países [1].

Los principales productos caprinos son la leche y la carne; en general, encuentra mercado en México en especial la carne de los animales pequeños, que es consumida como cabrito; o bien de los adultos con la cual se prepara birria, la leche por su parte presenta mayores cambios en el mercado debido a su producción estacional [1].

Según datos de la SAGARPA en México existen 9 millones de cabras y se puede decir que es el rebaño más grande del continente americano, con una producción de leche de 162 mil litros y 77 mil toneladas de carne, esta población caprina es susceptible a diferentes microorganismos por los que los aspectos sanitarios son importantes en esta especie [1].

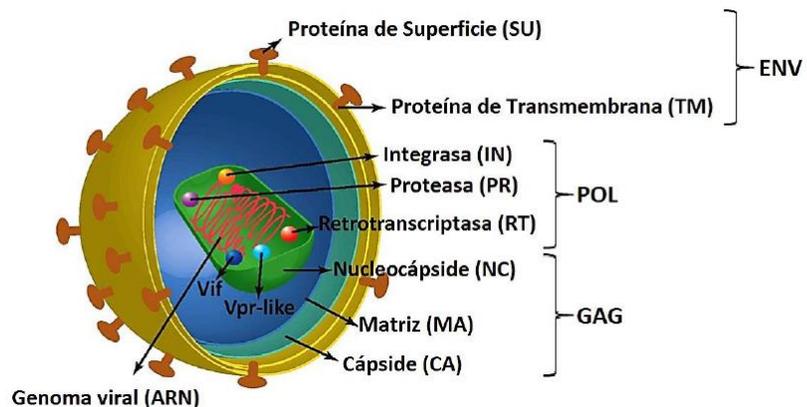
## 1.2. Antecedentes de los lentivirus de pequeños rumiantes

Los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR), antes denominados Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (AEC) y Maedi-Visna (MV), afectan principalmente a los caprinos y ovinos generando infecciones lentas y persistentes. La etiología retroviral de la AEC se reportó por primera vez en los Estados Unidos en 1974 [2] y fue aislado hasta 1980 [3]; no obstante, el MV fue el primero en describirse en

1915 en Sudáfrica y en Estados Unidos fue reportado en 1923. Actualmente, las herramientas de diagnóstico que se emplean para apoyar en el control y erradicación de esta infección en países europeos se basan en el uso del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) [4].

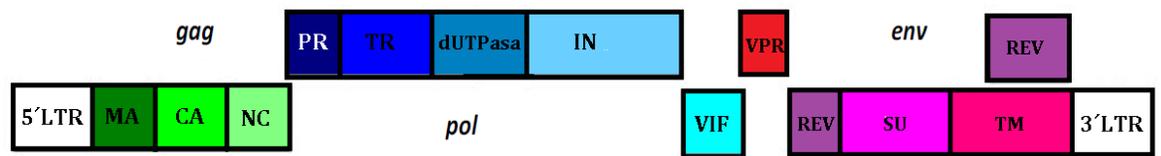
### 1.3. Etiología

Los LVPR pertenecen al orden *Ortervirales* [5], familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus*, se componen aproximadamente de 60 % de proteínas, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN; es un virión de 80-100 nm de diámetro, está formado por dos subunidades de ARN de cadena sencilla, no segmentado y de polaridad positiva. El genoma viral está protegido por la nucleocápside (NC) que a su vez está rodeada por la cápside (CA) y la proteína de matriz (MA); posee una envoltura exterior lipídica procedente de la membrana plasmática celular, esta envoltura de glicoproteína se conforma por subunidades de transmembrana (TM) y superficie (SU) como se muestra en la figura 1 [6].



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura y genes que componen a los lentivirus de pequeños rumiantes [6].

El genoma de los LVPR tiene un tamaño de 8.4 a 9.2 kilobases, el cual se divide en tres grupos de genes principales, *gag* (antígeno específico de grupo), *pol* (polimerasa) y *env* (envoltura). Además, cuenta con genes auxiliares como *vif*, *vpr-like* y *rev*, y en ambos extremos posee una región repetida de terminación larga (*LTR*), la organización del genoma se representa en la figura 2 [6]. Mientras que en el cuadro 1 se mencionan las proteínas codificadas por LVPR resumiendo algunas de sus funciones.



**Figura 2.** Organización del genoma proviral de lentivirus de pequeños rumiantes, donde se observa la repetición de terminación larga (*LTR*) en los extremos, el gen *gag* que codifica para las proteínas de Matriz (*MA*), Cápside (*CA*) y Nucleocápside (*NC*), gen *pol* codifica a la Proteasa (*PR*), Transcriptasa reversa (*TR*), dUTPasa e Integrasa (*IN*) y el gen *env* codifica las proteínas de superficie (*SU*) y Transmembrana (*TM*). Además de los genes auxiliares como *vif*, *vpr-like* y *rev*. Figura modificada de M [6].

**CUADRO 1.** Proteínas codificadas por LVPR y características de cada una de ellas.

<b>Gen</b>	<b>Proteína codificada</b>	<b>Característica/Función</b>
<i>gag</i>	Matriz p16-MA	Principal componente proteico en la partícula viral madura.
	Cápside p28 o p25-CA	Forma parte del complejo CA-NC-ARN. Provoca una fuerte respuesta antigénica.
	Nucleocápside p14-NC	Forma parte del complejo CA-NC-ARN.
<i>Pol</i>	Proteasa PR	Escinde los precursores de la poliproteína Gag y Gag-Pol para generar proteínas Gag y Pol maduras.
	Transcriptasa reversa (RT)	ADN polimerasa dependiente de ARN.
	dTUTPasa (DU)	Favorece la replicación en células que no se dividen. Minimiza la incorporación de residuos de uracilo [7].
	Integrasa (IN)	Participa en la integración del ADN retroviral al genoma de la célula huésped.
<i>env</i>	Proteína de superficie (gp135-SU)	Se une a receptores de la célula huésped. Induce la generación de anticuerpos neutralizantes.
	Transmembrana (gp38-TM)	Media la fusión de la membrana viral con la célula y permite el ingreso del virus a la célula.
<i>vpr-like</i>	<i>vpr-like</i>	Regula el transporte del complejo de preintegración al núcleo. Activa la transcripción viral y expresión de genes celulares implicados en la vía de activación [8].
<i>Vif</i>	<i>Vif</i>	Evita incorporación en las partículas virales de factores de restricción celular. Indispensable para la replicación viral [9].
<i>Rev</i>	<i>Rev</i>	Regula la expresión de los genes estructurales al transportar ARNm [10].
Región <i>LTR</i>	<i>LTR</i>	Promueve la transcripción de ARN mensajero. Señal de poliadenilación y terminación.

#### **1.4. Genotipos**

Los LVPR se han clasificado con base en las secuencias nucleotídicas de los genes *gag-pol*, que tienen una longitud de 1.8 kb y 1.2kb respectivamente, identificando hasta ahora cinco genotipos (A, B, C, D, E). La divergencia estimada entre los genotipos es de 25 al 37%, mientras que para los subtipos esta diferencia es entre el 15 al 27 % [11]. Los genotipos que incluyen subtipos son el genotipo A, que tiene 19 [12], el B que cuenta con 4 [13] y el genotipo E con solo 2 subtipos [14]. Los LVPR se pueden transmitir naturalmente entre ovejas y cabras en condiciones naturales, por lo tanto, los genotipos y sus subtipos no se consideran específicos de especie [15].

La distribución de los genotipos A y B es mundial, el genotipo C se ha reportado solo en Noruega, el D en España y Suiza, mientras que el genotipo E se limita a Italia y Turquía. Una característica importante de los LVPR es la variabilidad genética debida a mutaciones y recombinaciones. Las mutaciones que sufren estos virus son debido a que la RT carece de capacidad de corrección, lo cual ocasiona una frecuencia de 0.2 a 2 mutaciones por genoma, por ciclo, lo que genera una variabilidad de secuencias dentro de un mismo individuo (cuasiespecies). La recombinación se genera en las células coinfectadas lo que permite ensamblar combinaciones genéticas beneficiosas, elimina mutaciones perjudiciales y favorece la adaptabilidad, integración y persistencia del genoma viral [4,9].

#### **1.5. Transmisión**

Los caprinos al nacer están desprotegidos inmunológicamente, por lo que la ingesta de calostro y leche es la única forma de adquirir protección inmunológica y la principal vía de transmisión de LVPR. El contacto directo o cercano entre

animales favorece la transmisión del virus a través de la orina, saliva o secreciones nasales [17].

Los fómites, instalaciones y equipos pueden ser fuentes de infección de LVPR para animales susceptibles y la transmisión iatrogénica se ha identificado como otra fuente de infección. Existen factores de riesgo que incluyen el aumento de la edad y la alta densidad poblacional. La vía sexual también se ha reportado, ya que se ha encontrado la presencia de LVPR en aparato genital de machos y en el semen [18]. Además, se ha demostrado que la inseminación artificial con semen infectado puede ser una fuente de infección [19].

Estudios de genomas caprinos han revelado la presencia de copias genéticas de retrovirus endógenos, pero no hay evidencias de que el genoma del LVPR esté presente en células de la línea germinal [19].

## **1.6. Tropismo**

Las células diana de los LVPR son principalmente los monocitos/macrófagos [20] y las células dendríticas [21], otros estudios han demostrado que el virus también se puede encontrar en células epiteliales mamarias [22], células endoteliales y células microgliales. En condiciones *in vitro* el virus se replica en células de membrana sinovial caprina, plexo coroideo, epiteliales del pulmón, corneales, riñón, hepatocitos, miocitos, oviducto y epidídimo [16].

## **1.7. Ciclo de replicación**

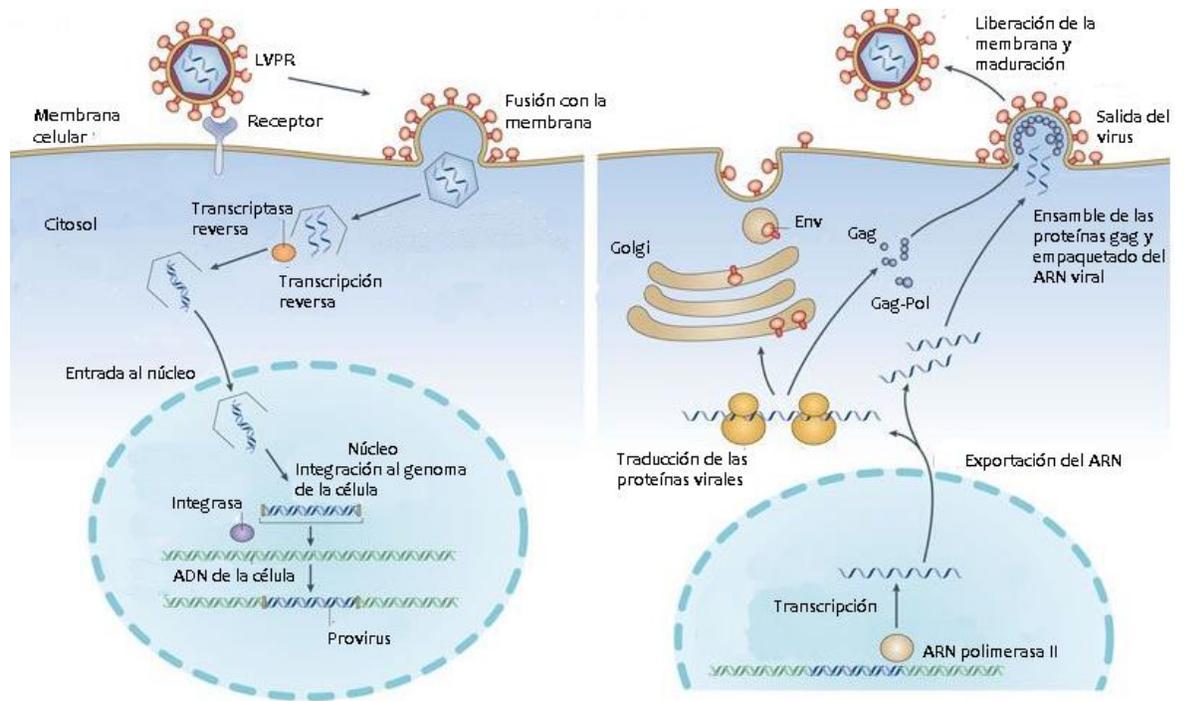
La replicación de LVPR comienza con el reconocimiento de la proteína de SU por el receptor presente en la célula diana, algunos estudios han identificado posibles receptores como pueden ser las moléculas de MHC de clase II [13,14], un conjunto de tres proteínas de membrana con peso molecular de 15 kD, 20 kD y 30 kD que

forman un complejo [25], los receptores de manosa [16,17], entre otros, pero ninguno de ellos se ha establecido como el principal receptor.

Posterior al reconocimiento de virus se da la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, produciendo la liberación de la cápside viral en el citoplasma y así la transcriptasa inversa sintetiza el ADN viral utilizando el ARN viral como plantilla y los nucleótidos del huésped [ 27].

El ADN pro-viral se importa al núcleo a través del poro nuclear, este se une al genoma del huésped por la acción de la integrasa viral. La ARN polimerasa II sintetiza el ARN viral y los ARN que codifican las proteínas virales. La transcripción se dirige desde los promotores en la LTR, el ARNm produce los precursores de las proteínas Gag y Gag-Pol; mientras que las proteínas Env se dirigen hacia el retículo endoplásmico rugoso para ser glicosiladas y al llegar al aparato de Golgi son escindidas formando las subunidades SU y TM [27, 28].

Las proteínas virales de Env se insertan en la membrana plasmática de la célula huésped. Las proteínas precursoras Gag y Gag-Pol se asocian con la membrana y Env permitiendo la encapsidación del genoma de los LVPR, el virión se libera por gemación. La maduración final de los viriones (escisión de Gag y Gag / Pol) se produce después de que la cápside sale a través de la membrana celular [19, 20].



**Figura 3.** Ciclo de replicación de los LVPR. Modificada de J. Stoye [32].

## 1.8. Patogenia

Cuando el virus ingresa al monocito la expresión viral es nula o poca, la replicación y expresión de partículas virales se favorece cuando el monocito madura a macrófago [33]. Los monocitos migran a través del torrente sanguíneo infectando a más monocitos y células de tejidos, como al epitelio mamario en donde el virus puede permanecer latente [34].

La respuesta inmunitaria contra el virus causa inflamación crónica en los tejidos ocasionando la presentación clínica de la enfermedad [30].

## 1.9. Signos clínicos

Solo entre el 30 a 40% de los animales infectados por LVPR llegan a desarrollar signos clínicos. Estos se asocian a lesiones inflamatorias progresivas por infiltrados de células mononucleares, causando una enfermedad multisistémica, con cuatro presentaciones: artrítica, nerviosa, mamaria y respiratoria [6].

### **Artrítica**

La presentación artrítica se caracteriza por hipertrofia de las articulaciones, artritis proliferativa crónica y sinovitis, afectando principalmente la articulación carpal y tarsal, que provoca cojera y marcha dificultosa, afectando principalmente a cabras mayores de 2 años [3].

### **Mamaria**

La glándula mamaria es un órgano diana del virus, afectando a animales mayores de 1 año. Produce una mastitis intersticial difusa periacinar crónica, subclínica, indurativa, difusa bilateral y no dolorosa. Debida a la infiltración de células mononucleares alrededor de acines glandulares y conductos galactóforos, en casos severos puede presentarse agalactia [6].

### **Nerviosa**

La presentación nerviosa es menos frecuente, afecta a cabritos de entre 2 a 4 meses de edad mostrando debilidad en el tren posterior y ataxia, seguida de cuadriplejia [6].

## **Respiratoria**

Los animales desarrollan una neumonía crónica y disnea progresiva, aumento de la frecuencia respiratoria, respiración abdominal y jadeo. Esto causa la pérdida de peso y aumenta la posibilidad de infecciones secundarias por bacterias [35].

### **1.10. Respuesta inmune**

La infección por LVPR induce una respuesta humoral y celular en los animales; al infectar a la célula diana estos virus se replican de forma latente, provocando que la respuesta inmune sea tardía variando de semanas hasta años después de la infección [34, 35, 36].

En animales infectados se ha detectado el desarrollo de una respuesta humoral con la producción de inmunoglobulinas de subclase IgG1 inducidas por una respuesta de células T auxiliares de tipo 2 (Th2), los anticuerpos contra el virus se dirigen principalmente a las proteínas de los genes *gag* y *env*. Se ha reportado que las cabras con predominio de anticuerpos de subclase IgG1 presentan artritis, mientras que si hay anticuerpos de subclase IgG1 e IgG2 no se presentan signos [39]. Los anticuerpos durante la vida del animal pueden mostrar una baja afinidad, bajos títulos y no ser neutralizantes [40].

Ni la respuesta humoral ni celular son capaces de proteger al animal debido a la heterogeneidad del virus, provocando una infección persistente [38, 39].

## **1.11. Diagnóstico**

El diagnóstico de las infecciones por lentivirus puede ser realizado de forma clínica, sin embargo, la presencia de cuadros clínicos solamente se describe en un 30-40% de los animales infectados de un rebaño y es raro reconocerlo en animales menores de 2 años. Los principales métodos son los que detectan anticuerpos e incluyen: la inmunodifusión en gel de agar (IDAG), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y las técnicas de confirmación como radioinmunoprecipitación (RIPA) y el Western blot (WB) [42].

### **1.11.1 Pruebas serológicas**

La prueba de IDAG fue la más empleada en los estudios serológicos realizados durante la década de los 80's y 90's, pero actualmente se emplea poco debido a su baja sensibilidad, subjetividad de interpretación de los resultados y su difícil automatización. Por otra parte, la prueba de ELISA es fácil de realizar e interpretar, permitiendo hacer estudios más amplios en poblaciones en un tiempo corto. Actualmente se usan el ELISA indirecto o competitivo con diversos antígenos como virus completos, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos [40, 41]. En el cuadro 2 se mencionan algunas pruebas serológicas comerciales que se utilizan actualmente y el antígeno que utilizan.

**Cuadro 2.** Pruebas serológicas comerciales y antígeno que contienen.

<b>Nombre de la prueba</b>	<b>Antígeno</b>
<b>ELITEST</b>	Péptido de transmembrana p25 recombinante de un genotipo A.
<b>CHEKIT</b>	Virus completo de un genotipo B.
<b>SRLV Antibody (VMRD)</b>	gp135 de un genotipo B.
<b>Eradikit™ SRLV</b>	Péptidos Gag y Env, genotipos virales de LVPR (A, B y E).

[16][42][44].

### **1.11.2. Reacción en cadena de la polimerasa**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en el uso de iniciadores diseñados en regiones conservadas del virus de los genes *gag*, *pol* y *LTR*, permitiendo detectar animales infectados en las primeras semanas post-infección, antes de que ocurra la seroconversión [43, 44].

### **1.12. Situación en México**

La infección por LVPR en caprinos fue detectada en México por pruebas serológicas en cabras provenientes de EUA en 1984 [47]. Daltabuit en 1999 reportó el aislamiento del virus por primera vez [48] y en el 2011 se logró secuenciar el genoma completo de un LVPR B1 circulante en caprinos en México [49].

Los lentivirus de pequeños rumiantes (AEC y VMV) se encuentra enlistados en el “Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos”, ubicándose en el grupo 3 constituido por aquellas enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y son consideradas como endémicas; y que por representar un riesgo menor desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, son consideradas de notificación mensual obligatoria [50].

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Estudios previos realizados en México han demostrado la presencia del genotipo B en pequeños rumiantes. Adicionalmente, otros estudios han demostrado que el uso de ELISAs comerciales generan discrepancias en la identificación de animales infectados o no infectados. Es por ello por lo que es necesario contar con técnicas de detección de LVPR que contengan antígenos derivados de genotipos prevalentes que se encuentre infectando caprinos en la República Mexicana.

La utilización de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos derivados del genotipo prevalente en el país, resultan ser adecuados para ser utilizados en pruebas de ELISA, lo cual podría generar mejores valores de sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos específicos contra LVPR.

### **3. HIPÓTESIS**

El uso de antígenos expresados por los genes *gag* y *env* derivados de lentivirus de pequeños rumiantes del genotipo B en pruebas de ELISA permite la unión de anticuerpos específicos presentes en cabras infectadas, generando resultados similares o superiores al uso de ELISAs comerciales

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 GENERAL**

Detectar anticuerpos contra LVPR mediante una técnica de ELISA indirecta (ELISAI) basada en el uso de la proteína recombinante p16 y un péptido sintético derivado de la proteína de transmembrana.

#### **4.2 ESPECÍFICOS**

1. Realizar el diseño de péptidos sintéticos utilizando algoritmos para la identificación de epítomos lineales para células B.
2. Estandarizar pruebas de ELISAI en las que se utilicen como antígenos péptidos o proteínas recombinantes.
3. Con las pruebas de ELISAI estandarizadas evaluar un banco de plasmas caprinos obtenidos de 10 Estados de la República previamente evaluados con pruebas de ELISA comercial.
4. Determinar la sensibilidad, especificidad y concordancia entre las pruebas de ELISAI basadas en el uso de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes.
5. Confirmar mediante PCR los resultados discordantes entre las ELISAI y las ELISAs comerciales.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Muestras séricas

Se utilizaron 456 muestras de un banco de plasmas de caprinos obtenidos de los Estados de Baja California Sur, Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala y Veracruz.

### 5.2 Pruebas de ELISA comerciales

Todas las muestras séricas fueron previamente evaluadas con 2 kits comerciales siguiendo las indicaciones del fabricante: cELISA (VMRD™, USA) que utiliza como antígeno la proteína gp135 de un genotipo B y Eradikit™ SRLV Screening (In3 Diagnostic, Italia) basado en el uso de péptidos sintéticos de las proteínas Gag (cápside y matriz) y Env de los genotipos A y B [51], los resultados de las dos pruebas en los diferentes Estados se muestran en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Resultados obtenidos en muestras de caprinos de diferentes Estados del país, evaluados con ELISAs comerciales para la detección de anticuerpos contra LVPR.

Estado	VMRD		ERADIKIT	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Baja California Sur	34	5	34	5
Coahuila	18	10	20	8
Durango	30	3	30	3
Estado de México	25	20	28	17
Guanajuato	25	74	27	72
Querétaro	7	9	11	5
Sinaloa	49	29	53	25
Sonora	5	15	7	13
Tlaxcala	8	1	8	1
Veracruz	35	54	59	30
Total	236	220	277	179

### **5.3 Prueba de ELISAI para la proteína de matriz (p16)**

Se sensibilizaron placas de poliestireno (MaxiSorp microplates, Nunc, ThermoFisher, E.U) de 96 pozos, distribuyéndose 500 ng/pozo de la proteína p16 (proporcionada por la Dra. Laura Cobos, FMVZ) en 50 µl de buffer carbonato/bicarbonato 0.1 M pH 9.6 (Sigma, E.U). Cada dos filas con antígeno incluyeron una fila sin antígeno (buffer carbonato/bicarbonato únicamente), se incubaron 18 horas a 4°C. Luego se realizaron tres lavados con PBS pH 7.4 (Sigma, E.U) conteniendo Triton al 0.05% (PBS-Triton 0.05%), se bloquearon los sitios libres de antígeno con 150 µl de caseína/pozo (Sigma, E.U) al 2.5% durante 1 hora a 37°C. Se repitió el lavado y se añadieron a cada pozo 100 µl de plasma diluido 1/10 en solución de dilución (caseína al 1.25% peso/volumen en PBS) y se incubó la placa a 1hr a 37°C. Se repitieron los lavados y se añadió 100 µl de proteína G conjugada con peroxidasa diluida 1/5000 (0.2 µg/ml; Pierce, ThermoFisher, E.U) en caseína al 1.25%. Transcurrida una hora a 37°C, se lavó la placa dos veces con PBS-Triton 0.05% y dos veces más con PBS. Se agregaron 100 µl del cromógeno ABTS® [2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] (Chemicon, Millipore, Sigma, E.U) a cada pozo y se incubaron las placas durante 30 min a temperatura ambiente en obscuridad. Se obtuvo la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm. Se determinó la densidad óptica (D.O) neta mediante la diferencia entre la D.O del pozo sin antígeno y la D.O de los pozos con antígeno. La técnica de ELISA empleada es una modificación de la ELISAI propuesta para la proteína recombinante de p16 de Siliceo, 2014 [52].

### **5.2. Optimización de la ELISAI-p16**

Se sensibilizó una placa con diferentes concentraciones de la proteína recombinante p16 (500 ng, 400 ng, 300 ng y 200 ng) siguiendo el protocolo descrito previamente, utilizando un pool de plasma en las diferentes

concentraciones de la proteína p16. Además, se realizaron lecturas cada 5 minutos para identificar los cambios en los valores de absorbancia.

### 5.3. Diseño del péptido sintético

El diseño del péptido sintético se basó en la secuencia proteica de la región de transmembrana del gen *env* del virus FESC-752 (número de acceso: HM210570), al cual se le determinaron las regiones hidrofílicas y antigénicas con el algoritmo propuesto por Kolaskar y Tongaonkar (1990) [53]. El algoritmo  $A_p = fAg/fs$  puede identificar epítomos lineales para linfocitos B. En donde  $A_p$  es el valor de propensión de antigenicidad,  $fAg$  es la frecuencia de incidencia de los aminoácidos determinantes de la antigenicidad (hidrofilicidad, accesibilidad y flexibilidad) y  $fs$  es frecuencia de incidencia de aminoácidos en la superficie (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>).

Se eligió un péptido de 15 aminoácidos con la siguiente secuencia: <sup>756</sup>QLTQEQARRIPDVWA<sup>770</sup> (nombrado TM2), el cual se sintetizó por la empresa Peptide 2.0 Inc (<https://www.peptide2.com/>) por un procedimiento químico denominado en fase sólida.

### 5.4. Prueba de ELISAI para el péptido TM2

El protocolo para la realización del ELISAI-TM2 fue similar al realizado para el ELISAI-p16 con algunas variaciones. Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos, distribuyéndose 300 ng/pozo del péptido TM2 en 50 µl de buffer carbonato/bicarbonato al 0.1 M pH 9.6, se incubaron toda la noche a 37°C. Luego se realizaron tres lavados con PBS pH 7.4 conteniendo Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween 20 0.05%), se bloquearon los sitios libres de antígeno con 150 µl de caseína/pozo al 3.5% durante 1 hora a 37°C. Se repitió el lavado y se añadió el plasma diluido 1/10 y se incubó la placa 1hr a 37°C. Se repitieron los lavados y se

añadió 100 µl de proteína G peroxidada diluida a 1/1250 (0.8 µg/ml). Transcurrida una hora, se lavó la placa, se agregó el cromógeno ABTS y se incubaron las placas durante 30 min a temperatura ambiente en obscuridad. Se obtuvo la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm. Se determinó la densidad óptica (D.O) neta mediante la diferencia entre la D.O del pozo sin antígeno y la D.O de los pozos con antígeno.

### **5.5. Línea de corte**

A partir de 100 plasmas negativos a la presencia de anticuerpos contra LVPR en la prueba de ELISA comercial de VMRD y ERADIKIT (prueba de oro), se determinó el valor umbral de positividad para ambas ELISAs caseras. El valor de corte (VC) se obtuvo del cálculo de medias de las absorbancias obtenidas de 100 plasmas seronegativos más 3 desviaciones estándar ( $\sigma$ ) ( $VC = \mu + 3\sigma$ ) con el programa Excel del paquete Office. También se calculó la zona gris que es el intervalo entre el valor de corte de la prueba  $\pm 10\%$ .

### **5.6. Análisis estadístico**

Para el análisis de eficacia de los ELISAs estandarizados con la proteína P16 y el péptido sintético TM2, se llevó a cabo la comparación con los ELISAs comerciales (VMRD y ERADIKIT) que se consideraron como estándar de oro y los resultados de los ELISAs caseros. Se utilizó el programa Win Episcopy 2.0 (<http://winepi.net/sp/index.htm>) para determinar la sensibilidad, especificidad y valor kappa (cuadro 4) con un valor de confianza del 95%.

**Cuadro 4.** Valores de concordancia e interpretación utilizando el coeficiente kappa.

<b>Coeficiente kappa</b>	<b>Fuerza de la concordancia</b>
0,00	Pobre ( <i>Poor</i> )
0,01 - 0,20	Leve ( <i>Slight</i> )
0,21 - 0,40	Aceptable ( <i>Fair</i> )
0,41 - 0,60	Moderada ( <i>Moderate</i> )
0,61 - 0,80	Considerable ( <i>Substantial</i> )
0,81 - 1,00	Casi perfecta ( <i>Almost perfect</i> )

[54]

Las muestras con resultados discordantes e indeterminados entre las pruebas de ELISA de p16 y del péptido TM2, y los ELISAs comerciales fueron evaluados con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

### 5.7. Extracción de ADN

Se extrajo ADN total a partir de leucocitos de sangre periférica (LPS), usando el kit comercial FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraccion Mini Kit (Favorgen®, Taiwán), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó a la longitud de onda de 260-280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, USA). El ADN obtenido se almacenó a -70°C hasta su uso.

### 5.8. Reacción en cadena de la polimerasa

Se realizó la técnica de PCR anidada, la cual permite amplificar un fragmento del gen *gag* del genotipo B, en el cuadro 5 se presentan los iniciadores, posición y tamaño del producto de esta técnica que fue previamente establecida por Acevedo (2018)[51].

**Cuadro 5.** Iniciadores utilizados en la PCR anidada para amplificar un fragmento del gen *gag* de LVPR.

Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Posición	Tamaño del producto
GAG B FW 1	GTCTTTACAGGCCACATTAGC	784-804	783 pb
GAG B RV 1	TCTTCCACACTAGCCTGTTG	1547-1566	
GAG B FW 2	TGCAAACAGTAGCAATGCA	1008-1026	529 pb
GAG B RV 2	CCTAGTACTCTATCCATCTGCT	1515-1536	

Las posiciones son basadas en la secuencia CAEV-CO (M3367701).

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Buffer 1x (AMPLIQON, Dinamarca), 2.5mM de MgCl<sub>2</sub> (AMPLIQON, Dinamarca), 230 µM de dNTPs (KAPA Biosystems), 600 nM de cada iniciador, 5 U de Taq DNA polimerasa (AMPLIQON, Dinamarca) y 0.7 µg de ADN por reacción en un volumen final de 25 µl para la primera etapa de PCR. Para la segunda PCR se utilizó 1 µl del producto de la primera reacción con una mezcla similar a la previamente descrita. Las condiciones de amplificación se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Condiciones de amplificación para la PCR anidada del gen *gag* de LVPR.

Etapa	Reacción 1	Reacción 2	
Desnaturalización inicial	95°C / 5 min	95°C / 5 min	
Desnaturalización	95°C / 40 seg	45 ciclos	
Alineamiento	48°C / 40 seg		95°C / 40 seg
Extensión	72°C / 50 seg		50°C / 40 seg
Extensión final	72°C / 5 min	72°C / 5 min	

Los productos de la PCR anidada se separaron en geles de agarosa al 1.5% a 70 volts durante 30 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 mg/ml) y se observaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador (UVP, M-20E, USA).

### **5.9. Western blot**

Basado en los resultados que se obtuvieron en el ELISAI P16 y PCR se determinó realizar un Wester blot para indagar la causa de muestras falsas positivas y/o lecturas de absorbancias altas en los pozos sin antígeno en la técnica de ELISA. El Wester blot se realizó según lo descrito por Cerriteño- Sánchez (2016) utilizando 10 µg proteína recombinante de p16 por pozo [55].

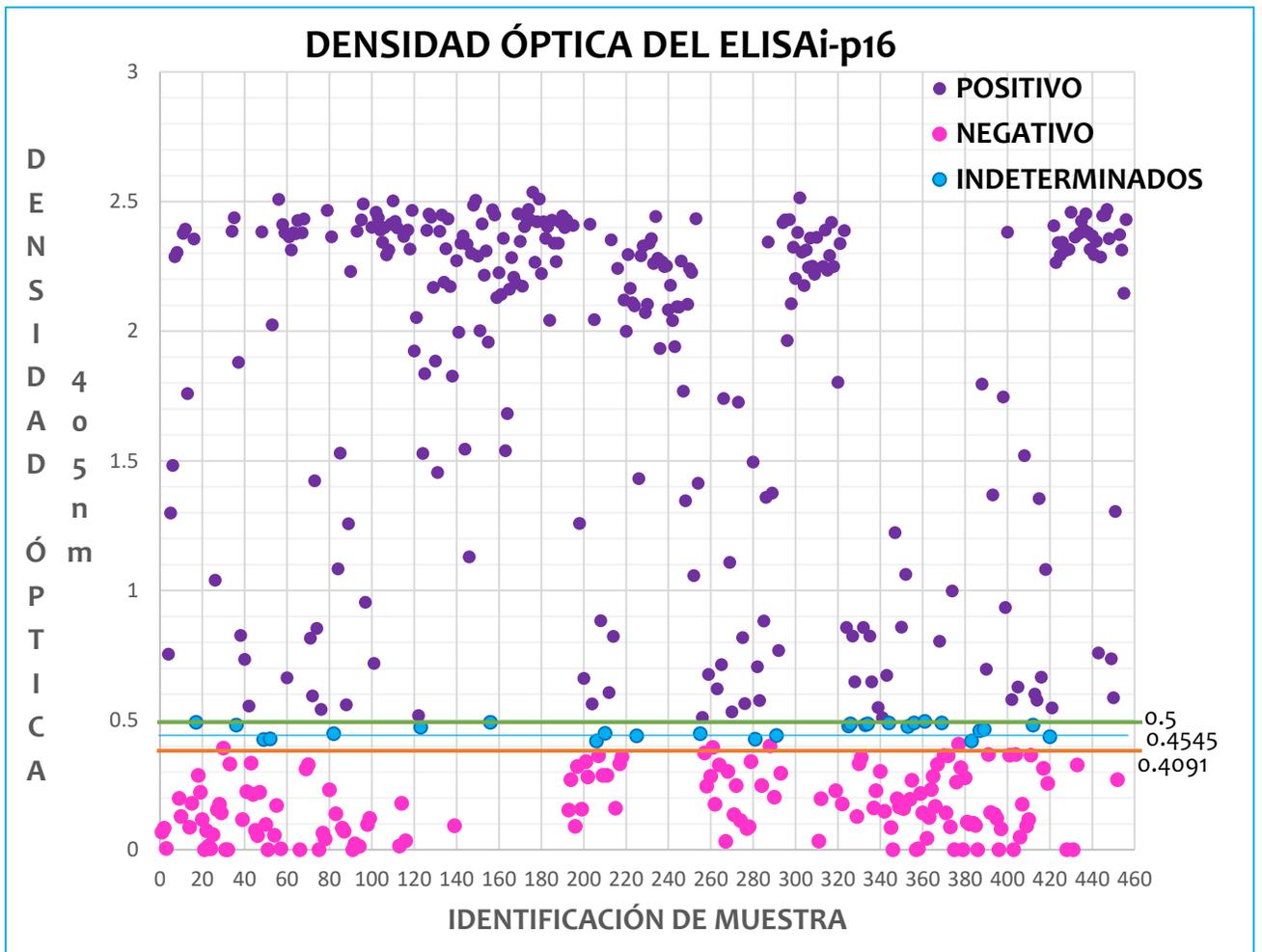
## 6. Resultados

### 6.1. ELISAs comerciales

Se utilizaron dos kits comerciales: cELISA (VMRD™, USA) que utiliza como antígeno la proteína gp135 de un genotipo B y Eradikit™ SRLV Screening (In3 Diagnostic, Italia) basado en el uso de péptidos sintéticos de las proteínas Gag (cápside y matriz) y Env de los genotipos A y B; entre ellos se identificaron resultados discrepantes entre las muestras evaluadas. De las 456 muestras, 220 fueron positivas a VMRD mientras que 179 en ERADIKIT, en el caso de las negativas se obtuvieron en VMRD 236 negativas y 277 para ERADIKIT. Obteniendo 41 muestras discordantes entre estas dos pruebas comerciales.

### 6.2. ELISAI de la proteína recombinante de matriz (p16)

El valor de corte obtenido para esta prueba fue de 0.4545 (línea azul) en donde se consideraron como muestras positivas aquellas superiores a 0.5 (línea verde) y muestras negativas aquellas menores de 0.4091 (línea naranja) (gráfica 1). En el cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos por estado en esta prueba de ELISAI-p16.



**Gráfica 1.** Distribución de los valores de absorbancia obtenidos en plasmas caprinos evaluados para la detección de anticuerpos contra la p16 de LVPR en un ELISAI.

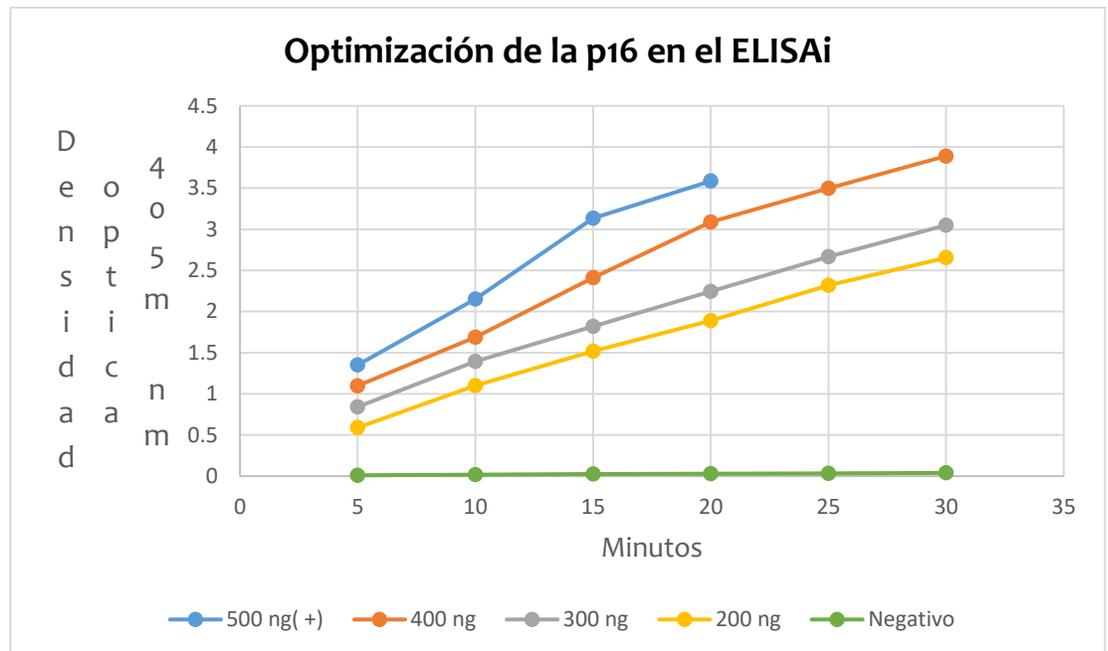
**Cuadro 7.** Resultados por Estados del país obtenidos en plasmas caprinos evaluados para la detección de anticuerpos contra LVPR utilizando un ELISAI basado en el uso de la proteína recombinante 16.

Estado	Indeterminados	Negativo	Positivos	Total
Baja California Sur	3	24	12	39
Coahuila	1	7	20	28
Durango	4	21	8	33
Estado de México	5	11	29	45
Guanajuato	4	13	82	99
Querétaro	1	4	11	16
Sinaloa	4	21	53	78
Sonora	2	2	16	20
Tlaxcala	0	4	5	9
Veracruz	3	35	51	89
Total	27	142	287	456

Los resultados muestran que se identificaron casi lo doble de animales seropositivos a LVPR, respecto a los animales seronegativos identificados.

### 6.3. Optimización del ELISA-p16.

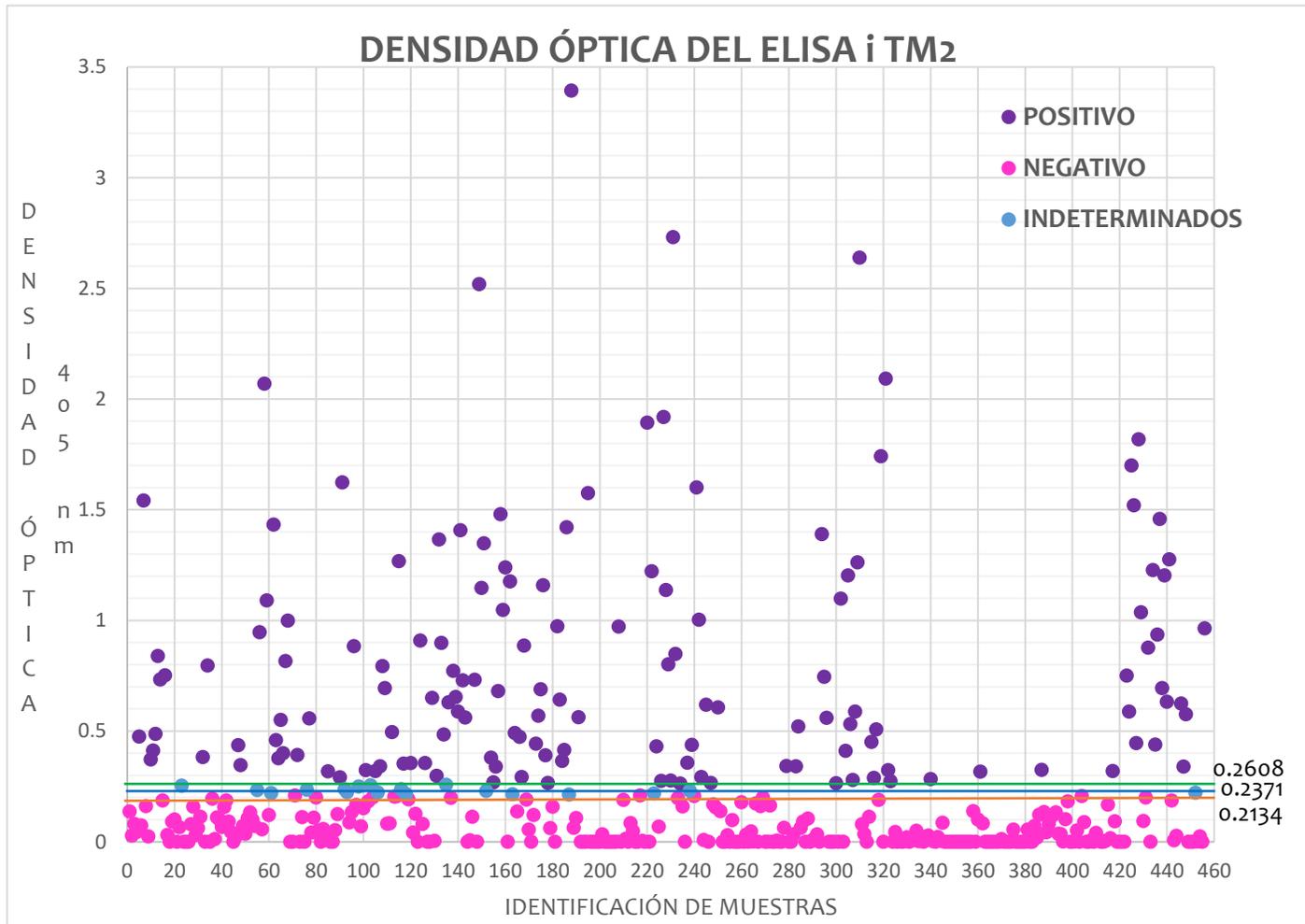
Los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de antígeno (p16) y diferentes tiempos de lecturas de absorbancia, mostraron una disminución en los valores de densidad óptica cuando se utilizó menos concentración de antígeno y menos tiempo en la lectura (gráfica 2), es posible optimizar el antígeno utilizando una concentración de 300 ng por pozo y realizando la lectura de la placa a los 15 minutos.



**Gráfica 2.** Densidades ópticas obtenidas con diferentes concentraciones de la proteína recombinante p16 y diferentes tiempos en la lectura.

#### 6.4. ELISAI con péptido sintético (TM2)

En la prueba de ELISA con el péptido TM2 se determinó un valor de corte de 0.2371 (línea azul), las muestras positivas fueron consideradas cuando fueron mayores a 0.2608 (línea verde) y menores a 0.2134 (línea naranja) fueron consideradas negativas (gráfica 3). En el cuadro 8 se observan los resultados obtenidos por el ELISAI-TM2 en las muestras de caprinos de diferentes Estados del país.



**Gráfica 3.** Distribución de los valores de densidad óptica obtenidos en plasmas caprinos evaluados para la detección de anticuerpos contra LVPR en un ELISAi que utiliza un péptido sintético, TM2.

**Cuadro 8.** Resultados por Estados del país obtenidos en plasmas caprinos evaluados para la detección de anticuerpos contra LVPR utilizando un ELISAI basado en el péptido sintético TM2.

Estado	Indeterminados	Negativo	Positivos	Total
Baja California Sur	0	35	4	39
Coahuila	0	20	8	28
Durango	0	29	4	33
Estado de México	0	27	18	45
Guanajuato	4	48	47	99
Querétaro	0	11	5	16
Sinaloa	1	57	20	78
Sonora	1	9	10	17
Tlaxcala	0	7	2	9
Veracruz	12	46	31	89
Total	18	289	149	456

Los resultados muestran que se identificaron casi lo doble de animales seronegativos a LVPR, respecto a los animales seropositivos identificados.

## 6.5. Análisis estadístico

Para el ELISAI con p16 se obtuvo una sensibilidad de 98.8%, especificidad de 60.4% y un valor kappa de 0.567; mientras que para el ELISAI con el péptido sintético TM2 se obtuvo una sensibilidad de 66.7%, especificidad de 92.6% y un valor kappa de 0.615. Lo que indica que en ambos ELISAs (p16 y TM2) tienen una concordancia moderada con las pruebas comerciales.

## 6.6. Muestras discordantes

Para resolver el estado infeccioso o no de las muestras discordantes e indeterminadas se evaluaron por PCR. En el cuadro 9 se observan las muestras discordantes e indeterminadas en las diferentes ELISAs, algunas de ellas no se pudieron evaluar debido a que no se contaba con células para la extracción.

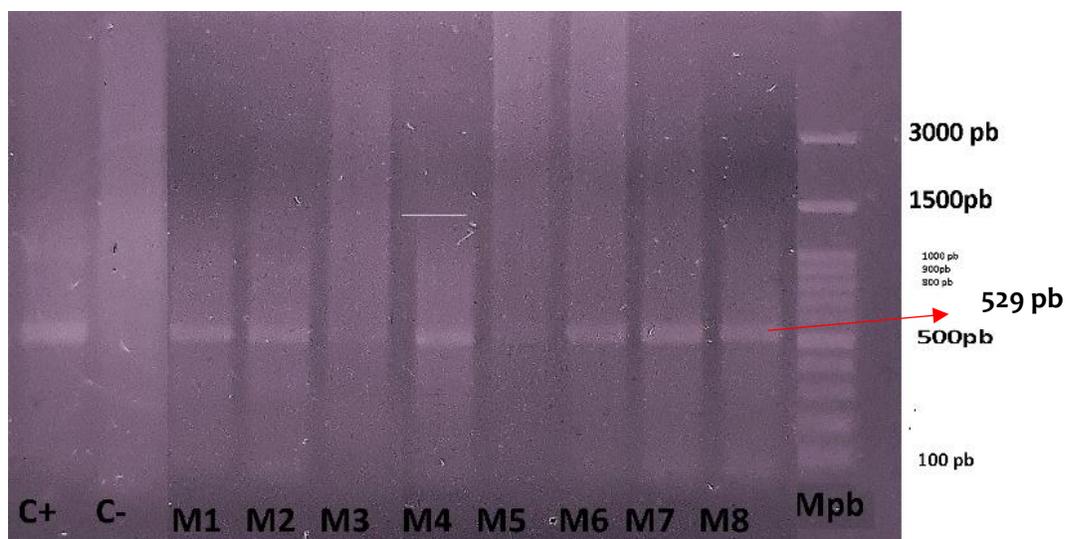
**Cuadro 9.** Muestras indeterminadas y discordantes en los ELISAsi basadas en el uso de la proteína p16 o el péptido sintético TM2.

ESTÁNDAR DE ORO			
ELISAI	-/+	+/-	Indeterminadas
<b>P16</b>	84	2	27
<b>TM2</b>	16	48	18

Se evaluaron 92/150 muestras que fueron discordantes en la prueba de ELISAI de p16 y TM2 obteniendo los resultados que se muestran en el cuadro 10 y en la figura 4 se observa un gel de agarosa con los productos de la PCR separados por electroforesis.

**Cuadro 10.** Resultados obtenidos en la PCR para muestras discordantes en el ELISAI de p16 y TM2.

	ELISAI-p16			ELISAI TM2		
	DISCORDANTE	PCR+	PCR-	DISCORDANTE	PCR+	PCR-
<b>Positivos ELISAc/ Negativos en ELISAI</b>	2	1	1	33	20	13
<b>Negativo ELISAc/ Positivos en ELISAI</b>	53	4	49	4	0	4
<b>Total</b>	55	5	50	37	20	17



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR-gag genotipo B. Los productos esperados fueron de 529 pares de bases. Mpb= Marcador de pares de base, C+= control positivo, C-= Control negativo, M1-M8= Muestras.

De las muestras indeterminadas en los ELISAi se evaluaron 10/45. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 11.

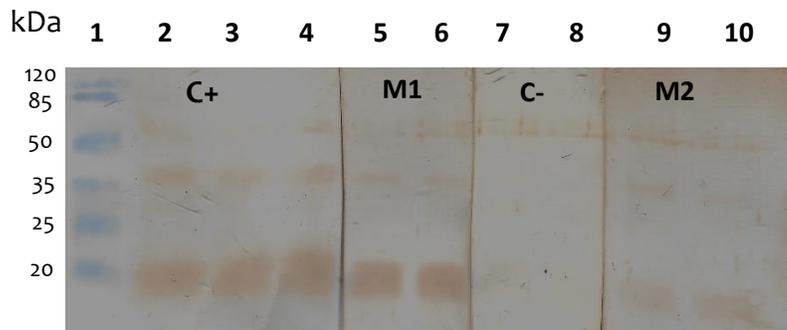
**Cuadro 11.** Resultados obtenidos en la PCR para muestras indeterminadas en el ELISAi de p16 y TM2.

ELISAi	Evaluadas	PCR +	PCR -
p16	4/27	0	4
TM2	6/18	4	2
<b>Total</b>	10/45	4	6

Basado en estos resultados se realizó un ajuste en los valores de sensibilidad, especificidad y concordancia para las dos técnicas de ELISA. Para el ELISAI p16 se obtuvo una sensibilidad del 99.4 % y 66.9% de especificidad con un valor kappa de 0.560 indicando una concordancia moderada; mientras que para el ELISA-TM2 se obtuvo una sensibilidad de 83.1 %, especificidad de 93% y valor kappa de 0.767, indicando una concordancia considerable.

## 6.7. Western Blot

Se evaluaron algunos plasmas por duplicado contra la proteína recombinante p16 los cuales reconocieron a la proteína y a algunas bandas inespecíficas como se observa en la figura 5.



**Figura 5.** Western blot de la proteína p16. Carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (MkDa), carril 2-4 control positivo (+), carril 5,6 y 9,10 muestras y carril 7,8 control negativo (C-).

## 7. DISCUSIÓN

La infección por lentivirus de pequeños rumiantes en ovinos y caprinos se encuentra ampliamente diseminada en el territorio nacional. Estudios de genotipificación han permitido identificar que el genotipo prevalente en rebaños nacionales es el B1 [56]. Es escaso el diagnóstico que se realiza en el país y las diferentes pruebas serológicas comerciales que se utilizan muestran resultados variables, debido a la diferencia de antígenos derivados de diferentes genotipos incluidos en dichas pruebas. Las técnicas moleculares como la PCR, no están disponibles para el diagnóstico rutinario de LVPR.

Las técnicas de ELISA se han empleado para el diagnóstico de infecciones causadas LVPR debido a que son más accesibles, automatizadas y objetivas; dejando de lado otras técnicas serológicas como la técnica de inmunodifusión en gel de agar [42].

Para la detección de anticuerpos contra LVPR se han utilizado técnicas de ELISA indirecta y competitiva [57], en un principio se usaron pruebas que utilizaban el virus completo, y aunque estas tienen alta sensibilidad y especificidad este antígeno se obtiene por medio de cultivos celulares con poco rendimiento [58]. Posteriormente se utilizaron proteínas recombinantes y péptidos solos o combinados obteniendo rendimientos similares a las de virus completos, las proteínas más utilizadas han sido la p-25, p-16, p-14, gp-135 y gp-38. Los resultados de diversos estudios muestran que hay una seroconversión temprana contra proteínas expresadas por el gen *gag* [36]. La proteína de envoltura gp-135 (SU) es una proteína glicosilada y se ha descrito que los títulos altos contra este antígeno se relacionan con el desarrollo de artritis [54,56]. La seroconversión contra la proteína SU aparece posterior a la presencia de anticuerpos contra las proteínas de Gag. Por otra parte, la proteína de gp 38 (TM) se ha utilizado principalmente para la identificación de cepas [61].

Se han realizado diversas investigaciones utilizando péptidos derivados de transmembrana para identificar anticuerpos que discriminan entre los genotipos A y B [42, 57]. En el presente trabajo se utilizó un péptido de 15 residuos obteniendo en el ELISAI una sensibilidad de 83.1 %, especificidad de 93%, resultados similares reportados por Andrés *et al.* (2013) [44], estos resultados muestran una excelente especificidad del péptido [63] y una sensibilidad algo reducida, lo cual está relacionado a un menor número de epítomos en el antígeno, en contraste una proteína recombinante contienen un mayor número de epítomos inmunodominantes.

El uso de la proteína de MA como antígeno es importante debido a que se pueden detectar anticuerpos en etapas tempranas de la infección, después del inicio de la respuesta contra la cápside; algunos animales negativos para esta proteína, en ocasiones son positivos para la proteína de la matriz cuando se analizan por Western Blot [58]. Al evaluar el ELISAI-p16 en el presente estudio se obtuvo una sensibilidad del 99.4 % y 66.9% de especificidad. La baja especificidad del ELISAI-p16 se relacionó aun número alto de falsos positivos (n=82). Se pudo evaluar un grupo reducido de estas muestras por Western Blot en las que se observó que los plasmas reconocieron otras proteínas además de la p16, esto puede deberse que al generar las proteínas recombinantes estas llegan a contener proteínas derivadas del mismo vector de expresión, que al purificarse no se eliminan o al intentar eliminarlas se reduce el rendimiento de la proteína recombinante [64]. Ante esto se ha recurrido a antígenos sintéticos que mejoran la especificidad y sensibilidad de las pruebas diagnósticas como se comprobó al evaluar el péptido sintético TM2 [42, 43].

El ELISAI-TM2 tuvo una especificidad buena pero una sensibilidad relativamente baja, mientras que el ELISAI-p16 fue a la inversa; en el presente estudio las pruebas de ELISA evaluadas con los diferentes antígenos tuvieron un valor kappa

de 0.560 para el ELISAI-p16 y de 0.767 para el ELISAI-TM2, teniendo una concordancia moderada y considerable respecto a nuestro estándar de oro [54]. Siendo el ELISAI-TM2 el que tuvo mejores resultados, además de generar menos muestras discordantes e indeterminadas.

En diferentes estudios se ha demostrado que las pruebas serológicas son limitadas cuando se utiliza un solo antígeno en comparación con aquellas que utilizan 2 o más antígenos [20, 21], debido a que la seroconversión contra las proteínas de LVPR se presenta en etapas diferentes de la infección [37]. En este estudio se evaluaron dos antígenos, sin embargo, al combinarlos no hubiera favorecidos la especificidad de la técnica ni tampoco se observarían mejoras en la sensibilidad; es posible que la p16 pueda usarse en una prueba tamiz aplicándola en rebaños con alta prevalencia de lentivirus caprinos.

Actualmente en México se ha confirmado la presencia de LVPR B1 afectando principalmente a cabras [56], por ello se decidió utilizar antígenos derivados de este genotipo para realizar las pruebas de ELISAI, sin embargo es necesario tomar en cuenta otros genotipos y subtipos que circulan en la República Mexicana para una identificación serológica más amplia de LVPR. Con el uso de las técnicas del ELISAI se pudo identificar la infección por el genotipo B1 en 10 Estados de la República mexicana.

Hasta el momento no se cuenta con una técnica 100% confiable que pueda detectar animales infectados con LVPR debido a la variabilidad genética y la variación antigénica [9, 14].

La técnica de ELISA nos permite detectar animales seropositivos, pero la seroconversión puede presentarse semanas o años después de la infección; la técnica de PCR nos permite detectar animales con infecciones tempranas o animales que son seronegativos [67]. Por ello, en planes de control y erradicación se sugiere el uso de ambas técnicas para mejorar la identificación de animales

infectados o evitando que animales de alto valor sean desechados antes de tiempo [4].

Las técnicas para detectar los LVPR dependen de varios factores como el diseño del ensayo, los antígenos derivados de genotipos que se encuentran en una región determinada, la replicación viral y la seroconversión; tomando en cuenta lo anterior se recomienda el uso de la técnica de ELISA y PCR para minimizar las deficiencias que puedan tener cada una de éstas, mejorando la capacidad de detección de los animales realmente infectados.

## 8. CONCLUSIONES

Se estandarizaron dos pruebas de ELISA<sup>i</sup> utilizando como antígeno una proteína recombinante y un péptido sintético, ambos derivados de secuencias de un Lentivirus de Pequeños Rumiantes genotipo B1.

El ELISA-p16 mostró buena sensibilidad, baja especificidad y moderada concordancia con las pruebas de ELISA comerciales.

El ELISA-TM2 mostró buena sensibilidad y especificidad, y una concordancia considerable con las pruebas de ELISA comerciales.

Es adecuado el uso del ELISA-TM2 para la detección de anticuerpos contra LVPR en caprinos infectados con virus del genotipo B.

## 9. REFERENCIAS

- [1] J. Cuéllar Ordaz, Jorge Alfredo Tórtora Pérez, A. Trejo González, and P. Román Reyes, *La producción caprina Mexicana, particularidades y complejidades*, Primera. México: Ariadna, 2012.
- [2] L. C. Cork, W. J. Hadlow, T. B. Crawford, J. R. Gorham, and R. C. Piper, “Infectious leukoencephalomyelitis of young goats,” *J. Infect. Dis.*, vol. 129, no. 2, pp. 134–141, 1974.
- [3] L. C. C. Crawford, T. B., D. S. Adams, W. P. Cheevers, “Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus,” *Science.*, vol. 207, no. 4434, pp. 997–999, 1980.
- [4] E. De Martin *et al.*, “Diagnostic response to a cross-border challenge for the Swiss caprine arthritis encephalitis virus eradication program,” *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, vol. 161(2), pp. 93–104, 2019.
- [5] M. Krupovic *et al.*, “Ortervirales : New virus order unifying five families of reverse-transcribing viruses ,” *Journal of virology*, vol. 92, no. 12, pp. 1–5, 2018.
- [6] E. Minguijón *et al.*, “Small ruminant lentivirus infections and diseases,” *Vet. Microbiol.*, vol. 181, no. 1–2, pp. 75–89, 2015.
- [7] P. Turelli, R. Vigne, G. Quérat, F. Guiguen, and J. F. Mornex, “dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions,” *Journal of virology*, vol. 71, no. 6, pp. 4522–4530, 1997.
- [8] S. Villet, B. A. Bouzar, T. Morin, G. Verdier, C. Legras, and Y. Chebloune, “Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein.,” *Journal of virology*, vol. 77, no. 17, pp. 9632–9638, 2003.
- [9] H. B. Kristbjörnsdóttir, V. Andrésdóttir, V. Svansson, S. Torsteinsdóttir, S.

- Matthíasdóttir, and Ó. S. Andrésón, “The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro,” *Virology*, vol. 318, no. 1, pp. 350–359, 2004.
- [10] K. L. T. T. Haase, “The rev gene of vira virus is required for productive infection,” *Virology*, vol. 200, no. 1, pp. 276–280, 1994.
- [11] C. Shah *et al.*, “Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: Evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade,” *Virology*, vol. 319, no. 1, pp. 12–26, 2004.
- [12] B. Colitti *et al.*, “A new approach for small ruminant lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains,” *PLoS One*, vol. 14, no. 2, pp. 1–12, 2019.
- [13] L. A. Santry, J. de Jong, A. C. Gold, S. R. Walsh, P. I. Menzies, and S. K. Wootton, “Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario, Canada,” *Virus Res.*, vol. 175, no. 1, pp. 30–44, 2013.
- [14] R. Reina *et al.*, “Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat,” *Vet. Microbiol.*, vol. 144, no. 1–2, pp. 24–31, 2010.
- [15] I. Leginagoikoa *et al.*, “Effects of housing on the incidence of visna/maedi virus infection in sheep flocks,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 88, no. 3, pp. 415–421, 2010.
- [16] H. Ramírez, R. Reina, B. Amorena, D. de Andrés, and H. A. Martínez, “Small ruminant Lentiviruses: Genetic variability, tropism and diagnosis,” *Viruses*, vol. 5, no. 4, 2013.
- [17] R. Reina *et al.*, “Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update,” *Vet. J.*, vol. 182, no. 1, pp. 31–37, 2009.
- [18] H. Alejandro, M. Rodríguez, and H. Ramírez, “Efecto del virus de artritis encefalitis

- caprina en el aparato reproductor de machos caprinos,” *Vet Mex.*, vol. 36, pp. 159–176, 2005.
- [19] B. A. Blacklaws *et al.*, “Transmission of small ruminant lentiviruses,” *Vet. Microbiol.*, vol. 101, no. 3, pp. 199–208, 2004.
- [20] L. W. Anderson, P. Klevjer Anderson, and H. D. Liggitt, “Susceptibility of blood-derived monocytes and macrophages to caprine arthritis-encephalitis virus,” *Infect. Immun.*, vol. 41, no. 2, pp. 837–840, 1983.
- [21] S. Ryan, L. Tiley, I. McConnell, and B. Blacklaws, “Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus,” *J. Virol.*, vol. 74, no. 21, pp. 10096–10103, 2000.
- [22] L. L. R. G. Bolea, Eva Monleón, L. P. Osuna Carrasco, Antonia Vargas, Damián de Andrés, B. Zandio Amorena, Juan José Sánchez Badiola, “Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells,” *Vet. Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 133–144, 2005.
- [23] The center for Food Security & Public Health, “Artritis y encefalitis caprina,” *Iowa State Univ.*, pp. 1–5, 2007.
- [24] R. G. Dalziel, J. Hopkins, N. J. Watt, B. M. Dutia, H. A. K. Clarke, and I. McConnell, “Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus,” *J. Gen. Virol.*, vol. 72, no. 8, pp. 1905–1911, 1991.
- [25] S. E. Crane, J. E. Clements, and J. Buzy, “Identification of cell membrane proteins that bind visna virus,” *Journal of virology*, vol. 65, no. 11, pp. 6137–6143, 1991.
- [26] H. Crespo *et al.*, “Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection,” *Vet. Res.*, vol. 42, no. 1, p. 28, 2011.
- [27] H. Crespo *et al.*, “Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis,” *Vet. Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–6, 2012.

- [28] N. J. M. and E. J. Dubovi, "Retroviridae," pp. 269–297, 2017.
- [29] W.-S. Ryu, "Virus Life Cycle," in *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, no. 1, 2017, pp. 31–45.
- [30] B. A. Blacklaws, "Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus," *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 35, no. 3, pp. 259–269, 2012.
- [31] B. Blacklaws and G. D. Harkiss, "Small ruminant lentiviruses and human immunodeficiency virus: cousins that take a long view," *Curr. HIV Res.*, vol. 8, no. 1, p. 26, 2010.
- [32] J. P. Stoye, "Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 6, pp. 395–406, 2012.
- [33] O. Narayan, S. Kennedy-Stoskopf, D. Sheffer, D. E. Griffin, and J. E. Clements, "Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages," *Infect. Immun.*, vol. 41, no. 1, pp. 67–73, 1983.
- [34] M. C. Zink, J. a Yager, and J. D. Myers, "Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats.," *Am. J. Pathol.*, vol. 136, no. 4, pp. 843–854, 1990.
- [35] M. Pépin *et al.*, "Maedi-visna virus infection in sheep : a review," *Vet. Res.*, vol. 29, pp. 341–367, 1998.
- [36] D. J. Houwers and I. M. Nauta, "Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections," *Vet Microbiol.*, vol. 19, pp. 127–139, 1989.
- [37] I. Singh, I. Mcconnell, and B. Blacklaws, "Immune response to individual maedi-visna virus gag antigens," *Journal of Virology* vol. 80, no. 2, pp. 912–919, 2006.
- [38] E. Gayo *et al.*, "Serological ELISA results are conditioned by individual immune

- response in ovine maedi visna,” *Small Rumin. Res.*, vol. 157, no. October, pp. 27–31, 2017.
- [39] J. D. Trujillo, K. J. Hötzel, K. R. Snekvik, and W. P. Cheevers, “Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: Disease status is predicted by SU antibody isotype,” *Virology*, vol. 325, no. 1, pp. 129–136, 2004.
- [40] O. Narayan, D. Sheffer, D. E. Griffin, J. Clements, and J. Hess, “Lack of neutralizing antibodies to caprine arthritis-encephalitis lentivirus in persistently infected goats can be overcome by immunization with inactivated *Mycobacterium tuberculosis*,” *Journal of virology*, vol. 49, no. 2, pp. 349–355, 1984.
- [41] S. Torsteinsdottir, “Immune response to maedi-visna virus,” *Front. Biosci.*, vol. 12, no. 1, p. 1532, 2007.
- [42] D. De Andrés *et al.*, “Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses,” *Vet. Microbiol.*, vol. 107, no. 1–2, pp. 49–62, 2005.
- [43] L. M. Herrmann-hoesing, “Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses,” *J Vet Diagn Invest.* vol. 855, pp. 843–855, 2010.
- [44] X. de Andrés *et al.*, “An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 152, no. 3–4, pp. 277–288, 2013.
- [45] P. G. Reddy, W. J. Sapp, and W. Heneine, “Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 31, no. 11, pp. 3042–3043, 1993.
- [46] J. M. A. Brinkhof, D. J. Houwers, L. Moll, D. Dercksen, and C. van Maanen, “Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing,” *Vet. Microbiol.*, vol. 142, no. 3–4, pp. 193–

198, 2010.

- [47] D. S. Adams *et al.*, “Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection,” *Vet. Rec.*, vol. 115, no. 19, pp. 493–495, 1984.
- [48] M. D. Test, A. De Concha-bermejillo, L. E. L. Espinosa, E. L. Rubio, and A. A. Setien, “Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico,” *Canadian journal of veterinary research*, no. 525, pp. 212–215, 1999.
- [49] H. Ramírez *et al.*, “Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico,” *Vet. J.*, vol. 190, no. 1, pp. 169–172, 2011.
- [50] SAGARPA, “Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.,” *DOF*. pp. 1–14, 2016.
- [51] A. J. G. Eduardo, “Tipificación serológica y genética de lentivirus de pequeños rumiantes: análisis comparativo,” UNAM, 2018.
- [52] S. C. I. Judith, “Evaluación de la peoteína recombinante P16 del virus de artritis encefalitis caprina para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta.,” UNAM, 2014.
- [53] A. S. Kolaskar and P. C. Tongaonkar, “A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens,” *FEBS Lett*, vol. 276, no. 1, pp. 1–3, 2011.
- [54] Anthony J. Viera and Joanne M. Garrett, “Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic,” *Fam. Med.*, vol. 37, no. 5, pp. 360–363, 2005.
- [55] J. L. Cerriteño-Sánchez, G. Santos-López, N. H. Rosas-Murrieta, J. Reyes-Leyva, S. Cuevas-Romero, and I. Herrera-Camacho, “Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of Porcine rubulavirus hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*,” *J. Biotechnol.*, vol. 223, pp. 52–61, 2016.

- [56] W. P. S. Mendiola *et al.*, “Genotyping based on the *Itr* region of small ruminant lentiviruses from naturally infected sheep and goats from Mexico,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, no. Mvv, pp. 1–8, 2019.
- [57] L. M. Herrmann *et al.*, “Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: Diagnostic tool for successful eradication,” *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 10, no. 2, pp. 267–271, 2003.
- [58] R. G. Zanoni, H. -R Vogt, B. Pohl, J. Böttcher, W. Bommeli, and E. Peterhans, “An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses,” *J. Vet. Med. Ser. B*, vol. 41, no. 1–10, pp. 662–669, 1994.
- [59] J. Keen, J. Kwang, E. T. Littledike, and L. L. Hungerford, “Ovine lentivirus antibody detection in serum, colostrum and milk using a recombinant transmembrane protein ELISA,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 51, no. 3–4, pp. 253–275, 1996.
- [60] G. Bertoni *et al.*, “Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis,” *Journal of virology*, vol. 68, no. 11, pp. 7139–47, 1994.
- [61] F. Mordasini *et al.*, “Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 3, pp. 981–991, 2006.
- [62] L. Sanjosé *et al.*, “Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA,” *Vet. J.*, vol. 204, no. 1, pp. 88–93, 2015.
- [63] J. Kwang and J. V. Torres, “Oligopeptide-based enzyme immunoassay for ovine lentivirus antibody detection,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 32, no. 7, pp. 1813–1815, 1994.

- [64] S. Rosati, A. Mannelli, T. Merlo, and N. Ponti, "Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen," *Virus Res.*, vol. 61, no. 2, pp. 177–183, 1999.
- [65] F. Tolari *et al.*, "Small ruminant lentiviruses in Jordan: Evaluation of sheep and goat serological response using recombinant and peptide antigens," *Trop. Anim. Health Prod.*, vol. 45, no. 6, pp. 1335–1340, 2013.
- [66] E. Saman *et al.*, "A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants," *Clin Diagn Lab Immunol*, vol. 6, no. 5, pp. 734–740, 1999.
- [67] Y. L'Homme, A. Leboeuf, J. Arsenault, and M. Fras, "Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF)," *Virology*, vol. 475, pp. 159–171, 2015.