



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS SEROLÓGICAS PARA LA DETECCIÓN DE
LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES DEL GENOTIPO A EN OVINOS Y
CAPRINOS.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CECILIA RODRÍGUEZ MURILLO

TUTOR:

DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ-FES-CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTORAL

DRA. LAURA COBOS MARÍN-FMVZ, UNAM

DRA. JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO-INIFAP

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mi madre Alma Fabiola por siempre ser la persona que más confía en mí y tener el super poder de la telepatía para venir al rescate. Te amo.

A mis hermanos Miguel, Abigail y Moisés por ser siempre mi motor y estar para mí cuando necesito volver al nido para refugiarme en sus abrazos, gracias bebés.

A la familia Zamudio-Murillo por haber recorrido este camino conmigo en el momento más oscuro. Estoy profundamente agradecida por haber caído en tan buenas manos, esto es para ustedes, gracias infinitas.

A los Murillo's por siempre apoyarme y estar pendiente de mí, me siento muy afortunada de que sean mi familia.

A Eduardo por caminar conmigo, por ayudarme, escucharme, aconsejarme y ser el mejor amigo. Que sean muchos momentos más a tu lado. Te quiero.

Al doctor Hugo por volver a aceptarme y querer seguir compartiendo su conocimiento y sabiduría conmigo. Muchas gracias.

A Víctor, gracias por todas esas pláticas llenas de humo que me hacen ver todo con más claridad; te quiero.

A Bryan, Sara, Eduardo y Dani por hacer de mi estancia en el INIFAP toda una experiencia. Gracias por sus consejos, sus risas y su colaboración.

A Hiram por ser el mejor compañero de laboratorio y apoyarme en la travesía de obtener el grado. Gracias amigo.

A todas las personas que formaron parte de este ciclo ¡muchas gracias!

Agradecimientos

A mis compañeros del laboratorio de virología, genética y biología molecular, FES-Cuautitlán.

Al doctor José Luis Cerriteño del Laboratorio de Virología II, CENID-MA, INIFAP por el apoyo a la producción de la proteína recombinante.

A mi comité tutorial: Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero y Dra. Laura Cobos Marín por todas sus valiosas aportaciones a lo largo del presente trabajo; así como a los miembros de mi jurado.

A todas y cada una de las personas que colaboraron para hacer este trabajo posible, gracias.

Al programa de becas del CONACyT por el apoyo otorgado a lo largo de mis estudios de maestría.

Este estudio fue apoyado por los siguientes proyectos:

- “ELISAs basadas en el uso de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos para la detección serológica de lentivirus en caprinos” con clave IT201217. PAPIIT. UNAM.
- “Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia* spp, *Brucella melitensis*, *Leptospira* spp y *Coxiella burnetii*, en ovinos y caprinos” Proyecto financiado por Fondos Sectoriales SAGARPA CONACYT, No. 291311.
- “Estudio de la respuesta inmune y genética retroviral” con clave PIAPI2041. Dentro del Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación. FESC. UNAM.

Todo lo que el Padre me da, vendrá a mí; y el que a mi viene, no le echo fuera. Porque he descendido del cielo, no para hacer mi voluntad, sino la voluntad del que me envió. Jn 6. 37,38.

Esto es para ustedes Macedonea y José Santos; estoy segura que están conmigo en todo momento.



Contenido	
Contenido	5
Resumen	14
Abstract	15
Introducción	17
Organización genómica	18
Ciclo de replicación	21
Tropismo	22
Variabilidad genética.....	23
Filogenia	25
Transmisión.....	25
Formas clínicas de la enfermedad	28
Enfermedad articular.....	28
Enfermedad respiratoria	29
Enfermedad mamaria	29
Enfermedad nerviosa	30
Respuesta inmune.....	31
Diagnóstico	33
Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).....	34
Western blot (WB).....	34
Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).....	34
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	36
Control y prevención.....	37
Lentivirus de pequeños rumiantes en México	38

Justificación.....	40
Hipótesis.....	41
Objetivo general.....	41
Objetivos particulares.....	41
Material y métodos.....	42
Muestras.....	42
Diseño de péptidos sintéticos.....	43
Estandarización del ELISA de péptidos.....	44
Construcción y expresión de la proteína recombinante de matriz de LvPR (p16)	45
Subclonación en el vector Champion-pETSUMO.....	47
Expresión de la proteína p16A en células <i>E coli</i> BL21.....	49
Purificación de la proteína p16A.....	50
Purificación de la proteína p16A por cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC).	50
Cuantificación de la proteína p16A por el método de Bradford.....	51
Estandarización del ELISA p16A.....	53
Línea de corte.....	57
Western blot.....	57
ELISA de péptidos.....	58
Expresión de la proteína p16-A.....	59
ELISA p16A.....	66
Western blot.....	69
Discusión.....	77
Conclusión.....	85

Bibliografía	86
Apéndice	93

Lista de cuadros.

Tabla 1. Población de ovinos provenientes de rebaños con información de la infección de LvPR del genotipo A, seleccionados por región y con resultados positivos en dos técnicas de ELISA comerciales.	42
Tabla 2. Población de caprinos provenientes de rebaños con información de la infección de LvPR del genotipo A, seleccionados por región y con resultados positivos en dos técnicas de ELISA comerciales.	43
Tabla 3. Secuencia en aminoácidos de la proteína de matriz de LvPR genotipo A2.	45
Tabla 4. Iniciadores diseñados para la amplificación de la proteína de matriz de LvPR genotipo A2.	46
Tabla 5. Condiciones establecidas para la PCR LvPR-p16A.	47
Tabla 6. Reactivos utilizados para ligar al vector de expresión Champion-pETSUMO.	47
Tabla 7. Iniciadores utilizados para corroborar el sentido correcto del inserto generado.	49
Tabla 8. Curva patrón para la técnica de cuantificación por el método de Bradford.	51
Tabla 9. Plasmas utilizados para la estandarización del ELISA-p16.	53
Tabla 10. Condiciones para el ELISA-p16A.	54
Tabla 11. Secuencias peptídicas derivadas de la proteína de superficie (SU) de LvPR del genotipo A.	58
Tabla 12. Tabla de contingencia de 2x2 donde se comparan los resultados obtenidos en ovinos evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro.	67

Tabla 13. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos, comparándola con los resultados concordantes entre ambas pruebas comerciales (estándar de oro).....	67
Tabla 14. Tabla de contingencia de 2x2 donde se comparan los resultados obtenidos en caprinos evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro.	67
Tabla 15. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en cabras, comparándola con el estándar oro.....	68
Tabla 16. Valores de concordancia e interpretación utilizando el coeficiente kappa (tomado de Antony et al. 2005).....	68
Tabla 17. Tabla de contingencia de 2x2 donde se comparan los resultados obtenidos en borregos y cabras evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro.....	69
Tabla 18. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos y cabras, comparándola con el estándar de oro.....	69
Tabla 19. Relación de animales clasificados como indeterminados al ELISA-p16A a los cuales se les realizo western blot.	70
Tabla 20. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia donde se comparan los resultados obtenidos en borregos evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro y western blot.....	71
Tabla 21. Tabla 2x2 y valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia donde comparan los resultados obtenidos en cabras evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro.....	71
Tabla 22. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA VMRD y el ELISA-p16A de animales identificados como infectados con el genotipo A de LvPR en borregos.....	72
Tabla 23. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA	

ERADIKIT y el ELISA-p16A de animales identificados como infectados con el genotipo A de LvPR en borregos.	73
Tabla 24. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A en borregos.	73
Tabla 25. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A en cabras.	74
Tabla 26. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A en borregos.	74
Tabla 27. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A en cabras.	74
Tabla 28. Resultados totales obtenidos en sensibilidad, especificidad y concordancia obtenidos de la comparación del ELISA-p16 con respecto a los resultados generados en ambas pruebas comerciales por especie y de forma individual ajustados con los resultados de western blot de los animales que resultaron indeterminados y discordantes en el estándar de oro.	75
Tabla 29. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el estándar de oro y el ELISA-p16A de animales identificados como infectados con el genotipo A de LvPR.	93
Tabla 30. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en animales infectados con LvPR genotipo A, con respecto a el estándar de oro.	93

Tabla 31. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA VMRD y el ELISA-p16A de animales identificados como infectados con el genotipo A de LvPR en borregos y cabras.	94
Tabla 32. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A con respecto al ELISA VMRD, en ovinos y caprinos infectados con LvPR genotipo A.....	94
Tabla 33. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA VMRD y el ELISA-p16A en borregos identificados como infectados con el genotipo A de LvPR.	94
Tabla 34. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos infectados con LvPR genotipo A, con respecto al ELISA VMRD.....	95
Tabla 35. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA ERADIKIT y el ELISA-p16A en borregos y caprinos identificados como infectados con el genotipo A de LvPR.	95
Tabla 36. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos y caprinos infectados con LvPR genotipo A, con respecto al ELISA ERADIKIT.....	96
Tabla 37. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA ERADIKIT y el ELISA-p16A en borregos identificados como infectados con el genotipo A de LvPR.	96
Tabla 38. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos infectados con LvPR genotipo A, con respecto al ELISA ERADIKIT.....	96
Tabla 39. Población de animales (borregos y cabras) clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A.	97

Tabla 40. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en animales (borregos y cabras) con infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial VMRD.	98
Tabla 41. Población de borregos clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A.	98
Tabla 42. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos de infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial VMRD.	98
Tabla 43. Población de cabras clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A.	99
Tabla 44. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en cabras de infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial VMRD.	99
Tabla 45. Población de animales (borregos y cabras) clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A.	99
Tabla 46. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos y cabras con infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial VMRD.	100
Tabla 47. Población de borregos clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A.	100
Tabla 48. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos con infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial ERADIKIT.	101

Tabla 49. Población de cabras clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A.	101
Tabla 50. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en cabras con infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial ERADIKIT.	101

Lista de figuras

Figura 1. Concentraciones utilizadas de péptido, plasma y conjugado en la prueba de ELISA basada en el uso de péptidos sintéticos.....	44
Figura 2. Gráfica de la cuantificación por espectrofotometría de la concentración de albumina.....	53
Figura 3. Población seleccionada para la estandarización del ELISA-p16A, en la tabla se observan las densidades ópticas obtenidas en dicha prueba.	55
Figura 4. Condiciones evaluadas para la estandarización del ELISA-p16A.	56
Figura 5. Gráfica dónde se observan las diferentes diluciones de dos pools de plasma (animales positivos y otro de negativos) utilizando una dilución del conjugado 1:2500 y una concentración de antígeno de 200 ng y 600 ng.	56
Figura 6. Alineamiento de las secuencias de la región de la superficie de LvPR de diferentes genotipos y el péptido 127 SUA (en el recuadro verde se evidencian los aislados del genotipo B respecto a las cepas A).	58
Figura 7. Alineamiento de las secuencias de la región de la superficie de LvPR de diferentes genotipos y el péptido 251 SUA (en el recuadro verde se evidencian los aislados del genotipo B respecto a las cepas A).	59
Figura 8. Colonias E. coli TOP 10 positivas a la clonación con el vector pJET (lado izquierdo) que incluye el inserto p16 de LvPR y un agar sin crecimiento (control negativo, lado derecho) y debajo se muestra el control positivo del sistema.	60
Figura 9. Electroforesis de un gel de agarosa de la PCR pJet-p16 dónde se muestra el amplicón (434 pb) en cuatro muestras seleccionadas (mpb=marcador de pares de bases, p1-p5= muestras enumeradas del 1 al 5, pb= pares de bases).	61

Figura 10. Resultados de la transformación de células E coli. Top 10 utilizando el vector Champion-pETSUMO con el inserto p-16A.....	61
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR fw sumo-rv p16A para confirmar el sentido correcto del inserto (mpb=marcador de pares de bases, p1-p16= plásmidos enumerados del 1 al 16, pb= pares de bases).	62
Figura 12. SDS-PAGE teñido con azul de coomassie de los cultivos inducidos para expresión de la proteína p16A con un peso molecular de 28 kDa (M=marcador de peso molecular; (-)=control negativo de expresión; (+)= control positivo de expresión; 1=clona 1.1; 2=clona 1.2; 3=clona 1.3; 4=clona 2.1; 5=clona 2.2 y 6= clona 2.3).....	62
Figura 13. Western blot de los cultivos inducidos para expresión de la proteína p16A (M=marcador de peso molecular; (-)=control negativo de expresión; (+)= control positivo de expresión; 1=clona 1.1; 2=clona 1.2; 3=clona 1.3; 4=clona 2.1; 5=clona 2.2 y 6= clona 2.3).	63
Figura 14. SDS-PAGE donde se observa la proteína p16A (M=marcador de peso molecular; (+)= control positivo, proteína p25 de LVPR; 1=cultivo de BL21 - p16A, 2=fracción soluble; 3=dilución 1:4 de cuerpo de inclusión).....	63
Figura 15. Western blot de la obtención de la proteína p16A (M=marcador de peso molecular; (+)= control positivo, proteína p25 de LVPR; 1=cultivo de BL21 -p16A, 2=fracción soluble; 3=dilución 1:4 de cuerpo de inclusión).....	64
Figura 16. SDS-PAGE y western blot del ensayo de purificación con 20 ml de muestra (M=marcador de peso molecular; MS= muestra soluble; NP=no pegado, L=lavado; 01-12=eluciones colectadas).....	65
Figura 17. SDS-PAGE y western blot del ensayo de purificación con 35 ml de muestra (M=marcador de peso molecular; MS= muestra soluble; NP=no pegado, L=lavado; 01-10=eluciones colectadas).....	65
Figura 18. SDS-PAGE de la proteína p16A purificada y dializada (M=marcador de peso molecular; 01-09= eluciones colectadas).	66
Figura 19. Western blot de muestras de borregos clasificados como indeterminados en el ELISA de la proteína recombinante p16A (mpm=marcador de peso molecular; c(+)= control positivo, 1-10=muestras de ovinos).	70

Resumen

Los *Lentivirus* no oncogénicos que infectan a los ovinos y caprinos (LvPR) son un grupo heterogéneo de virus que se caracterizan por producir enfermedades de curso lento que afectan principalmente pulmones, glándula mamaria, articulaciones y sistema nervioso central. El formato ELISA es la técnica de diagnóstico actualmente más utilizada y para ello se emplean kits de importación que en sus diseños derivan de monoestirpes principalmente del genotipo B, por lo que el objetivo del presente trabajo fue usar diferentes antígenos (proteínas recombinantes y péptidos sintéticos) para el desarrollo una prueba diagnóstica en formato ELISA que permita identificar borregos y cabras infectados con LvPR del genotipo A. Para ello se diseñaron dos péptidos de la región de la superficie del virus así como la expresión de la proteína recombinante de matriz de LvPR para posteriormente estandarizar y evaluar un total de 437 animales (304 borregos y 133 cabras) mediante un ELISA indirecto. Estos animales contaban con una evaluación previa por dos kits comerciales de ELISA, y el resultado de ambas pruebas se consideró como estándar de oro para comparar los resultados de los nuevos ELISAs. Los animales que resultaron indeterminados y discordantes en las pruebas de ELISA se les realizó western blot. Los resultados obtenidos del ELISA-p16 fue una sensibilidad de 78.9%, especificidad de 92% y un coeficiente de concordancia de 0.831 en borregos. En cabras se obtuvo una sensibilidad de 29%, especificidad de 97.1% y un coeficiente de concordancia de 0.269. Respecto a la evaluación de los péptidos diseñados estos no mostraron reactividad suficiente para discriminar entre animales positivos y negativos. Se realizaron diferentes análisis demostrando que la proteína recombinante de matriz (P16) del genotipo A, utilizada como antígeno en un ELISA indirecto parece una buena candidata para el diseño de pruebas serológicas que busquen aumentar nivel de especificidad en rebaños con infecciones del genotipo A de LvPR, principalmente en borregos.

Abstract

The non-oncogenic lentiviruses that infect sheep and goats (SRLV) are a heterogeneous group of viruses characterized by producing slow-course diseases, which mainly affect the lungs, mammary gland, joints, and central nervous system. The ELISA format is currently the most widely used diagnostic technique and, thus, import kits that are derived from monostripes, mainly genotype B, are used; therefore, the objective of this work was to use different antigens (recombinant proteins and synthetic peptides) for the development of a diagnostic test in the ELISA format that allows the identification of sheep and goats infected with SRLV, genotype A. With this in mind, two peptides from the surface region of the virus were designed, as well as the expression of the SRLV recombinant matrix protein, to later standardize and evaluate a total of 437 animals (304 sheep and 133 goats) by means of an indirect ELISA. These animals had been previously evaluated with two commercial ELISA kits, and the result of both tests was considered as gold standard to compare the results of the new ELISAs. The animals that were indeterminate and discordant in the ELISA tests were tested by western blot. The results obtained from the ELISA-p16 had a 78.9% sensitivity, 92% specificity, and a coefficient of agreement of 0.831 in sheep. In goats, a 29% sensitivity, 97.1% specificity, and a coefficient of agreement of 0.269 were obtained. Regarding the evaluation of the designed peptides, these did not show sufficient reactivity to discriminate between positive and negative animals. Different analyzes were carried out demonstrating that the recombinant matrix protein (P16) of genotype A, used as antigen in an indirect ELISA, seems a good candidate for the design of serological tests that seek to increase the level of specificity in herds with SRLV genotype A infections, mainly in sheep.

Introducción

Los *Lentivirus* no oncogénicos que infectan a los ovinos y caprinos (LvPR) son un grupo heterogéneo de virus que pertenecen a la familia *Retroviridae*; como los demás virus de su género se caracterizan por producir enfermedades de curso lento (crónicas), periodos de incubación largos, estados subclínicos y/o cuadros multisistémicos que afectan principalmente pulmones, glándula mamaria, articulaciones y sistema nervioso central (Thormar H, 2013).

La depresión económica que sufrió Islandia en la década de los 30 favoreció la importación de ovejas Karakul provenientes de Alemania a la isla; si bien los 20 carneros importados referían estar sanos y cumplir una cuarentena de dos meses antes de ser distribuidos en varias granjas del país, pronto se evidenció la presencia de enfermedades pulmonares graves entre ellas Maedi, que significa dificultad para respirar. Maedi no fue completamente reconocido como distinto de la adenomatosis pulmonar hasta en 1939 cuando se caracterizó como una infección linfoproliferativa progresiva que conducía a una neumonía intersticial mortal para los animales. Paralelamente se reportaban casos de una enfermedad del sistema nervioso central a la cual se le denominó Visna (emaciación) que comenzaba con una ligera ataxia y paresia particularmente en las patas traseras la cual progresaba lentamente y terminaba en paraplejía o parálisis total. Aunque los primeros estudios de estas formas clínicas se hicieron por separado, las características citopáticas del virus en cultivo y la posibilidad de desarrollar ambos cuadros clínicos al inocularlos en animales permitieron agruparlos como un solo padecimiento (Thormar H, 2013). Por otro lado, no fue hasta 1974 que en Estados Unidos se reportó por primera vez una enfermedad que causaba artritis en animales adultos atribuible a retrovirus (Cork, 1974), más tarde en 1980 un nuevo reporte describía cuadros de leucoencefalomielitis; en este mismo estudio se denominaba por primera vez a la enfermedad como Artritis Encefalitis Caprina (Crawford, 1980).

Actualmente ambas enfermedades están agrupadas y se les reconoce como lentivirus de pequeños rumiantes debido a la proximidad filogenética que existe entre ellos, así como, la posibilidad de que diversos subtipos estén presentes en ambas especies (ovinos y cabras) y pueden ser transmitidos entre ellas (Pisoni, 2007).

Organización genómica

Los viriones son esféricos y tienen una estructura única de tres capas, el tamaño de éstos es de unos 100 nm. La parte central del virus se conforma del complejo genoma-nucleoproteína, asociado con moléculas de la transcriptasa inversa; estas estructuras se encuentran dentro de una cápside icosaédrica rodeada por una envoltura derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora (Pépin, 1998).

Todos los *Lentivirus* tienen la misma base en su organización genética, el genoma proviral presenta en ambos extremos una zona no codificante (*LTR*), la cual proporciona las señales necesarias para la transcripción, integración y poliadenilación del ARN viral. Ésta se divide en las regiones U3, R y U5. La región U3 situada en el extremo 3' del provirus contiene la caja TATA, que favorece el inicio de la transcripción y presenta sitios de unión a factores de transcripción necesarios para la regulación, tales como los sitios AP-1, AML, AP-4, cajas CAAAT y los elementos que median una activación inducida por IFN- γ (gamma-activated sites; GAS) y por FNT- α (TNF- α activated site; TAS). La región R contiene el sitio CAP y la señal de poliadenilación de los mRNA. Por último, la región U5 es la primera que se retrotranscribe y constituye el extremo 5' del provirus. En la actualidad algunos estudios se centran en el papel que tiene esta región en la baja patogenicidad que algunos lentivirus presentan (Gomez-Lucia & Barquero, 2018).

Entre las *LTR*'s se encuentran tres genes estructurales: *gag*, el cual produce las proteínas estructurales de nucleocápside (NC o p14), cápside (CA o p25) y matriz (MA p16), esta última es responsable de la asociación del precursor gag con la membrana plasmática celular dentro de la partícula del virus, esta proteína se

localiza entre la membrana viral y la proteína de la cápside del virus. La proteína de la cápside es la más abundante del virión, forma el núcleo hidrófobo del virión y provoca una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección característica valiosa para las pruebas diagnósticas. La proteína de la nucleocápside recubre el genoma del ARN viral. El gen *pol* codifica enzimas que ejercen su actividad en distintos puntos del ciclo viral; transcriptasa inversa, proteasa e integrasa (Querat G, 1990).

El gen *env* codifica las glicoproteínas del virus. Estas se sintetizan como un precursor (gp160) y es escindida por una proteasa de la célula huésped en dos subunidades: la glicoproteína de superficie (SU; gp135) y la glicoproteína de transmembrana (TM; gp44). La TM participa en la fusión de membranas lipídicas (permitiendo la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula huésped) y es una proteína mucho más conservada; por esta razón, es un buen candidato para ser utilizado como antígeno en técnicas de ELISA. Dicha fusión celular origina *in vitro* el efecto citopático característico de las infecciones por LvPR, es decir, la formación de sincitios o células multinucleadas que pueden contener entre 5 y 30 núcleos. El reconocimiento del receptor celular por parte de la proteína gp135 juega un factor determinante en el tropismo y la patogénesis de los LvPR (Valas, 2000).

La glicoproteína SU no está ligada covalentemente a TM y contiene dominios que son reconocidos por los receptores celulares para permitir la entrada del virus a la célula; estimula la producción de anticuerpos y también es genéticamente variable, por lo que las modificaciones en SU determinan la variabilidad antigénica de los diferentes aislados. Las glicoproteínas de la envoltura de los lentivirus tienen muchas funciones biológicas importantes y contienen los epítomos responsables tanto de la inducción de anticuerpos neutralizantes como de la interacción del virus con el receptor de la célula hospedadora (Zanoni , 1998). Hasta la fecha, no se han definido de manera concluyente receptores de superficie para LvPR, aunque se han descrito proteínas celulares capaces de unirse al virus; esto

contrasta con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) donde hace tiempo se ha determinado el receptor (CD4) y los co-receptores (receptores de quimiocinas) (Minguijón, 2015).

Además, los *Lentivirus* contienen genes accesorios los cuales de acuerdo a la especie que afectan están presentes o ausentes como los genes *vif*, *rev*, *vpr-like*, que están en los lentivirus de pequeños rumiantes; adicionalmente el VIH incluye a los genes *vpu*, *tat*, *nef* y *vpx*. (Pépin, 1998)

La proteína Rev lentiviral desempeña un papel clave en la regulación de la expresión mediante la exportación nuclear de transcritos virales parcialmente empalmados o no empalmados para lograr el ciclo de replicación del virus. Para asegurar su función, la proteína Rev debe viajar entre el citoplasma y el núcleo a través de mecanismos que son impulsados por señales de localización nuclear y señales de exportación nuclear, la proteína Rev se dirige a los ARN parcialmente empalmados o no empalmados mediante el reconocimiento de una estructura de tallo bucle presente en estos ARN virales, al llamado elemento de respuesta Rev (RRE). Después de la unión inicial de un monómero Rev a sitios de unión de alta afinidad a RRE donde hasta doce moléculas Rev se unen y multimerizan a través de interacciones proteína-proteína-ARN cooperativas. (Labrecque, 2020).

El gen *tat* se describió por primera vez por su participación en la estimulación de la expresión génica dirigida por el promotor viral ubicado en la LTR 5'; la acción del gen *tat* puede estar mediada por la estimulación de genes celulares, como los de citocinas. Algunos trabajos se han centrado en examinar el papel de *tat* mediante el estudio de virus tipo AEC eliminando *tat*; esto demostró que este gen no es esencial para la replicación del virus (Villet, 2003). Sin embargo, puede contribuir a una interacción exitosa entre el virus y su huésped al reclutar o modular los factores celulares involucrados en el inicio de la transcripción durante el proceso de maduración de los monocitos a macrófagos, lo que conduce a una mayor expresión de genes virales *in vivo*. La función de esta proteína es similar a

la proteína Vpr del VIH tipo 1, por lo que se renombró la región genética como *vpr-like* (Rea-Boutrois A, 2009).

Finalmente, el factor de infectividad viral (Vif) tiene un papel en el ciclo de replicación y evasión de la respuesta inmune, al ser capaz de restaurar la infectividad viral desencadenando la degradación de la mayoría de las proteínas A3 o conocidas como APOBEC, importantes en la respuesta inmune innata. El mecanismo de degradación A3 es a través de vías dependientes de ubiquitina y proteasoma, reclutando proteínas celulares para construir un complejo de ubiquitina ligasa E3 mediada por Vif (Fu, D., Su, Chi, & Wang, 2020).

Ciclo de replicación

Al igual que otros virus envueltos, los LvPR ingresan a la célula huésped mediante la interacción de su proteína glicosilada de envoltura con los receptores celulares lo que permite la fusión del virus con la membrana celular objetivo (Tang H, 1999). Estudios recientes han identificado un receptor de manosa que parece estar involucrado en la entrada del virus a la célula diana, sin embargo, se sabe que no es el único involucrado (Crespo H, 2011). Una vez que el virus ingresa a la célula, el mecanismo de replicación es similar al de otros retrovirus produciendo un intermedio de ADN llamado provirus que se integra en el genoma de la célula hospedadora lo que resulta en una infección de por vida. Las proteínas virales y el ARN genómico se sintetizan a partir del ADN integrado, utilizando los sistemas enzimáticos de la célula huésped (Pépin, 1998). Una vez en el núcleo la transcripción es impulsada por la LTR proviral que se produce durante la síntesis del provirus lo que permite la expresión de ARNm viral y ARN genómico (Angelopoulou, 2006).

Finalmente, la envoltura viral se forma a partir de la membrana celular lipídica, que incorpora las glicoproteínas SU y TM. La maduración final de los viriones (escisión de GAG y GAG / POL) ocurre después de que el virión inmaduro brota a través de la membrana. En los macrófagos, esto puede ocurrir a través de la membrana plasmática y también por exocitosis (Gomez-Lucia & Barquero, 2018).

Puede parecer que el virus siempre logra infectar la célula, pero esto no es así ya que la célula combate la infección por LvPR con una variedad de mecanismos. Una vez que el virus entra en la célula diana, moléculas de inmunidad innata inician la restricción viral. Por ejemplo, la proteína 5 alfa que contiene motivos tripartitos (TRIM5) se unen a las cápsides virales inhibiendo las etapas de integración y postintegración del ciclo del virus; mientras que otras moléculas como las proteínas APOBEC (A3) ejercen su actividad inhibitoria principalmente a través de un mecanismo dependiente de la desaminasa. Las proteínas A3 producen la desaminación de las citocinas en el ADN de la primera cadena transcrita inversamente, lo que conduce a mutaciones de guanina a adenina en la cadena positiva del ADN proviral. A3 puede incorporarse a los virus de la progenie en células productoras e inhibir la replicación lentiviral en el siguiente ciclo de replicación en células diana. Por lo tanto, la falta de infección productiva no se debe solo a la falta de receptores funcionales ya que también pueden ser responsables los factores de restricción posteriores a la entrada. Sin embargo, los retrovirus pueden contrarrestar estos mecanismos (Sáez-Ciri3n, 2018).

Tropismo

El tropismo puede abordarse de diferentes 3pticas que depender3n del objeto de estudio, pero que est3n 3ntimamente ligadas entre ellas. Podemos destacar las que involucran especies hospedadoras (cabras, ovejas o ambas) y el tipo de tejido que es susceptible diferenciado seg3n la forma cl3nica de enfermedad: mastitis, artritis, encefalitis y / o neumon3a. (Pinczowski, 2017).

El mayor tropismo de los lentivirus es hacia los monocitos/macr3fagos y c3lulas dendr3ticas. Sin embargo, otros tipos de c3lulas tambi3n pueden infectarse y actuar como reservorios del virus. Entre ellas se encuentran las c3lulas epiteliales de la gl3ndula mamaria, que son una importante fuente de c3lulas infectadas y virus libres para la transmisi3n de los LvPR de las madres a su descendencia. Otras c3lulas infectadas importantes en la patog3nesis pueden ser las c3lulas endoteliales y las c3lulas microgliales del sistema nervioso central (Ram3rez H. R.-

M., 2012). Además, se han encontrado diferencias en la permisividad *in vitro* entre líneas celulares de origen heterólogo (pollo, hámster, humano, mono y codorniz), que son permisivas a la infección por LvPR y células de ovario de hámster chino que no son permisivas a la infección (Ramírez H. R., 2013).

Por su replicación *in vitro* los lentivirus de pequeños rumiantes se clasifican en rápidos-altos y virus lentos-bajos en células de origen homólogo (borregos o cabras) así como la generación de efectos citopáticos. Con frecuencia los aislados de oveja se clasifican fenotípicamente como rápidos - altos ya que se replican rápidamente además de inducir la formación de sincitios y / o lisis celular y cuando se cultivan los sobrenadantes alcanzan títulos altos; por el contrario, los aislados de las cabras suelen ser virus lentos - bajos, que crecen lentamente y producen títulos bajos. Sin embargo, se han aislado virus similares a VMV y CAEV de fenotipos intermedios tanto de ovejas como de cabras (Pinczowski, 2017).

Variabilidad genética

La recombinación de diferentes cepas y subtipos es un sello distintivo de las infecciones por lentivirus, esto contribuye significativamente a la diversidad y evolución viral tanto en los hospederos de manera individual como en las poblaciones. Los virus recombinantes se generan en individuos coinfectados con más de una cepa o subtipo lentiviral (Pisoni, 2007). Cuando una célula se infecta conjuntamente con dos o más cepas de LvPR, los genomas de ARN correspondientes pueden empaquetarse conjuntamente en la progenie viral; si estas plantillas de ARN viral corresponden a un subtipo igual derivará en una progenie similar, por el contrario, si este empaquetamiento contiene plantillas de ARN diferentes (dos subtipos de LvPR), la posibilidad de tener como resultado una progenie viral diferente de los subtipos inicialmente empaquetados aumentará (Ramírez H. R., 2013).

En contraste, con los cambios lentos y constantes causados por la mutación el evento de recombinación es una fuerza evolutiva mucho más poderosa; este mecanismo de diversificación genética puede permitir eficazmente mutaciones

dentro de una cuasiespecie; puede establecer rápidamente combinaciones genéticas beneficiosas que serían difíciles de generar solo por mutación y también puede eliminar eficazmente mutaciones perjudiciales. El concepto de cuasiespecie viral se define como un conjunto de virus que se encuentran en un individuo infectado. Frecuentemente este fenómeno se origina en determinadas circunstancias de presión selectiva, como la ejercida por el sistema inmunológico, la frecuencia de formas genéticas en la población viral puede cambiar. El alcance de la diversidad genética dentro de una cuasiespecie depende de un conjunto complejo de factores, que incluyen un alto recambio viral, altas tasas de mutación, recombinación retroviral y selección por el sistema inmunológico del huésped hasta los límites de las propias limitaciones genéticas y fenotípicas de la variación (Ramírez H. R., 2013).

Por otro lado, una pieza que contribuye en gran medida a la variabilidad genética en LvPR y suma a los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped son las mutaciones; que en gran medida se le atribuyen a la transcriptasa inversa característica de retrovirus la cual no tiene actividad exonucleasa correctora, aunado a la recombinación dentro de las células coinfectadas pueden contribuir a una tasa de mutación elevada. Sin embargo, la heterogeneidad genética observada *in vivo* no puede atribuirse completamente a la baja fidelidad de la RT. Existen pasos en la replicación y que involucra la presión selectiva derivada de la respuesta inmune que facilitarían dichas mutaciones, tal es el caso de las proteínas APOBEC, una proteína intrínseca que se sabe que incorpora mutaciones deletéreas en el genoma viral mediante la desaminación de citosina a uracilo. El exceso de uracilo en la hebra de ADN negativa transcrita inversamente puede conducir posteriormente a mutaciones de G-a-A en la hebra positiva del ADN proviral. La desaminación de citosina no se produce de forma aleatoria, ya que los miembros de la familia APOBEC tienen distintas preferencias de dinucleótidos, esto en conjunto con la acción de vif viral en aras de contrarrestar dicho efecto causado por APOBEC puede resultar en una fuente importante de heterogeneidad viral y definir el resultado de la infección. Junto con esto, se sabe que los macrófagos,

conocidos por ser células diana de LvPR contienen una mayor cantidad de dUTP intracelulares. Este exceso de uracilo puede incorporarse al ADN, lo que da lugar a más mutaciones en los viriones recién producidos (Ramírez H. R., 2013).

Filogenia

Como consecuencia de la alta variabilidad genética presente en los lentivirus de pequeños rumiantes algunos estudios se han enfocado en describir la relación filogenética presente entre las diferentes secuencias de LvPR descritas en el mundo. En la actualidad existe una clasificación propuesta por Shah y cols. basada en la información de secuencia de 2 regiones genómicas, la región gag-pol (1.8 kb) y pol (1.2 kb). De este análisis surgieron 5 genotipos que se identifican con letras del abecedario; genotipo A (cepas tipo Maedi Visna), B (estirpes virales tipo Artritis Encefalitis Caprina), C (ovejas y cabras de Noruega), D (Suiza y España; sin embargo, el genotipo D en la actualidad se ha considerado que se encuentra dentro del genotipo A) y el genotipo E (aislado únicamente en cabras de Italia).

Derivado de estos tipos genéticos, el genotipo A y B a su vez se dividen en subtipos y son los de mayor distribución en el mundo. El genotipo A es el grupo más heterogéneo y hasta ahora comprende al menos 22 subtipos (Molae, 2020); aislados de ovejas (A1, A2), cabras (A5, A7) o ambas especies (A3, A4, A6). Mientras que el genotipo B se divide en 5 subtipos aislados de ambas especies (para el caso de los subtipos B1, B2 y B5) (Michiels R. A., 2020). Este trabajo, aunado a otros permitió confirmar que la infección no es exclusiva de una sola especie, sino que de manera natural pueden ocurrir infecciones cruzadas, esto cobra relevancia en aspectos como el diagnóstico, control y prevención (Leroux, 1997).

Transmisión

Se han descrito las principales vías de transmisión; sin embargo, su importancia y alcance siguen sin estar claros. La transmisión vertical de LvPR se refiere a la transmisión del virus a la progenie o descendencia durante la gestación (transplacentaria), durante el parto o durante la lactancia. El hecho de si es frecuente la infección intrauterina se ha abordado en varios estudios y es la vía de

transmisión más controvertida. Algunos autores aportan evidencia a favor de esta vía de transmisión, mientras que otros reportan hallazgos negativos (Furtado Araújo, y otros, 2020). Algunos estudios han evaluado *in vitro* la capacidad del virus de infectar productivamente células epiteliales del oviducto, sin embargo, hasta la fecha no hay reportes de que esto suceda *in vivo*. Por otro lado, algunos autores han informado de su incapacidad para detectar el virus en embriones de oveja Texel infectados experimentalmente. Otros han reportado el aislamiento de lentivirus ovino de un feto de 100 días de edad extraído por cesárea de una oveja infectada naturalmente y en la actualidad se han realizado estudios en los se caracteriza la infección por LvPR en ovejas y cabras, así como sus crías por medio de técnicas de biología molecular, serología y aislamiento viral; en estos estudios se han realizado análisis de secuencias virales que han permitido identificar en las crías y sus madres el origen parental de los virus y demostrar la transmisión por esta vía (Pépin, 1998). En general, los datos sugieren que puede ocurrir una infección transplacentaria, aunque la contribución relativa de esta vía de transmisión a las tasas de infección es incierta. Se considera que la vía más importante de transmisión vertical es la lactogénica a través de la ingestión de calostro y leche de madres infectadas a su descendencia. Existe evidencia de que la transmisión lactogénica es más significativa en los pequeños rumiantes que en los primates debido a la mayor permeabilidad del tracto digestivo de los pequeños rumiantes en las primeras 24 horas posteriores al parto lo que permite que los viriones y las células infectadas sean absorbidas por el intestino del cordero (Kalogianni AI, 2020).

La transmisión horizontal de LvPR incluye las rutas ambiental, mecánica e iatrogénica y se refiere principalmente a la transmisión a través de secreciones respiratorias. Los pulmones son el principal órgano diana de MVV en el tracto respiratorio. En los pulmones, el virus infecta a los monocitos, macrófagos y células dendríticas lo que conlleva a una posible transmisión horizontal a través de las secreciones respiratorias que contienen estas células. Esta ruta de transmisión es relevante en unidades pecuarias donde los encierros son prolongados y existe una

mala ventilación de los mismos. Por otro lado, el intercambio de animales vivos a través de las fronteras nacionales se considera una causa importante de transmisión horizontal de LvPR (Peterhans, 2004). Un ejemplo claro de esto implica la introducción de la enfermedad en un país por primera vez después de la importación de animales vivos. Hay varios ejemplos en la literatura de infecciones por LvPR y en México si bien no existen estudios que respalden esta vía de transmisión es recurrente en la práctica el préstamo de sementales entre los productores, así como programas de apoyo gubernamental dónde se proporcionan hembras ovinas reproductoras.

La transmisión por vía sexual ha sido poco estudiada sin embargo ya ha sido demostrada. Existe evidencia de proliferación del virus en los genitales de carneros infectados y el virus se ha encontrado en el semen de carneros con leucocitospermia y carneros positivos para *Brucella ovis*. En otro estudio que utilizó PCR en tiempo real, se encontró ADN proviral de LvPR en el semen (desprendimiento intermitente) y el tracto genital de carneros (Ramírez H., 2009). Uno de los últimos trabajos publicados se llevó a cabo mediante la inseminación a hembras libres de LvPR con semen infectado experimentalmente a una dosis de 106 DICT50 / ml y por medio de western blot se identificó la seroconversión del 60% de las hembras inseminadas al mes de haber sido inseminadas por lo que la vía venérea potencialmente puede ser considerada como una vía de transmisión (Costa de Souza K., 2013).

Se cree que la transmisión a través de pastos contaminados es muy baja incluso durante las etapas clínicas de la enfermedad, así como la presencia del virus en el agua y el aire de los corrales con animales infectados indica que la transmisión por el aire y por el agua en las granjas no puede descartarse (Villoria M., 2013). La transmisión mecánica por agujas contaminadas con sangre es una vía teórica de infección, pero no hay estudios publicados adecuados que aborden esta cuestión.

Formas clínicas de la enfermedad

La infección por lentivirus de pequeños rumiantes se caracteriza por un período de incubación prolongado y por lo general los signos tardan varios meses o incluso años en presentarse. La infección persiste de por vida y los animales infectados son un reservorio constante de infección que en consecuencia permite que el virus persista en su hospedador. En la mayoría de los casos, la replicación del virus es lenta y el número de células sanguíneas infectadas en la circulación es muy bajo; como consecuencia la enfermedad clínica es latente o progresiva y en muchos casos, los signos clínicos no son evidentes o característicos de la enfermedad en sus etapas iniciales (Nalbert, 2020). Maedi-Visna y AEC se caracterizan por signos clínicos respiratorios, nerviosos, mamarios y articulares. La afección clínica parece depender del tropismo de las cepas de LvPR, las especies afectadas y los antecedentes genéticos de cada raza o animal. Aunque el proceso suele ser subclínico, un pequeño porcentaje de animales puede presentar algunos o todos estos signos. Habitualmente, los signos respiratorios y mamarios son predominantes en las infecciones tipo Maedi Visna, mientras que los signos nerviosos y articulares son más importantes en las infecciones tipo Artritis Encefalitis Caprina (Kalogianni AI, 2020).

Enfermedad articular

La artritis es la presentación frecuente en las infecciones de tipo AEC. Afecta a animales de entre 2 y 3 años. Las articulaciones afectadas suelen ser el carpo y el tarso por lo que el proceso se caracteriza por la cojera. Pero también pueden verse afectadas las articulaciones metatarsianas, metacarpianas y vertebrales. El proceso comienza con edema y congestión de la membrana sinovial y la cápsula de la articulación, lo que provoca que ambas estructuras se engrosen y agranden las articulaciones. Hay un endurecimiento del tejido periarticular y agrandamiento de la membrana sinovial, junto con erosiones frecuentes de las superficies articulares, que pueden incluso extenderse a la destrucción ósea. La erosión del cartílago de la articulación y el líquido sinovial pueden aparecer turbios. La membrana sinovial prolifera y en ocasiones se desprende. La fibrosis difusa de la cápsula y otras

estructuras es común y en casos graves, puede observarse necrosis tisular, a veces con calcificación distrófica y cartilaginosa y / o metaplasia ósea. Finalmente, la artrosis evoluciona a anquilosis por calcificación o fibrosis. Curiosamente, se sabe que las cabras con una respuesta de células T CD4 del tipo Th2 desarrollan artritis, pero aquellas con una respuesta mixta IgG1 e IgG2 permanecen sin signos clínicos, lo que sugiere que los anticuerpos IgG2 anti-SRLV protegen contra la inducción de la enfermedad (Pérez, 2015).

Enfermedad respiratoria

La enfermedad respiratoria es la forma clínica más común en borregos. Afecta a animales adultos mayores de 2 años, y una vez que los signos son evidentes, la esperanza de vida del animal no excede de 1 año. La primera fase de la enfermedad a menudo se pasa por alto, aunque puede empeorar por deficiencias en el manejo. Los signos clínicos respiratorios incluyen disnea y aumento de la frecuencia respiratoria, causados por la neumonía intersticial linfocítica característica. La principal lesión macroscópica es el agrandamiento pulmonar y el aumento de peso de este órgano. Los pulmones crónicamente afectados son hipertróficos, hasta tres veces el tamaño normal, redondeados, gomosos, de color amarillo grisáceo y con manchas grises focales o difusas en la superficie pleural pulmonar. Los signos clínicos se deben a una neumonía intersticial que aumenta el grosor de los tabiques alveolares y reduce progresivamente la capacidad de intercambio de aire de los pulmones afectados. Los septos interalveolares están infiltrados por linfocitos, monocitos, macrófagos y células plasmáticas, lo que contribuye al engrosamiento e hiperplasia de las fibras musculares lisas de las paredes alveolares, favoreciendo la disfunción pulmonar. A medida que avanza la enfermedad, las lesiones se vuelven fibróticas (Gomez-Lucia & Barquero, 2018)

Enfermedad mamaria

La enfermedad mamaria es la segunda forma importante tanto en ovinos como en caprinos, debido a las pérdidas económicas y la frecuencia de aparición. Esta forma clínica es común en cabras y en el caso de borregos en países de Europa.

Generalmente afecta a animales adultos de entre 3 y 5 años, pero también se ha observado en animales de 1 año. La mastitis suele ser subclínica, indurativa (conocida como ubre de madera), crónica, difusa, bilateral e indolora, con inflamación de los linfonodos mamarios. La producción de leche puede disminuir y sus propiedades macroscópicas (color y consistencia) no varían. Las lesiones solo son aparentes después del parto. La patología revela mastitis intersticial crónica caracterizada por la infiltración de células mononucleares alrededor de los acines mamarios y los conductos mamarios. Esto causa hiperplasia, vacuolización y descamación del epitelio ductal. Finalmente, la lesión se vuelve fibrótica provocando induración mamaria y estenosis del conducto lácteo (Gayo, 2019).

Enfermedad nerviosa

Si bien la forma nerviosa es muy rara en ovejas en los últimos años se han diagnosticado brotes de la infección caracterizados por lesiones en el sistema nervioso en el noroeste de España que incluyen a animales de hasta 4 meses de edad. Los signos nerviosos incluyen debilidad y ataxia de las extremidades traseras, hipermetría y parálisis que generalmente conducen a la postración de animal, aunque permanece alerta y responde a los estímulos externos. La lesión principal es la encefalitis o encefalomiелitis. La meningoencefalomiелitis crónica no purulenta, es generalmente acompañada de desmielinización. En cabras es menos frecuente que la forma articular y se caracteriza por una leucoencefalomiелitis en cabritos de 2 a 6 meses, este síndrome incluye incoordinación, ataxia de las extremidades traseras, que eventualmente puede también afectar a las extremidades anteriores y finalmente postración y parálisis (Ramírez H. R.-M., 2012).

Estos signos clínicos se pueden presentar durante 6 meses a un año, acompañados de adelgazamiento progresivo y en algunos casos, caquexia. En este punto y dependiendo de la forma clínica el animal puede morir pronto o permanecer crónicamente afectado. A pesar del alto nivel de infección en algunos rebaños las manifestaciones clínicas pueden no ser muy aparentes ya que hay muchos factores

que influyen en la patogenia. Estos incluyen la cepa viral (por ejemplos genotipos A2/A3 de LvPR), la edad, raza del animal, ruta de exposición, las posibles infecciones secundarias y las condiciones de manejo (Illius, 2020)

Respuesta inmune

Tanto la respuesta inmunológica innata como la adaptativa son inducidas por la infección de los LvPR. Los macrófagos y las células dendríticas son células importantes en el desarrollo de la respuesta inmune innata/adaptativa, actuando como células presentadoras de antígenos para la estimulación de la respuesta de células T. Por lo tanto, la infección por LvPR puede interferir en la función de estas importantes células y alterar así los tipos de respuestas inmunitarias que se inducen (Stonos, 2014).

La célula combate la infección por LvPR con una variedad de mecanismos. Una vez que el virus entra en la célula diana, las moléculas de la inmunidad innata y adaptativa inician la restricción viral por parte del hospedador. Las moléculas de la inmunidad innata, por ejemplo, el motivo tripartito 5 (TRIM5), se unen a las cápsides virales inhibiendo las etapas de integración y postintegración del ciclo del virus. Sin embargo, los retrovirus pueden contrarrestar estos mecanismos. En los rumiantes, las células $\gamma\delta T$ comprenden aproximadamente el 70% de todos los linfocitos en los animales jóvenes y son una parte importante del sistema inmunológico innato. Las cabras infectadas con CAEV tienen una proporción significativamente mayor de células $\gamma\delta T$ en comparación con las cabras sanas, lo que sugiere que estas células pueden ser importantes para controlar la infección por LvPR. Dado que las células $\gamma\delta T$ tienden a localizarse en las superficies mucosas, es posible que este tipo de células juegue un papel crucial en la limitación de la entrada de SRLV y mediar las respuestas inmunes tempranas contra estos virus (Yirsaw, 2021).

Si el virus es capaz de superar estos mecanismos de restricción, hay una fase corta de viremia. En esta etapa, hay alteraciones inmunopatológicas transitorias. Los LvPR tienen tropismo *in vivo* por monocitos, macrófagos y células dendríticas.

También pueden infectar células de la microglía, células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales de otros tejidos, y estas células pueden actuar como reservorios del virus. El linaje de monocitos / macrófagos representa un puente entre las inmunidades innatas y adaptativas contra LvPR; los cuales actúan como células presentadoras de antígeno (CPA), procesando las proteínas virales. La replicación en los monocitos y macrófagos circulantes no ocurre hasta la maduración de estas células en los órganos diana. Por lo tanto, los monocitos y macrófagos inmaduros actúan como "caballos de Troya", permitiendo que el virus escape de las respuestas inmunes celulares y humorales. Se cree que los macrófagos infectados penetran hasta la médula ósea donde pueden afectar a las células mieloides o estromales, lo que determinaría una producción continua de monocitos infectados y provocaría una infección crónica durante toda la vida del animal, aunque la médula ósea puede no desempeñar un papel destacado como reservorio de virus. Los macrófagos infectados expresan proteínas virales codificadas por *env* y *gag* en su superficie, principalmente asociadas con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El complejo de proteínas virales-MHC es reconocido por los linfocitos T estimulando la producción de interferón (I y II). Esto atrae a otras células inflamatorias al foco y en consecuencia se mantiene el ciclo de replicación viral así como la inflamación crónica. Esta inflamación crónica se vuelve progresiva y es similar en todos los órganos diana siendo responsable de las formas clínicas desarrolladas por los animales (Stonos, 2014).

En cuanto a la respuesta inmune humoral los primeros anticuerpos pueden aparecer 3 semanas después de la infección experimental y son contra p25, CA. Dos semanas después, las ovejas y las cabras sintetizan anticuerpos contra gp46 TM, p14 NC y p16 MA. En la mayoría de los casos, los anticuerpos contra gp135 SU se generan algo más tarde. Además, como sucede en la infección por VIH-1, estos anticuerpos tempranos son específicos de epítopos lineales y por lo tanto no son neutralizantes; sin embargo, estos pueden jugar un papel importante en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, así como en la opsonización. Los anticuerpos neutralizantes pueden tardar hasta 2 años en

aparecer y pueden controlar la infección del virus. Sin embargo, como sucede con el VIH-1, los epítomos de LvPR pueden mutar en respuesta a la presión de selección impuesta por las inmunoglobulinas del hospedador (Lacerenza D. G., 2006).

Por otro lado, los anticuerpos anti-Gag son de especial relevancia en el diagnóstico de la infección por LvPR. Actualmente está documentado que la respuesta de los anticuerpos derivados contra las proteínas expresadas por el gen *gag* sigue siendo detectables durante mucho tiempo, e inclusive de por vida y la reactividad cruzada entre genotipos A y B (P16-25) es aceptable ya que permite aumentar los niveles de detección de la infección en ambas especies, excepto en la fase inicial de la infección, cuando el antígeno homólogo se reconoce más rápidamente. Otros estudios han caracterizado las proteínas de matriz y cápside, en las cuales se han identificado epítomos conservados lo que permitiría discriminar serológicamente genotipos (A, B y E). Entre los antígenos virales, la proteína de matriz (MA) es una proteína estructural de 15 a 17 kDa codificada por el gen *gag*. La reactividad del anticuerpo contra MA es detectable en animales infectados durante la etapa temprana de la infección, después del inicio de la respuesta específica anti-CA (cápside). Representa un marcador útil de infección ya que en estudios en los que se han realizado ensayos de serología en los se prueban subunidades de la proteína (MA) frente a sueros de diversos rebaños infectados (incluyendo cepas tipo A y B) muestran reactividades aceptables lo que indica que existen diversos epítomos distribuidos a lo largo de la molécula. Por lo que tanto esta proteína como la de cápside son opciones a considerar en el diseño de pruebas de detección serológica (Lacerenza D. G., 2006).

Diagnóstico

El diagnóstico precoz y eficaz de la infección por LvPR es un parámetro crítico para el control y erradicación de la infección. Éste se basa en la detección de anticuerpos contra las proteínas del virus y en las últimas dos décadas el genoma viral (Kalogianni AI, 2020).

Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)

Debido a la persistencia de anticuerpos circulantes, el diagnóstico de la infección por LvPR se basa más comúnmente en pruebas serológicas. En un principio la Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) descrita por primera vez a finales de la década de 1970 era ampliamente utilizada. En su diseño contiene las dos proteínas estructurales principales, es decir, la proteína central p25 y la glicoproteína principal de la envoltura gp135, fue una técnica de elección debido a la alta especificidad y bajo costo. Varios estudios demostraron que un ensayo IDGA con CAEV gp135 es más sensible que un ensayo IDGA con CAEV p25. Los ensayos de radioinmunoprecipitación revelaron que las cabras infectadas con CAEV tienen títulos de anticuerpos mucho más altos contra gp135 que contra p25, enfatizando la necesidad de usar el antígeno apropiado en IDGA para lograr una alta sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos contra cepas tipo CAEV o MVV. En general la interpretación de la prueba que evalúa la unión del antígeno con los anticuerpos del animal suele ser subjetiva por lo que se requiere experiencia para su interpretación (Kalogianni AI, 2020).

Western blot (WB)

El western blot es una prueba de laboratorio que se utiliza como confirmatoria, la cual detecta anticuerpos en suero que reconocen proteínas virales. En general, WB es más sensible que ELISA, pero resulta una técnica de diagnóstico laboriosa y con menor rendimiento. La reactividad cruzada con proteínas celulares inespecíficas también es un problema (Pépin, 1998).

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

El formato ELISA comenzó a cobrar relevancia por su realización e interpretación relativamente fáciles. A lo largo del tiempo los diseños y los recursos disponibles para su fabricación han ido cambiando en función de las tecnologías desarrolladas y las variantes antigénicas del virus (Gomez-Lucia & Barquero, 2018).

Los ELISA's de primera generación utilizaban preparaciones parciales o altamente purificadas de antígenos de virus completos y conjugados policlonales, los cuales

favorecían resultados falsos positivos lo que conllevaba a una alta dilución de los sueros para evitar reacciones inespecíficas. Posteriormente los ensayos de segunda generación incluyeron formatos con anticuerpos monoclonales y un método de doble sándwich, los cuales mejoraron la especificidad y confiabilidad. Se han desarrollado numerosas proteínas recombinantes desde 1990, tras la localización inicial de regiones inmunodominantes en las proteínas Env y Gag expresadas en *Escherichia coli* y/o en células de insecto mediante el uso de baculovirus recombinantes. Sin embargo, incluso si los resultados obtenidos con proteínas recombinantes resultan ser más sensibles, algunas reacciones inespecíficas permanecen debido principalmente a los métodos de purificación de estas proteínas; actualmente estos inconvenientes se han superado mediante sistemas de purificación más eficientes (Pépin, 1998).

Los llamados ensayos de tercera generación incluyen pruebas serológicas que tiene como antígeno oligopéptidos sintéticos que corresponden a epítomos inmunodominantes de proteínas como la gp46 TM ó p25 CA, Una ventaja que ofrecen este tipo de ELISA's es que el antígeno al ser producto de una síntesis química tiene una mayor pureza y mejora aspectos de sensibilidad; por otro lado, se pueden combinar diferentes péptidos que correspondan a epítomos de las proteínas estructurales del virus, esto permite contrarrestar el factor de la variabilidad genética y asegurar un diagnóstico más certero en los rebaños (Lacerenza D. G., 2006).

Hay disponibles varios tipos de ELISA comerciales, en los que se utilizan diversos diseños. La eficiencia de detección de estas pruebas puede variar dependiendo del genotipo viral que utilicen, así como del uso de virus completos y purificados, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos (Grego E. P., 2002). Además, se han desarrollado métodos de ELISA competitivo o indirecto. Por otro lado, se ha observado que la heterogeneidad antigénica de los lentivirus de pequeños rumiantes complica aún más la situación diagnóstica a nivel de campo. Como se mencionó con anterioridad, los epítomos inmunodominantes de las proteínas de

matriz y antígenos de la cápside son variables entre cepas similares a VMV (A1-22) y las similares a VAEC (B1 y B2) independientemente del animal del que se han aislado, lo que sugiere que tanto las ovejas como las cabras pueden ser serológicamente reactivas contra la infección por LvPR de una manera específica. Las pruebas de diagnóstico actualmente disponibles se basan en un formato ELISA de una sola cepa, que utiliza antígenos de virus completos, recombinantes y sintéticos. Estas se emplean generalmente en ambas especies, ya que se han encontrado epítomos de reacción cruzada en todas las proteínas estructurales. Sin embargo, la variabilidad antigénica mencionada aún no se ha tenido en cuenta (Nardelli, 2020).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La seroconversión puede llevar mucho tiempo aunado al hecho de que algunos animales infectados pueden no desarrollar una respuesta de anticuerpos detectable. Además, dado que los animales serológicamente positivos pueden resultar negativos transitoriamente, se requieren nuevos métodos de diagnóstico para detectar la presencia de componentes virales en células o tejidos. En los últimos años, la PCR conocida por su alta sensibilidad se ha aplicado al diagnóstico complementario de la infección por lentivirus en ovejas y cabras para detectar ADN y ARN en sangre y tejidos periféricos (pulmones, leche, sangre periférica, glándula mamaria y membranas sinoviales). Como todas las pruebas de diagnóstico presenta retos a la hora de hacerla una técnica eficiente que detecte a la mayoría de animales infectados; en ese sentido es importante desarrollar cebadores que consideren los subtipos presentes en la regiones geográficas donde esta se realice, si bien diversos estudios han tratado de diseñar cebadores universales considerando regiones conservadas de algunos genes como *gag*, *pol* o las regiones de la *LTR* lo que difícilmente se logra debido a la alta heterogeneidad genética (recordemos que existen alrededor de 30 subtipos distribuidos en 5 genotipos). Por otro lado, una desventaja que presenta el diagnóstico molecular es que a lo largo de la infección de los animales, la carga proviral fluctúa siendo muchas de las veces indetectable; respecto a técnicas de

diagnóstico serológico la PCR resulta ser más costosa. La ventaja más significativa de la PCR es su capacidad para detectar la infección antes de la seroconversión. Sin embargo, la PCR no es un método de referencia y se sugiere que se combine con pruebas serológicas para superar el problema de la especificidad selectiva asociado con la falta de cebadores universales fiables. Los métodos anidados de PCR y PCR en tiempo real (RT-PCR) aumentan la sensibilidad y especificidad, sin embargo, su uso es menos frecuente o es usada con fines de investigación (Reczyńska D, 2018).

Control y prevención

Actualmente no existe un tratamiento ni una vacuna eficaz contra la infección por LvPR. A lo largo de estos años el diseño de vacunas ha explorado diferentes aristas para obtener resultados aceptables. Las primeras opciones contemplaban vacunas atenuadas y de subunidades, pero ninguna de ellas demostró ser eficaz para prevenir infecciones virales. Los principales obstáculos para el desarrollo de una vacuna eficaz incluyen la inducción de altos títulos de anticuerpos contra la variación genética de las cepas virales y sus mutaciones continuas y la evidencia de que la producción de anticuerpos neutralizantes específicos contra LvPR sea eficaz en la prevención de la enfermedad. Los esfuerzos de investigación actuales para el desarrollo de una vacuna efectiva incluyen pseudovirus / partículas virales, virus recombinantes que portan genes de cepas de LvPR y plásmidos desnudos que portan genes de LvPR más la adición de factores que mejoren las respuestas inmunes innatas. Sin embargo, la efectividad de estas estrategias alternativas no ha sido suficientemente validada y se consideran inapropiadas para uso extensivo (Kalogianni AI, 2020).

En consecuencia, actualmente el eje principal del control de la enfermedad se sustenta en la identificación de rebaños e individuos infectados. Esto con la finalidad de disminuir prevalencias de la infección hasta poder certificarse como un hato libre de la misma. Es por ello que en estrategias de control de la enfermedad se sugiere el uso de dos o más pruebas; ya sean serológicas o

moleculares que permitan detectar con seguridad los animales positivos (Illius, 2020). Otro punto clave es el manejo del rebaño para prevenir la transmisión viral y la eventual eliminación de animales infectados. La ruta de transmisión más importante es la vertical a través del calostro y la leche infectados desde las madres a su descendencia, por tanto, se sugiere la separación de las crías inmediatamente después del parto y la lactancia artificial con calostro de bovino o de cabras y de borregas no infectadas o calostro tratado térmicamente (56 °C durante 60 min). Por otro lado, el sacrificio temprano de los animales una vez que presenta la signología y el reemplazo de los mismos con ejemplares libres de la infección para así disminuir gradualmente la prevalencia de infección. La compra y movilización de animales debe ser más rigurosa con certificados libres de la infección, así como una cuarentena y pruebas de diagnóstico posteriores. Las medidas antes mencionadas deben incluir ambas especies cuando hay rebaños mixtos; los programas de erradicación han fracasado debido a la omisión de alguna de las dos especies (Reina R. B., 2009).

Lentivirus de pequeños rumiantes en México

La importancia económica de esta infección ha sido ampliamente discutida, ya que la enfermedad clínica con pérdidas directas relacionadas por la infección comúnmente sucede en países como España, Francia, Italia y Suiza, dónde los animales desde jóvenes presentan cuadros nerviosos y artríticos. En estos países se ha demostrado una baja en la producción de leche, peso al nacimiento de corderos, peso al destete y aumento en la tasa de reemplazos (Gomez-Lucia & Barquero, 2018). En México, la infección subclínica es la que mayormente predomina en los rebaños del país y en menor proporción se identifican animales con cuadros de artritis o mastitis de tipo indurativa en cabras. Mientras que en borregos hasta el momento no se ha evidenciado un cuadro clínico sugerente de la enfermedad, en parte se debe a que su ciclo productivo por lo regular termina a temprana edad (8 meses) (González Méndez, 2020).

Los primeros estudios realizados en el país comenzaron en la década de los 80, empleando técnicas de serología; desde entonces la frecuencia de infección en los estudios realizados ha ido en aumento. Los primeros reportes que incluyen biología molecular comenzaron a finales de los 90 mediante aislamiento y PCR de cabras que presentaban signología clínica (Daltabuit Test, 1999). En 2011 Ramírez y colaboradores secuenciaron el primer genoma completo aislado de un caprino de un rebaño mixto del Estado de México que fue agrupado en el genotipo B1 y trabajos recientes han reportado la presencia de los subtipos A1 y A2 tanto en borregos como en cabras de la República Mexicana (Acevedo Jiménez, 2021). La publicación más reciente corresponde al primer reporte de caso de un borrego con signología característica de lentivirus en el Estado de Sonora lo que refuerza la idea del aumento en la prevalencia de la infección y la necesidad de comenzar estrategias de control a nivel nacional en el país (Borquez Cuevas, 2021).

Justificación

En México la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes es reconocida oficialmente como enfermedades endémicas en cabras desde los noventa y en borregos desde 2016; actualmente estudios filogenéticos evidencian genotipos B y A en rebaños del país. Para realizar el diagnóstico por serología se han utilizado kits de importación que utilizan como antígeno el derivado de monoestirpes, principalmente del genotipo B; no obstante, es posible generar pruebas diagnósticas que puedan ser más específicas en borregos y cabras infectados con un genotipo A, lo que permitiría aumentar la eficiencia en la detección, así como el abaratamiento en los costos de diagnóstico.

Hipótesis

El uso de péptidos sintéticos y/o el de la proteína recombinante de matriz (genotipo A2) en el desarrollo de un ELISA indirecto, permitirá mejorar la detección de animales infectados con esta variante, incrementando la especificidad de detección.

Objetivo general

- ✓ Usar diferentes antígenos (proteínas recombinantes y péptidos sintéticos) para desarrollar una prueba diagnóstica en formato ELISA que permita identificar borregos y cabras infectados con LvPR del genotipo A2.

Objetivos particulares

- Diseñar péptidos sintéticos derivados de las proteínas codificadas por el gen de la envoltura de LvPR, para utilizarlos como antígenos en pruebas de ELISA.
- Elaborar y expresar una proteína recombinante derivada de la matriz de LvPR genotipo A2, para utilizarla en una prueba de ELISA.
- Estandarizar ELISA's para la detección de la infección por LvPR genotipo A2, evaluando plasmas de rebaños en los que previamente se ha identificado la presencia de este genotipo.

Material y métodos

Muestras

A partir de un banco de muestras de ovinos disponibles en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES-Cuautitlán se seleccionaron 442 plasmas entre positivos y negativos a la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes. El criterio de selección se basó en los resultados de pruebas serológicas que se realizaron previamente con dos kits comerciales: VRMD®, el cual es un ELISA de tipo competitivo de manufactura americana y que en su diseño utiliza como antígeno la proteína de superficie (gp135) del gen de la envoltura viral de LvPR; el segundo, ERADIKIT® de procedencia italiana, utiliza como antígenos péptidos sintéticos de proteínas de matriz, cápside y transmembrana. Aunado a lo anterior se tomaron en cuenta trabajos previos realizados por el grupo de trabajo en el que se lograron secuenciar ovinos positivos por PCR en diferentes rebaños (uno o más animales por rebaño) y dichas secuencias fueron clasificadas de acuerdo a análisis filogenéticos en genotipo A. En el caso particular del núcleo de muestras provenientes de cabras infectadas con el genotipo A, en algunos de estos rebaños también se lograron obtener secuencias que correspondieron al genotipo B. En las tablas 1 y 2 se enlista el total de animales seleccionados y la procedencia de los mismos. El grupo incluye animales mayores de 6 meses de edad sin distinción de sexo y raza.

Tabla 1. Población de ovinos provenientes de rebaños con información de la infección de LvPR del genotipo A. seleccionados por región y con resultados positivos en dos técnicas de ELISA comerciales.

Estado	Total de animales	VMRD (+)	ERADIKIT (+)
BCS	13	9	5
Edo. de Mex.	119	71	52
Hidalgo	96	19	14
Sonora	36	6	10
Veracruz	40	10	7

Total	304	115	88
-------	-----	-----	----

Tabla 2. Población de caprinos provenientes de rebaños con información de la infección de LvPR del genotipo A, seleccionados por región y con resultados positivos en dos técnicas de ELISA comerciales.

Estado	Total de animales	VMRD (+)	ERADIKIT (+)
BCS	10	0*	0*
Coahuila	14	0*	0*
Edo. de Mex.	16	13	13
Guanajuato	2	0*	0*
Querétaro	57	53	40
Sinaloa	7	0*	0*
Sonora	9	9	9
Veracruz	18	0*	0*
Total	133	75	62

*Debido a que la mayoría de las cabras resultaron seropositivas, se incluyó un núcleo de muestras seronegativas.

Diseño de péptidos sintéticos

Para la realización del diseño de los péptidos sintéticos se hizo un consenso de las secuencias disponibles en GenBank de los genotipos A, principalmente de los subtipos encontrados en estudios previos por el grupo de trabajo (A2) y mediante herramientas bioinformáticas (BioEdit Sequence Alignment) con las que se hicieron alineamientos para elegir las secuencias más conservadas en aminoácidos. Una vez elegida la secuencia se analizaron mediante diversos algoritmos con el programa Predicting Antigenic Peptides el cual toma en cuenta aspectos de hidrofiliidad (Parker Hydrophilicity Prediction) y epítomos lineales para linfocitos B con base en la hidrofiliidad y flexibilidad (Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale). Una vez que se obtuvieron algunas propuestas de péptidos correspondientes a las glicoproteínas de la envoltura (transmembrana y proteína

de superficie) se compararon con las propuestas de otros autores con la finalidad de asegurar que no estuvieran previamente descritas. Es por ello que solo se eligieron para síntesis dos péptidos de la glicoproteína de superficie.

Estandarización del ELISA de péptidos

A través de la empresa PROBIOTEK© se realizó la síntesis de los péptidos y una vez en el laboratorio se pesó 1 miligramo y se diluyó en 500 µl de buffer de carbonatos para utilizarlo como stock.

La selección de plasmas para las pruebas de estandarización se realizó tomando en cuenta las densidades ópticas obtenidas en borregos infectados de diferentes rebaños evaluados por los dos kits de ELISA comerciales.

Para ambos péptidos se evaluaron diferentes concentraciones de antígeno, plasma y conjugado, las cuales se muestran a continuación (figura 1).

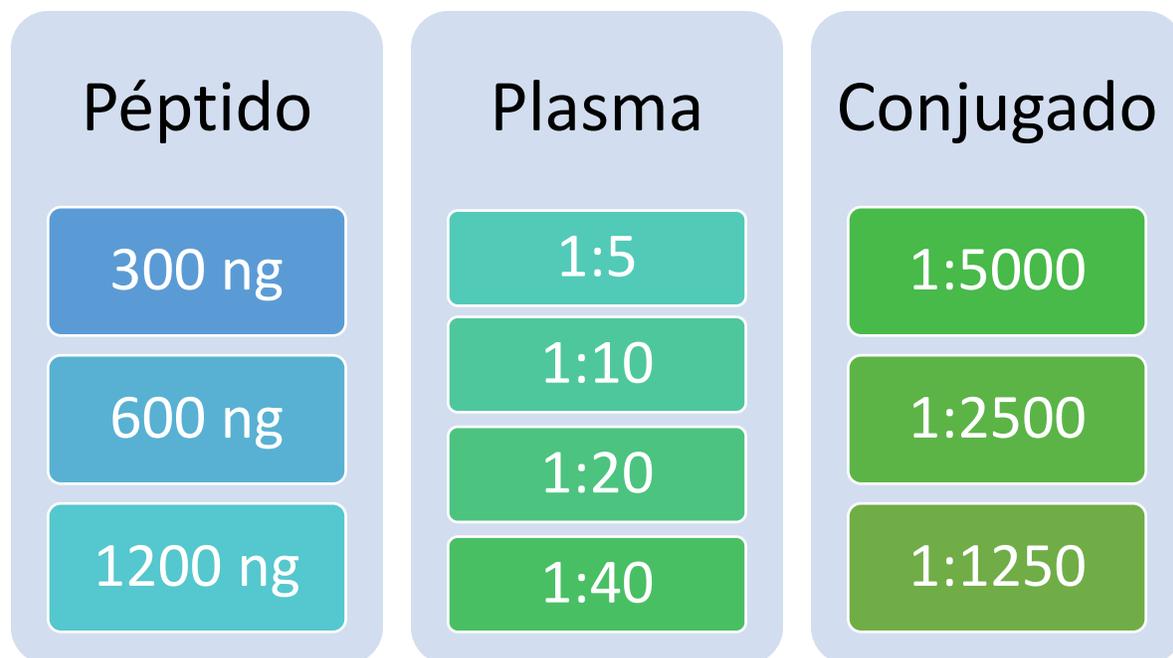


Figura 1. Concentraciones utilizadas de péptido, plasma y conjugado en la prueba de ELISA basada en el uso de péptidos sintéticos.

Adicionalmente se midió la reactividad de los plasmas probados a diferentes tiempos (20, 30 y 40 minutos) una vez agregado el sustrato (ABTS).

De manera general el ensayo de ELLISA se realizó la sensibilización antigénica en una placa de 96 pozos (Polysorp, Nunc® Brand Products) con el péptido diluido en buffer de carbonatos (50 µl); dos pozos con antígeno y uno sólo con buffer para cada plasma a probar y se dejó incubar toda la noche (14-16 hrs) a 37°C. Transcurrido el tiempo se realizaron dos ciclos de lavado con PBS + tween y posteriormente la placa se bloqueó con 150 µl de caseína al 2.5% por una hora a 37°C. Se realizaron tres ciclos de lavado para después agregar 100 µl de plasma diluido 1:10 en PBS + caseína al 1.25% y se dejó incubar una hora a 37°C. Pasados tres ciclos de lavado la placa se incubó con proteína G conjugada con peroxidasa diluida 1:2500 con caseína al 1.25% (100 µl) por otra hora. Por último, se realizaron dos ciclos de lavado con PBS + Tween y dos con PBS para posteriormente agregar 100 µl de cromógeno ABTS e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido el tiempo se obtuvo por espectrofotometría la densidad óptica de cada pozo leída a una longitud de onda de 405 nm; para el cálculo final de la densidad óptica (D.O.) neta se hizo el promedio de los dos pozos con antígeno menos la D.O. del pozo sin antígeno.

Construcción y expresión de la proteína recombinante de matriz de LvPR (p16)
Para lograr la expresión de la proteína p16 se decidió sintetizar la secuencia nucleotídica de la proteína de matriz a través de la empresa UNIPARTS® a partir de una secuencia disponible en el GenBank (tabla 3) (No. de acceso KC155804.1) de un genotipo A2 de origen canadiense.

Tabla 3. Secuencia en aminoácidos de la proteína de matriz de LvPR genotipo A2.

Secuencia en aminoácidos (p16) de LvPR genotipo A2
TEGNCLWALKTIDFIFEDLKSEPWTLTKMYTIWERLKQVTPEETSKREFASLQATLACIMCSQM GMKPETVQAARGIMSMKEGLQESKETKEKTVEQLYPNLEKHKEVY

Se diseñaron iniciadores que flanqueaban la secuencia en nucleótidos de dicha proteína; el diseño incluyó en el caso del iniciador reverso la adición de un codón de paro; el producto esperado fue de 429 pb (tabla 4).

Tabla 4. Iniciadores diseñados para la amplificación de la proteína de matriz de LvPR genotipo A2.

Primer	Secuencia
Fw	GCGAAGCAAGGCTCAAAGGAGAA
Rv	GAGAAGCACAAAGGAAGTATACTAGTAGCGC

En el laboratorio de virología II del INIFAP el gen sintetizado fue resuspendido siguiendo las instrucciones del fabricante y se empleó directamente como inserto para la clonación en el vector pJET, este tiene como característica un sistema de selección positiva (pJET1.2 / romo). El vector contiene un gen el cual codifica una enzima de restricción letal que se interrumpe por la inserción de un fragmento de ADN en el sitio de clonación. Como resultado, solo las células bacterianas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias. Esta selección positiva acelera drásticamente el proceso de selección de colonias y elimina pasos adicionales necesarios para la selección (colonias azules / blancas).

Una vez seleccionadas las colonias se extrajeron los plásmidos con el kit comercial FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwán) siguiendo las instrucciones del fabricante y se evaluó la integridad de los mismos mediante un gel de agarosa.

Una vez observados los plásmidos en el gel se realizó la PCR con los cebadores diseñados previamente. Para establecer las condiciones adecuadas de alineamiento se realizó la estandarización mediante gradientes de temperatura, las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones establecidas para la PCR LvPR-p16A.

Agua grado biología molecular	Desnaturalización inicial 95°C: 5 min (1 ciclo).
PCR mix	Desnaturalización 95°C: 30 seg.
Iniciadores: 10 mM de c/u	Hibridación 64 °C: 30 seg. } 30 ciclos
Plásmido pJet-p16: dilución 1:20	Extensión 72 °C: 30 seg. }
Volumen de reacción: 50 µl	Extensión final 72 °C: 30 min (1 ciclo).

Subclonación en el vector Champion-pETSUMO

Se seleccionó el plásmido número uno (figura 4) para repetir la PCR con la finalidad de aumentar el volumen de reacción y posteriormente purificar directamente con el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwán) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado se analizó en una electroforesis de agarosa y se cuantificó de manera relativa en comparación con el marcador de pares de bases para lograr la adecuada ligación.

Para el ligado al vector de expresión se utilizó una relación molar aproximada 1:3 (una parte de vector por tres de inserto), se incubó a temperatura ambiente toda la noche y posteriormente se congeló a -20°C hasta su uso. En la siguiente tabla (tabla 6) se especifican los componentes.

Tabla 6. Reactivos utilizados para ligar al vector de expresión Champion-pETSUMO.

Componente	Cantidad
Buffer de ligación	1 µl
Vector	2 µl
Inserto (1:3)	2 µl
Agua	4 µl

Ligasa	1 μ l
Total	10 μ l

El producto del ligado (vector + inserto) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* One Shot Top 10 (Invitrogen). Las células competentes se prepararon acorde al método de Cohen et al. (1972) de la siguiente manera; 5 ml de un precultivo de medio LB de células de *E. coli* One Shot Top 10, crecido 37 °C por 16 h, se usó para inocular 50 ml de medio LB el cual se incubó hasta una densidad óptica (D.O.) de 0.35 UA a 600 nm. El cultivo se pasó a un tubo de 50 ml y se colocó en hielo por 10 min. Las células se recuperaron por centrifugación a 4100 rpm por 10 min a 4 °C, posteriormente se eliminó el sobrenadante y el tubo se colocó en posición invertida para eliminar todo el medio. El paquete celular se re-suspendió en 15 ml de una solución fría de MgCl₂-CaCl₂ (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂). Las células se recuperaron por centrifugación, se eliminaron las trazas de solución del paquete celular y se resuspendieron en 1 ml de CaCl₂ 0.1 M frío. Posteriormente, 200 μ l de células competentes se utilizaron para cada transformación. Se les adicionó el vector en un volumen no mayor a 10 μ l y menos de 50 ng de ADN de transformación. La mezcla se colocó en hielo por 30 min y se llevó a choque térmico a 42 °C por 90 segundos exactamente, después se colocó en hielo de 1 a 2 min. Se adicionaron 800 μ l de medio LB y se incubó a 37 °C por 1 hora con agitación moderada. Una vez transcurrido el tiempo de recuperación se transfirieron 200 μ l de medio a cajas de agar LB + antibiótico y se crecieron a 37 °C por 16h.

Las transformantes positivas que aceptaron el vector (encerradas en marcador color naranja; figura5) fueron seleccionadas (16 en total) picando 1 sola colonia que fue inoculada en 5 ml de medio LB con antibiótico (100 μ g/ml) e incubada toda la noche a 37 °C. Posteriormente se extrajeron los plásmidos con el kit FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwán) y se realizó la PCR para corroborar la inserción del vector.

Para confirmar que los plásmidos tuvieran el inserto con la orientación correcta, se realizó una PCR utilizando los iniciadores Fw SUMO (incluido en el kit comercial) y el Rev-p14A, el cual está referido en la tabla 7 (figura 6) obteniendo un producto de 539 pb.

Tabla 7. Iniciadores utilizados para corroborar el sentido correcto del inserto generado.

Nombre	Secuencia	Tamaño del producto
Fw SUMO	5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3'	539 pb
Rv LvPR p16 A	5'-GAGAAGCACAAGGAAGTATACTAGTAGCGC	

Se seleccionaron dos colonias que contenían el plásmido (p1 y p2) para las pruebas de expresión, las cuales se sembraron en placas de agar LB + kanamicina a 37 °C por 16 horas.

Expresión de la proteína p16A en células *E coli* BL21

Una vez crecidas en agar LB se picaron tres colonias que incluían cada uno de los plásmidos (p1 y p2) para inocular 10 ml de medio líquido LB + 25 µl de kanamicina en tubos cónicos de 50 ml y se dejaron crecer por aproximadamente 30 minutos hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.5 UA a 600 nm para su inducción con IPTG 1mM y dejar incubar a 18 horas, 37 °C en agitación a 250 rpm.

Una vez transcurrido el tiempo los tubos cónicos se centrifugaron a 12,000 rpm por un minuto, se desechó el sobrenadante y se colectaron los pellets. Antes de este paso se tomaron 200 µl de cada cultivo para agregar buffer reductor y realizar la evaluación visual mediante geles de SDS-PAGE así como por western blot. Una característica de las proteínas recombinantes expresadas mediante el vector pET-

SUMO es que en su construcción contiene una etiqueta de histidinas la cual se utiliza para realizar la inmunodetección por medio de western blot.

Purificación de la proteína p16A

El escalamiento se realizó induciendo un cultivo de 100 ml siguiendo los pasos antes mencionados. Una vez transcurrido el tiempo se obtuvieron 500 microlitros del cultivo en dos microtubos de 1.5 µl para su análisis en geles de SDS-PAGE y western blot. Posteriormente se distribuyó el cultivo en 5 tubos cónicos de 50 ml (20 ml en cada uno de ellos) y se centrifugó 15 minutos a 7000 rpm. Pasado el tiempo se desechó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 1ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, una vez resuspendidas se aforó a 300 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 para realizar el lisado de células por medio del homogeneizador Gaulin (Manton-Gaulin, EUA) durante 15 minutos; transcurrido el tiempo se colocó el total del lisado en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugó a máxima velocidad por 20 minutos, el sobrenadante y los pellet se recuperaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso; de las dos fases también se tomaron muestras para ser evaluarlas.

Dado que la mayor concentración de proteína se observa en la fase soluble se procesó todo el sobrenadante del lisado celular; para ello se añadió sarcosyl al 4% quedando un volumen final de 300 ml.

Purificación de la proteína p16A por cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC).

La purificación de la proteína se realizó mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC); ésta se llevó a cabo manualmente en columna fija de sefarosa.

Se activó y sanitizó la columna para la eliminar de cualquier remanente que ésta contuviera y que pudiera dañar el paso y afinidad de la muestra a purificar. La activación de la columna consta del paso de soluciones por la misma en el siguiente orden:

-Agua destilada filtrada/4 volúmenes de columna

- EDTA 0.2 M/1 volumen de columna
- NaOH 0.5 M/10ml
- Agua destilada filtrada/4 volúmenes de columna
- Cloruro de níquel 0.2 M/1 volumen de columna
- Agua destilada filtrada/6 volúmenes de columna
- Solución de equilibrio (Tris-HCl 50 mM pH 8)/6 volúmenes de columna.

La muestra soluble ya tratada fue ajustada a pH 8 y filtrada por 0.45 μ m, posteriormente se pasó la muestra en la columna a un flujo controlado de 3 ml/min. En el transcurso del paso de la muestra, se recolectó 1 ml de muestra con la etiqueta "no pegado". Después se pasó por la columna la solución de lavado dónde nuevamente se colectó 1 ml con la leyenda "lavado", finalmente se pasó la solución de lavado (12 ml en total) y se fueron colectando en 12 tubos de 1 ml cada uno. Con la finalidad de evaluar cuanta proteína podía ser purificada se realizaron dos ensayos con 20 y 35 ml de muestra en la columna.

Posterior a la purificación se realizó la diálisis del purificado para eliminar el remanente de sales que pudiera contener; se colocó dicha muestra en una membrana de celulosa, ésta se colocó en buffer Tris-HCl 5 mM pH 7.5 con agitación a 70 rpm durante 24 hrs. (se realizaron 3 cambios de buffer Tris cada hora). Transcurrido el tiempo la proteína se cargó en un gel de SDS-PAGE y almacenó hasta su uso a -20 °C.

Cuantificación de la proteína p16A por el método de Bradford

Usando albúmina a una concentración conocida (2 mg/ml) como estándar se preparó una curva patrón en el siguiente orden de diluciones:

Tabla 8. Curva patrón para la técnica de cuantificación por el método de Bradford.

<i>Tubo</i>	Estándar (stock albúmina/ μ l)	Agua destilada (μ l)
1	40	760
2	20	780
3	10	990
4	500 μ l del tubo 3	500
5	500 μ l del tubo 4	500
6	0	1000

Posteriormente, en celdillas limpias y sin rayaduras, se colocó 150 μ l del reactivo de Bradford más 150 μ l de cada tubo (se tomó por duplicado para disminución de errores). Para cuantificar la proteína se tomaron directamente más los 150 μ l de reactivo. La mezcla se dejó en incubación a temperatura ambiente por 5 min. Se llevaron a lectura en espectrofotómetro, en modalidad Bradford (595 nm) y se leyeron por duplicado. Los resultados obtenidos se graficaron (figura 2) la concentración de albúmina vs la absorbancia y se realizó una regresión lineal para corregir los datos experimentales, posteriormente se interpoló la absorbancia de la muestra para conocer la concentración de la proteína quedando de la siguiente manera.

$$x \frac{0.59 - 0.2913}{0.0072}$$

$$x = 41.5 \mu g/ml$$

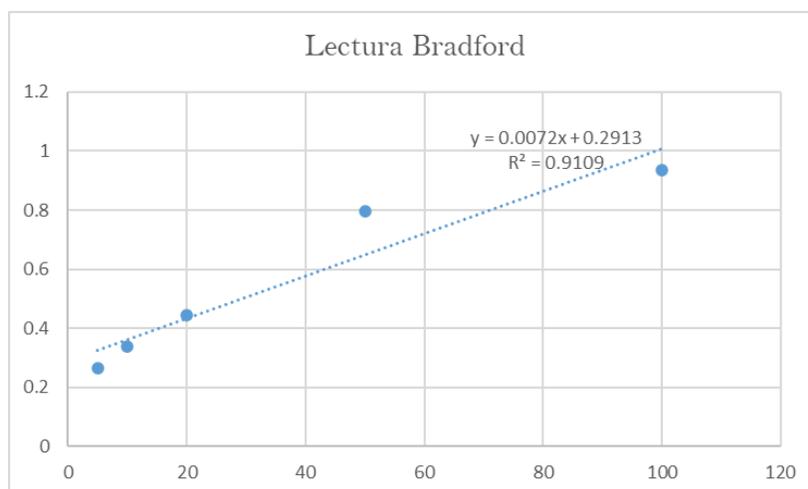


Figura 2. Gráfica de la cuantificación por espectrofotometría de la concentración de albumina.

Estandarización del ELISA p16A.

En el laboratorio de virología de la FESC se comenzó la estandarización del ELISA-p16A, al tener poca cantidad de proteína y basado en la experiencia previa de otros protocolos estandarizados en el laboratorio, se decidió comenzar evaluando tres sueros con características definidas (suero 1: positivo únicamente a ERADIKIT (ya que en su diseño contiene epítomos de ambos genotipos y VMRD únicamente genotipo B), suero 2: positivo a ambas técnicas y con información de secuencia de LvPR y suero 3: negativo a todas las pruebas comerciales) dos concentraciones de proteína (400 y 200 ng), concentración de plasma (1:10, 1:20 y 1:40) y dos diluciones de conjugado (1:2500 y 1:1250) fueron utilizadas.

Posteriormente se realizó un segundo ensayo dónde se evaluaron 10 sueros diferentes (tabla 9) teniendo como variante la concentración de proteína y la dilución de plasma (400 ng/1:20 y 200 ng/1:10).

Tabla 9. Plasmas utilizados para la estandarización del ELISA-p16.

Animal	VMRD	ERADIKIT	Secuencia
1) 0001	(-)	(+)	A
2) 8981	(-)	(+)	
3) 55320	(-)	(+)	
4) 32	(-)	(+)	
5) CR104	(-)	(+)	A
6) 9	(-)	(+)	
7) 10	(-)	(+)	
8) 14	(-)	(+)	
9) 18	(-)	(+)	
10) 20	(-)	(+)	

Una vez evaluadas las condiciones en estos dos escenarios se determinó probar una tercera placa con condiciones definidas (tabla 10) y una población heterogénea de plasmas (figura 3).

Tabla 10. Condiciones para el ELISA-p16A.

Concentración de antígeno por pozo	200 ng
Dilución del plasma	1:10
Dilución del conjugado	1:2500
Tiempo de lectura	30 minutos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.961	2.807	0.18	1.085	1.124	0.12	0.44	0.396	0.299	0.183	0.182	0.139
B	2.66	2.701	0.175	1.244	1.133	0.141	0.649	0.705	0.129	0.15	0.168	0.112
C	2.836	2.456	0.105	0.854	0.942	0.202	1.174	0.976	0.15	0.996	1.029	0.126
D	0.302	0.248	0.095	0.85	0.834	0.126	0.153	0.151	0.096	0.143	0.138	0.101
E	1.434	1.092	0.146	0.616	0.538	0.358	0.282	0.28	0.165	0.181	0.162	0.105
F	0.891	0.612	0.092	0.764	1.043	0.153	0.124	0.136	0.089	0.593	0.625	0.119
G	0.883	1.019	0.149	1.553	1.678	0.201	0.209	0.227	0.172	0.255	0.227	0.155
H	0.814	0.665	0.151	1.233	1.186	0.161	0.26	0.274	0.145	2.105	2.219	0.177

Negativa a VMRD
Positiva a ERADIKIT

Genotipadas por PCR GAG A

Negativas en ambas pruebas

Positivas en ambas pruebas de serología

Figura 3. Población seleccionada para la estandarización del ELISA-p16A, en la tabla se observan las densidades ópticas obtenidas en dicha prueba.

Una vez obtenidos estos resultados se seleccionaron 5 sueros positivos (algunos de esto animales tenían identificado el genotipo infectante (A2) por PCR-secuenciación) y 5 sueros negativos para realizar dos mezclas y hacer un último ensayo probando las diferentes condiciones (figura 4) y tiempo de lectura dichos resultados fueron graficados (figura 5). Dichas mezclas fueron utilizadas como controles para cada una de placas que se realizaron.

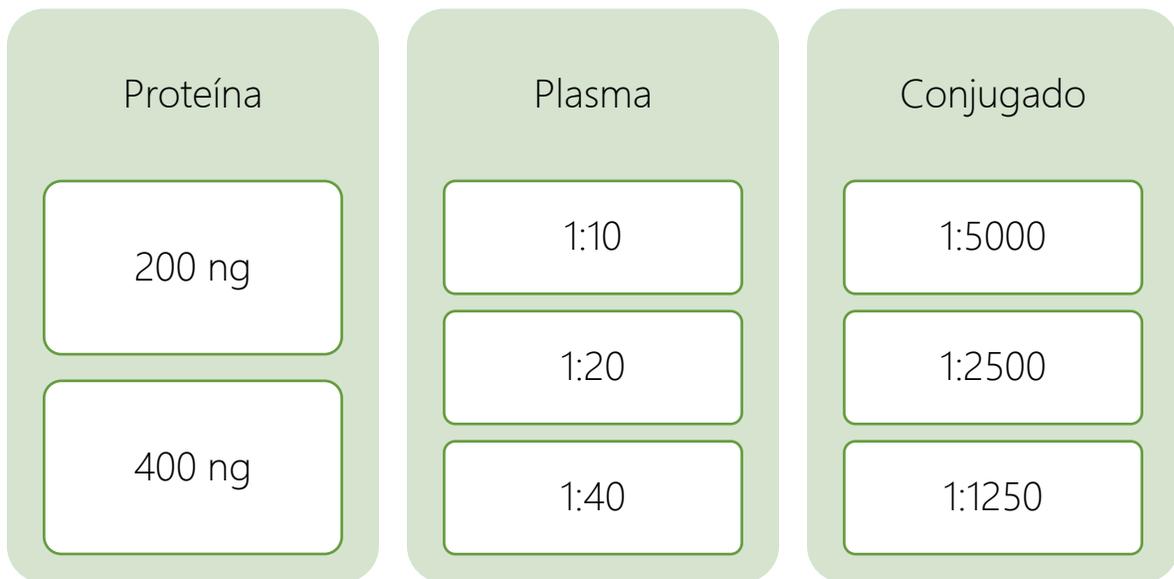


Figura 4. Condiciones evaluadas para la estandarización del ELISA-p16A.

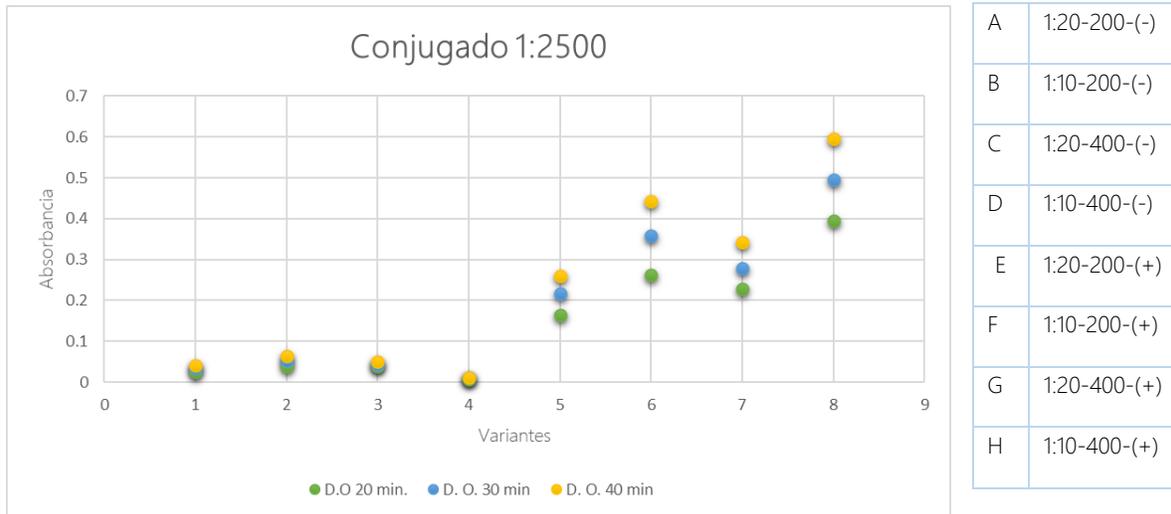


Figura 5. Gráfica dónde se observan las diferentes diluciones de dos pools de plasma (animales positivos y otro de negativos) utilizando una dilución del conjugado 1:2500 y una concentración de antígeno de 200 ng y 600 ng.

Como en el protocolo anterior de ELLISA se realizó la sensibilización antigénica en placas de 96 pozos (Polysorp, Nunc® Brand Products) con la proteína diluida en PBS (50 µl); dos pozos con antígeno y uno sólo con buffer para cada plasma a probar y se dejó incubar toda la noche (14-16 hrs) en refrigeración. Transcurrido el tiempo se realizaron tres ciclos de lavado con PBS + tween y posteriormente la placa se bloqueó con 150 µl de caseína al 2.5% por una hora a 37°C. Se realizaron tres ciclos de lavado para después agregar 100 µl de plasma diluido 1:10 en PBS + caseína al 1.25% y se dejó incubar una hora a 37°C. Pasados tres ciclos de lavado la palca se incubó con proteína G peroxidada diluida 1:2500 con caseína al 1.25% (100 µl) por otra hora. Por último, se realizaron dos ciclos de lavado con PBS Tween y dos con PBS para posteriormente agregar 100 µl de cromógeno ABTS e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido el tiempo se obtuvo por espectrofotometría la densidad óptica de cada pozo leída a una longitud de onda de 405 nm; para el cálculo final de la densidad óptica (D.O.) neta

se hizo el promedio de los dos pozos con antígeno menos la D.O. del pozo sin antígeno.

Línea de corte

Una vez establecidas las condiciones del ELISA-p16A se evaluaron 100 plasmas negativos (50 borregos y 50 cabras) a la presencia de anticuerpos contra LvPR con dos kits comerciales (VMRD y ERADIKIT) se determinó la línea de corte de la siguiente manera.

$$x = 0.04902$$

$$\sigma = 0.03463576$$

$$x + 3\sigma = 0.153$$

Western blot

Para las muestras que resultaron indeterminadas y discordantes en el estándar de oro se realizó western blot; para ello se preparó por SDS-PAGE en el cual se cargaron 15 μ l de la proteína p16-A purificada (400 ng por pozo) en todos los pozos y uno para el marcador de peso molecular.

Una vez realizada la electroforesis se llevó a cabo la transferencia húmeda en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 30 amperios durante 1:30 hrs. Las membranas transferidas fueron cortadas en tiras y posteriormente se incubaron con 30 ml de solución de bloqueo (blotting grade blocker BioRad® al 3% en PBS+tween) durante 1 hora; una vez transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS/tween cada 10 minutos. Posteriormente se colocaron las membranas en carriles por separado para incubar los sueros problema (dilución 1:40 del suero en caseína al 1.25% +PBS) durante 1 hora. Se realizaron nuevamente los lavados y las membranas fueron sumergidas en el conjugado (dilución del conjugado 1:2500 en cabras y 1:1250 en ovinos + caseína al 1.25% diluida en PBS) por 1 hora; se realizó un último ciclo de lavado y el revelado de las membranas se hizo utilizando diaminobencidina, peróxido de hidrógeno al 30% ambos diluidos en PBS durante 30 segundos hasta un minuto y posteriormente se sumergieron en agua destilada para parar la reacción de revelado.

Resultados

ELISA de péptidos

Derivado del análisis realizado para el diseño de péptidos, en la siguiente tabla se muestran los péptidos seleccionados así como un alineamiento de las secuencias peptídicas con diferentes cepas de LvPR.

Tabla 11. Secuencias peptídicas derivadas de la proteína de superficie (SU) de LvPR del genotipo A.

Nombre	Secuencia
Péptido 127 SUA	VETVPVTCTTKNFTQWGCQPEG
Péptido 251 SUA	KIKINCTEARAVSCTEEMPLA

	140	150	160
A1 PIOLV AF479638	TQVETVPVTCVT	KNFTQWGCQPEG	AYH
A1 LV1 M10608.1	QH	.	.
A1 KV1772 L06906.1	QH	.	.
A1 1514 M60610.1	QH	.	.
A1 SAOMV M34193	KY	S	M
A1 EV1 S51392	R	.	R.L
A2 USMARC-1 KY358787.1	A	.	T
A2 USMARC-2 KY358788.1	R	.	T
A2 85/34 armada	K	A	T
A3 697 HQ848062.1	.	M.M	N
A4 SRLV-A	.	L	K.D
Péptido 127 SUA	--	T	--
B1 NC 001463 (M33677) Cepa CO	KN.SG	.	E.AK.L
B1 HM210570 FESC-752	RN.SG	M	E.AK.L
B1 AY900630 Gansu	KN.SG	.	E.AR.L
B1 GU120138 Shanxi	KN.SG	.	E.AR.L
B1 GQ381130 Seui	RD.TN	.	.
B2 FJ195346 496	RN.SG	.	K.AK.I
B3 JF502416 Fonni	RN.TG	.	E.SK.L
B3 JF502417 Volterra ovino	RN.SGI	.	E.SK.L

Figura 6. Alineamiento de las secuencias de la región de la superficie de LvPR de diferentes genotipos y el péptido 127 SUA (en el recuadro verde se evidencian los aislados del genotipo B respecto a las cepas A).

	270	280
A1 PIOLV AF479638	AEKIKINCTKAKAVSCTEKMP	LAAVQ
A1 LV1 M10608.1
A1 KV1772 L06906.1	S.....
A1 1514 M60610.1
A1 SAOMV M34193	QQ.....	Q.....
A1 EV1 S51392	Q.....	Y.....G.....
A2 USMARC-1 KY358787.1	RR.....	E R.....I.....SIH
A2 USMARC-2 KY358788.1	R.....	E R.....V.....SIH
A2 85/34 armada	RQ.....	SE R.....E.....SIH
A3 697 HQ848062.1GI.....
A4 SRLV-A	R.....DR.....G.....
Péptido 251 SUA	--.....	E R.....E.....--
B1 NC 001463 (M33677) Cepa CO	G.....	E R.....D.....SIH
B1 HM210570 FESC-752	R.....	R.....E.....S.H
B1 AY900630 Gansu	R.....	E R.....E.....SIH
B1 GU120138 Shanxi	R.....	E R.....E.....SIH
B1 GQ381130 Seui	G..Q.....	R.VV.....HN.....GIK
B2 FJ195346 496	KN.....	N R.....E.....SIH
B3 JF502416 Fonni	QVNV.....	S..V.....V.....SSLH
B3 JF502417 Volterra ovino	HAEV.....	S..V.....NE.....SLH

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de la región de la superficie de LvPR de diferentes genotipos y el péptido 251 SUA (en el recuadro verde se evidencian los aislados del genotipo B respecto a las cepas A).

Una vez evaluadas diversas condiciones para la estandarización y con un panel de sueros con diferentes características (positivos a los kits comerciales y en algunos casos animales que fueron probados por PCR y se lograron secuencias para conocer el genotipo) se llegó a la conclusión de que ninguno de los dos péptidos logró reactividades adecuadas en las muestras seleccionadas. En el caso del péptido 127 SUA mostró una reactividad pobre, respecto al péptido 251 SUA el cual no fue reactivo en ninguna de las condiciones ni con diferentes plasmas; cabe mencionar que ambos péptidos fueron evaluados con al menos 150 plasmas entre ovinos y caprinos.

Expresión de la proteína p16-A

Una vez realizada la PCR para la amplificación del producto que corresponde a la proteína de matriz p16 A se clonó en el vector de resguardo pJET; en la figura 8 se muestran los resultados de dicha transformación.

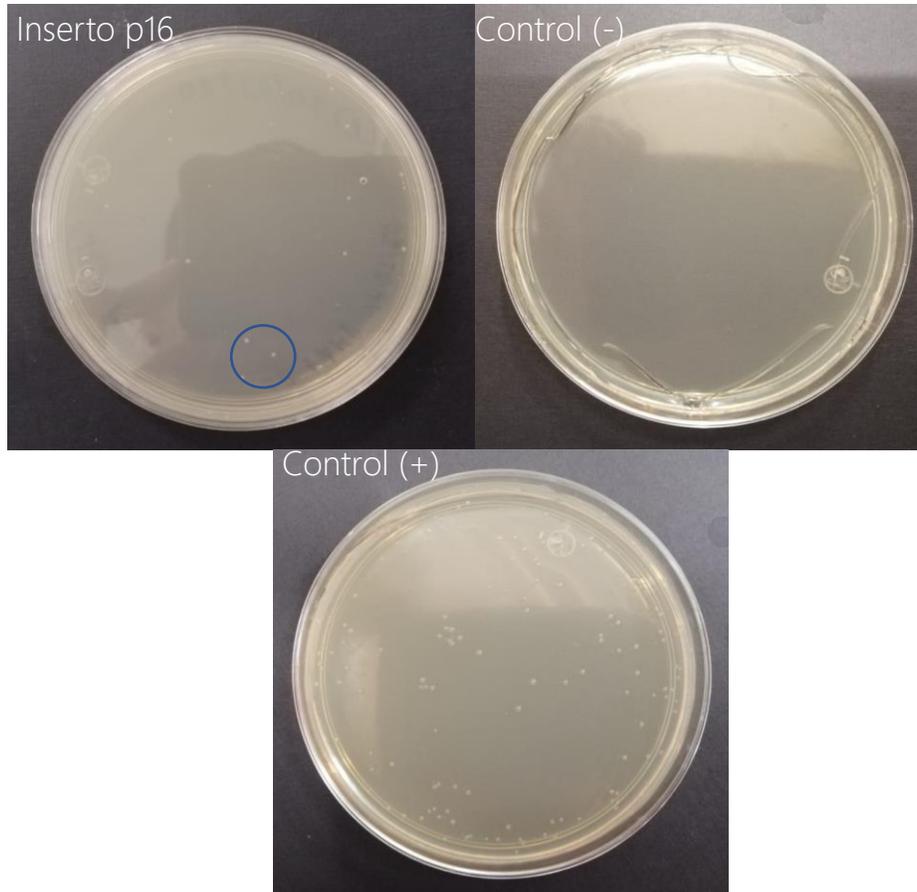


Figura 8. Colonias E. coli TOP 10 positivas a la clonación con el vector pJET (lado izquierdo) que incluye el inserto p16 de LvPR y un agar sin crecimiento (control negativo, lado derecho) y debajo se muestra el control positivo del sistema.

Para comprobar que las colonias transformadas tuvieran el inserto se realizó la extracción del plásmido y la PCR para identificar el producto (434 pb) figura 9.



Figura 9. Electroforesis de un gel de agarosa de la PCR pJet-p16 dónde se muestra el amplicón (434 pb) en cuatro muestras seleccionadas (mpb=marcador de pares de bases, p1-p5= muestras enumeradas del 1 al 5, pb= pares de bases).

Una vez confirmado el inserto en el vector se realizó la subclonación en el vector Champion-pETSUMO la cual se muestra en la siguiente figura 10.



Figura 10. Resultados de la transformación de células E coli. Top 10 utilizando el vector Champion-pETSUMO con el inserto p-16A.

Posteriormente, ya seleccionadas las 16 colonias que se muestran en la FIGURA 17 se realizó la PCR para comprobar que el inserto estuviera presente y posteriormente se realizó una segunda PCR para confirmar el sentido correcto de las cadenas figura 11.

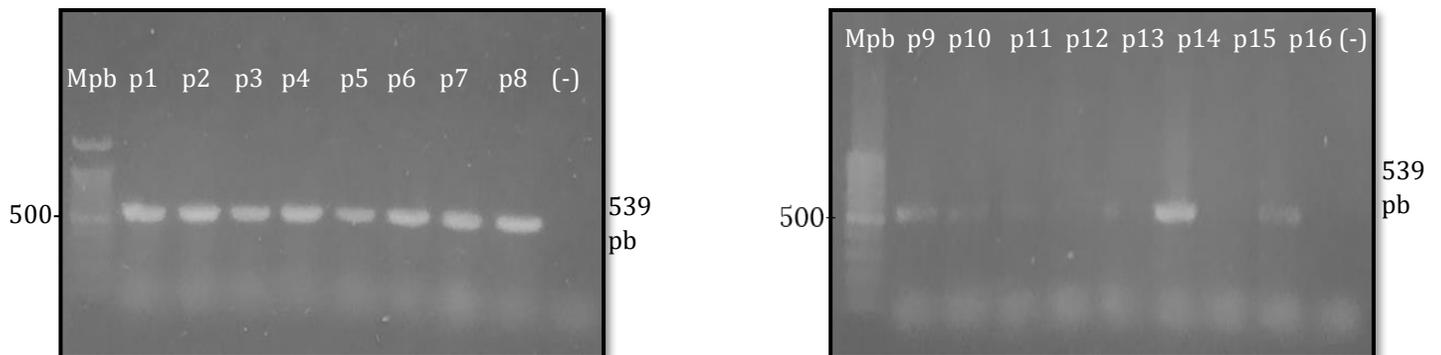


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR fw sumo-rv p16A para confirmar el sentido correcto del inserto (mpb=marcador de pares de bases, p1-p16= plásmidos enumerados del 1 al 16, pb= pares de bases).

Posteriormente las colonias seleccionadas se crecieron en medio liquido MB para posteriormente inducir las para su posterior expresión. Transcurrido el tiempo se lisaron las bacterias y se realizó la electroforesis en geles de SDS-PAGE y teñidos con azul de coomassie así como el western blot figura 12 y 13.

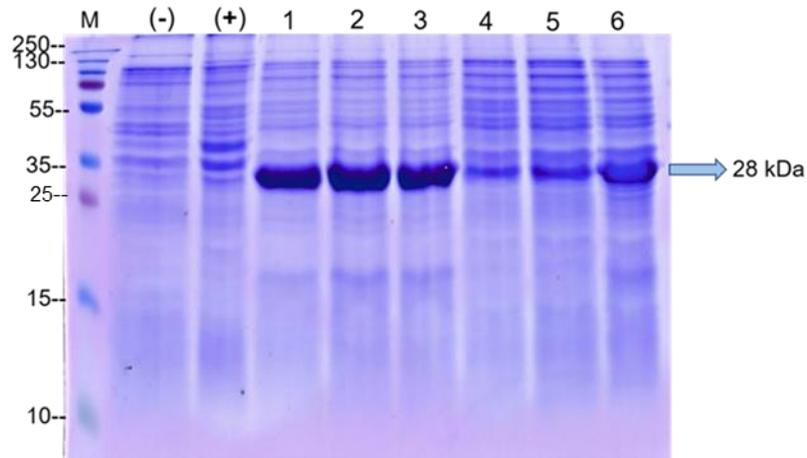


Figura 12. SDS-PAGE teñido con azul de coomassie de los cultivos inducidos para expresión de la proteína p16A con un peso molecular de 28 kDa (M=marcador de peso molecular; (-)=control negativo de expresión; (+)= control positivo de expresión; 1=clona 1.1; 2=clona 1.2; 3=clona 1.3; 4=clona 2.1; 5=clona 2.2 y 6= clona 2.3).

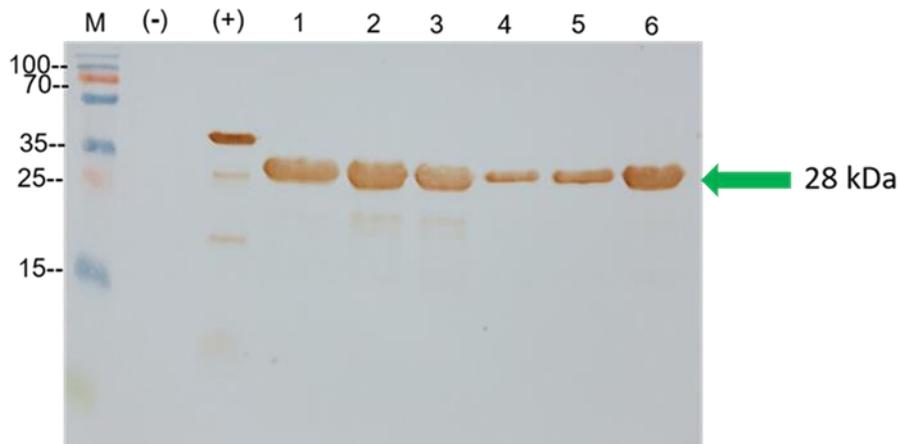


Figura 13. Western blot de los cultivos inducidos para expresión de la proteína p16A (M=marcador de peso molecular; (-)=control negativo de expresión; (+)= control positivo de expresión; 1=clona 1.1; 2=clona 1.2; 3=clona 1.3; 4=clona 2.1; 5=clona 2.2 y 6= clona 2.3).

Una vez analizados los cultivos que mostraron la expresión de la proteína p16 en seis casos, obteniendo una masa molecular de 28 kDa en su forma monomérica correspondiente a lo esperado. El control negativo de expresión (correspondiente a la cepa sin transformar) no muestra señal alguna y el control positivo de expresión (una cepa que produce la proteína CAT) presenta señal al peso molecular esperado de 28 kDa, confirmando la fidelidad del ensayo. Finalmente, dada su alta producción, así como, una degradación menor respecto a las otras muestras fue seleccionada la clona 1 (figura 14 y 15) para hacer un escalamiento y obtener mayor cantidad de proteína que fue posteriormente purificada.

Realizado el escalamiento se realizó una primera evaluación de la proteína que se muestran en las figuras 16 y 17.

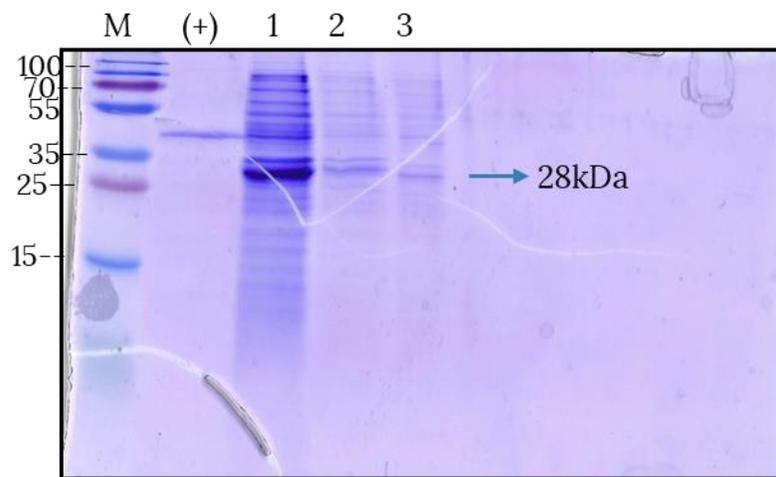


Figura 14. SDS-PAGE donde se observa la proteína p16A (M=marcador de peso molecular; (+)= control positivo, proteína p25 de LVPR; 1=cultivo de BL21 - p16A, 2=fracción soluble; 3=dilución 1:4 de cuerpo de inclusión).

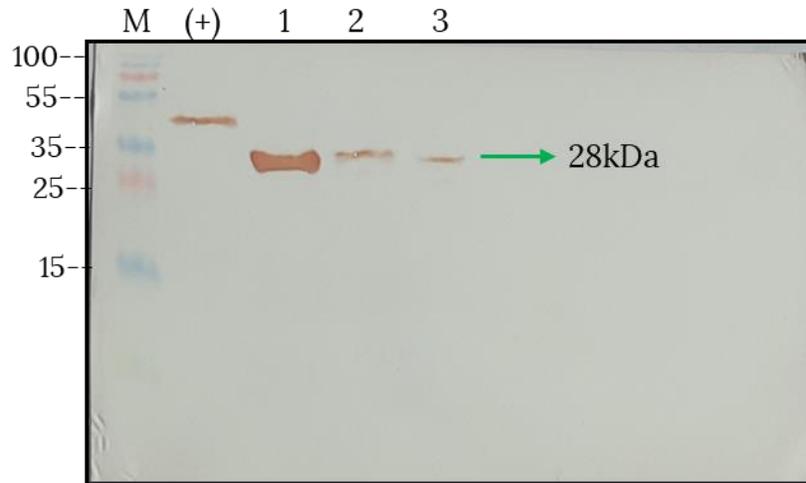


Figura 15. Western blot de la obtención de la proteína p16A (M=marcador de peso molecular; (+)= control positivo, proteína p25 de LVPR; 1=cultivo de BL21 -p16A, 2=fracción soluble; 3=dilución 1:4 de cuerpo de inclusión).

Posteriormente se realizaron los ensayos para evaluar la cantidad de proteína que podía ser purificada en la columna de sefarosa; se probaron volúmenes de 20 y 35 ml del total obtenido.

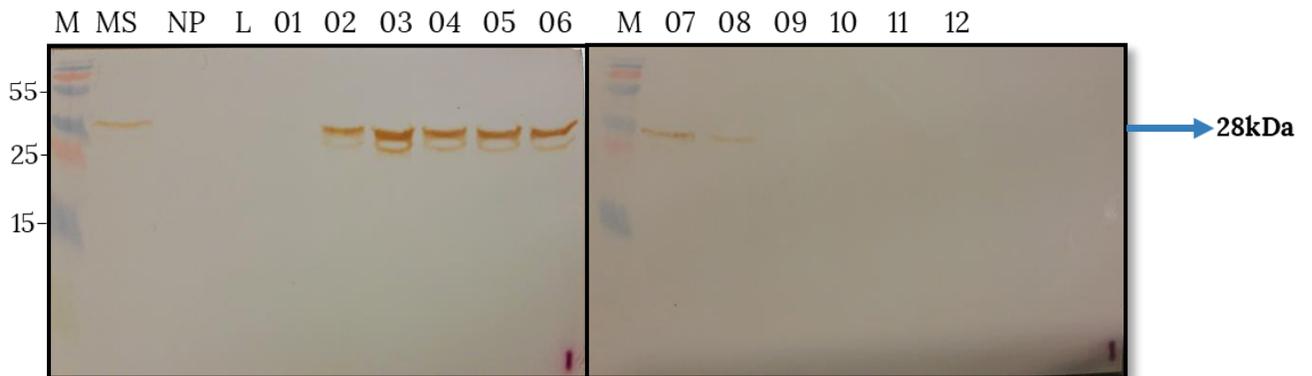
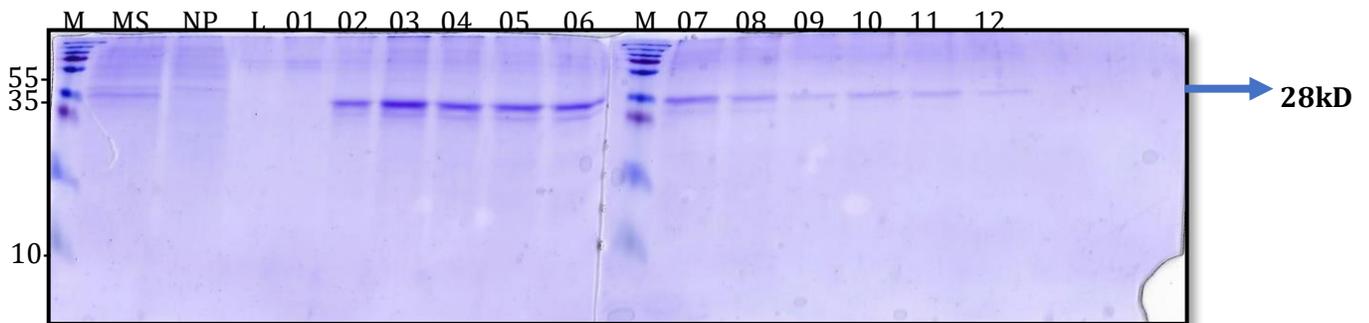


Figura 16. SDS-PAGE y western blot del ensayo de purificación con 20 ml de muestra (M=marcador de peso molecular; MS= muestra soluble; NP=no pegado, L=lavado; 01-12=eluciones colectadas).

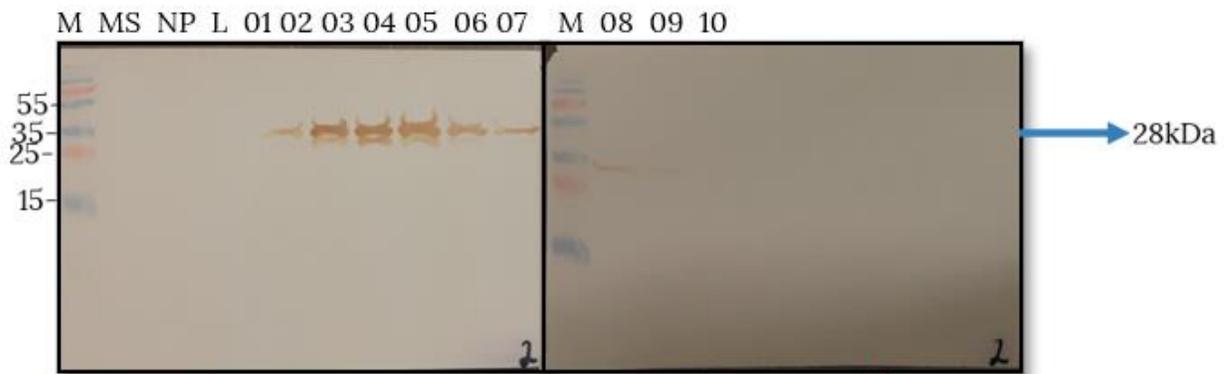
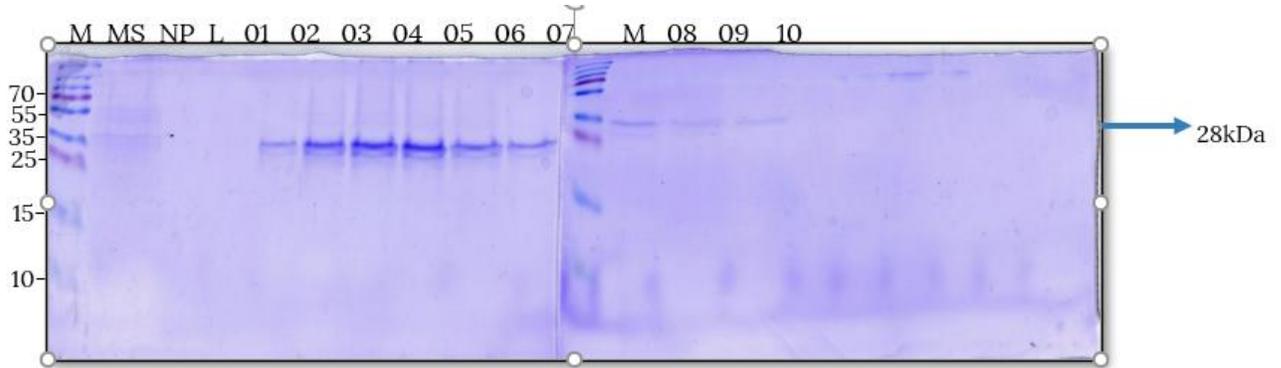


Figura 17. SDS-PAGE y western blot del ensayo de purificación con 35 ml de muestra (M=marcador de peso molecular; MS= muestra soluble; NP=no pegado, L=lavado; 01-10=eluciones colectadas).

Una vez fijado el volumen de columna se purificó el resto de la muestra y se dializó para retirar los excesos de sal, se realizó una última electroforesis en geles de SDS-PAGE para teñir con azul de coomassie y observar la proteína dializada figura 18.

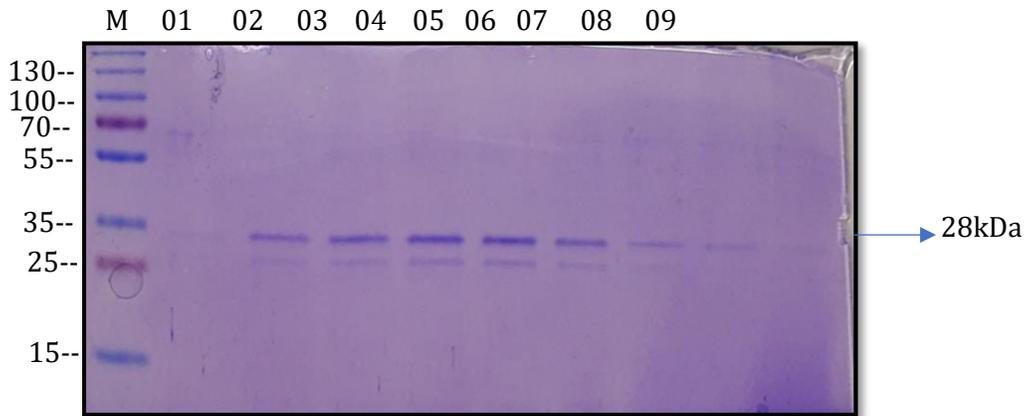


Figura 18. SDS-PAGE de la proteína p16A purificada y dializada (M=marcador de peso molecular; 01-09= eluciones colectadas).

ELISA p16A

Se evaluó el total de la población de estudio (borregos y cabras) con el ELISA-p16A realizando diferentes análisis los cuales se muestran en las siguientes tablas (en el apéndice se anexan otros análisis para futura consulta). El número total de animales evaluados fue de 437; de los cuales 304 fueron borregos y 133 cabras.

La primera comparación se realizó para poder evaluar la eficiencia diagnóstica del ELISA-p16A tomando como estándar de oro solo los resultados que coincidieron con resultados positivos y negativos en las dos pruebas comerciales previamente utilizadas (VMRD y ERADIKIT), en ambas especies (borregos y cabras) y por separado. Para este análisis se incluyeron 352 borregos y cabras del total previamente mencionado.

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en borregos (n=235) determinando los valores de sensibilidad, especificidad y valor kappa comparando con el estándar de oro (resultados en ELISAs comerciales).

Tabla 12. Tabla de contingencia de 2x2 donde se comparan los resultados obtenidos en ovinos evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro.

Borregos		Estándar de oro	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	52	38
	Negativo	16	129

Tabla 13. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos, comparándola con los resultados concordantes entre ambas pruebas comerciales (estándar de oro).

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
76.5%	77.2%	0.490

A continuación, se muestran los resultados obtenidos evaluando únicamente la población caprina (n=117) con el estándar oro.

Tabla 14. Tabla de contingencia de 2x2 donde se comparan los resultados obtenidos en caprinos evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro.

Cabras		Estándar de oro	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	10	6
	Negativo	51	50

Tabla 15. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en cabras, comparándola con el estándar oro.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
16.4%	89.3%	0.055

Como podemos observar en las tablas 12-15 se aprecia una diferencia importante cuando se analizan los datos por especie; mientras que en borregos y cabras los valores de especificidad son buenos (77.2% y 89.3, para ovinos y cabras respectivamente) y el coeficiente de concordancia es moderado en borregos y al contrario es pobre en cabras (tablas 13, 15 y 16), así como, la sensibilidad es más baja en caprinos respecto a la obtenida en borregos.

Tabla 16. Valores de concordancia e interpretación utilizando el coeficiente kappa (tomado de Antony et al. 2005).

Coeficiente kappa	Fuerza de la concordancia
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>)

Por último, se presenta la distribución de ovinos y caprinos positivos, negativos y los valores de sensibilidad, especificidad y valor kappa comparándolos con los resultados positivos y negativos del estándar de oro (n=352).

Tabla 17. Tabla de contingencia de 2x2 donde se comparan los resultados obtenidos en borregos y cabras evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro.

Borregos/Cabras		Estándar de oro	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	62	44
	Negativo	67	179

Tabla 18. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos y cabras, comparándola con el estándar de oro.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
48.1%	80.3%	0.294

En esta comparativa se puede observar claramente que la sensibilidad baja cuando se juntan los resultados de ambas especies, no obstante, la especificidad permanece alta (80.3%). Analizados los datos en conjunto (ambas especies) no permiten ver la baja sensibilidad (16.4%) que se obtiene principalmente en la evaluación de plasmas de cabras, lo que demuestra la importancia del análisis de los resultados por especie.

Del total de animales probados por el ELISA-p16 23 de ellos (19 borregos y 4 cabras) resultaron indeterminados a dicha prueba de ELISA (tabla 19) y junto con los animales que resultaron discordantes en el estándar de oro (ambas pruebas de ELISA comercial) fueron probados por western blot.

Western blot

Las muestras que resultaron indeterminadas en el ELISA-p16A fueron evaluadas por western blot (figura 28), los resultados se muestran en la tabla 19.

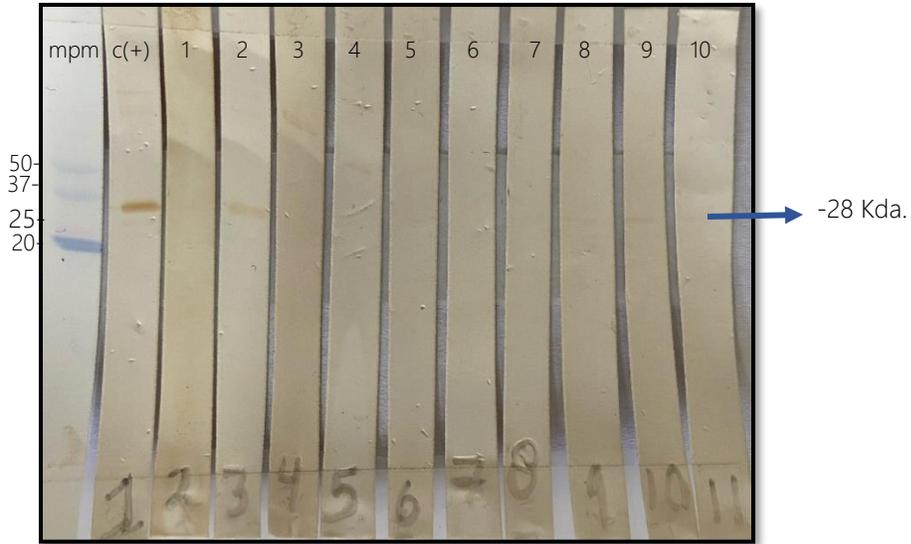


Figura 19. Western blot de muestras de borregos clasificados como indeterminados en el ELISA de la proteína recombinante p16A (mpm=marcador de peso molecular; c(+)= control positivo, 1-10=muestras de ovinos).

Tabla 19. Relación de animales clasificados como indeterminados al ELISA-p16A a los cuales se les realizo western blot.

Especie	VMRD	ERADIKIT	ELISA-p16A	Western blot	Secuencia gag
Borrego	+	+	Indeterminado	Negativo	A
Borrego	+	+	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	+	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	-	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	-	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	-	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	-	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	-	Indeterminado	Negativo	
Borrego	+	+	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	-	Indeterminado	Positivo	
Borrego	+	-	Indeterminado	Negativo	
Borrego	+	+	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	-	Indeterminado	Negativo	

Borrego	+	+	Indeterminado	Negativo	B
Borrego	-	-	Indeterminado	Negativo	
Borrego	-	-	Indeterminado	Positivo	
Borrego	+	+	Indeterminado	Positivo	B
Borrego	+	+	Indeterminado	Positivo	
Borrego	+	+	Indeterminado	Negativo	
Cabra	+	+	Indeterminado	Negativo	A y B
Cabra	+	-	Indeterminado	Negativo	
Cabra	-	-	Indeterminado	Positivo	
Cabra	-	-	Indeterminado	Positivo	

Tomando en cuenta los resultados de western blot se volvieron a determinar los valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia en ovinos y caprinos (tabla 20) los análisis se replantearon únicamente por especie debido a que es más notable la mejora analizándola de esta manera.

Tabla 20. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia donde se comparan los resultados obtenidos en borregos evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro y western blot.

Borregos		Estándar de oro	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	60	14
	Negativo	16	162
Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia	
78.9	92%	0.831	

Tabla 21. Tabla 2x2 y valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia donde comparan los resultados obtenidos en cabras evaluados con el ELISA-p16A con respecto al estándar de oro.

Cabras		Estándar de oro	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	18	2
	Negativo	44	66
Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia	
29%	97.1%	0.269	

En el grupo de estudio se identificaron rebaños (n=158) en los que a partir de animales infectados se obtuvieron secuencias de LvPR clasificadas filogenéticamente como genotipo A, y se compararon de forma independiente con cada ELISA comercial que se utilizó previamente (VMRD y ERADIKIT).

En las siguientes tablas se muestran la comparativa entre el kit VMRD y la selección de animales que se describió en el párrafo anterior. Como se puede apreciar con las tablas anteriores, el análisis se muestra por especie.

Tabla 22. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA VMRD y el ELISA-p16A de animales identificados como infectados con el genotipo A de LvPR en borregos.

Infección A (borregos)		VMRD	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	23	14
	Negativo	13	105
Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia	
63.9%	88.2%	0.516	

En cabras los valores no se modificaron, los resultados que se observaron se presentan en el apéndice.

A continuación se muestra la misma comparativa pero con el kit comercial ERADIKIT.

Tabla 23. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA ERADIKIT y el ELISA-p16A de animales identificados como infectados con el genotipo A de LvPR en borregos.

Infección A (borregos)		ERADIKIT	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	23	14
	Negativo	8	110
Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia	
74.2%	88.7%	0.586	

Por otro lado, se decidió tomar en cuenta los rebaños que presentan infecciones mixtas (n= 119); es decir que en al menos uno o más animales fueron identificados infectados con genotipos A y/o B en ambas especies. Como en el análisis anterior también se separó por especie y kit comercial.

Para el caso de los rebaños mixtos las comparativas mostraron los siguientes resultados.

Tabla 24. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A en borregos.

Infección mixta (borregos)		VMRD	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	38	1
	Negativo	11	20
Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia	
77.6%	95.2%	0.641	

Tabla 25. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A en cabras.

Infección mixta (cabras)		VMRD	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	15	0
	Negativo	36	4
Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia	
29.4%	100%	0.057	

Se presentan a continuación la comparativa usando el ELISA ERADIKIT y los resultados del ELISA-p16A en borregos y cabras.

Tabla 26. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A en borregos.

Infección mixta (borregos)		ERADIKIT	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	29	10
	Negativo	3	28
Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia	
90.6	73.7%	0.632	

Tabla 27. Tabla 2x2 con valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A en cabras.

Infección mixta (cabras)		ERADIKIT	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	13	2
	Negativo	27	15
Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia	
32.5%	88.5%	0.146	

Tabla 28. Resultados totales obtenidos en sensibilidad, especificidad y concordancia obtenidos de la comparación del ELISA-p16 con respecto a los resultados generados en ambas pruebas comerciales por especie y de forma individual ajustados con los resultados de western blot de los animales que resultaron indeterminados y discordantes en el estándar de oro.

Comparativa por técnica	Comparativa por especie	Sensibilidad	Especificidad	Valor K	Concordancia
Estándar de oro	Borregos	78.9%	92%	0.831	Casi perfecta
Estándar de oro	Cabras	29%	97.1%	0.269	Aceptable
VMRD	Infección A (borregos)	63.9%	88.2%	0.516	Moderada
ERADIKIT	Infección A (borregos)	74.2%	88.7%	0.586	Moderada
VMRD	Infección mixta (borregos)	77.6%	95.2%	0.641	Considerable
VMRD	Infección mixta (cabras)	29.4%	100%	0.057	Leve
ERADIKIT	Infección mixta (borregos)	90.6%	73.7%	0.632	Considerable
ERADIKIT	Infección mixta (cabras)	32.5%	88.5%	0.146	Leve

En conclusión, cuando se realizaron los análisis de eficiencia diagnóstica (sensibilidad, especificidad) incluyendo ambas especies y en ambos kits comerciales fueron muy similares, lo que no permite identificar el efecto que se observó relacionado a la especie (borregos o cabras), siendo los valores de eficiencia diagnóstica mejores en borregos y en especial cuando son comparados con el ELISA de ERADIKIT el cual incluye antígenos del genotipo A de LvPR.

Discusión

Además del impacto en el bienestar animal, los LvPR causan pérdidas económicas considerables en la industria de los pequeños rumiantes debido al sacrificio temprano, la reducción en la producción de leche y las restricciones al movimiento de animales (Blacklaws, 2004); si bien en México los cuadros clínicos suelen ser menos evidentes, especialmente en ovinos, y aún no se tienen trabajos que evalúen exclusivamente el impacto económico de la infección. Por otro lado, actualmente no hay vacunas ni terapias disponibles y el control de LvPR se basa principalmente en estrategias para prevenir la introducción del virus en el rebaño o la transmisión de madres infectadas a sus recién nacidos (Minguijón, 2015). La detección de la respuesta de anticuerpos específicos que generalmente permanece de por vida hace que la serología sea la herramienta más conveniente para diagnosticar de manera temprana infecciones por LvPR mucho antes de que ocurra la etapa clínica (Illius, 2020).

En los diagnósticos de rutina, los ensayos más utilizados son la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La IDGA se considera muy específica y reproducible, pero tiene una sensibilidad relativamente baja. Por otro lado, se sabe que la prueba ELISA es relativamente económica, se puede automatizar, funciona para una variedad mayor de muestras (leche, suero, semen) y permite interpretaciones cuantitativas (Kalogianni AI, 2020). Estas ventajas hacen que los ELISA se utilicen como métodos de elección para el seguimiento y los grandes programas de vigilancia en Europa; sin embargo, al realizarse estudios donde se comparan diferentes pruebas diagnósticas la mayoría llega a la conclusión de que no es suficiente una sola prueba para establecer el estatus de infección de los rebaños y menos cuando se aplican para detectar una población con baja seroprevalencia (Michiels R. V., 2018). Se han desarrollado muchos ELISAs indirectos y competitivos utilizando antígenos de una o varias cepas, pero continúan surgiendo nuevos subtipos y por lo tanto reducen el rango de detección de los kits individuales (Nardelli S., 2020). Además, la seroconversión

lenta de los animales recién infectados, la tendencia a una respuesta de anticuerpos fluctuante durante el primer mes posterior a la infección y las diferencias individuales entre ovejas y cabras en el desarrollo de la respuesta inmunitaria contra los antígenos de LvPR hacen que los resultados negativos en ELISA o en otras pruebas serológicas a veces no reflejen el estado de infección real de los animales (Michiels R. V., 2018).

En el presente trabajo se incluyeron diseños de antígenos del genotipo A en el desarrollo de un ELISA de tipo indirecto, el primer tipo de antígeno que se diseñó fueron los péptidos de superficie de lentivirus del genotipo A. A pesar de que el análisis *in silico* sugería que estos péptidos podían ser buenos candidatos, con algoritmos que toman en cuenta regiones de inmunogenicidad así como hidrofiliidad de la proteína, estos no lograron reactividades aceptables en la población evaluada. Los antígenos derivados de las proteínas de la envoltura de LvPR regiones de la transmembrana (TM) y superficie (SU) han resultados buenos antígenos en diferentes pruebas de diagnóstico (Germain, 2008), sin embargo, este gen tiene zonas altamente variables a lo largo de su secuencia; esta variabilidad puede obedecer a la función que tiene la envoltura del virus de entrar en contacto con la membrana de la célula huésped para poder penetrar y quizás incluso participe en la evasión de la respuesta inmune de manera eficiente (Leroux C., 1997). Por otro lado la variabilidad genética que puede ser producto de las cepas infectantes principalmente genotipos A y B o posibles combinaciones así como de las interacciones del virus con el hospedero ya sea borregos o cabras; elementos que podrían modular la respuesta humoral de manera diferente, lo que eventualmente puede afectar en la eficiencia de este péptido como posible candidato a antígeno; como se observa en las figuras 13 y 14 la secuencia de aminoácidos de ambos péptidos presenta variaciones, no solo respecto al genotipo sino entre subtipos, si bien son menos las diferencias, éstas pueden influir en el reconocimiento de los anticuerpos presentes en los animales a los antígenos diseñados (Mordasini, 2006).

Por otro lado, sería ideal considerar un set más amplio de péptidos para realizar una evaluación más completa e identificar una batería más amplia de epítomos inmunodominantes. Los péptidos propuestos en el presente estudio se eligieron en función de lo reportado en la bibliografía para poder aportar información novedosa al respecto (Valas, 2000).

En general las proteínas estructurales Gag y Env de LvPR son los principales objetivos de la respuesta inmune humoral y se han seleccionado como antígenos para el serodiagnóstico; principalmente en etapas tempranas de la infección (proteínas del gen *gag*) y en algunos casos puede permanecer largo tiempo en el animal infectado (antígenos de las proteínas de la envoltura) (Pisoni G, 2006). La proteína de matriz (MA) de lentivirus de pequeños rumiantes al igual que la de cápside presenta en su secuencia varios epítomos inmunodominantes que pueden tener reacción cruzada entre genotipos independientemente del animal de donde se aísla, por lo que esta proteína ha sido considerada en el diseño de pruebas diagnósticas comerciales (Grego E. B., 2005).

En el presente estudio se expresó una proteína de matriz de LvPR del genotipo A2, basado en estudios previos y se estandarizó una técnica de ELISA indirecta. Los resultados obtenidos se analizaron bajo diferentes comparativas para determinar la eficiencia diagnóstica de la proteína de matriz como antígeno. En el país existen pocos trabajos que aborden la genotipificación de las cepas de LvPR circulantes en el territorio; recientemente algunos de estos han identificado por primera vez el genotipo A en rebaños tanto de borregos como de cabras (González Méndez, 2020), (Acevedo Jiménez, 2021) y en general, los ELISAs que están disponibles para el diagnóstico de la infección por LvPR en el país contempla principalmente el uso de antígenos derivados del genotipo B, por lo que el presente trabajo aporta por primera vez datos sobre la eficiencia diagnóstica de una proteína utilizada como antígeno derivada de un genotipo A2.

Los resultados obtenidos considerando como prueba de oro la concordancia de resultados entre las pruebas comerciales en ambas especies y de forma individual,

observando valores de sensibilidad del 45.2% (tabla 32) cuando se determinan para ambas especies en conjunto. Mientras que, si la determinación se realiza por separado, ésta aumenta a un 78.9% (tabla 20) en borregos. Esto puede deberse a que las muestras que se contemplaron para este estudio fueron de rebaños que en un trabajo previo fueron identificados como genotipo A en al menos un animal de cada granja incluida (Acevedo Jiménez, 2021). Si bien como se mencionó con anterioridad la proteína de matriz cuenta con epítomos inmunodominantes de reacción cruzada, también presenta otros que son específicos de tipo genético y que podrían favorecer la reactividad en muestras donde no se habían encontrado animales reactivos con las pruebas comerciales (Grego E. B., 2005) (14 animales positivos al ELISA p16 A y negativos en ambas pruebas comerciales) los cuales fueron confirmados por western blot. En el caso de las cabras analizadas la discordancia entre pruebas fue menor (únicamente 2 casos de discordancia con las pruebas comerciales) y esto puede explicarse primero en la diferencia de población evaluada por especie en este estudio (117 cabras en comparación a los 235 borregos referidos en esta primer comparativa) y por otro lado los rebaños de dónde proceden estas cabras en su mayoría tienen registro de que fue posible secuenciar LvPR que corresponde a un genotipo B; además de la identificación del genotipo A, esto se refleja en el nivel de especificidad que se presenta en las tablas cuando se comparan por especie (80% cuando se comparan ambas y aumenta 97.1% cuando solo se toman en cuenta cabras) (Olech, 2012). Esto demuestra que la presencia de más de un genotipo infectante, al menos en caprinos es favorecido por el reconocimiento de epítomos de reacción cruzada (infecciones genotipo B) y específicos para el genotipo A en la proteína de matriz, incrementando la especificidad en la prueba ELISA.

Por otro lado, el estado de la infección es importante en la respuesta de anticuerpos frente a proteínas estructurales; estudios informan que la respuesta temprana de anticuerpos contra proteínas estructurales codificadas por el gen *gag* se dirigen a epítomos específicos de tipo (ya sea A o B) (Lacerenza D. G., 2008). La bibliografía evidenció que en los borregos infectados con el genotipo del grupo

A, el antígeno homólogo clasificó a los animales infectados meses antes que el antígeno heterólogo e inclusive los ELISAs disponibles comercialmente que se desarrollaron usando cepas del grupo B (Lacerenza D. G., 2006).

En el presente estudio la edad de los animales es variada y no en todos se conoce, sin embargo, si la infección por genotipo A es de reciente introducción (ya que en el pasado sólo se había identificado la presencia del genotipo B en rebaños mixtos del Estado de México) o los animales infectados son jóvenes, esto reforzaría la discordancia que existe entre pruebas comerciales y el ELISA-p16A.

Otro abordaje realizado en el análisis de resultados y que es importante en la discusión de este trabajo son las comparativas por kit comercial. Cuando se realizó la comparación de la eficiencia diagnóstica se puede apreciar un desempeño mejor del ELISA p16A con respecto al kit comercial ERADIKIT® (datos mostrados en el apéndice de este trabajo). Algunos estudios han concluido que el diseño de pruebas de ELISA que contemplen antígenos de diferentes proteínas estructurales de los genotipos más comúnmente distribuidos favorece la sensibilidad de la prueba como es el caso del kit comercial ERADIKIT® en comparación con diseños de un solo antígeno de cepa única donde se observa una mayor especificidad (Rosati, 2004). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el kit comercial ERADIKIT® contemplando rebaños infectados con genotipo A y mixtos en borregos (sensibilidad de 74.2% (tabla 23) y 90.6% (tabla 26) respectivamente) en comparación con las sensibilidades obtenidas utilizando el kit VMRD® (63.9% (tabla 22) en rebaños identificados como genotipo A y 77.6% (tabla 24) en rebaños mixtos). Es posible que el incremento observado en la sensibilidad del ELISA-p16 con respecto al ERADIKIT, también esté relacionado a que esta prueba incluye como antígenos péptidos sintéticos derivados de un genotipo A. Mientras que la sensibilidad en cabras fue pobre con cualquiera de los dos kits (sensibilidad de 22% en rebaños genotipo A y 15% (tabla 50) en rebaños mixtos con cualquiera de los dos kits comerciales).

El kit VMRD tiene en su diseño anticuerpos monoclonales contra epítomos inmunodominantes de la glicoproteína de superficie de lentivirus de pequeños rumiantes de genotipo B (Herrmann LM, 2003). Las referencias bibliográficas disponibles contemplaban que en un inicio para su desarrollo incluyó únicamente cabras infectadas en unidades pecuarias de Estados Unidos, posteriormente se realizó un trabajo que analizó esta ELISA de tipo competitiva (cELISA) en una población de borregos mostrando valores de sensibilidad y especificidad adecuados (Herrmann-Hoesing, 2010). Por otro lado, otros estudios donde se han caracterizado cepas de lentivirus para análisis con diferentes antígenos, han demostrado que las cepas del genotipo B de LvPR podrían impulsar la respuesta de anticuerpos contra epítomos más conservados, en comparación con las del genotipo A en donde hay una mayor variación (hasta 22 subtipos diferentes contra 5 del genotipo B) por lo que podría sugerirse que es necesaria la presencia de antígenos de ambas cepas para lograr una mayor eficiencia en el diagnóstico (Narayan, 1998).

En general la especificidad es mayor respecto a la sensibilidad en diferentes comparativas realizadas y esto es más evidente en los análisis realizados con rebaños donde solo se toma en cuenta infecciones que fueron reportadas con un genotipo A, esta idea la refuerzan los resultados de western blot que favorecieron ligeramente (debido a que fueron pocas muestras clasificadas como indeterminadas en ambas especies) el aumento de dichos valores, lo que refuerza la hipótesis del presente trabajo.

En ovinos y caprinos los isotipos de Ig-G; Ig G1 e Ig G2, son los que se han caracterizado en algunos estudios, indicando su participación en la respuesta inmunológica a la infección por lentivirus (Micusan, 1977). En el caso de borregos infectados con LVPR (maedi visna) la relación de los isotipos Ig-G1 respecto a la Ig-G2 (proporción normal 2/3 Ig-G1 vs 1/3 Ig-G2) se modifica al grado de ser nula la presencia del isotipo Ig-G2; mientras que se puede identificar un importante incremento en el reconocimiento del isotipo Ig-G1, específicamente a antígenos

de la cápside (Bird, 1995). En el caso de las cabras infectadas los estudios realizados han demostrado que la relación de anticuerpos Ig-G1/Ig-G2 (proporción normal cercana al 50% para cada isotipo) se modifica en función de la presencia de cuadro clínico o no en los animales. Es decir, cuando los animales son asintomáticos existe un sesgo en la presencia de Ig-G2 la cual se mantiene hasta la aparición del cuadro clínico artrítico, donde predomina una tendencia al incremento del isotipo Ig-G1 (Trujillo, 2004). En conclusión, los ovinos y caprinos del estudio presentaban de forma diferencial una mayor concentración del isotipo Ig-G1 e Ig-G2 en ovinos y caprinos respectivamente. Estos resultados permiten hipotetizar que la diferencia de reactividades en ELISA-P16A observadas en muestras de plasmas de ovinos y caprinos pudiera estar relacionado a la concentración predominante del isotipo de IgG en los animales infectados por lentivirus, ya que aunque se describe que la proteína G tiene una alta afinidad tanto al isotipo Ig-G1 e Ig-G2 en ambas especies, el isotipo Ig-G1 que fue el único aparentemente identificado en los ovinos infectados favoreciendo mayores reactividades en el ELISA característica que se asoció a un mayor número de animales seropositivos, respecto a las reactividades bajas encontradas en caprinos donde predominó la presencia del isotipo Ig-G2, lo cual se explica porque prácticamente todas las cabras analizadas no presentaron cuadro clínico artrítico.

Las herramientas serológicas son importantes en el control de la infección por LvPR pero en muchas ocasiones no reflejan el estado real de la infección (Michiels R. V., 2018). Como podemos observar a lo largo de la discusión del presente trabajo existen factores que son ajenos al diseño de antígenos, como son: la seroconversión de los animales, la respuesta inmune a diferentes antígenos en momentos puntuales de la infección, la posible fluctuación de dichos anticuerpos relacionada a situaciones hormonales, la variación genética intrínseca del virus, así como, el tipo de respuesta inmune de acuerdo a cada especie susceptible y que repercuten de manera importante en las comparativas con diferentes kits comerciales (de Andrés, 2013). El presente trabajo demuestra la importancia de contemplar antígenos de diferentes genotipos del virus con la finalidad de

evidenciar animales que escapan a las pruebas diagnósticas comerciales (Echeverría I, 2020).

Ninguna prueba de diagnóstico es 100% confiable y siempre se sugiere evaluar a los rebaños con dos o más pruebas serológicas, así como, complementar con pruebas de biología molecular como la PCR, sobre todo en rebaños donde se tiene como objetivo la erradicación de la infección (Michiels R. A., 2020). Si bien en México estamos lejos de implementar campañas de erradicación, los esfuerzos deben centrarse en conocer el estatus de prevalencia de la infección en territorio nacional. Se requieren más estudios de caracterización genética en rebaños de borregos y cabras en el país; con la finalidad de conocer los subtipos circulantes y sus interacciones con los diferentes huéspedes (borregos y cabras).

Por otro lado, los diseños de pruebas serológicas deben contemplar antígenos de reacción cruzada para abarcar un mayor número de cepas infectantes, así como, antígenos específicos de tipo que se generan en etapas tempranas de la infección y que pueden diferir por especie (Reina R. G., 2009).

Si bien el uso de proteínas recombinantes favorece la presencia de varios epítomos que pueden ser reconocidos por los anticuerpos, el uso de péptidos sintéticos a la larga puede ser más barato y permitir incluir varios epítomos de diferentes proteínas estructurales, así como disponer de una mayor pureza del antígeno debido a su naturaleza química, en comparación con las proteínas recombinantes que se obtienen de bacterias y deben ser purificadas (Mordasini, 2006).

Los resultados del presente trabajo aportan una óptica diferente en la estrategia del diseño de pruebas serológicas para la identificación de la infección por lentivirus de pequeños rumiantes en ovinos y caprinos infectados naturalmente, donde se demuestra que si bien las pruebas disponibles son eficientes en el diagnóstico el uso de antígenos derivados de un genotipo A asegura un espectro mayor de animales detectados cuando los rebaños mantienen de forma prevalente infecciones del genotipo A de LvPR.

Conclusión

- ✓ La proteína recombinante de matriz (P16) del genotipo A utilizada como antígeno en un ELISA indirecto parece una buena candidata para el diseño de pruebas serológicas que busquen aumentar nivel de especificidad en rebaños con infecciones del genotipo A de LvPR.
- ✓ El análisis refleja en general datos de reactividad mayores en borregos infectados con genotipos A de LvPR que en cabras, lo que sugiere el uso de antígenos derivados de genotipos A para una mejor eficiencia en la detección de la infección.
- ✓ El uso de antígenos diversos en los diseños de pruebas serológicas permitirá una mejoría en la eficiencia de diagnóstico para una mejor comprensión del nivel de infección que existe en el país.

Bibliografía

- Acevedo Jiménez, G. E. (2021). Serotyping versus genotyping in infected sheep and goats with small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*, 252, 108931.
- Angelopoulou, K. B. (2006). A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus research*, 118(1-2), 178–184.
- Bird, P. R. (1995). The restricted IgG1 antibody response to maedi visna virus is seen following infection but not following immunization with recombinant gag protein. *Clinical and experimental immunology*, 102(2), 274–280.
- Blacklaws, B. A. (2004). Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*, 101(3), 199–208.
- Borquez Cuevas, M. Y. (2021). Ovine Progressive Pneumonia: Diagnosis and Seroprevalence in the South of Sonora, Mexico. *Case reports in veterinary medicine*, 2021, 6623888.
- Cork, L. C. (1974). Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *The Journal of infectious diseases*, 129(2), 134–141.
- Costa de Souza K., R. P. (2013). Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, 109, 2–3,, 193-198.
- Crawford, T. B. (1980). Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, 207(4434), 997–999.
- Crespo H, R. R.-P. (2011). Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Veterinary Research*, 7;42, 28.
- Daltabuit Test, M. d.-B. (1999). Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Canadian journal of veterinary research*, 63(3), 212–215.

- de Andrés, X. R.-M.-C. (2013). An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Veterinary immunology and immunopathology*, *152*(3-4), 277–288.
- Echeverría I, D. M.-M. (2020). Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Frontiers in veterinary science*, *30*;7, 182.
- Fu, Y., D., L., Su, Y., Chi, H., & Wang, J. &. (2020). The Vif protein of caprine arthritis encephalitis virus inhibits interferon production. *Archives of virology*, *165*(7), 1557–1567.
- Furtado Araújo, J., Andrioli, A., Pinheiro, R. R., Sider, L. H., de Sousa, A., de Azevedo, D., . . . Souza, S. &. (2020). Vertical transmissibility of small ruminant lentivirus. *PloS one*, *15*(11), e0239916.
- Gayo, E. P. (2019). Characterization of minimal lesions related to the presence of visna/maedi virus in the mammary gland and milk of dairy sheep. *BMC veterinary research*, *15*(1), 109.
- Germain, K. C. (2008). Field evaluation of a gag/env heteroduplex mobility assay for genetic subtyping of small-ruminant lentiviruses. *The Journal of general virology*, *89*, 2020–2028.
- Gomez-Lucia, E., & Barquero, N. &. (2018). Maedi-Visna virus: current perspectives. *Veterinary medicine*, *9*, 11–21.
- González Méndez, A. S. (2020). Signature patterns in region V4 of small ruminant lentivirus surface protein in sheep and goats. *Virus research*, *280*, 197900.
- Grego, E. B. (2005). Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary microbiology*, *106*(3-4), 179–185.
- Grego, E. P. (2002). Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-

strain-based immunoassay. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(4), 828–832.

Herrmann LM, C. W. (2003). Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and diagnostic laboratory and immunology*, 10(5), 862-5.

Herrmann-Hoesing. (2010). Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 22(6), 843–855.

Illius, A. W.-P. (2020). Epidemiology and control of maedi-visna virus: Curing the flock. *PloS one*, 15(9), e0238781.

Kalogianni AI, B. I. (2020). Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review. *Animals (Basel)*, 10(4), 616.

Labrecque, M. M. (2020). Characterization of Signal Sequences Determining the Nuclear/Nucleolar Import and Nuclear Export of the Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Rev Protein. *Viruses*, 12(8), 900.

Lacerenza, D. G. (2006). Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Veterinary immunology and immunopathology*, 112(3-4), 264–271.

Lacerenza, D. G. (2008). Characterization of an immunodominant epitope of small ruminant lentivirus (SRLV) nucleoprotein. *Veterinary immunology and immunopathology*, 125(3-4), 361–367.

Leroux, C. C. (1997). Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *142(6)*, 1125–1137.

Leroux, C. C. (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), 1125–1137.

- Michiels, R. A. (2020). Phylogenetic Analysis of Belgian Small Ruminant Lentiviruses Supports Cross Species Virus Transmission and Identifies New Subtype B5 Strains. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *9(3)*, 183.
- Michiels, R. V. (2018). Comparative Analysis of Different Serological and Molecular Tests for the Detection of Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) in Belgian Sheep and Goats. *Viruses*, *10(12)*, 696.
- Micusan, V. V. (1977). Biological properties of goat immunoglobulins G. *Immunology*, *32(4)*, 373–381.
- Minguijón, E. R.-M. (2015). Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary microbiology*, *181(1-2)*, 75–89.
- Molaei, V. B. (2020). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Scientific reports*, *10(1)*, 2243.
- Mordasini, F. V. (2006). Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *Journal of clinical microbiology*, *44(3)*, 981–991.
- Nakano, Y. A.-F. (2017). A conflict of interest: the evolutionary arms race between mammalian APOBEC3 and lentiviral Vif. *Retrovirology*, *14(1)*.
- Nalbert, T. C.-J.-D. (2020). The effect of the subclinical small ruminant lentivirus infection of female goats on the growth of kids. *PloS one*, e0230617.
- Narayan, O. K.-S. (1998). Lentivirus-host interactions: lessons from visna and caprine arthritis-encephalitis viruses. *Annals of neurology*, *23*, S95–S100.
- Nardelli, S. B. (2020). Eradication of caprine arthritis encephalitis virus in the goat population of South Tyrol, Italy: analysis of the tailing phenomenon during the 2016-2017 campaign. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, *32(4)*, 589–593.

- Olech, M. R. (2012). Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus research*, 163(2), 528–536.
- Pépin, M. V. (1998). Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary research*, 29(3-4), 341–367.
- Pérez, M. B. (2015). Small ruminant lentivirus-induced arthritis: clinicopathologic findings in sheep infected by a highly replicative SRLV B2 genotype. *Veterinary pathology*, 52(1), 132–139.
- Peterhans, E. G. (2004). Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary research*, 35(3), 257–274.
- Pinczowski, P. S. (2017). Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Veterinary pathology*, 54(3), 413–424.
- Pisoni G, B. G. (2006). Phylogenetic analysis of the gag region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: comparative analysis and molecular epidemiological applications. *Virus Research*, 16(1-2), 159-67.
- Pisoni, G. B. (2007). Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *Journal of virology*, 81(10), 4948–495.
- Querat G, A. G. (1990). Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology*, 175(2); 434-47.
- Ramírez H., R. B.-P. (2009). Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology*, 72(8), 1085–1096.
- Ramírez, H. R. (2013). Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses*, 5(4), 1175–1207.

- Ramírez, H. R.-M. (2012). Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC veterinary research*, 8, 8.
- Rea-Boutros A, V. S.-L. (2009). Small ruminant lentivirus Tat protein induces apoptosis in caprine cells in vitro by the intrinsic pathway. *Virology*, 5, 93-102.
- Reczyńska D, Z. M. (2018). Acute Phase Protein Levels as An Auxiliary Tool in Diagnosing Viral Diseases in Ruminants-A Review. *Viruses*, 10(9), 502.
- Reina, R. B. (2009). Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Veterinary journal*, 182(1), 31–37.
- Reina, R. G. (2009). Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Veterinary microbiology*, 138(3-4), 251–257.
- Rosati, S. P. (2004). Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. *Journal of virological methods*, 121(1), 73–78.
- Sáez-Cirión, A. &. (2018). Immune Responses to Retroviruses. *Annual review of immunology*, 36, 193–220.
- Stonos, N. W. (2014). Immunogenetics of small ruminant lentiviral infections. *Viruses*, 6(8), 3311–3333.
- Tang H, K. K.-S. (1999). Lentivirus replication and regulation. *Annual Review of Genetics*, 33, 133–170.
- Thormar H. (2013). The origin of lentivirus research: Maedi-visna virus. *Current HIV research*, 11(1), 2–9.
- Trujillo, J. D. (2004). Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. *Virology*, 325(1), 129–136.

- Valas, S. B. (2000). Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Journal of virology*, 74(13), 6178–6185.
- Villet, S. B. (2003). Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. *Journal of virology*, 77(17), 9632–9638.
- Villoria M., L. L. (2013). Detection of Small Ruminant Lentivirus in environmental samples of air and water. *Small Ruminant Research*, 110, 155– 160.
- Yirsaw, A. &. (2021). Goat $\gamma\delta$ T cells. *Developmental and comparative immunology*, 103809, 114.
- Zanoni , R. (1998). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *The Journal of general virology*, 79 , 1951–1961.

Apéndice

Comparativa de los resultados obtenidos en el ELISA-p16A y el estándar de oro, tomando en cuenta únicamente los plasmas obtenidos de animales con información de secuencias virales y en los cuales se determinó la infección con el genotipo A (Acevedo, 2020). La información disponible indicaba que estos rebaños probablemente no contaban con infecciones mixtas (rebaños que pudieran tener infección con un genotipo B). Bajo esos criterios sólo se tomaron en cuenta 9 animales tabla 32.

Tabla 29. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el estándar de oro y el ELISA-p16A de animales identificados como infectados con el genotipo A de LvPR.

Genotipo A		Estándar de oro	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	7	0
	Negativo	2	0

Tabla 30. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en animales infectados con LvPR genotipo A, con respecto a el estándar de oro.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
77.8%	100%	0.000

Para poder analizar los resultados tan heterogéneos que se muestran, se decidió únicamente tomar en cuenta los rebaños (n=158) que en el trabajo de Acevedo et al., (2020) se lograron identificar secuencias de LvPR clasificadas filogenéticamente

como genotipo A, para así compararlos de forma independiente con cada ELISA comercial que se utilizó previamente (VMRD y ERADIKIT).

En las siguientes tablas se muestra la comparativa entre el kit VMRD y la selección de animales que se describió en el párrafo anterior. Como se puede apreciar con las tablas anteriores, el análisis se muestra por especie y en conjunto.

Tabla 31. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA VMRD y el ELISA-p16A de animales identificados como infectados con el genotipo A de LvPR en borregos y cabras.

Genotipo A (borregos y cabras)		VMRD	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	19	30
	Negativo	23	86

Tabla 32. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A con respecto al ELISA VMRD, en ovinos y caprinos infectados con LvPR genotipo A.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
45.2%	74.1%	0.184

Una vez analizadas por especie se decidió no mostrar los datos obtenidos en las cabras debido a que son únicamente 9 animales; en borregos se presentan los datos a continuación.

Tabla 33. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA VMRD y el ELISA-p16A en borregos identificados como infectados con el genotipo A de LvPR.

Genotipo A (borregos)		VMRD	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	17	30
	Negativo	16	86

Tabla 34. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos infectados con LvPR genotipo A, con respecto al ELISA VMRD.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
51%	74%	0.223

Como se observa en las tablas anteriores la sensibilidad se aumenta ligeramente cuando se comparan los resultados del kit VMRD en borregos (en ambas especies el valor fue de 45.2%, mientras que en borregos alcanzó una sensibilidad del 51%); así como, el nivel de concordancia con un valor de 0.223 (mientras que comparándola con ambas especies el valor fue de 0.184), el cual se considera aceptable.

Por otro lado, se presentan a continuación la comparativa usando el ELISA ERADIKIT y los resultados del ELISA-p16A en ambas especies y en borregos.

Tabla 35. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA ERADIKIT y el ELISA-p16A en borregos y caprinos identificados como infectados con el genotipo A de LvPR.

Genotipo A (ambas especies)		ERADIKIT	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	19	30
	Negativo	17	92

Tabla 36. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos y caprinos infectados con LvPR genotipo A, con respecto al ELISA ERADIKIT.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
52.8%	75.4%	0.250

Mientras que el análisis solo en borregos se muestra en las siguientes tablas.

Tabla 37. Tabla de contingencia 2x2 donde se muestra la distribución de positivos y negativos en el ELISA ERADIKIT y el ELISA-p16A en borregos identificados como infectados con el genotipo A de LvPR.

Genotipo A (borregos)		ERADIKIT	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	17	30
	Negativo	10	92

Tabla 38. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos infectados con LvPR genotipo A, con respecto al ELISA ERADIKIT.

Sensibilidad	Especificidad	Coefficiente de concordancia
63%	75.4%	0.298

Como se observa en las tablas presentadas los valores de sensibilidad y coeficiente de concordancia se ven aumentados de 52.8% a 63% y 0.250 a 0.298 respectivamente, cuando se comparan solo borregos, tal y como pasó con el kit VMRD. Sin embargo, los valores en general de estos tres parámetros (sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia) se muestran aumentados cuando se hace el análisis con el kit ERADIKIT respecto al kit VMRD.

Por otro lado, se decidió tomar en cuenta los rebaños que presentan infecciones mixtas (n= 119); es decir que en al menos uno o más animales fueron identificados infectados con genotipos A y/o B en ambas especies. Como en el análisis anterior también se separó por especie y kit comercial.

Para el caso de los rebaños mixtos las comparativas mostraron los siguientes resultados.

Tabla 39. Población de animales (borregos y cabras) clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A.

Infección mixta (ambas especies)		VMRD	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	46	8
	Negativo	52	13

Tabla 40. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en animales (borregos y cabras) con infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial VMRD.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
46.9%	61.9%	0.049

Para la realización de este análisis se pudo hacer por especie (borregos=64 y cabras=55) y los datos que a continuación se presentan corresponden a los borregos comparándolos con el kit comercial VMRD.

Tabla 41. Población de borregos clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A.

Infección mixta (borregos)		VMRD	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	38	8
	Negativo	9	9

Tabla 42. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos de infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial VMRD.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
80.9%	52.9%	0.332

En cabras los resultados quedaron de la siguiente manera.

Tabla 43. Población de cabras clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial VMRD y el ELISA-p16A.

Infección mixta (cabras)		VMRD	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	8	0
	Negativo	43	4

Tabla 44. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en cabras de infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial VMRD.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
15.7%	100%	0.026

Como puede observarse en las tablas 43 y 45 la sensibilidad se muestra significativamente aumentada (46.9% a 80.9%) cuando se toman en cuenta únicamente borregos en el análisis, mientras que en cabras (tabla 47) disminuye drásticamente la sensibilidad (15.7%) si se compara con el resultado obtenido en ambas especies (46.9%), En contraste, la especificidad en borregos disminuye (52.9%) en el análisis individual respecto al que se obtuvo en ambas especies (61.9%).

Comparando los resultados del ELISA comercial ERADIKIT los resultados se muestran a continuación.

Tabla 45. Población de animales (borregos y cabras) clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-

secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A.

Infección mixta (ambas especies)		ERADIKIT	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	35	19
	Negativo	35	30

Tabla 46. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos y cabras con infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial VMRD.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
50%	61.2%	0.107

Los siguientes análisis se realizaron en cada especie, primero borregos y posteriormente cabras.

Tabla 47. Población de borregos clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A.

Infección mixta (borregos)		ERADIKIT	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	29	17
	Negativo	2	16

Tabla 48. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en borregos con infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial ERADIKIT.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
93.5%	48.5%	0.414

Tabla 49. Población de cabras clasificados como infección mixta por tener ambos genotipos de LvPR (A y B) identificados por PCR-secuenciación comparando los resultados de la técnica comercial ERADIKIT y el ELISA-p16A.

Infección mixta (cabras)		ERADIKIT	
		Positivo	Negativo
ELISA-p16A	Positivo	6	2
	Negativo	33	14

Tabla 50. Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia del ELISA-p16A en cabras con infección mixta, comparándola con los resultados obtenidos en el ELISA comercial ERADIKIT.

Sensibilidad	Especificidad	Coeficiente de concordancia
15.4%	87.5%	0.018

En el caso del ELISA comercial ERADIKIT la sensibilidad se muestra aumentada en dos (ambas especies y borregos (tablas 25 y 27)) de los tres casos respecto al ELISA VMRD. Como se observa en la tabla 27 el valor de sensibilidad alcanza el 93.5% en borregos y cuando se obtienen incluyendo ambas especies disminuye (50%); de forma similar, la especificidad aumenta en cabras alcanzando el 87.5%, no

obstante, la sensibilidad calculada para ambas especies disminuye (61.2%) por último, el coeficiente de concordancia fue moderado en el caso que incluye solo borregos, mientras que en cabras y conjuntando ambas especies los valores obtenidos los clasifican como leves.

En conclusión, cuando se realizaron los análisis de eficiencia diagnóstica (sensibilidad, especificidad) incluyendo ambas especies y en ambos kits comerciales fueron muy similares, lo que no permite identificar el efecto que se observó relacionado a la especie (borregos o cabras), siendo los valores de eficiencia diagnóstica mejores en borregos y en especial cuando son comparados con el ELISA de ERADIKIT el cual incluye antígenos del genotipo A de LvPR.