

## **Purificación y evaluación de la proteína p25 como antígeno recombinante en la detección del virus de la artritis encefalitis caprina (AEC)**

## **Purificação e avaliação da proteína p25 do vírus da artrite encefalite caprina (CAE)**

DOI: 10.34188/bjaerv6n3-049

Recebimento dos originais: 05/05/2023

Aceitação para publicação: 30/06/2023

### **Isidro Humberto Almeyda León**

Dr. en Biotecnología por la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. INIFAP-Campo Experimental General Terán. Km 31, Carretera Montemorelos-China, Ex-hacienda Las Anacuas, C.P. 67400, Cd. General Terán, Nuevo León, México  
Correo electrónico: almeyda.isidro@inifap.gob.mx

### **Santiago Saavedra Alonso**

Dr. en Microbiología por la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, 66455 San Nicolás de los Garza, N.L  
Correo electrónico: ssaavedraln@uanl.edu.mx

### **Timoteo Delgado Maldonado**

M. C. en Biotecnología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica del IPN. Blvd del Maestro SN, Narciso Mendoza C.P. 88710, Reynosa, Tamaulipas  
Correo electrónico: titi\_999@live.com

### **Melina López Pecina**

M. C. en Biotecnología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica del IPN. Blvd del Maestro SN, Narciso Mendoza C.P. 88710, Reynosa, Tamaulipas  
Correo electrónico: lopezpecinamelina9012@gmail.com

### **Eduardo Cruz González**

M. C. en Biotecnología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica del IPN. Blvd del Maestro SN, Narciso Mendoza C.P. 88710, Reynosa, Tamaulipas  
Correo electrónico: eduardocruzglz@hotmail.com

### **María Genoveva Alvarez Ojeda**

Dr. en Microbiología por la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. INIFAP-Campo Experimental Río Bravo. Km 61, Carretera Matamoros-Reynosa. CP. 88900, Río Bravo, Tamaulipas, México  
Correo electrónico: alvarez.genoveva@inifap.gob.mx

## **RESUMEN**

Para emplearse como antígeno en inmunoensayo indirecto, se purificó la proteína p25 recombinante del virus de la artritis encefalitis caprina mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. Se desarrollaron y estandarizaron las mejores condiciones que permitieron su fiabilidad, para después ser validada con un total de 46 muestras positivas y negativas de referencia. Se estableció la concentración de 4 µg/ml como óptima para la sensibilización de las microplacas. La robustez del ELISA se demostró utilizando como diseño el modelo de Youden y Stainer, y

aplicando el criterio del comité de Secretaría de Salud. La concordancia respecto a un estuche comercial fue del 71.73 %, en cuanto a la sensibilidad y especificidad fue del 59.37 % y 100 %, respectivamente. Además, no se presentaron reacciones cruzadas para 3 antígenos probados previamente. Por lo tanto, se concluye que el método de ELISA recombinante implementado en este trabajo, es un método excelente, sencillo, barato y específico para el diagnóstico y tamizaje de la artritis encefalitis caprina, ya que disminuye las reacciones cruzadas.

**Palabras clave:** Inmunoensayo, estandarización, antígeno p25, detección y diagnóstico

## ABSTRACT

For use as an antigen in indirect immunoassay, recombinant protein p25 of caprine arthritis encephalitis virus was purified by immobilized metal ion affinity chromatography. The best conditions that allowed its reliability were developed and standardized, and then validated with a total of 46 positive and negative reference samples. The concentration of 4  $\mu\text{g/ml}$  was established as optimal for sensitization of microplates. The robustness of the ELISA was demonstrated using the Youden and Stainer model as a design, and applying the criteria of the Secretary of Health committee. The concordance with respect to a commercial case was 71.73 %, in terms of sensitivity and specificity was 59.37 % and 100 %, respectively. In addition, no cross-reactions were presented for 3 previously tested antigens. Therefore, it is concluded that the recombinant ELISA method implemented in this work, is an excellent method, simple, cheap and specific for the diagnosis and screening of caprine arthritis encephalitis, as it decreases cross-reactions.

**Keywords:** Immunoassay, standardization, p25 antigen, detection and diagnosis

## 1 INTRODUCCION

El Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (AEC) es un Lentivirus que pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Lentivirinae, que provoca una patología infecciosa y contagiosa que ataca a diversos aparatos y sistemas de los caprinos y se manifiesta de manera persistente durante la vida del animal infectado. La transmisión del agente etiológico en los cabritos es a través del contacto directo con cabras infectadas y por el consumo de leche y calostro contaminado. Sin embargo, la diseminación también se presenta a través del semen en los machos (Ledezma et al., 2022; Ahmad et al., 2012; Martínez et al., 2006). Las principales manifestaciones de la enfermedad por el virus de la artritis encefalitis caprina es una inflamación crónica de las articulaciones cárpales y tarsales, junto con el endurecimiento de las ubres (Murphy et al., 2021; Sáenz, 2006). Por ésta razón, las pérdidas económicas en la producción caprina se ven reflejadas cuando se realizan importaciones y éstos dan positivo a las pruebas serológicas, por lo que los animales afectados son sacrificados. Además, llevar a cabo una campaña para erradicar la enfermedad resulta muy costosa, por lo que es más conveniente para los productores la identificación y el diagnóstico oportuno de la enfermedad para aislar los animales enfermos y así evitar su propagación (Rowe and East, 1997; Petursson et al., 1990). Por lo general, se recurre a las pruebas serológicas para diagnosticar a los animales infectados, siendo la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) la más comúnmente utilizada debido a

su simplicidad y bajo costo, aunque su sensibilidad se considera baja (Tavella et al., 2018; Panneum and Rukkamsuk, 2017; Kwang et al., 1995). Sin embargo, hoy día la tecnología del DNA recombinante en el sistema de expresión procariota *E. coli*, ha dado muy buenos resultados en cuanto a la expresión y obtención de proteínas heterólogas, esto debido a las grandes ventajas que ofrece este sistema, lo cual ha sido documentado en trabajos previos (López, 2015; Cruz, 2016). Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue purificar y evaluar la proteína p25 recombinante como posible inmunógeno en la prueba del inmunoensayo (ELISA).

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

**Material Biológico:** Se utilizó una cepa de *E. coli* BL21 transformada con un vector de expresión que contenía el fragmento que codifica para la proteína p25 del VAEC, un gen de resistencia a antibiótico y una secuencia que agrega una etiqueta de poli-histidinas a la proteína de interés. Se probaron un total de 46 sueros, los cuales fueron recolectados en un hato caprino del estado de Tamaulipas para un estudio de seroprevalencia realizado por Cantú et al. (2015), en el cual se utilizó una prueba de ELISA (CAEV/MVV Antibody test kit, IDEXX Laboratories) para seleccionar los sueros como referencia y probar el antígeno p25 recombinante en la prueba de ELISA.

En un trabajo previo, se clonó y expresó la proteína p25 del virus de la AEC, en el sistema de *E. coli* BL21. Con el propósito de determinar el tiempo en qué las bacterias llegan a la fase exponencial, se activó la cepa ya transformada con el plásmido en caldo Luria Bertani (LB) y se incubó a 37 °C ±18 horas. Al día siguiente, se tomó 1 ml del cultivo y se adicionó 50 mg/ml de ampicilina en un matraz que previamente contenía 25 ml de caldo LB y se procedió a realizar la cinética de crecimiento con el fin de determinar sus fases y conocer el tiempo en que llega a una Densidad Óptica 600 nm ( $DO_{600} = \sim 0.5$  nm) para agregar el inductor metabólico isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en distintas concentraciones y sobre-expresar la proteína, para lo cual el cultivo se incubó de nuevo a 37 °C en agitación a 200 rpm. Este mismo procedimiento fue realizado por segunda vez, sin embargo, ya se conocía el tiempo de inducción y la concentración óptima del inductor IPTG. Al finalizar el tiempo de inducción el cultivo fue centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos. El pellet obtenido fue lavado dos veces con PBS y conservado a -20 °C hasta su uso.

**Electroforesis SDS-PAGE:** El pellet de células de *E. coli* BL21 fue descongelado y lisado con 1 ml del amortiguador que contenía imidazol. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se recuperó la fracción soluble en un tubo nuevo, se agregó 40  $\mu$ l de amortiguador 2X SDS-PAGE, y se calentó en baño seco a 100 °C por 5 minutos.

El gel separador y el gel concentrador fueron preparados a una concentración del 15 % y 5 %, respectivamente según (Sambrook, 2001) y se cargaron 15 µl de muestra en cada pocillo, para establecer el tamaño molecular de la proteína expresada, en un pocillo se cargaron 5 µl del Marcador de Peso Molecular (MPM, Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) y la electroforesis se dejó correr a 100 Voltios por cuatro horas. El gel fue teñido en solución de azul de coomassie por 1 hora y posteriormente se colocó en una solución desteñidora hasta que las bandas fueron visibles.

**Western blot:** Para confirmar la expresión de la proteína p25, se llevó a cabo la transferencia semy-dry desde el gel hacia una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) durante dos horas a 25 voltios en una cámara semi seca (Enduro™ Semy-Dry 20, Labnet International, Inc.), de acuerdo al protocolo establecido por (Sambrook, 2001).

**Purificación por cromatografía de afinidad:** Una vez confirmada la expresión de la proteína p25 recombinante por medio de western blot, se procedió a su purificación. Para este procedimiento se usó el kit comercial QIAGEN® Ni-NTA Fast start Handbook de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las fracciones obtenidas fueron separadas por SDS-PAGE al 15 % para ubicar dónde se hallaba la mayor cantidad de proteína recombinante, y su cuantificación fue corroborada usando el método de Bradford.

**Diálisis:** La diálisis se realizó con una membrana de éster de celulosa (Spectra/Por® Dialysis Membrane, Biotech CE Trail Kit) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La muestra de la fracción de elución del purificado se dializó en agitación a 4 °C ± 17 horas, y al siguiente día la muestra fue recolectada en un tubo estéril y se conservó a -20 °C hasta su uso.

**Preparación de sueros controles:** Se realizó un muestreo a cabras con sospecha de AEC, y de la sangre se obtuvieron las células blancas para hacer la extracción de ADN por el método CETAB, posteriormente se sometieron a la técnica de PCR anidada siguiendo el protocolo previamente descrito por Lima et al en el 2010. Los sueros fueron clarificados mediante centrifugación a 15 000 rpm a 8 °C por 10 min. y filtrados con poro de 0.20 µm para conservarse con ≤0.01 % de NaN<sub>3</sub> a -20 °C hasta su uso.

**Determinación de la concentración óptima:** Se llevaron a cabo 3 ensayos en una placa de Poliestireno (PS) estéril de fondo plano (Costar® 3370 Corning, NY 14831), la cual se tapizó con 2 hasta 10 µg/ml de p25 diluido en amortiguador carbonato-bicarbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>; 50 mM, pH 9.6) a razón de 100 µl por pozo. Enseguida, se incubó a 37 °C por 1 h y después de 4 a 8 °C por 18 ± 2 horas. Transcurrido ese tiempo, la placa fue lavada 3 veces con 200 µl de PBS-T (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4 con 0.05 % Tween). Se bloquearon los sitios de unión inespecífica con albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %

en PBS-T durante 1 h a 37 °C. Después se lavó 3 veces con PBS-T para eliminar los restos de proteína no adsorbida y se dejó secar en una toalla estéril.

**Técnica de ELISAI:** Los controles empleados fueron los preparados anteriormente y como blanco reactivo el PBS-T, los cuales se diluyeron 1/10 en amortiguador PBS-T. Se dispensó 100 µl de la dilución en cada pozo y se dejó incubar 1 h a 37 °C en cámara húmeda, después se realizaron 3 lavados con 200 µl de PBS-T y se añadió a cada pozo 100 µl del conjugado anticabra unido a peroxidasa de rábano (200 µg/0.5 ml) diluido 1/5000 en BSA 1 %. De nuevo se incubó por 1 h a 37 °C en cámara húmeda, posteriormente se hicieron 3 lavados y se agregó el sustrato TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Life Technologies®), y se colocó en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. La lectura de la placa fue en un espectrofotómetro (Sigma Diagnostics, EIA multi-well reader) a λ= 450 nm. Para catalogar las muestras como positivas o negativas, se aplicó la siguiente fórmula: (DO Muestra-DO Negativo) / (DO Positivo-DO Negativo) x 100. Las lecturas obtenidas fueron sometidas a análisis estadístico en hojas de cálculo (Excel 2013) para graficar la absorbancia versus la concentración, y así establecer la concentración más adecuada, siguiendo lo descrito por Ochoa (2012).

**Concordancia o Eficacia:** Se refiere a la capacidad general del método para detectar e identificar correctamente todas las muestras positivas y todas las negativas respecto a un estándar de referencia, es decir que sea óptima al no presentar resultados falsos negativos ni positivos. Para su cálculo se emplea una tabla de contingencia como la que se muestra a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo de una tabla de contingencia de 2x2 para el cálculo de la concordancia.

Prueba en estudio	Estándar de referencia		Total
	Resultados (+)	Resultados (-)	
Resultados (+)	Verdaderos positivos (A)	Falsos positivos (B)	A+B
Resultados (-)	Falsos negativos (C)	Verdaderos negativos (D)	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

**Sensibilidad diagnóstica:** Corresponde a la proporción de muestras positivas identificadas correctamente por la prueba utilizada, respecto a una estándar de referencia. Para calcular este parámetro, expresado en (%) se utiliza la siguiente fórmula: Sensibilidad = [Verdaderos positivos / (Verdaderos positivos + Falsos positivos)] x 100.

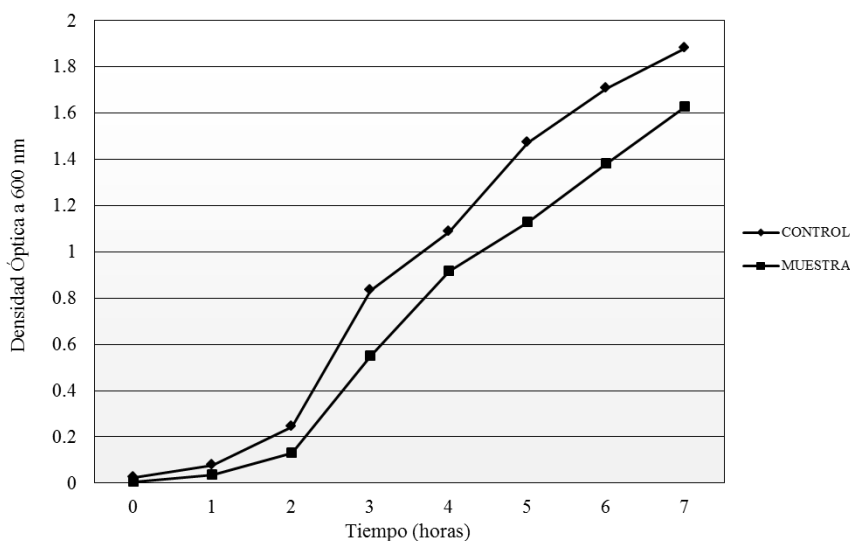
**Especificidad:** Corresponde a la proporción de muestras negativas correctamente identificadas por la prueba utilizada, respecto a una de referencia. Se calcula a partir de: Especificidad = [Verdaderos negativos / (Falsos negativos + Verdaderos negativos)] x 100. Además, se analizaron 16 sueros negativos y positivos a otros antígenos para descartar reacción cruzada.

**Robustez:** Para su evaluación se aplicó la prueba de Youden y Steiner, el cual permite analizar y verificar 7 variables en sólo 8 ensayos con una misma muestra para poder determinar cuál de ellas afectaría la fidelidad de los resultados. De modo que a cada variable se le asigna un valor alto (“A”) y uno bajo (“a”) representados por una letra mayúscula y minúscula, respectivamente para poder realizar la prueba.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Cinética de crecimiento de la proteína p25:** Una vez que se activó la cepa, para llevar a cabo la cinética de crecimiento se midió la absorbancia cada hora en un espectrofotómetro (SPECTRONIC® GENESYS™ 5) a una densidad óptica de 600 nm. En la figura 1, se observa el comportamiento de la cinética de crecimiento monitoreada durante siete horas (discriminando la hora cero) donde se determinó que el tiempo necesario en que la clona E. coli BL21 llegue a la fase exponencial es de 3 horas.

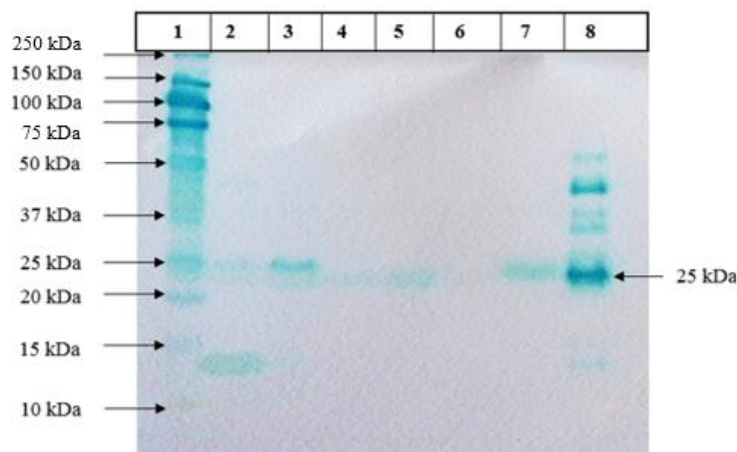
Figura 1. Cinética de crecimiento bacteriano de la clona E. coli BL21 transfectada con el plásmido con respecto a un control de la misma sin IPTG.



**Western blot:** Aplicando la técnica del western blot se confirmó la expresión de la proteína p25 recombinante, probando distintas concentraciones proporcionales de un anticuerpo anti-histidinas (1:1000 y 1:5000) y del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), observándose una banda de aproximadamente 32 kDa que corresponde a la proteína p25 del virus de la AEC, esto debido al peso molecular que agrega la etiqueta de histidinas (Figura 2).

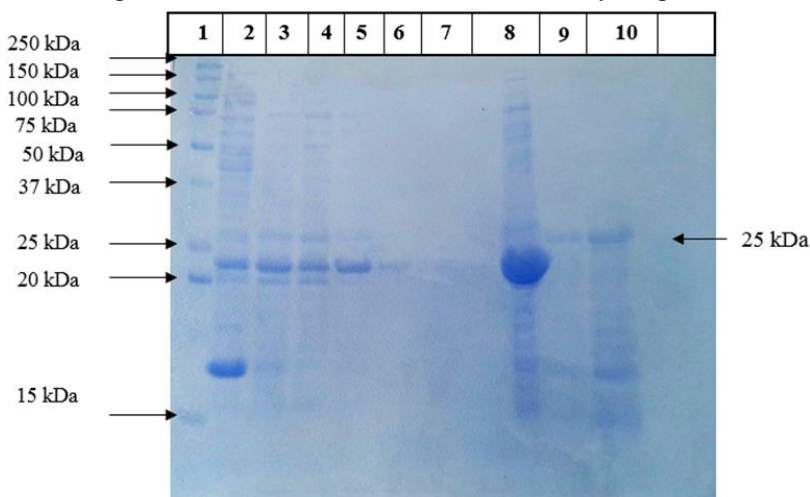


Figura 2. Western blot donde se confirma la expresión de la proteína recombinante p25. De izquierda a derecha: Carril 1: MPM, Carril 2: Control sin inductor, Carril 3: Lisado, Carril 4: Lisado pasado por la columna, Carril 5: Primer lavado, Carril 6: Segundo lavado, Carril 7: Elución, Carril 8: Dializado.



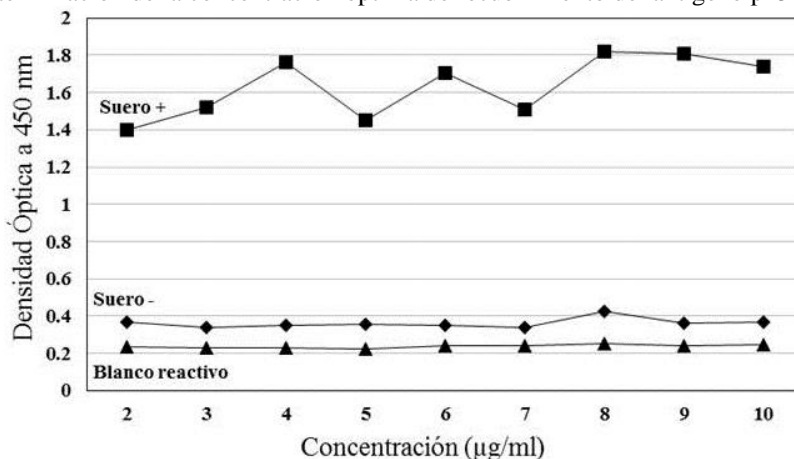
Purificación de p25 AEC. Una vez demostrada la expresión de la proteína p25 del virus de la AEC se purificó por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC por sus siglas en inglés), con el kit QIAGEN® Ni-NTA Fast start Handbook y después se cuantificó por el método de Bradford frente a una curva estándar de suero de albúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés), registrándose una concentración de 0.46 mg/ml de proteína. Por último, las fracciones del purificado se corrieron en PAGE-SDS, y se visualizaron las bandas de la proteína de interés a p25 kDa (Figura 3).

Figura 3. Gel de poliacrilamida al 15 % de la purificación. De izquierda a derecha: Carril 1: MPM, Carril 2: Control sin inductor, Carril 3: Lisado, Carril 4: Lisado pasado por la columna, Carril 5: Primer lavado, Carril 6: Segundo lavado, Carril 7: Lavado final, Carril 8: p25 dializada en columna de 50K, Carriles 9 y 10: p25 dializada en columna de 10K.



**Determinación de la concentración óptima:** Se estableció la concentración de 4 µg/ml como óptima para la sensibilización de microplacas, ya que esta fue la que mejor permitió discriminar entre muestras positivas y negativas (Figura 4).

Figura 4. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento del antígeno p25 recombinante.



**Concordancia:** En la tabla 2 se distingue la concordancia del ELISAi recombinante, respecto a un estuche de ELISA comercial (IDEXX CAEV/MVV) como estándar de referencia.

Tabla 2. Concordancia del ELISA respecto a un estuche comercial.

Elisa Casera	Elisa Comercial		Total
	Resultados (+)	Resultados (-)	
Resultado (+)	19	13	32
Resultado (-)	0	14	14
total	19	27	46

$$\text{Concordancia} = \frac{(A+D)}{(A+B+C+D)} \times 100 = \frac{(19+14)}{(46)} \times 100 = 71.73 \%$$

**Sensibilidad diagnóstica:** La sensibilidad para este inmunoensayo respecto a un ELISA comercial, se determinó con la fórmula  $[A/(A+B)] \times 100$ . Sustituyendo los valores en la fórmula el resultado obtenido en este trabajo fue:  $[19/(19+13)] \times 100 = 59.37 \%$ .

**Especificidad:** Sustituyendo los valores en la fórmula, la especificidad obtenida en este trabajo con respecto al ELISA comercial fue:  $[14/(0+14)] \times 100 = 100 \%$ . Igualmente, las muestras utilizadas para la determinación de reacción cruzada, 12 de ellas fueron positivas a Chlamydomphila abortus por aislamiento, 6 resultaron positivas a nuestro ELISA debido posiblemente a que previamente no se les realizó análisis para AEC. Sin embargo, sueros estándares de Neospora caninum y Brucella dieron resultados negativos con una absorbancia  $<0.300$ .

**Robustez.** La evaluación de este parámetro da una visión sobre los factores o variables que pueden influir en el método. Una vez culminado cada uno de los 8 ensayos, se obtuvieron los resultados para cada variable con su valor alto y bajo. Luego se calcularon los promedios de éstos,



y se comparó la desviación estándar de los resultados (s, t, u, v, w, x, y, z) contra la desviación estándar de las diferencias entre los promedios (alto y bajo) como se aprecia en la Tabla 3.

Por último, se adoptó como criterio de aceptación el postulado en la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, Criterios para la validación de métodos físico-químicos de Secretaría de Salud; el cual enuncia que un método es robusto (no es afectado por pequeñas variaciones) si la desviación estándar de las diferencias es menor a la desviación estándar de los resultados ( $SD_i < SR$ ) (Bolanos y Davies. 2006).

Tabla 3. Resultados de robustez para cada una de las variables ensayadas.

Condición Variable	Valor		Resultados		Diferencia $\Delta(X-x)$	Comparación $DS_{dif} < DS_{res}$
	alto	bajo	Promedio X	Promedio x		
Tiempo de Lectura de la microplaca	A	a	0.5177	0.5000	0.0177	No influye
Temperatura de bloqueo	B	b	0.4767	0.5412	-0.0645	No influye
Tiempo de reacción con el suero	C	c	0.4420	0.5760	-0.1340	No influye
Nº de lavados	D	d	0.5082	0.5097	-0.0015	No influye
Solución STOP	E	e	0.5187	0.4992	0.0195	No influye
pH de PBS	F	f	0.5170	0.5010	0.0160	No influye
Tiempo de reacción con el sustrato	G	g	0.5102	0.5077	0.0025	No influye

#### 4 CONCLUSIONES

Se obtuvo un 100 % de especificidad, un 59.37 % de sensibilidad diagnóstica y una concordancia del 71.73 al utilizar la proteína p25 como antígeno en la técnica de ELISA indirecta utilizando sueros de caprinos con respecto a un kit de ELISA comercial. El ELISA indirecto demostró ser un excelente candidato para el recubrimiento de microplaca al disminuir las reacciones cruzadas. La sensibilidad de diagnóstico obtenida en este trabajo no fue la esperada; sin embargo, fue altamente específica, por lo que se considera un punto de partida para continuar con la implementación y optimización de métodos de diagnóstico y tamizaje de la AEC utilizando proteínas recombinantes.

## REFERENCIAS

Ahmad A. A., Chebloune Y., Chatagnon G., Pellerin J L., Fieni F., 2012. Is caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) transmitted vertically to early embryo development stages (morulae or blastocyst) via in vitro infected frozen semen? *Theriogenology* 77, 1673-1678

Bolanos-García VM & Davies OR. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *England. Biochimica et Biophysica Acta*, 2006; Vol. 1760: 1304-1313.

Cantú Covarrubias A., Álvarez Ojeda G. 2015. Situación epidemiológica de algunas enfermedades infecciosas más importantes en explotaciones caprinas de Tamaulipas. *Memorias, Toluca, Méx. RNIP*, 145-147.

Cruz González Eduardo. 2016. Clonación y expresión de la proteína p25 del Virus Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) en el sistema *Escherichia coli* BL21. Tesis de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán. 35 pp.

Kwang J. Keen J., Cutlip RC, et al. 1995. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Rum. Res* 16:171-177.

Ledezma Torres R., Segura Correa J. C., Chávez Sánchez J. F., Rodríguez García A. J., Cedillo Rosales S., Moreno Degollado G., Avalos Ramírez R. 2022. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de lentivirus en rebaños ovinos y caprinos del noreste de México. *Revista mexicana ciencia pecuaria*; 13 (4): 995-1008.

Lima-Feitosa ALV, da Silvia-Teixeira MF, Rizaldo-Pinheiro R, Silva da Cunha RM, Santos-Lima JPM, Andrioli A et al. 2010. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Brazil. Small Ruminant Research*, Vol. 94: 205-209.

López Pecina Melina. 2015. Detección del Virus artritis encefalitis caprina por medio de PCR en muestras de sangre de caprinos colectadas en el noreste de México y la clonación de la secuencia codificante de la proteína viral p25 en un sistema de expresión procariota. Tesis de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán. 40 pp.

Martínez, R.H.A.; García, R.L.I.; Arcilla, L.T. y Medina, F.E. 2006. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal. Edo de México. Celaya, Guanajuato. Grupo Ganadero para la validación y transferencia tecnológica caprina. México.

Murphy B.G., Castillo D., Mete A., Vogel H., Goldsmith D., Barro M., Gonzales-Viera O. 2021. Caprine Arthritis Encephalitis Virus is associated with renal lesions. *Viruses*, 13, 1051.

Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R et al. Sensibilización de placas para ensayos inmunoenzimáticos con antígenos vacunales. *La Habana, Cuba. VacciMonitor*, 2001; Vol. 10: 14-17.

Panneum S., Rukkwamsuk T. 2017. Diagnosis of caprine arthritis encephalitis virus infection in dairy goats by ELISA, PCR and viral culture. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 20, No 2, 347-353.

Petursson G, Georgsson G, Palsson P. 1990. Maedi-visna virus. In: Dinker Z, Morein B, eds. Virus infections of ruminants. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 431-440. (vol de la revista)

Rowe J. D y East N. E. 1997. Risk Factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. Veterinary clinics of North America: food animal practice. Vol 12. 1.

Sáenz Contreras Manuel Alberto. 2006. Determinación de la presencia del síndrome de Artritis Encefalitis Caprina en granjas semitecnificadas de los departamentos de Guatemala, Santa Rosa, Sololá y Suchitepéquez. Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.37 pp.

Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. Vol: 3, 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York.

Tavella A., Bettini A., Ceol M., Zambotto P., Stifter E., Kasstatscher N., Lombardi R., Nardeli S., Beato M. S., Capello K., Bertoni G. 2017. Achievements of an eradication programme against caprine arthritis encephalitis virus in South Tyrol, Italy. Veterinary Record.