



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## **PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN PRODUCCIÓN OVINA**

### **VIGÉSIMO SEXTA GENERACIÓN 2016 – 2017**

## **TRABAJO FINAL**

**“DETECCIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE LENTIVIRUS  
DE PEQUEÑOS RUMIANTES QUE CIRCULAN DE FORMA  
NATURAL EN OVINOS DE DOS ESTADOS DEL ALTIPLANO  
MEXICANO.”**

**P R E S E N T A**  
MVZ Jossué Gabriel Loeza Cortina.

Asesores:  
Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat  
M.C. Luis Gómez Núñez  
M.C. Jazmín De la Luz Armendáriz



**Toluca, Estado de México junio 2017**

## DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a las personas que me apoyaron durante todo el proceso del posgrado.

Principalmente a Dios porque me demostró que en todo momento está conmigo, apoyándome y guiándome en el camino que él tiene preparado para mí.

A mis padres y hermana que a la distancia nunca me dejaron solo y en todo momento me apoyaron sin importar las circunstancias.

Mis sobrinos, que han sido un motor para continuar y seguir saliendo adelante.

A Zurisadai Zavala, que en todo momento estuvo ahí para mí, para brindarme su cariño, amor y amistad sin importar la distancias.

A mi Abuela que sé que desde donde este este logro es para ella, que siempre estuvo al pendiente de mí.

A toda mi familia que siempre me brindaron el apoyo para llegar hasta donde estoy.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

El presente trabajo de tesina se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). El estudio fue financiado por el proyecto de investigación: “Desarrollo de una prueba de ELISA indirecta basada en la proteína recombinante de la cápside (CAp25) expresada en *E. coli*, para el diagnóstico en lentivirus en caprinos”. Recursos Fiscales INIFAP No. SIGI. 1115534018.

Agradecerle al equipo de trabajo de dicho laboratorio al Dr. José Luis Cerriteño Sánchez, por el apoyo y conocimientos en biotecnología, lo cuales fueron muy importantes y relevantes para este trabajo y mi formación. Al Dr. José Francisco Rivera Benítez, por su apoyo en la interpretación de resultados.

A mis asesores por el apoyo, la confianza y la comprensión para la realización de este proyecto.

Al personal de trabajo que labora en el Laboratorio de Virología.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de México que con los profesores que laboran en el programa de la Especialidad en Producción Ovina, me formaron durante toda esta etapa como especialistas.

A mis compañeros que estuvieron en esta gran generación.

Por último, pero no menos importante a los propietarios de los ranchos donde se me permitió la toma de muestras para elaborar este trabajo.

## RESUMEN

Loeza Cortina Jossué Gabriel Detección serológica y molecular de lentivirus de pequeños rumiantes que circulan de forma natural en ovinos de dos estados del altiplano mexicano. Tesina de Especialidad en Producción Ovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Bajo la asesoría de Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat, MC. Jazmín De la Luz Armendáriz y MC. Luis Gómez Núñez

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) presentan una amplia distribución mundial, provocan enfermedades multisistémicas, crónicas degenerativas e incurables en ovinos y caprinos. En 2010, se realiza la primera secuenciación del genoma completo de LvPR en México y se clasificó dentro del subgrupo B1. Para el 2016, las infecciones por lentivirus en los ovinos fueron incluidas en el Diario Oficial de la Federación. Por lo que los reportes sobre la infección natural por LvPR en ovinos son pocos, el objetivo de este trabajo fue detectar serológica y molecularmente la infección por lentivirus en ovinos y caprinos de dos estados de la región del altiplano mexicano y la evaluación de la capacidad antigénica de una proteína recombinante CAp25. Se encontró la presencia de anticuerpos de ovinos y caprinos contra la proteína SU, gp135, y solo de caprinos contra la CA, p25, el análisis de los epitopes antigénicos se encontraron diferencias antigénicas en las regiones inmunodominantes de la proteína CA, p25 en aislamientos ovinos previamente reportados por otros autores. Aunado a esto, en el presente trabajo, se logró determinar la presencia de provirus tanto en ovinos como en caprinos. Con lo que se podemos concluir que la combinación entre métodos moleculares y serológicos, representa una estrategia importante para la identificación de infecciones por LvPR en los ovinos y caprinos.

**Palabras clave:** Lentivirus, serología, molecular, proteína, epitopes.

## ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	II
RESUMEN	III
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	12
III. OBJETIVOS	13
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	14
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
VI. CONCLUSIONES	40
VII. BIBLIOGRAFÍA	41

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1.- Protocolo del CENID-MA para la obtención de cuerpos de inclusión.	18
Cuadro 2.- Procedimiento para prueba de Western Blot.	21
Cuadro 3.- Procedimiento para la prueba de ELISA.	23
Cuadro 4.- Secuencia de los iniciadores.	24
Cuadro 5.- Mezcla de reacción de PCR.	24
Cuadro 6.- Resultados de la prueba de ELISAc en ovinos y caprinos del Estado de México.	26
Cuadro 7.- Resultados de la prueba de ELISAc en ovinos y caprinos para el estado de Querétaro.	26
Cuadro 8.- Resultados de la prueba de ELISAc en ovinos y caprinos en dos estados de la región del altiplano mexicano.	27
Cuadro 9.- Comparación de los epitopes de la proteína de la cápside CA, p25 con la secuencia de referencia de LvPR 496/España.	33
Cuadro 10.- Pruebas de PCR en ovinos y caprinos de Estado de México.	35
Cuadro 11.- Pruebas de PCR en ovinos y caprinos de Estado de Querétaro.	35
Cuadro 12.- Comparativo entre pruebas de ovinos positivos.	38
Cuadro 13.- Comparativo entre pruebas de caprinos positivos.	39

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Representación esquemática de la estructura de lentivirus de pequeños rumiantes.	4
Figura 2.- Representación esquemática del provirus de LvPR.	4
Figura 3.- Clasificación de los grupos genéticos de lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR).	5
Figura 4.- Esquema de replicación viral de LvPR.	7
Figura 5.- Detección de la proteína recombinante CA, p25, de LvPR.	19
Figura 6.- Gel de poliacrilamida con la proteína recombinante CA, p25 de LvPR purificada.	19
Figura 7.- Curva de albúmina sérica bovina para cuantificar la proteína recombinantes CA, p25 de LvPR.	20
Figura 8.- Western Blot de los sueros testigos positivos y negativos.	22
Figura 9.- Representación esquemática de las condiciones térmicas programadas en el termociclador	25
Figura 10.- Gráfica para determinar la concentración de proteína.	28
Figura 11.- Gráfica para poder determinar las diluciones de los sueros con anticuerpos secundario 1:7500.	30
Figura 12.- Gráfica para poder determinar las diluciones del anticuerpo secundario.	31
Figura 13.- Gráfica para determinar la dilución de suero y anticuerpo secundario en ovinos.	32
Figura 14. Gráfica de dispersión con los valores de absorbancia de sueros de caprinos.	34
Figura 15.- Gel de agarosa de prueba de PCR para amplificar la detección de provirus por LTR	36
Figura 16.- Gel de prueba de PCR amplificación de fragmento de LTR.	37

## I. INTRODUCCIÓN

### **Antecedentes.**

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) presentan una amplia distribución mundial, provocan enfermedades multisistémicas, crónicas degenerativas e incurables en ovinos y caprinos. Los LvPR, comprenden al virus maedi-visna (vMV) y artritis encefalitis caprina (vAEC). El vMV, se describió por primera vez en Islandia en ovinos Karakul importados de Alemania en la década de los 50'S (Sidgursson et al., 1957), mientras que el vAEC, fue descrito en caprinos en los Estados Unidos de América en 1974 (Pétursson et al., 1976; Pétursson et al., 1992). Las infecciones por lentivirus en ovinos y caprinos anteriormente se consideraban específicas de especie, el vMV en ovinos y vAEC en caprinos. Sin embargo, a partir del 2004, estos dos virus fueron reclasificados como lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR), con base en estudios de epidemiología molecular que demostraron su estrecha relación filogenética (Shah et al., 2004). Los LvPR presentan una marcada predisposición por el sistema retículo endotelial, respiratorio y nervioso central.

En México, se identificó la infección por lentivirus en caprinos importados de Estados Unidos de América, en 1984. La prevalencia determinada fue de un 27.1% positivos por serología (Adams *et al.*, 1984). Por otra parte, en 1986, se realizó un estudio serológico en ovinos para identificar anticuerpos contra vMV, los resultados determinaron una frecuencia positiva por serología del 8.2% (Molina *et al.*, 1986). A finales de la década de los 90's se reportó el primer aislamiento de lentivirus de caprino, utilizando co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (Daltaubuit et al., 1999). Posteriormente, en 2010 se realizó un estudio serológico en caprinos provenientes de la región centro del país, que originó la secuenciación del genoma completo denominada como FESC-752 (No. de acceso HM210570.1) perteneciente al subtipo genético B1 de LVPR (Ramírez *et al.*, 2011).

Aunque existían reportes de la presencia de anticuerpos contra lentivirus en caprinos y ovinos, solamente la artritis y encefalitis caprina (AEC) era considerada enfermedad enzoótica, de notificación obligatoria y reporte mensual, razón por la cual la mayoría de los reportes de seroprevalencia, se enfocaron al estudio de lentivirus en esta especie. En el año 2003 se reportó la presencia de anticuerpos contra LvPR en caprinos del estado de Yucatán con un 3.8% de prevalencia positivas por serología (Torres Acosta *et al.*, 2003). En otro estudio realizado en caprinos en 2008, se reportó una frecuencia del 39.35% de animales positivos a anticuerpos contra LvPR (Vázquez *et al.*, 2008). En el año 2007, se notificó, la pérdida económica de aproximadamente 3 millones de pesos, por el sacrificio de 265 animales ovinos exportados de México a Colombia, la razón fue la detección de anticuerpos contra LvPR en 17 animales positivos a serología por la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (CONASA, 2013). En 2016, las infecciones por lentivirus en los ovinos fueron incluidas en el Diario Oficial de la Federación publicado el 4 de mayo de 2016 (DOF,2016).

### **Agente etiológico.**

Los LvPR pertenecen a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus*. Su genoma está compuesto por dos copias idénticas de ARN lineal de polaridad positiva de 8.4 - 9.2 kb de longitud. La partícula viral mide entre 80 a 100 nm de diámetro, sensible al calor, detergentes y formaldehídos. Los LvPR se conforman de aproximadamente un 60% de proteínas, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN (Sidgursson *et al.*1957, Pétursson *et al*, 1992, ICTV 2009).

El Género lentivirus incluye al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (VIH), virus inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), Virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), y virus de la artritis y encefalitis caprina y virus maedi-visna (LvPR) (ICTV, 2009).

El genoma ARN viral posee tres genes que codifican para las proteínas estructurales, organizados de la siguiente manera: 5'-gag-pol-env-3' (Figura 1). El gen *gag* (antígeno específico de grupo), presenta un tamaño entre 1229 – 1479 nucleótidos de longitud que codifican para una poliproteína de 55 kDa (p55), precursora de las proteínas de la nucleocápside (p14), cápside (p25) y matriz (p17). El gen *pol*, Comprende entre 2934 – 3333 nucleótidos de longitud, codifica para las enzimas virales; transcriptasa reversa, proteasa e integrasa viral, las cuales son esenciales para iniciar el ciclo replicativo y la integración del ADN en la célula hospedadora en forma de provirus. Aunado a esto, el gen *pol* codifica para la enzima dUTPasa, necesaria para la infección en monocitos/macrófagos y células dendríticas. Por último, el gen *env* comprende 2, 549 - 2, 999 nucleótidos de longitud, que codifican para dos proteínas, la primera denominada de transmembrana (TM, gp45) y la segunda de superficie (SU, gp135). La proteína de superficie, es la encargada del reconocimiento y fusión con el receptor de la célula hospedadora y la inducción de anticuerpos neutralizantes. Como otros lentivirus, los LvPR, contienen además otros genes que codifican para proteínas accesorias implicadas en los procesos de transcripción y replicación viral. La proteína *vif* denominada factor de la infectividad viral, es una proteína altamente conservada, que induce una respuesta débil ante el sistema inmunológico del hospedero en condiciones *in vivo*, además de estar involucrada en los procesos de replicación y patogenicidad viral. La proteína *vpr-like*, incrementa la expresión genética viral y por último, la proteína *rev*, regula la expresión de proteínas del virión y síntesis de los transcritos de ARN viral (Narayan et al., 1990, Pétursson *et al*, 1992, Clements et al., 1996, Murphy, 1999). A continuación, en la figura 1 se muestra una representación esquemática de la estructura de un lentivirus y su conformación proteica.

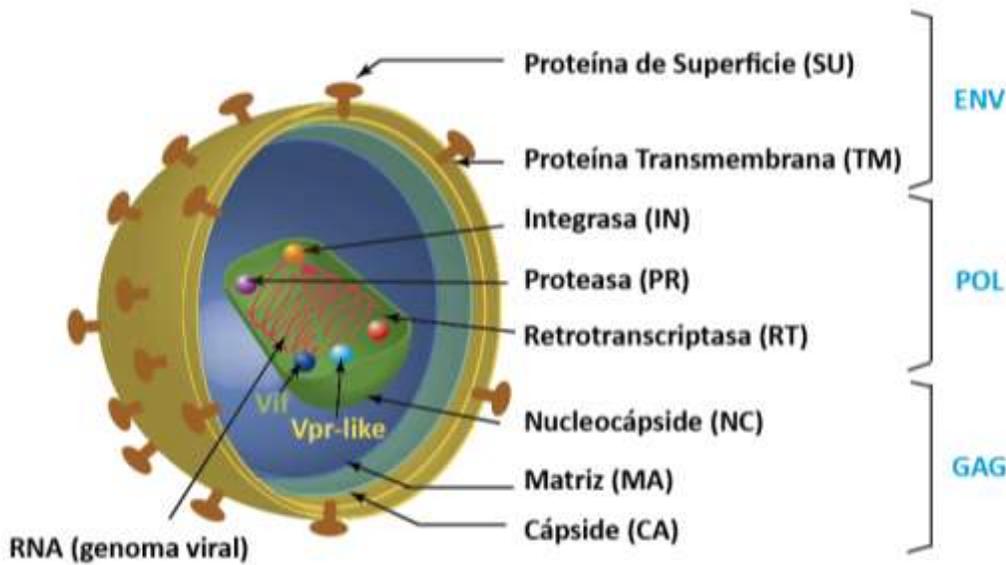


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de lentivirus de pequeños rumiantes. Adaptado de Galaria, 2015.

Una de las características de los lentivirus en su ciclo de replicación es la integración de una copia de ADN intermediario en el genoma de la célula hospedadora denominado como provirus. El provirus se encuentra flanqueado en sus extremos por una región no codificante de repetición larga (LTR, *Long Terminal Repeat*) (Figura 2.). La secuencia LTR, regula la transcripción, el periodo de latencia y la expresión viral. El provirus de los lentivirus se transcribe en el núcleo celular donde se sintetiza el genoma. (Pétursson *et al*, 1992).

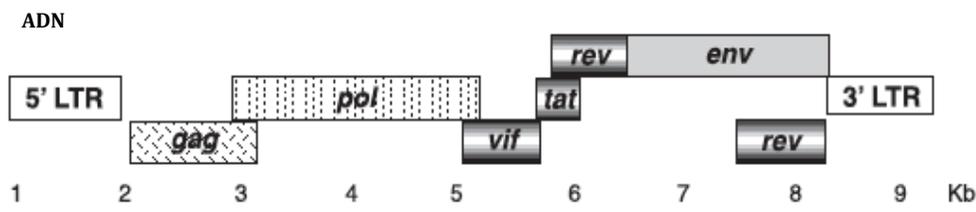


Figura 2. Representación esquemática del provirus de LvPR. Adaptado de Minguijón 2015.

Actualmente los LvPR, se clasifican en 5 grupos genéticos denominados del A-E, los cuales presentan una diferencia de un 25 – 37% en sus secuencias de nucleótidos de dos fragmentos del genoma, uno de 1.8 Kb procedente del gen *gag* y el segundo de 1.2 Kb perteneciente al gen *pol*. En el grupo genético A se han reconocido 15 subtipos genéticos diferentes (A1-A15), mientras que para el grupo B, solamente tres subtipos genéticos (B1-B3), en el grupo C, se encuentran clasificados los aislamientos de Noruega, y en el genotipo D las secuencias de Suiza y España (Reina *et al.*, 2010, Glaria *et al.*, 2012, Shah *et al.*, 2004, Kuhar *et al.*, 2013, Rachid *et al.*, 2013, Workman *et al.*, 2017). El grupo genético E contiene dos subtipos genéticos procedentes de aislamientos en Italia (Greco *et al.*, 2009) (Figura 3).

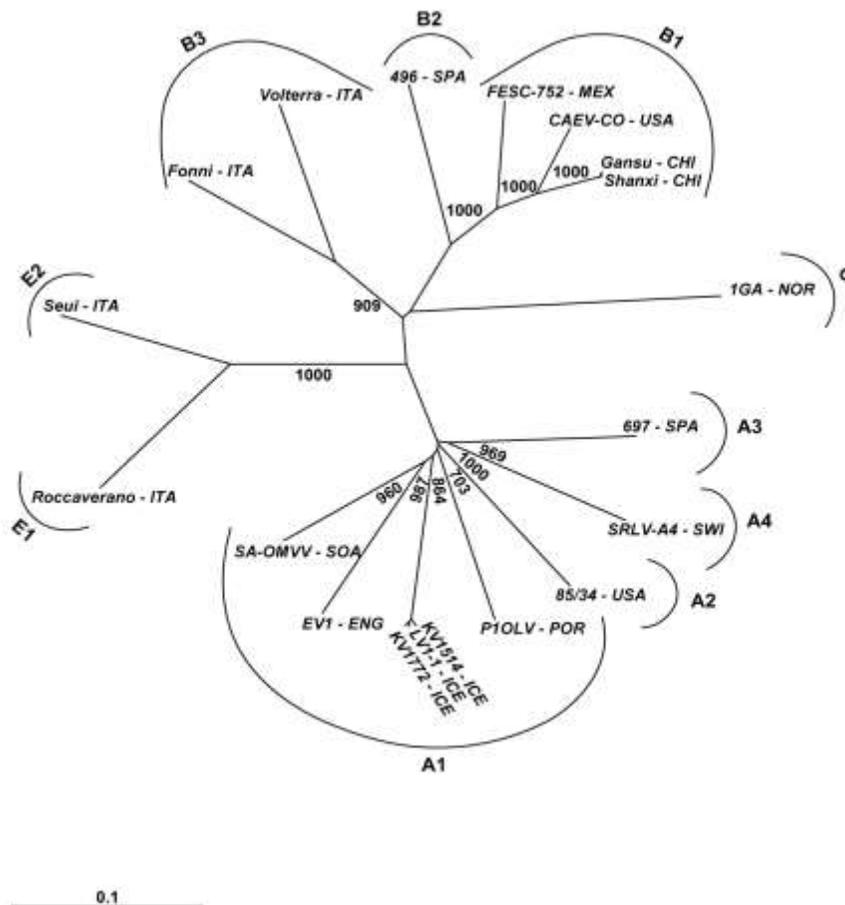


Figura 3. Clasificación de los grupos genéticos de lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR). Adaptado de Ramírez *et al.*, 2016.

Se ha descrito que los genotipos B, C y D, así como los genotipos A1, A3, A4, A5, A6, A9, A11, A12 y A13, son capaces de compartir la infección entre los ovinos y caprinos. Los subtipos que se han descrito solamente en una de las dos especies son: A2 y A15 en ovinos; y A7, A8, A10, A14; E1 y E2 en caprinos (Pisoni *et al.*, 2010).

### **Replicación viral.**

El ciclo de replicación inicia cuando la glicoproteína de superficie SU, gp135 de los lentivirus reconoce al receptor celular presente en las células permisivas a la infección con LvPR como los monocito/macrófago y células dendríticas, posteriormente, se da un cambio conformacional de la proteína de la membrana (TM gp46) que conlleva a la fusión de la membrana viral con la membrana celular, la nucleocápside es liberada dentro del citoplasma, para la transcripción del ARN viral, posteriormente la transcriptasa reversa sintetiza una copia complementaria de ADN (provirus), la cual es transportada al núcleo para su integración en el ADN cromosómico de la célula. La integración del provirus se lleva a cabo mediante secuencias cortas ubicadas en la región no codificante LTR, las cuales son complementarias con las secuencias del ADN cromosómico de las células permisivas fagocíticas-mononucleares. El provirus permanece en forma latente en los monocitos hasta la maduración en macrófagos, en este momento se activan factores transcripcionales que inician la expresión de ARN mensajero (ARNm) para la expresión de proteínas y síntesis de nuevas partículas virales. Las proteínas codificadas por los genes estructurales *gag* y *pol* son sintetizadas en los ribosomas libres en el citoplasma celular, mientras que las proteínas codificadas por el gen *env* se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso, para después ser modificadas en el aparato de Golgi y ensambladas junto con ARN genómico para formar la estructura viral. Estas estructuras son liberadas por gemación a través de la membrana plasmática, sin producir lisis celular, de este modo el virus asegura la continuidad de la infección (Figura 3). (Coffin, 1996, Cunha *et al.*, 2001, Rauddi, 2005)

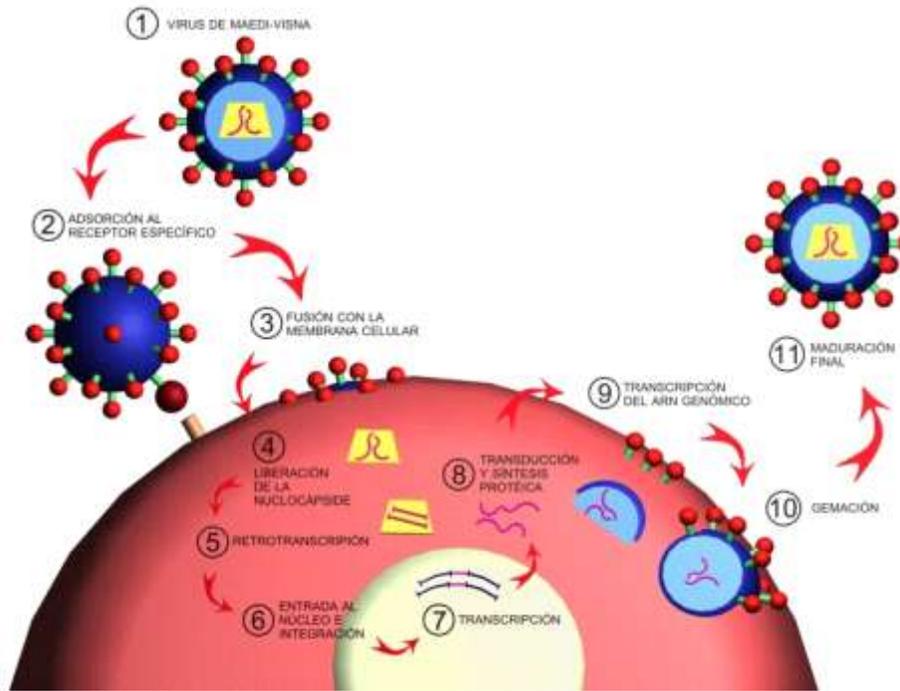


Figura 4. Esquema de replicación viral de LvPR. Adaptado de Perdignes, 2004

### Mecanismo de transmisión de los LvPR.

La infección por LvPR, se da durante los primeros meses de vida principalmente por la ingesta de calostro procedente de hembras previamente infectadas con LvPR, sin embargo, se ha descrito que los ovinos y caprinos puede adquirir la infección por aerosoles a través del contacto directo prolongado y por agua y/o alimento contaminado (Blacklaws et al., 2004), se ha detectado la presencia de ADN proviral en el tracto reproductor de las hembras por lo que es posible la transmisión de forma intra-uterina, así como en el tracto genital de machos y líquido seminal (Barlough et al., 1994, Mohamad et al., 2012, Andréia et al, 2013)

### Patogenia viral.

Una vez que entra el virus al animal es absorbido a nivel intestinal, por las células blanco monocitos y macrófagos, cuando los monocitos maduran a macrófagos, la replicación del virus aumenta, de esta forma el virus puede ser trasladado a

distintos órganos del hospedero evadiendo la respuesta inmune, mecanismo conocido como “Caballo de Troya”. Los ovinos y caprinos infectados con LvPR, presentan un estado de viremia breve, que conlleva a la inducción de anticuerpos contra las proteínas de superficie SU, gp135 y de cápside CA, p25. Los anticuerpos contra la infección por LvPR, se producen en las fases tempranas, sin embargo, la respuesta inmune en el hospedero, es incapaz de mantener títulos altos de anticuerpos neutralizantes, cuando la infección pasa de un estado latente (provirus) a productiva (infección persistente). La infección latente se caracteriza por una replicación viral en concentraciones reducidas, principalmente en ganglios linfáticos, en donde es captado por células presentadoras de antígenos, las cuales van a ser contenidas por los linfocitos, lo que conlleva a procesos inflamatorios crónicos en los órganos blanco, y por lo tanto, la aparición de los cuadros clínicos. (Peluso *et al.*, 1988, Narayan *et al.*, 1989, Cheevers *et al.*, 1988, Blacklaws *et al.*, 1995).

Los LvPR, se replican en monocitos ubicados en sangre, pulmones, bazo y médula, células dendríticas, células de plexo coroideo, células epiteliales y fibroblastos de piel de ovino (Gendelman *et al.*, 1985; Peluso *et al.*, 1988, Brodie *et al.*, 1993)

### **Cuadros clínicos.**

El periodo de seroconversión por LvPR en ovinos y caprinos, se estima a partir de los seis meses a los dos años de edad, sin embargo, la mayoría de las infecciones en los ovinos pueden ser asintomáticas (ausencia de cuadros clínicos), la cual, depende directamente de las propiedades genéticas y antigénicas de la cepa viral. De acuerdo con algunos autores, solamente un 30% de los animales infectados desarrollan la enfermedad clínica, la cual está directamente relacionada con la expresión viral. Los cuadros clínicos comúnmente presentados en los ovinos incluyen problemas neurológicos, respiratorios y en caprinos jóvenes problemas neurológicos y en el estado adulto articulares (Pétursson *et al.*, 1976).

### **a.- Nerviosos**

La presentación nerviosa se suele presentar en animales jóvenes entre los dos a seis meses de edad, en la cual se puede observar leuco encefalomielitis, caracterizada por ataxia unilateral o bilateral de los miembros posteriores y cojeras. Al inicio de la presentación de los cuadros clínicos se puede observar dificultad al caminar, debilidad de miembros posteriores, postración, inclinación de la cabeza, torticolis, temblor en los labios, paraplejía, temblores musculares, ausencia de fiebre y muerte por inanición. En cerebro y médula espinal se observan lesiones inflamatorias con infiltración de células mononucleares de forma multifocal con gliosis astrocítica y desmielinización (Trigo, 1991, Pétursson *et al.*, 1992, Ramírez *et al.*, 2010).

### **b. Respiratorios**

La forma respiratoria se presenta en animales adultos mayores de los dos a cuatro años de edad, uno de los primeros signos que se pueden observar es la pérdida de peso (caquexia), retraso en el crecimiento e intolerancia al ejercicio, pudiendo incluso llegar a la muerte por anorexia. Los cuadros clínicos respiratorios incluyen, neumonía crónica, tos seca, sin fiebre, lo que conlleva a la muerte por problemas respiratorios por agentes secundarios, principalmente bacterianos. Los pulmones aumentan de peso y volumen, conteniendo focos múltiples de 1 – 1.5 mm de diámetro de color gris bien delimitados, las lesiones microscópicas incluyen engrosamiento de los alvéolos pulmonares con infiltración de células mononucleares, hiperplasia del músculo liso y fibrosis (Pétursson *et al.*, 1990, Pétursson *et al.*, 1992, Brodie *et al.*, 1998, Ramírez, 2010).

### **c.- Articulares**

La presentación de cuadros artríticos es una de las manifestaciones más importantes en los caprinos. Los animales con este problema presentan deformidades en las articulaciones, siendo las más afectadas suelen ser las

articulaciones del carpo y las del tarso, la artritis puede ser unilateral o bilateral, los animales que se ven afectados pierden peso hasta quedar postrados. La cantidad de líquido sinovial en las articulaciones incrementa, al igual que la concentración de células mononucleares, las articulaciones pueden contener fibrina y color rojizo o pardusco. Microscópicamente, se observa sinovitis proliferativa crónica, hiperplasia de membrana sinovial con infiltración de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (Narayan *et al.*, 1990, Trigo 1991., Pétursson *et al.*, 1992).

#### **d.- Glandular**

La presencia de mastitis se puede presentar tanto en ovinos como en caprinos, la ubre aumenta de tamaño, se vuelve asimétrica y dura. La mastitis es indurativa difusa, bilateral, crónica, no dolorosa, los ganglios linfáticos supramamarios se hipertrofian. Una de las causas más importantes que se observa es una reducción en la producción y calidad de la leche, lo que conlleva a pérdidas económicas. Este tipo de mastitis por LvPR se caracterizan por presentar una inflamación no supurativa con infiltrado difuso de células mononucleares (Trigo, 1991, Pétursson *et al.*, 1992)

#### **Diagnóstico.**

Las pruebas para la detección de anticuerpos contra LvPR en los ovinos y caprinos incluyen, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Daltabuit, 2006, Ramírez *et al.*, 2013), que actualmente se encuentran disponibles de forma comercial los cuales emplean diferentes formatos y diseños como, virus purificado, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos y/o la combinación entre ambos. La prueba de ELISA tipo competitiva se basa en el reconocimiento de anticuerpos contra la proteína de superficie SU gp135 (Small ruminant lentiviruses antibody test, VMRD) (Houwens *et al.*, 1982, Ramírez *et al.*, 2013), mientras que la prueba de ELISA indirecta, se basa en la combinación de una proteína recombinante denominada p28 y un péptido inmunogénico sintético contra la proteína TM gp46 codificada por el gen *env* (Chekit CAEV/MVV, IDEXX). Los

métodos de ELISA comerciales emplean proteínas que derivan de los genes *gag* y *env* (Zanoni et al., 1994). Otro método disponible para la detección de anticuerpos contra LvPR, es por inmunodifusión en gel de agar con el antígeno Pourquier p28 (Pourquier® AGID CAEV p28 Ab Test). Las pruebas complementarias para la confirmación de anticuerpos contra LvPR, incluyen Western blot, inmunofluorescencia, radioinmunoprecipitación e inmunohistoquímica, sin embargo, requiere de personal capacitado y tiempos relativamente prolongados para la realizar la identificación, así como un alto costo por la prueba. Las pruebas serológicas cuentan con algunas limitaciones como son; tiempos prolongados para inducir seroconversión, bajos títulos de anticuerpos que, en pruebas poco sensibles, pudiera otorgar resultados falsos negativos y una reducida compatibilidad con los antígenos utilizados en la prueba diagnóstica (Ramírez et al, 2013)

Los métodos moleculares, han sido de gran utilidad como pruebas complementarias para la detección del ARN viral o provirus. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y PCR tiempo real, han sido las mayormente utilizadas, para confirmar la ausencia de provirus en células mononucleares de sangre periférica en ovinos y caprinos negativos a la serología. Los métodos moleculares al igual que las pruebas serológicas también presentan algunas limitaciones, por lo tanto, se debe evaluar la especificidad de los iniciadores y realizar una correcta elección de la región blanco del genoma que se desea amplificar, actualmente, se han reportado diversos métodos experimentales, para la identificación del provirus que incluye la identificación de la región no codificante de terminación larga (LTR), y los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* de LvPR. (Barquero et al, 2013, Ramírez et al, 2013, Kuhar et al, 2013)

## II. JUSTIFICACIÓN

La producción ovina en el Estado de México y Querétaro aportan un 16% de la producción anual nacional (SIAP, 2016). Sin embargo, existen pocos reportes sobre la infección natural de LvPR en ovinos ya que hasta 2016 se integró dentro del grupo 3 de enfermedades de reporte obligatorio mensual del Diario Oficial de la Federación.

### III. OBJETIVO GENERAL

- Detectar serológica y molecularmente la infección por lentivirus en ovinos y caprinos de dos estados de la región del altiplano mexicano.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar anticuerpos específicos contra la proteína de superficie (SU, gp135) de LvPR, utilizando una prueba comercial.
- Evaluar la propiedad antigénica de una proteína recombinante de la cápside CAp25 de LvPR, en sueros provenientes de ovinos y caprinos.
- Identificar el *provirus* en células mononucleares de sangre periférica e hisopados nasales de ovinos y caprinos.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

##### **Diseño experimental.**

Se realizó un muestreo transversal no probabilístico (muestreo de sujetos disponibles) en sistemas de producción en donde co-habitaban caprinos y ovinos del Estado de México y Querétaro. El número de muestras fue calculado con la fórmula de Canon y Roe con un límite de confianza del 95%, utilizando una frecuencia previamente reportada en ovinos de 5% por Sánchez, *et al.*, 2016. El número de muestras de sangre con anticoagulante (heparina), sin anticoagulante e hisopados nasales a coleccionar fue de 35 ovinos y caprinos por unidad de producción.

En México, la infección por lentivirus en los ovinos puede presentarse de forma asintomática (ausencia de cuadros clínicos), sin embargo, existe evidencia científica que el subtipo genético B1 enzoótico en caprinos, representa un factor de riesgo para la transmisión interespecie. Con base en esta información, se eligieron unidades de producción en donde cohabitarán ambas especies, con la intención de incrementar la probabilidad de encontrar la presencia de anticuerpos y provirus en la especie ovina.

##### **Colección de muestras.**

Las muestras coleccionadas fueron sangre sin anticoagulante para la separación de suero, sangre con anticoagulante para la separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) e hisopados nasales, los cuales fueron colocados en criotubos con 1 ml de Medio de transporte medio mínimo esencial modificado Dulbecco (DMEM).

Todas las muestras se transportaron a 4°C para su procesamiento en el laboratorio de Virología del CENID-Microbiología Animal del INIFAP.

## **Procesamiento.**

### **Suero**

Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron centrifugadas durante 15 minutos a 800 x g, posteriormente se colectó el suero en dos alícuotas cada una de 1 ml. Los sueros fueron almacenados a -20°C, para realizar la detección de anticuerpos contra LvPR.

### **Células mononucleares de sangre periférica (CMSP).**

A partir de las muestras de sangre con heparina se realizó la separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por gradiente de densidad empleando el reactivo comercial Ficoll-Paque PREMIUM® (GE Healthcare), de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente. En un tubo falcón de 15 ml, se colocó tres mililitros (ml) del reactivo Ficoll-Paque PREMIUM®, posteriormente se añadieron tres ml de sangre con heparina, las muestras fueron centrifugadas a 1,800 rpm durante 30 minutos en condiciones de refrigeración (4°C). Posteriormente, se identificó en el gradiente de densidad, las CMSP, las cuales fueron colectadas con una micropipeta en tubos de 1.5 ml nuevos y estériles. Finalmente, las CMSP fueron almacenadas a -20°C.

### **Extracción de ADN de células mononucleares de sangre periférica e hisopados nasales.**

La extracción de ADN genómico, se realizó con el producto comercial Quick-g DNA Mini Prep (Zymo Research No. Cat. D3025), siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante. Posterior a la extracción las muestras fueron conservadas a -20°C.

### **Detección de anticuerpos en ovinos y caprinos contra la proteína de superficie (SU, gp135) de LvPR, utilizando una prueba comercial.**

### **Ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo (ELISAc).**

La prueba se realizó con un paquete comercial para la detección de anticuerpos dirigido a la proteína de superficie (SU, gp135) de LvPR (Small Ruminant Lentivirus Antibody Test Kit VMRD No. Cat. 289-2), siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante.

Posteriormente se realizó la lectura de las absorbancias y se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula:

$$\% I = 100 [1 - (\text{densidades ópticas de las muestras} / \text{el promedio de las densidades ópticas de los controles negativos})].$$

Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera. Sueros con un porcentaje mayor o igual a 35%, fueron considerados como positivos, mientras que los sueros con un porcentaje menor a 35%, se consideraron como negativos.

### **Evaluación de la propiedad antigénica de una proteína recombinante de la cápside CAp25 de LvPR, contra sueros provenientes de ovinos y caprinos**

A partir de una clona de *Escherichia coli* BL21 (*E. coli* BL21) que expresa la proteína recombinante de la cápside (CA, p25) de LvPR generada por, Valladares, 2016. Se comenzó el proceso de producción y purificación para la evaluación de la propiedad antigénica de la proteína recombinante de la cápside (CA, p25) de LvPR. Con base en los resultados obtenidos en la detección de anticuerpos contra LvPR por la prueba comercial, se seleccionaron un suero testigo positivo con el mayor porcentaje de inhibición y un suero testigo negativo con el menor porcentaje de inhibición tanto de ovino como de caprino, para determinar los parámetros de cantidad de antígeno, dilución inicial de suero y titulación del conjugado.

### **Producción y purificación de proteína recombinante P25 de LvPR.**

La proteína recombinante de la cápside (CA, p25) de LvPR, expresada en *E. Coli* BL21, se inoculó en un precultivo, de 10 ml de medio Luria-Bertani (LB), el cual fue incubado por 12 horas, con una agitación de 200 rpm y una temperatura de 37°C. Posteriormente a los precultivos, se les midió absorbancia, y se tomó un mililitro para transferirlo a 50 ml de medio LB, a partir de una absorbancia de 0.1 unidades, los cultivos fueron colocados en agitación por una hora hasta que alcanzaron 0.3 - 0.4 unidades de absorbancia, posteriormente, fueron inducidos con 1.0 milimolar (mM) de IPTG e incubados en agitación, durante 18 horas y al día siguiente se obtuvo el paquete celular para realizar la extracción de proteínas totales de la fase soluble e insoluble donde se recuperaron y purificaron los cuerpos de inclusión (Cuadro 1).

Cuadro 1. Protocolo del CENID-MA para la obtención de cuerpos de inclusión.

- 1 Centrifugar los 50 ml de medio de expresión a 6000 rpm por 10 minutos.
- 2 Lavar con 20 ml de agua y centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos.
- 3 Resuspender el paquete celular en 5 ml de sacarosa al 2%.
- 4 Agitar a 250 rpm por 10 minutos.
- 5 Centrifugar a 6000 rpm por 20 minutos.
- 6 Resuspender en Tris-HCP 50 mM pH7.
- 7 Agitar a 250 rpm x 10 minutos.
- 8 Añadir 5 ml de perlas y romper en vórtex por 1.5 horas intercalando 5 minutos de contacto con hielo por 10 minutos en vórtex.
- 9 Separar las perlas con una gasa y lavar con 2 ml de Tris – HCL 50 mM a pH7.
- 10 Centrifugar el lisado a 6000 rpm por 20 minutos.
- 11 Resuspender el paquete celular en 5 ml de tritón 1%.
- 12 Agitar a 250 rpm por 10 minutos.
- 13 Centrifugar a 6000 rpm por 20 minutos.
- 14 Re suspender el precipitado en 5 ml de agua Milli Q.
- 15 Agitar a 250 rpm por 10 minutos.
- 16 Centrifugar a 6000 rpm por 20 minutos.
- 17 Re suspender el precipitado en 5 ml de Tris-HCP + urea 8M a pH 7.5.
- 18 Centrifugar a 6000 rpm por 20 minutos.
- 19 Al precipitado agregarle 5 ml de sarcocyl 5%.
- 20 Agitar por 1 hora a 250 rpm.
- 21 Dejar al menos por 6 horas en inclinación.
- 22 Ajustar pH 8.
- 23 Centrifugar a 6,000 rpm por 20 minutos.
- 24 Filtrar la parte soluble en 0.45 µm.
- 25 Se coloca en membrana de diálisis con buffer de Tris Hcl 5mM pH 7.5. con 3 cambios de buffer.

La visualización de la proteína CA, p25 recombinante de LvPR se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12.0%. En la figura 5, se muestra las fases de purificación de la proteína recombinante expresada en *E. coli* BL21, y la proteína purificada por columna de afinidad (Figura 6).

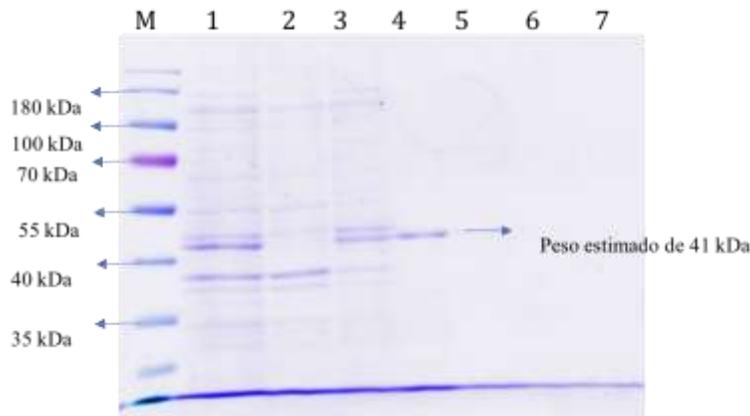


Figura 5. Detección de la proteína recombinante CA, p25, de LvPR. M.- Marcador de peso molecular, carril 1.- proteína de los cuerpos de inclusión, 2.- Filtrado de proteínas, 3.- Proceso de lavado, de los carriles 4 al 7 elusión de la proteína recombinante CA, p25 de LvPR. Fuente: Cerriteño *et al.*, 2017 (Publicación en proceso).

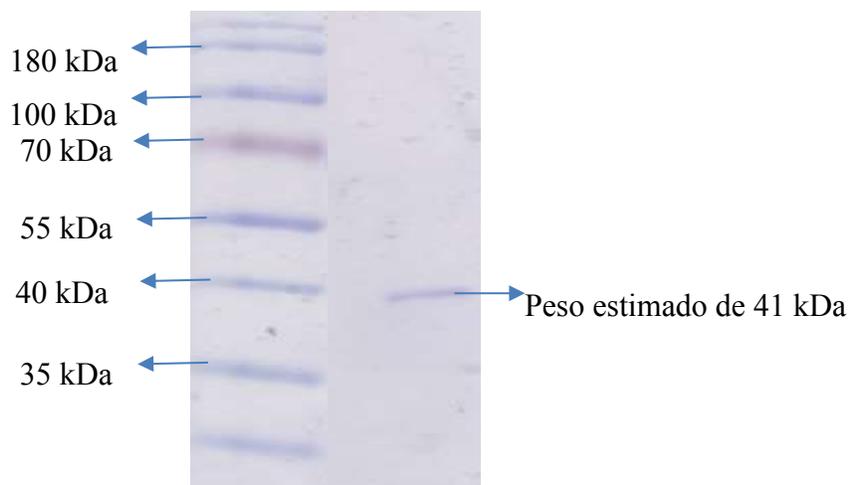


Figura 6. Gel de poliacrilamida con la proteína recombinante CA, p25 de LvPR purificada. Fuente: Cerriteño *et al.*, 2017 (Publicación en proceso).

La cuantificación de la proteína recombinante CA, p25 de LvPR, se realizó por el método de Bradford, utilizando como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina con concentraciones descendentes previamente conocidas (Figura 7). Posteriormente, fueron calculadas las concentraciones de expresión en  $\mu\text{g/ml}$  de la proteína recombinante purificada, utilizando un análisis de regresión lineal con una eficiencia del 0.9873 (Figura 7).

En la curva se observa la fórmula empleada para cuantificar la proteína CA, p25 por  $\mu\text{g/ml}$ .

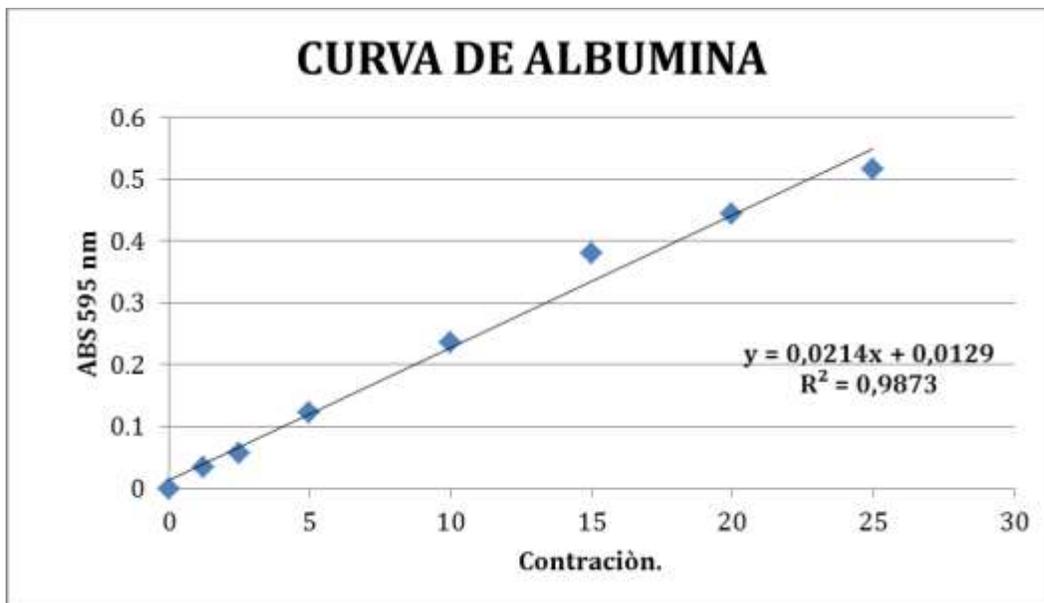


Figura 7. Curva de albúmina sérica bovina para cuantificar de la proteína recombinante CA, p25 de LvPR.

Los sueros testigos positivos y negativos de ovinos y caprinos fueron evaluados por Western blot (Cuadro 2, Figura 8).

Cuadro 2. Procedimiento para prueba de Western Blot.

- 1 Sumergir la membrana por 30 segundos en metanol.
- 2 Lavar en agitación constante en agua por 5 minutos.
- 3 Lavar el gel y la membrana en buffer de transferencia en agitación constante por 10 minutos.
- 4 Mojar por capilaridad seis papeles filtro en buffer de transferencia.  
Colocar en la superficie del equipo de transferencia (Trans-Blot® Turbo™) tres papeles filtro, posteriormente la membrana, el gel de poliacrilamida con las proteínas a transferir y por último, y otros tres papeles filtro, procurando que no queden burbujas al interior.
- 5 Cerrar el equipo colocando las condiciones de transferencia, a 200 miliamperios (mA), 24 voltios, por 50 minutos.
- 6 Sacar la membrana lavar en agitación constante con agua por 10 minutos, después lavar en TBS+Tween por 10 minutos.
- 7 Poner en agitación en rojo de ponceau, para ver que se hayan realizado la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF.
- 8 Poner las membranas en TBS+Tween con el 5% de leche, en agitación constante por toda la noche a 4°C.
- 9 Colocar el suero diluido en TBS+Tween con el 5% de leche, en agitación constante por 2 horas a temperatura ambiente.
- 10 Lavar con TBS+Tween por 10 minutos en tres ocasiones.
- 11 Colocar el anticuerpo secundario diluido TBS+Tween con el 5% de leche, en agitación constante por 2 horas a temperatura ambiente.
- 12 Lavar con TBS+Tween por 10 minutos en tres ocasiones.
- 13 Revelar, con 12 mg de DAB disueltos en 10 ml de PBS 1x, agregando 300 µl de agua oxigenada al 3.34%, hasta observar las bandas.
- 14 Detener la reacción con agua Milli-Q.

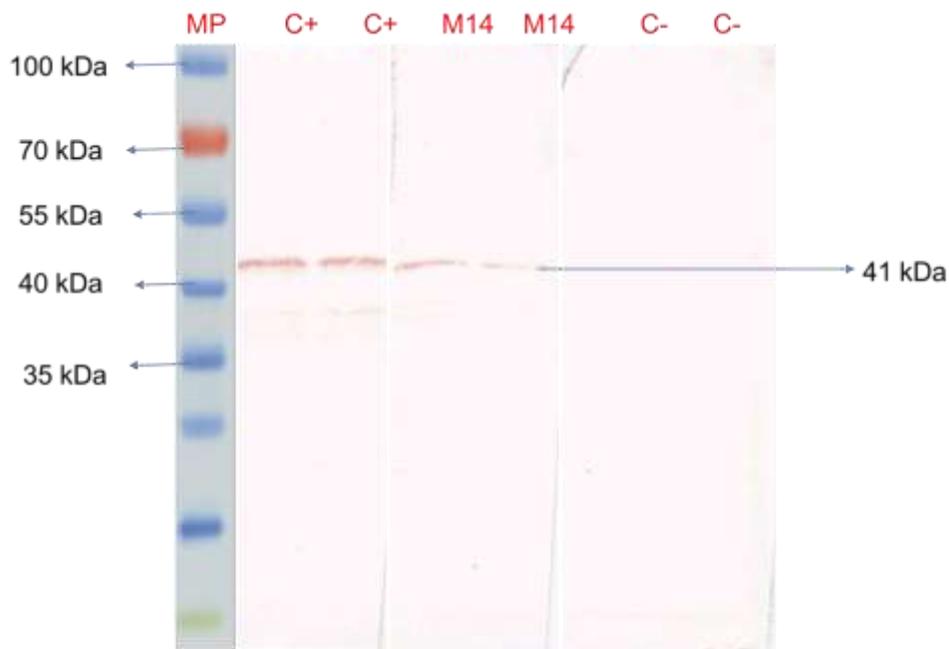


Figura 8. Western Blot de los sueros testigos positivos y negativos. Los carriles denominados como C+, indican la reacción antígeno-anticuerpo de la proteína recombinante CA, p25 recombinante confrontada con el suero testigo positivo. Los carriles C-, indican la ausencia de reacción antígeno – anticuerpo de la proteína CA, p25 confrontada con el suero testigo negativo. los controles negativos de la prueba y M14, corresponde a una muestra de suero testigo positivo para validar la prueba. Fuente: Cerriteño *et al.*, 2017 (Publicación en proceso).

Utilizando la proteína recombinante CA, p25 de LvPR purificada, se llevó a cabo una ELISA indirecta, para la detección de anticuerpos en sueros de ovinos y caprinos, estableciendo previamente un protocolo preliminar indicado en el cuadro 3. Los resultados fueron interpretados con los valores de absorbancia y correlacionados con los de ELISA competitiva comercial.

Cuadro 3. Procedimiento para la prueba de ELISA.

- 1 Sensibilizar la placa con la proteína CA, p25 diluida con buffer de carbonatos 0.05M pH 9.6 con 100µl por pozo y dejar reposando por 24 horas, a 4°C.
- 2 Lavar con PBS + tween 0.05% con 250µl por pozo en tres ocasiones.
- 3 Bloquear con albúmina al 2% o leche 5% en PBS + tween con 100µl por pozo dejando incubar toda la noche a 24°C.
- 4 Lavar con PBS + tween 0.05% con 250µl por pozo tres ocasiones.
- 5 Colocar los sueros diluidos en PBS + tween o leche al 5%, 100µl por pozo, dejando incubar por 1 hora a 37°C.
- 6 Lavar con PBS + tween 0.05% con 250µl por pozo en tres ocasiones.
- 7 Colocar el anticuerpo secundario + HRP diluido en PBS + tween o leche al 5%, 100µl por pozo, dejando incubar por 1 hora a 37°C.
- 8 Lavar con PBS + tween 0.05% con 250µl por pozo en tres ocasiones.
- 9 Colocar 100µl por pozo de solución de rebelado, (esta debe estar a temperatura ambiente), y a una solución de 1:1 de los dos componentes de la solución.
- 10 Tapar para que no llegue la luz a la placa, hasta que se vea la coloración azul de la reacción 10-20 min aproximadamente.
- 11 Detener la reacción con 100µl por pozo de ácido sulfúrico 2M.
- 12 Leer la placa con un filtro de 450 nm.

**Identificación del provirus en células mononucleares de sangre periférica e hisopados nasales provenientes de ovinos y caprinos.**

**Reacción en cadena de la polimerasa punto final.**

A partir del ADN purificado a partir de CMSP de ovinos y caprinos, se realizó la amplificación de 233 nucleótidos de la región no codificante larga terminal (LTR) de LvPR, de acuerdo a lo reportado por Sánchez *et al.*, 2016. A continuación, se muestra la secuencia de los iniciadores utilizados en la Prueba de PCR punto final (Cuadro 4).

Cuadro 4. Secuencia de los iniciadores.

Nombre	Secuencia	Tamaño
FW LTR	GAAACTTCGGGGACGCCTG	233
RV LTR	CCTCGCCATGTCTCTATCTAG	

La reacción de PCR, se llevó a cabo en un volumen final de 12.5  $\mu$ l, empleando una polimerasa comercial (PCR, Master Mix (2X), Thermo Scientific) (Cuadro 5). Las condiciones de PCR, fueron desnaturalización inicial a 95°C por tres minutos, desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineamiento a 56°C por 30 segundos, extensión a 72° por 30 segundos (40 ciclos) y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. (Figura 9)

Cuadro 5. Mezcla de reacción de PCR.

Componente	$\mu$ l
Master Mix	6
Iniciador FW	1
Iniciador RV	1
H2O	2
ADN	2.5
Total	12.5

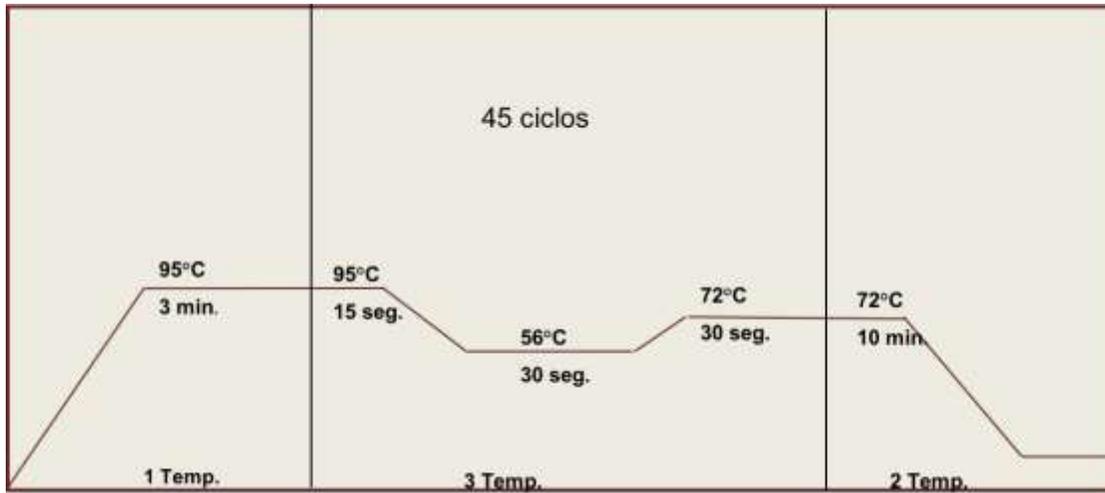


Figura 9. Representación esquemática de las condiciones térmicas programadas en el termociclador

## V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### Detección de anticuerpos en ovinos y caprinos contra la proteína de superficie (SU, gp135) de LvPR, utilizando una prueba comercial

#### Ensayo inmunoenzimático de tipo competitivo.

La detección de anticuerpos contra la proteína de superficie Su, gp135 de LvPR, se realizó en 71 sueros de ovinos y 44 sueros de caprinos provenientes del Estado de México (Cuadro 6) y Querétaro (Cuadro 7), las muestras fueron analizadas por duplicado.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de ELISAc en ovinos y caprinos del Estado de México.

Muestras	Negativo	Positivo	Total
Ovino	32	4	36
Caprino	8	1	9

Para las muestras procedentes del Estado de México se obtuvo un 11.1% de serología positiva a la prueba de ELISAc en los ovinos como en caprinos, en esta unidad de producción el manejo es semi-intensivo.

Cuadro 7. Resultados de la prueba de ELISAc en ovinos y caprinos para el estado de Querétaro.

Muestras	Negativo	Positivo	Total
Ovino	33	2	35
Caprino	29	6	35

Se obtuvo un 5.7% de frecuencia serológica positiva a la prueba de ELISAc en ovinos mientras que en caprinos fue un 17.1%, para las muestras procedentes del

estado de Querétaro, cabe destacar que en esta unidad de producción tiene un sistema de producción intensivo, en el que tanto ovinos como caprinos se ordeñan para la elaboración de quesos. Destacando que la seropositividad en ovinos fue mayor en el Estado de México a diferencia de Querétaro y la de los caprinos fue mayor en el estado de Querétaro.

Cuadro 8. Resultados de la prueba de ELISAc en ovinos y caprinos en dos estados de la región del altiplano mexicano.

Muestras	Negativo	Positivo	Total
Ovino	65	6	71
Caprino	37	7	44

De acuerdo con la interpretación planteada en material y métodos se obtuvo seis muestras con un porcentaje de inhibición mayor al 35%, lo que corresponde a una frecuencia serológica positiva del 8.4% en los sueros ovinos, por otra parte, en caprinos siete sueros presentaron un porcentaje de inhibición mayor al punto de corte, lo que corresponde a una frecuencia serológica positiva del 15.9%. En un estudio realizado por Flores en 2015, en el estado de Sinaloa en el cual reporta que con la prueba comercial de ELISA para la detección de anticuerpos contra la proteína de superficie (SU, gp135), no detectó anticuerpos contra la proteína de superficie SU, gp135 en sueros de ovinos, mientras que en caprinos encontró una seroprevalencia del 13.47% (Flores, 2015). En otro estudio reportado por Sánchez y colaboradores en 2016, analizaron sueros de ovinos pelibuey para la detección de anticuerpos contra la proteína de superficie utilizando la ELISA comercial, los resultados mostraron la ausencia en la detección de anticuerpos, sin embargo, a través de un ELISA indirecta basada en péptidos sintéticos contra la proteína de la transmembrana (TM, 46) la frecuencia serológica positiva fue del 24 al 28% (Sánchez *et al.*, 2016).

Por otra parte, González y colaboradores en 2016, detectaron un 19.2% de frecuencias serológicas positivas en sueros de ovinos provenientes de diferentes

estados de la república mexicana (González *et al.*, 2016). La prueba comercial de ELISA competitiva, se basa en la detección de la proteína de superficie Su, gp135 proveniente de una cepa estándar de caprino que pertenece al subtipo genético B1, por lo tanto, la variación de los resultados, puede estar asociada a la transmisión interespecie del subtipo genético B1 en los ovinos, para los casos positivos con la ELISA competitiva comercial o por otra parte, en los sueros negativos de ovino, la variabilidad antigénica en regiones inmunodominantes o la presencia de otros grupos genéticos diferentes al B1.

### **Evaluación de la propiedad antigénica de una proteína recombinante de la cápside CAp25 de LvPR, contra sueros provenientes de ovinos y caprinos.**

La concentración de la proteína recombinante de la cápside (CA, p25) determinada por el método de Bradford, mostró un rendimiento de 16.42 µg/m. Para estandarizar el ensayo preliminar se sensibilizaron placas Maxisorp con concentraciones ascendentes de la proteína recombinante de la cápside (CA, p25), la cual fue evaluada con sueros testigos positivos y negativos de caprinos, en la gráfica se muestra los valores de absorbancia para cada una de las concentraciones evaluadas.

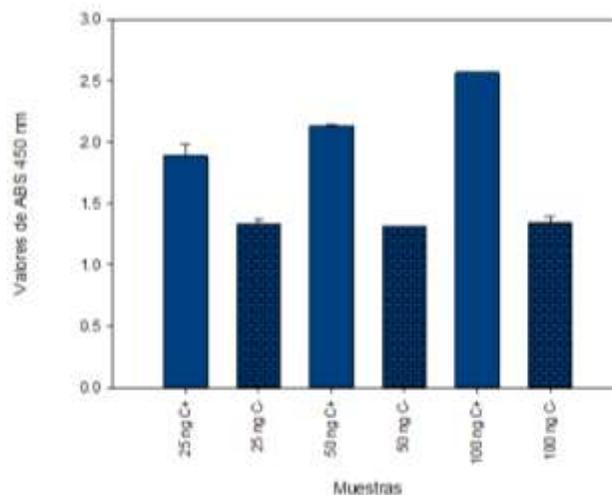


Figura 10. Gráfica para determinar la concentración de proteína.

Con base a los resultados se determinó que la concentración de 100 ng, fue la óptima para llevar a cabo la sensibilización de las placas Maxisorp, debido a que los valores de absorbancia de los controles testigos positivo y negativos, presentaron la proporción más amplia en unidades de absorbancia. La cantidad de antígeno empleado en el presente estudio concuerda con lo reportado por Sanjosé y colaboradores en el 2016, que utilizaron 100 ng de dos péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos contra la proteína de la membrana de LvPR (Sanjosé *et al.*, 2016), sin embargo en otros estudios donde se ha empleado virus purificado para el desarrollo de ELISAS, han utilizado hasta 3.0 µg por cada pozo para la sensibilización de las placas Maxisorp, lo que representa 30 veces más a la cantidad utilizada en nuestro estudio (Sardi *et al.*, 2010).

Posteriormente, se determinó la dilución de los sueros testigos positivos y negativos incluidos en la evaluación a partir de 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500, como se observa en la figura 11, los valores de absorbancia del suero testigo negativo en una dilución de 1:100 fue menor a comparación de una dilución de 1:50, por lo que se estableció como dilución inicial para la identificación de anticuerpos, con el argumento de que las infecciones por lentivirus en ovinos y caprinos, pueden presentar títulos de anticuerpos reducidos. En las diluciones 1:250 y 1:500 se visualizó una reducción significativa de la proporción de los valores de absorbancia de los sueros testigos positivo y negativo, lo que pudiera dar origen a una reducida sensibilidad para el reconocimiento de la proteína recombinante de la cápside (CA, p25) y conducir a resultados falsos negativos. Con esta prueba se pudo determinar las diluciones del suero quedando como la mejor condición 1:100 con la dilución del anticuerpo secundario con 1:7500, pero se hicieron más diluciones del anticuerpo secundario para determinar si la lectura de los valores de absorbancia basal del control testigo negativo presentaba mayor reducción (Figura 12). Para el desarrollo de un método estandarizado es importante realizar la evaluación de la concentración de antígeno, dilución inicial de las muestras problema y titular el conjugado.

En el presente estudio, se realizó los ensayos preliminares para desarrollar una prueba de ELISA, basada en una proteína recombinante homóloga a la de un lentivirus que circula de forma natural en los caprinos altamente relacionado con el subtipo genético B1. En un estudio reportado por Nascimento y colaboradores en 2013, evaluaron diferentes concentraciones de antígeno a partir de 0.125 µg hasta 1.0 µg, la dilución inicial de los sueros problema a partir de 1:50 hasta 1:200 y titulación del conjugado a partir de 1: 2, 000 a 1:10, 000, las concentraciones óptimas finales que los autores reportan para su ensayo fueron de 0.25 µg de antígeno, dilución inicial del suero 1:200 y título del conjugado en 1: 3, 000 (Nascimento *et al.*, 2013).

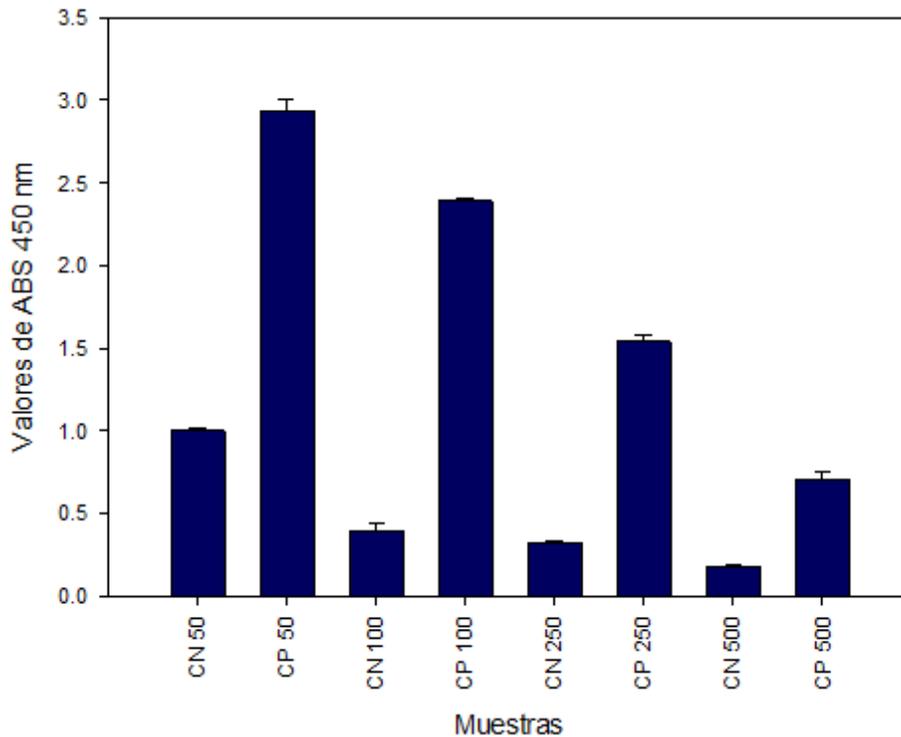


Figura 11. Gráfica para poder determinar las diluciones de los sueros con anticuerpos secundario 1:7500.

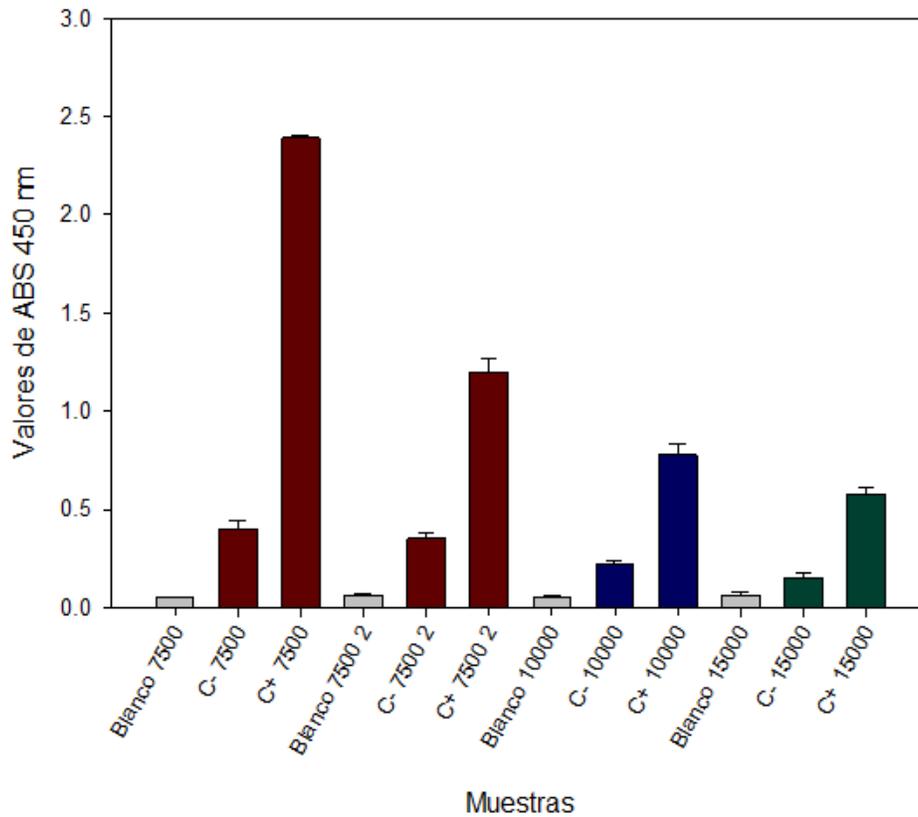


Figura 12. Gráfica para poder determinar las diluciones del anticuerpo secundario.

De igual forma se realizó un estudio preliminar para determinar la propiedad antigénica de la proteína recombinante de la cápside (CA, p25), en sueros ovinos utilizando las mismas constantes de proteína determinada en la prueba de caprinos, y utilizando los controles de caprino como testigos positivos y negativos de la prueba, donde se buscó determinar las mejores condiciones de la dilución de los sueros las cuales iban desde: 1:2, 1:10 y 1:20 y del anticuerpo secundario que fueron de 1:5000, 1:7500 y 1:10000. (Figura 13).

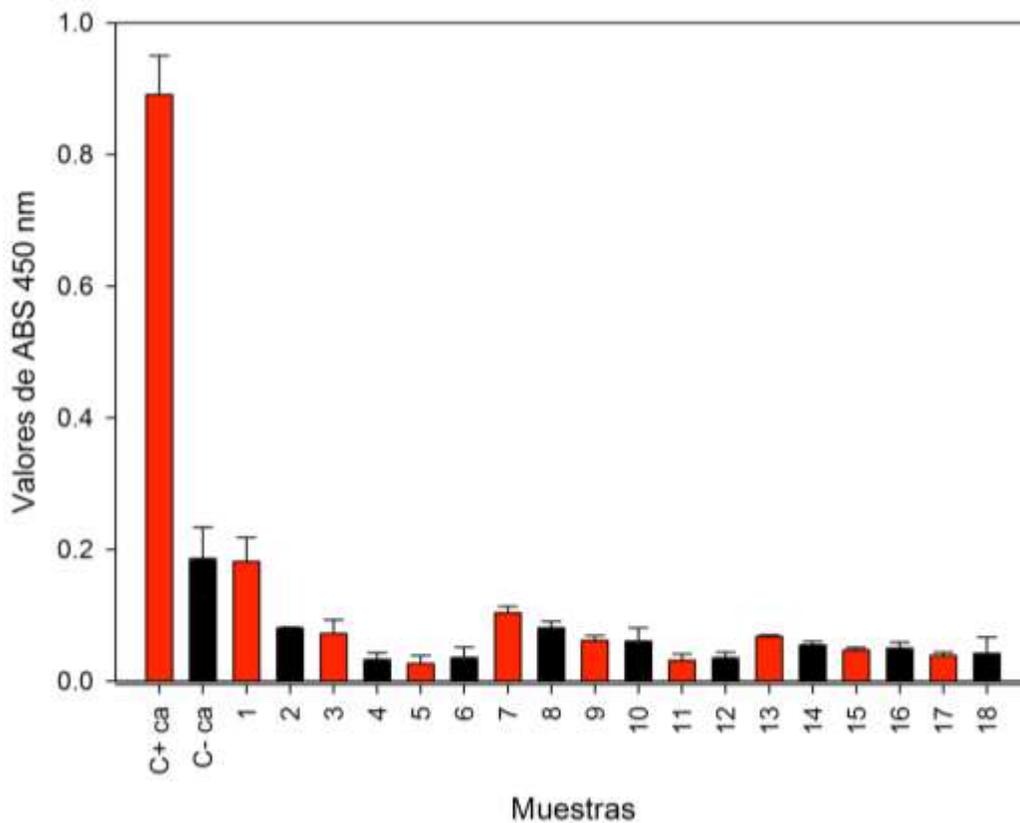


Figura 13. Gráfica para determinar la dilución de suero y anticuerpo secundario en ovinos.

Como se observa en la figura 13 no se encontró reconocimiento de los sueros de ovinos a la proteína recombinante de la cápside (CA, p25), por lo que se analizaron las secuencias la proteína de la cápside para determinar variabilidad en los epitopes antigénicos de esta proteína en los 10 subtipos de LvPR, reportados que afectan a los ovinos KV1514 (No. access. M60610), LV1 (No. access.M10608), Kv1772 (No. access. L06906), Fonni (No. access. JF502416), Volterra (No. access. JF502417), Spain 496 (No. access. FJ195346), Spain 697 (No. access. HQ848062), SA – MVV (No. access. M34193), P1OLV (No. access. AF479638), 85/34 (No. access. AY101611) reportadas en el Gen Bank, todas analizadas contra la proteína recombinante de la cápside (CA, p25),

Esta proteína presenta 8 determinantes antigénicos potenciales de los cuales solo en cinco de ellos se encontró homología con los epítopes previamente reportados para lentivirus en caprinos, siendo la cepa española 496 la que presentó mayor compatibilidad antigénica (cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de los epítopes de la proteína de la cápside CA, p25 con la secuencia de referencia de LvPR 496/España.

Proteína p25				Secuencia Spain 496			
n	Codón de inicio	Secuencia	Codón de término	n	Codón de inicio	Secuencia	Codón de término
1	22	MFQQLQTVAMQHGLVS	37	1	14	SWKAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVS	37
2	41	<b>ERQLAYYA</b>	48	2	41	<b>ERQLAYYA</b>	48
3	55	<b>DILEVLA</b>	61	3	55	<b>DILEVLA</b>	61
4	95	<b>GGLTVDQ</b>	101	4	95	<b>GGLTVDQ</b>	101
5	120	ARQICLQWVISALRAVRH	137	5	120	ARQICLQWVISALRAVRH	137
6	159	<b>FAARLLEA</b>	166	6	159	<b>FAARLLEA</b>	166
7	168	DAEPVTQAIKEYLKLTSY	186	7	168	DAEPVTQPIKEYLKLTSY	186
8	197	<b>MDRVLGQRVQQAS</b>	209	8	197	<b>MDRVLGQRVQQAS</b>	209

Se realizó la prueba de ELISAI solo con los 44 sueros de caprinos para la evaluación de la proteína recombinantes de la cápside (CA, p25) y detectar los anticuerpos específicos para LvPR, los resultados se muestran en la figura 14.

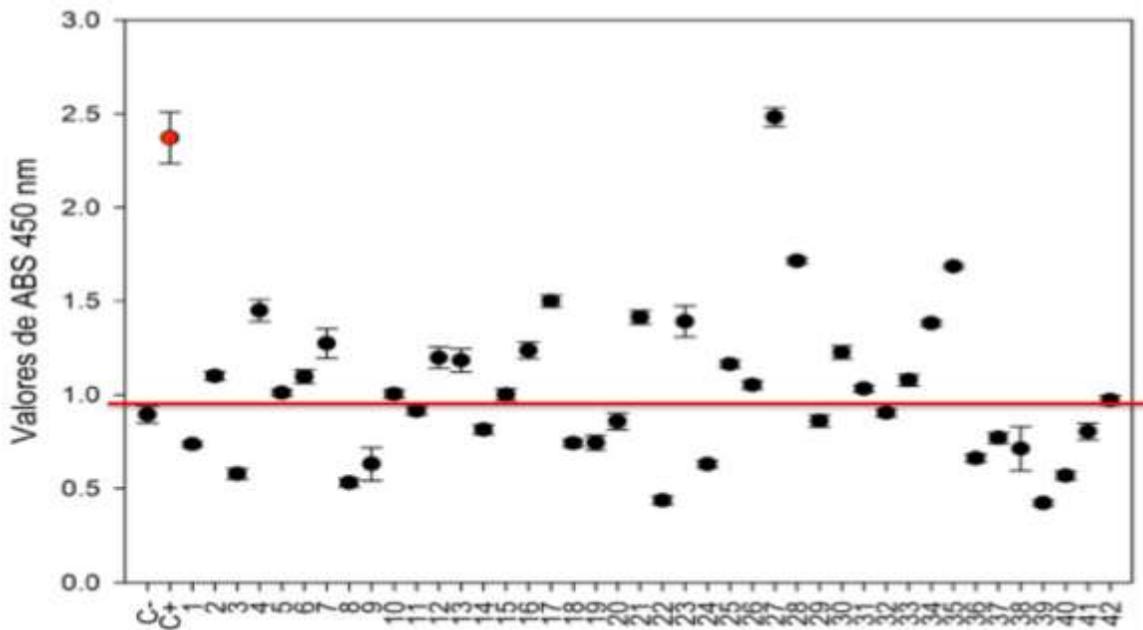


Figura 14. Gráfica de dispersión con los valores de absorbancia de sueros de caprinos.

En el estudio de Flores, 2015 en donde trabajo con una prueba de ELISAI con péptidos sintéticos reportadas por de Andrés y colaboradores en 2013, En los que con la prueba de ELISAI en España encontraron la presencia de anticuerpos en ovinos y caprinos, mientras que en este trabajo la proteína recombinante que se utilizó para la ELISAI, no reconoció anticuerpos de ovinos contra LvPR (De Andrés *et al.*, 2013; Flores, 2015)

**Identificación del provirus en células mononucleares de sangre periférica e hisopados nasales provenientes de ovinos y caprinos.**

**Reacción en cadena de la polimerasa punto final.**

La detección de provirus en células mononucleares de sangre periférica se llevó a cabo a partir de 71 muestras de ovino y 44 de caprino. Los resultados por PCR punto final presentados en el cuadro 7 mostraron una frecuencia positiva a la detección del provirus del 9.8% para ovinos y un 18.2% de frecuencia positiva a la

detección del provirus en caprinos. Así mismo, se realizó la detección en hisopados nasales en donde la frecuencia positiva fue del 1.4% en ovinos y un 0% para los caprinos. La detección de provirus es importante en el diagnóstico de LvPR, como pruebas complementarias para detectar ovinos y caprinos con infecciones latentes, que aún no han seroconvertido, y por lo tanto en la evaluación serológica son considerados como negativos. La detección de la región no codificante LTR, ha sido ampliamente explorada para el desarrollo de herramientas moleculares, en ovinos de la raza pelibuey se logró la detección de un 31% de animales positivos por serología (Sánchez *et al.*, 2016) y en ambas especies (Barquero *et al.*, 2013).

Cuadro 10. Pruebas de PCR en ovinos y caprinos de Estado de México.

Especie	CMSP			HN		
	+	-	Total	+	-	Total
Ovinos	0	36	36	0	36	36
Caprinos	0	9	9	0	9	9

En el Estado de México no se encontró la presencia de provirus.

Cuadro 11. Pruebas de PCR en ovinos y caprinos de Estado de Querétaro.

Especie	CMSP			HN		
	+	-	Total	+	-	Total
Ovinos	7	28	35	1	34	35
Caprinos	8	27	35	0	35	35

En las muestras del estado de Querétaro se detectó la presencia de provirus en ambas especies, siendo un 20% de positivos en ovinos y un 22.8% en caprinos para la prueba de PCR de células mononucleares de sangre periférica (CMS) y un 2.8% en ovinos y 0% en caprinos para la prueba de PCR de hisopados nasales.

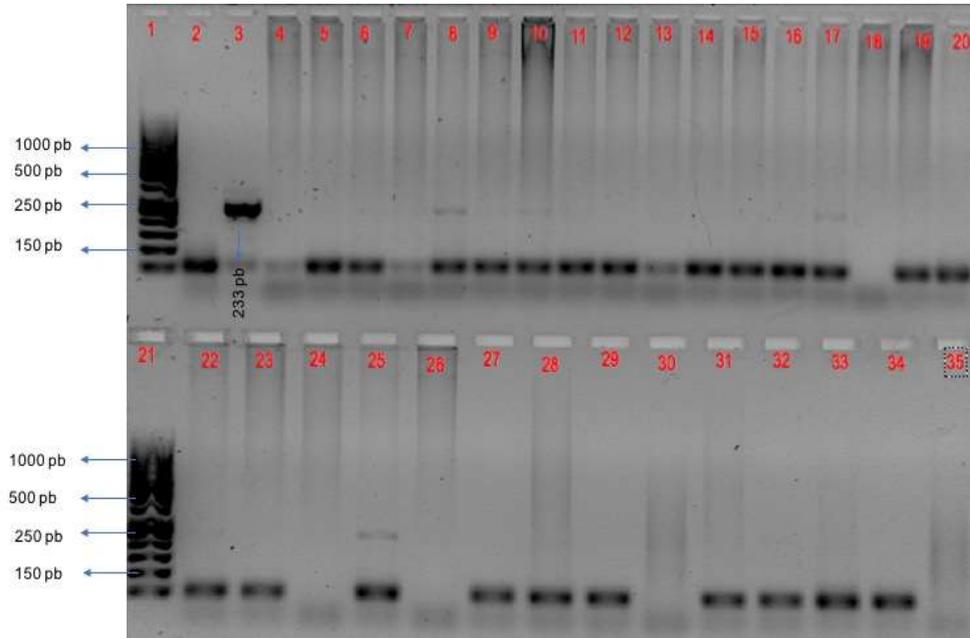


Figura 15. Gel de agarosa de prueba de PCR para la detección de provirus por LTR. En los carriles 1 y 21 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2.- control negativo de reacción, 3.- control positivo a partir de un purificado de proteína de LTR, de los carriles 4 al 15 son muestras de CMSP de ovinos, del carril 16 al 26, son muestras de CMSP de caprinos, del carril 27 al 35 son muestras de hisopados de ovinos.

Se observan ligeramente bandas del tamaño esperando en los carriles 8, 10, 17 y 25, en los otros carriles se alcanza a ver bandas con mayor expresión las cuales son considerados componentes de la reacción de PCR.

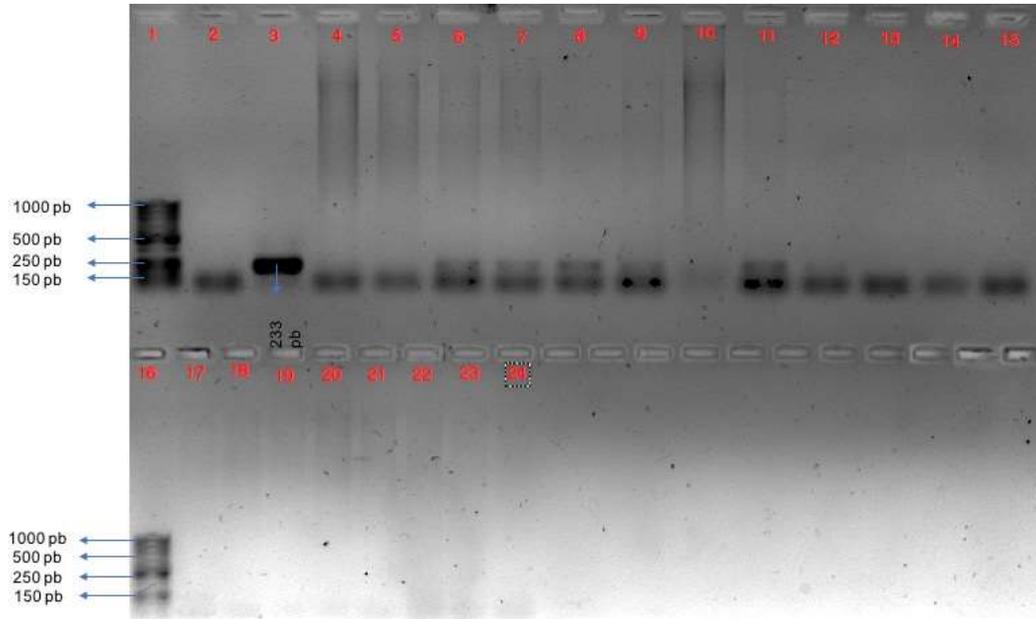


Figura 16. Gel de prueba de PCR amplificación de fragmento de LTR. Los carriles 1 y 16 son los marcadores de peso molecular, carril 2.- control negativo de reacción, 3.- control positivo a partir de purificado de proteína de LTR, de los carriles del 4 al 24 son muestras de CMSP de ovinos.

Se observa una banda de amplificación del tamaño esperado en los carriles 6, 7, 8, 9, 11. El resto de los carriles no se apreció esa banda por lo que se consideran negativos.

Posteriormente se realizó una evaluación de la relación de los animales positivos a las diferentes pruebas para, poder identificar que animales pudieran estar con la etapa de latencia del virus y aparte diseminando o que tenga anticuerpos contra los LvPR (Cuadro 12 y 13).

Cuadro 12. Comparativo entre pruebas de ovinos positivos.

	ELISA	PCR	
	Comercial (gp 135)	CMSP	HN
1	--	+	+
2	--	+	--
3	--	+	--
4	--	+	--
5	--	+	--
6	--	+	--
7	--	+	--
8	+	--	--
9	+	--	--
10	+	--	--
11	+	--	--
12	+	--	--
13	+	--	--

Para esta evaluación solo se tomó en cuenta la prueba de ELISA comercial y las pruebas de PCR, debido a que el ELISAi interno, los sueros que se probaron como controles negativo y positivo no presentaron reacción ante la proteína recombinante. En este cuadro se observa que solo un ovino repitió resultados en las dos pruebas de PCR, y que los demás animales dieron solo positivos en una de las tres pruebas.

En un estudio realizado en España por Barquero et al., 2013, en los que buscaron por medio de una prueba de ELISA y PCR, la presencia de provirus y anticuerpos en ovinos y caprinos, describe que en varias muestras de ovinos en los que encontró positividad en PCR, estas bajaron cuando se llevó a cabo la seroconversión, algo muy similar a lo que se reporta en este trabajo en el que se encontraron animales, que fueron positivos solo al ELISA, y no así para las pruebas de PCR.

Los autores consideran, que la respuesta inmune en los ovinos es muy eficiente para el control y neutralización del virus, lo que podría sugerir una causa probable de los resultados obtenidos en este estudio. En caprinos ellos encontraron muy bajos resultados de animales positivos ELISA y en PCR un 54.8%, fueron positivos, lo que podría deberse a que en España la presencia de LvPR en ovinos es mucho más importante a diferencia de México en donde la presencia de LvPR en caprinos es más estudiada que en ovinos.

Cuadro 13. Comparativo entre pruebas de caprinos positivos.

	ELISA		PCR	
	Comercial (gp 135)	Interno (P25)	CMSP	HN
1	--	1.449	+	--
2	+	1.010	--	--
3	--	1.096	+	--
4	--	1.274	+	--
5	+	1.198	--	--
6	+	1.184	+	--
7	+	1.001	+	--
8	--	0.743	+	--
9	--	0.858	+	--
10	+	1.052	--	--
11	--	0.954	+	--
12	+	1.684	--	--

Se tomaron en cuenta las pruebas de diagnóstico y solo los valores de absorbancia de la prueba de ELISAi con la proteína recombinante de la cápside (CA, p25), donde el valor de absorbancia del testigo negativo fue de 0.895 y se observa que solo dos sueros de los animales no fueron superiores al valor de absorbancia del testigo negativo. Se observa que dos caprinos repitieron como positivos con el ELISA comercial y PCR de CMSP, y los demás animales dieron positivos a una sola prueba.

## VI. Conclusión.

La epidemiología de los lentivirus de pequeños rumiantes, se deben considerar el estudio en ambas especies (ovinos y caprinos). En el presente estudio se realizó la detección de anticuerpos contra la proteína de superficie SU, gp135 y la proteína recombinante de la cápside CA, p25 en sueros de caprinos, sin embargo, solo existió reconocimiento para la proteína de superficie SU, gp135 en los sueros de ovinos, lo que pudiera ser interpretado como variabilidad genética en los determinantes antigénicos de la proteína de la cápside de los lentivirus que circulan naturalmente en ovinos o incluso la presencia de otros grupos genéticos al B subtipo 1 de LvPR. La combinación entre métodos molecular y serológicos, es una estrategia adecuada para la identificación de infecciones latentes a través de la amplificación de un segmento de provirus, que permita mejorar las estrategias para el control de la infección en estas especies.

## VII. Bibliografía.

- Ali Al Ahmad Mohamad Z, Laurence Dubreil, Gérard Chatagnon, Zakaria Khayli, Marine Theret, Lionel Martignat, Yahia Chebloune and Francis Fieni. (2012). Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) in vivo. *VETERINARY RESEARCH*, 7.
- Adams D. S., R. E. Oliver, E. Ameghino, J. C. DeMartini, D. W. Verwoerd, D. J. Houwers, S. Waghela, J. R. Gorham, B. Hyllseth, M. Dawson, F. J. Trigo, T. C. McGuire. (1984). Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *The Veterinary Record*, 493 - 495.
- Andréia P. Turchetti, Juliana J. Paniago, Luciana F. da Costa, Juliano C.M. da Cruz, Gissandra F. Braz, Aurora M.G. Gouveia , Tatiane A. Paixão , Renato L. Santos , Marcos B. Heinemann,. (2013). Distribution of caprine arthritis encephalitis virus provirus, RNA, and antigen in the reproductive tract of one naturally and seven experimentally infected bucks. *Theriogenology*, 933-939.
- Antoine Rachid, Benoit Croisé, Pierre Russo, Michel Vignoni, Daniela Lacerenza, Sergio Rosati, Jacek Kuz´mak and Stephen Valas. (2013). Diverse host–virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats. *Journal of General Virology* (94), 634-642.
- Aspen M. Workman, Aaron M. Dickey, Michael P. Heaton, Michael L. Clawson, Timothy P. L. Smith. (2017). Complete Genome Sequences of Two Genotype A2 Small Ruminant Lentiviruses Isolated from Infected U.S. Sheep. *American Society for microbiology*, 5, 2.
- Blacklaws, BA., Beriatua, E., Torteinsdottir, S., Watt, NJ., de Andres, D., Klein, D., Harkhiss, GD. (2004). Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiology*. 101;199-208.

- Blacklaws, B. A. (2012). Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* (35), 259 - 269.
- Barlough J, E. N. (Diciembre de 1964). Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J Virol Methods*(50), 101 - 113.
- Barquero N., A. Domenech, A. Arjona, J.F. Fernández-Garayzabal, J.A. Ruiz-Santa-Quiteria, E. Gomez-Lucia. (2013). Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Research in Veterinary Science*(94), 817 - 819.
- Borderías, M. N. (2004). Seguimiento de la infección por el Virus de Maedi Visna en una explotación de ganado ovino. Universidad Complutense.
- D. Andrés D, Klein N.J., Berriatua E. 2005. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses, *Ver. Microbiol.* 10;49-61.
- De la Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ. (1996). Shedding of ovine lentiviruses in the semen of infected rams. *Amer. J. Vet.*(57), 684 - 688.
- Daltabuit Test M., de la Concha Bermejillo A., Espinoza L.E.L., Loza Rubio E., Aguilar Setién A., (1999). Isolation of Caprine Arthritis Encephalitis Virus From Goats In Mexico. *Can J Vet Res.* (63), 212-215.
- Flores, R. C. (2015). Detección de Lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) en hatos mixtos de ovinos y caprinos en Culiacán. Tesis. Culiacán, Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Glaría, E. I. (2015). Base genética del tropismo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3. Tesis doctoral. Iruña, Pamplona: Universidad Pública de Navarra.

- Hermann-Hoesing Lynn M. (2010). Diagnostic assay used to control small ruminant lentivirus. *J Vet Diagn Invest.* (22). 843-855
- Murphy, FA., Gibbs, EP., Horzinek, MC., Studdert, MJ. (1999.). *Vet Virol* (3rd edition. ed.). Academic Press.
- Nascimento Caliandra Bona, Raymundo Rizaldo Pinheiro, Francisco Selmo Fernandes Alves, Roberta Lomonte Lemos de Brito, Apoliana de Sousa Rodrigues, Ricardo Abílio Bezerra e Silva, Ney Rômulo de Oliveira Paula, Maria do Carmo de Souza Batista. (2014). Ferramentas diagnósticas de Lentivirose de Pequenos Ruminantes: padronização da técnica de ELISA indireto Diagnostic tools of small ruminant lentiviruses: standardization of indirect ELISA. *ARq. Inst. Biol. São Paulo.* (81). (1). 9 – 15.
- Narayan, O. C. (1989). Biology and Pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virology.* (70), 1617 - 1639.
- Perdigones, B. M. (noviembre de 2004). SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE MAEDI VISNA EN UNA EXPLOTACIÓN DE GANADO OVINO. Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense.
- Pétursson, G., Andrésdóttir, V., Andrésón, O.S., Georgsson, G., Pálsson, P.A., Rafnar, B., Torsteinsdóttir, S. (1992). Lentivirus diseases of sheep and goats: maedi-visna and caprine arthritis-encephalitis. En A. W. Speedy, *Progress in Sheep and Goat Research.* (págs. 107 - 129). Oxford: CAB International.
- Ramírez C, Trigo F.J. (1983). Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la neumonía progresiva ovina en México. Reunión de investigación pecuaria en México.
- Ramírez H., Glaria, I. de Andrés, X., Martínez, H.A., Hernández, M.M., Reina, R., Iráizoz, E., Crespo, H., Berriatua, E., Vázquez, J., Amorena, B., de Andrés, D., (2011). Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and

sheep of imported breeds in Mexico. *The Veterinary Journal*. 190(1): 169 - 172.

Ramírez Hugo, Ramsés Reina, Beatriz Amorena, Damián de Andrés, and Humberto A. Martínez. (2013). Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Viruses*, 1175-1206.

Ramirez, A. (2010). Contribución al diagnóstico y a la filogenia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes. Pamplona, España: Departamento de Producción Agraria, Instituto de Agrobiotecnología.

Ramírez, H. Á. (2015). Artritis y encefalitis caprina. En E. D. Aparicio (Ed.), *Enfermedades de las Cabras* (págs. 259-274). Ciudad de México: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal.

Ramírez, H. Á. (2016). Situación de la infección por lentivirus ovinos en México. Congreso Internacional de Ovinocultura.

Ramírez, H. R., Reina R., Amorena B., de Andrés D., Martínes H. A., (2013). Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Viruses*, 5(4): 1175-1207.

Rauidi, M. (2005). Capacidad de unión al ARN genómico viral de mutantes de la proteína nucleocápside del virus de inmunodeficiencia de felinos (tesina de grado). (F. d. Naturales., Ed.) Argentina: Universidad de Belgrano.

Sánchez, J. H., Martinez, H. A., García, M. M., Garrido, G., Gómez, L., Aguilar, J. A., de Andrés, D.F, Reina, R., Ramírez, H. (2016). The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology*, 86(8): 1953 - 1957.

Sanjosé, Leticia, Helena Crespo, Laure Blatti-Cardinaux, Idoia Glaria, Carlos Martínez –Carrasco, Eduardo Berriatua, Beatriz Amorena, Damián de Andrés,

- Giuseppe Berton, Ramses Reina. (2016). Post-entry blockade of small ruminant lentivirus by wild ruminants. *Veterinary Research*. (47). 1 – 12.
- Leticia Sanjosé, Pedro Pinczowski, Helena Crespo, Marta Pérez, Idoia Glaria, Marina Gimeno, Damián de Andrés, Beatriz Amorena, Lluís Luján, Ramsés Reina, Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA, *The Veterinary Journal* (2015), <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tvjl.2015.01.012>.
- Sardi, Silvia Inés, Julianna Alves Torres., Camila Fonseca Lopes Brand, Dellane Martins Tigre, Gubio Soares Campos. (2012). Early Detection of goats infected with Lentivirus Small Ruminant virus by ELISA assay. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. (11). (1). 35-40.
- Shah, Cyril, Jon B. Huder, Jürg Böni, Marietta Schönmann, Janine Mühlherr, Hans Lutz, Jörg Schüpbach. (2004). Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *Journal of veterinary*, 78(14), 7518–7522.
- Sigurdsson, B., Grimsson, H, Palsson, P.A. J. (1957). Maedi a chronic progressive infection of sheep lungs. *J. Inf. Dises*, 233 - 241.
- Trigo, J. (1991). *La Artritis Encefalitis Caprina*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, Ciencias Veterinarias., Ciudad Universitaria. México D.F.
- Urška Kuhar, Darja Barlič-Maganja and Jože Grom. (2013). Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. *BMC Veterinary Research*, 1-12.
- Valladares, R. B. (enero de 2016). Generación y caracterización de la proteína p25 del Lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) expresada en *Escherichia col*. Tesis de Maestría. DF, México: Universidad Nacional Autónoma de México.