

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Título: “PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES DE VALOR  
INMUNOGENICO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA Y SU APLICACIÓN AL  
DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD “**

**AUTOR: LARSEN, Alejandra Edith**

**DIRECTOR: Dr. MORTOLA, Eduardo C.**

**CODIRECTOR : Dra GONZALEZ, Ester T.**

**LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Virología, Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias  
Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.**

**MIEMBROS DEL JURADO: Dra. DIAZ, Silvina**

**Dr. TABOGA, Oscar**

**Dra. VENTURINI, Ma Cecilia**

**AÑO: 2014**

## Dedicatoria

A Gonza, Facu y Anita responsables de mi felicidad.

A mi papá

A mi hermano y Ale Moren

Y a mí mama que nos cuida desde el cielo

## **Agradecimientos**

Agradecer en especial a mis directores, Dr. Eduardo M3rtola y Dra. Teresa Gonz1lez, por el apoyo y la confianza que me brindaron para cumplir con este proyecto y por abrirme las puertas del Laboratorio de Virolog1a. A la Dra Cecilia Galosi por ayudarme a continuar con los trabajos en virolog1a y a la Dra Gabriela Etcheverria por compartir conocimientos y reactivos. Decirle gracias a todos mis compa1eros profesores, auxiliares de la docencia y no docentes del laboratorio German, Sole, Nadia, Marcelo, Hern1n, Fito, Mercedes, Mariela, Ale, Mumi y Javi, por la ayuda incondicional y permanente que me proporcionaron y me siguen brindando. Al Med. Vet. Santiago Corva, por su colaboraci3n en el an1lisis estad1stico del trabajo. A mis amigos de la facu: Juan Manuel, Diana, Isi, Fabiana, Martin, Moni, Walter y Fabio. A mis compa1eros del laboratorio de Inmunoparasitolog1a y de la C1tedra de Inmunolog1a Veterinaria, en especial al Prof. Enrique F. F. Pennimpe por su confianza y su ejemplo acad1mico.

A mi querida facultad.

## **Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales**

### **Reuniones y Jornadas científicas**

-A.E. Larsen, E.T Gonzalez y E.C. Mortola. Expresión recombinante de las proteínas gp51 y p24 del virus de la leucosis bovina para su aplicación al diagnóstico de la enfermedad. Jornada Sudamericana sobre Leucosis Bovina. Sociedad Argentina de Virología. Asociación Argentina de Microbiología 3 y 4 de mayo de 2012. Presentación oral.

- A. Larsen, J. Panei, E. T. González y E. Mortola Desarrollo de una prueba de ELISA dual para el diagnóstico serológico de la leucosis enzoótica bovina. XIX Reunion Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. 2012. Buenos Aires 7, 8 y 9 de noviembre. Poster

### **1ER MENCION AL MEJOR TRABAJO CIENTIFICO.**

- A. Larsen, J. Panei, J., Moore y E. Mortola. Biotecnología de los ISCOMs aplicada a una prueba de ELISA para el inmunodiagnóstico de la leucosis enzoótica bovina. XIX Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. 2012. Buenos Aires 7, 8 y 9 de noviembre. Poster

### **Revistas científicas**

Larsen A., Gonzalez E.T., Serena M.S., Echeverría M.G., Mortola E. "Expression of p24 gag Protein of Bovine Leukemia Virus in Insect Cells and Its Use in Immunodetection of the Disease." Mol Biotechnol. 2012 Jul 25. DOI 10.1007/s12033-012-9587-7

## INDICE

### CAPITULO I. GENERALIDADES

I.A. INTRODUCCION .....	5
I.B FUNDAMENTOS DE LA ELECCIÓN DEL TEMA. ....	49
I.C. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	52
I.D. OBJETIVOS. ....	52

### CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.A PRODUCCION DE LA PROTEINA p24 DEL VLB.....	55
II.B.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p24 DEL VLB EN EL SISTEMA BACTERIANO.....	55
II.B.2 EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p24 DEL VLB....	63
II.C. PRODUCCION DE LA PROTEINA gp51 DEL VLB.....	73
II.D. ENSAYO DEL ELISA INDIRECTO.....	84

### CAPITULO III RESULTADOS

III.A EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p24 DEL VLB EN EL SISTEMA BACTERIANO.....	91
III.B EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p24 DEL VLB.....	100
III.C EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE gp51 DEL VLB....	108
III.C ENSAYO DEL ELISA INDIRECTO.....	117

ANEXO I Y II.....	132
CAPITULO IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFIA.....	154.

## Abreviaturas

**Ac:** anticuerpo

**ACP:** alta carga proviral

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**Ag:** antígeno

**BCP:** baja carga proviral

**BSA:** seroalbúmina bovina

**C:** citosina

**C':** complemento

**°C:** grados centígrados

**CD4+:** linfocito T colaborador

**CD8+:** linfocito T citotóxico

**cél:** célula/s

**cm<sup>3</sup>:** centímetros cúbicos

**CMH I:** complejo mayor de histocompatibilidad clase I

**CMH II:** complejo mayor de histocompatibilidad clase II

**DO:** densidad óptica

**CPV:** carga proviral

**Da:** Dalton

**ELISA:** "Enzyme Linked Immunoassay"

**E4:** suero control positivo de referencia

**Fc:** fragmento constante

**FLK-VLB:** fetal lamb kidney (riñón de feto de cordero) crónicamente infectado con el Virus de la leucosis bovina-VLB

**G:** guanina

**gr:** gramo/s

**gp51:** glicoproteína 51

**h/hs:** hora/s

**IF:** inmunofluorescencia

**IgA:** inmunoglobulina A

**IgG:** inmunoglobulina G

**IgM:** inmunoglobulina M

**IPTG:** isopropil-tio-β-D-galactopiranosido

**Kb:** kilobases

**kDa:** kilo Dalton

**L-B:** Luria-Bertani

**LB:** linfocitos B

**LT:** linfocitos T

**LTR:** repetición terminal repeat

**M:** molar

**mg:** miligramo/s

**min:** minuto/s

**mM:** milimolar

**ml:** mililitro/s

**MOI:** multiplicidad de infección

**ng:** nanogramo/s

**NK:** células "Natural Killer"

**nm:** nanómetro/s

**Ni-NTA:** nickel-nitilotriacetic acid

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal

**pb:** pares de bases

**PBS:** buffer fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**pmol:** picomolar

**p24:** proteína 24

**RI:** respuesta inmune

**rpm:** revoluciones por minuto

**RT-PCR:** transcripción reversa seguida por amplificación mediante PCR

seg: segundo/s

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

**SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad Animal

**SFB:** suero fetal bovino

**T:** timina

**UI:** unidades internacionales

**UV:** ultravioleta

**V:** voltios

**µg:** microgramo/s

**µl:** microlitro/s

**µM:** micromolar

**VLB:** Virus de la leucosis bovina

**W:** Watt

**Título:**

“PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES DE VALOR INMUNOGENICO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA Y SU APLICACIÓN AL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD “

**Palabras claves**

Virus de la Leucosis Bovina- gp51-p24- baculovirus- expresión en bacterias- ELISA

**Resumen**

El virus de la leucosis bovina (VLB) es el agente causal de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB), enfermedad de distribución mundial, presente en nuestro país. En nuestro país los niveles de prevalencia oscilan entre 33% a 84% dependiendo del tipo de explotación bovina, estos altos valores de prevalencia se traducen en grandes pérdidas económicas incluyendo la perdida de mercados internacionales. El programa nacional de control y erradicación reglamentado por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) resolución 337/94, se basa en el diagnóstico serológico de la LEB y segregación de animales positivos. El diagnóstico de la LEB se basa en la detección de anticuerpos contra las dos proteínas inmunogénicas del virus: gp51 y p24. Para su detección existen varias pruebas inmunodiagnósticas, las que utilizan una u otra proteína purificadas o recombinante. En este trabajo se desarrolló una prueba de ELISA dual indirecto y como antígeno diagnostico se utilizó una mezcla de proteínas recombinante p24 y gp51, producidas en sistema bacteriano y de baculovirus respectivamente. Se evaluaron un panel de 194 sueros, cuyos resultados se contrastaron con los resultados obtenidos por otras dos técnicas aprobadas: Inmunodifusión en gel de agar y un ELISA indirecto comercial. El análisis

de repetibilidad intraplaca de nuestro ELISA dual arrojó un valor de 0.992 de “coeficiente de concordancia” (CCC). Las características operativas de la prueba se analizaron por el programa estadístico STATA SE 11 y TG-ROC. Para una dilución sérica de 1/25 y un valor de corte de 0.3 la sensibilidad fue de 95.65% y 91.30% de especificidad. Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos con nuestro ELISA gp51r/p24r son muy alentadores para continuar con la validación de la prueba, con la finalidad de contar con una herramienta diagnóstica para optimizar el control y facilitar los planes de erradicación de la LEB en nuestro país.

### **Abstract**

The bovine leukemia virus (BLV) is the causative agent of Enzootic Bovine Leukosis (EBL). In Argentina, the prevalence of this disease ranges from 33% to 84% depending of beef or dairy farming. The high prevalence of this disease results in large economic loss including failure of international markets. The national program of control and eradication of the disease, regulated by the National Animal Health Service (SENASA) Resolution 337/94, is based on serological diagnosis of EBL and separation of positive animals. EBL diagnosis is based on detection of antibodies against the two immunogenic proteins of the virus: gp51 and p24. There are several immunodiagnostic tests for detection of the disease; most of them use either purified or recombinant protein. In this study an indirect dual ELISA test was developed, using a mixture of recombinant p24 and gp51 proteins as antigen. The recombinant proteins were produced in bacterial and baculovirus systems. A panel of 194 sera was analyzed by our in house ELISA test and the results were compared with the results obtained by two other approved techniques: agar gel immunodiffusion test

and a commercial indirect ELISA test. Analysis of intraplate repeatability of our in house ELISA yielded a value of 0.992 of "concordance coefficient" (CCC). The operational characteristics of the test were analyzed by the STATA SE 11 and TG-ROC statistical program. For a serum dilution of 1/25 and a cutoff value of 0.3, sensitivity was 95.65% and specificity 91.3%. Statistical analysis of the results obtained with our in house ELISA are very encouraging for further validation of the test, in order to have a diagnostic tool to optimize the control and facilitate eradication plans of EBL in Argentina.

## **CAPITULO I. GENERALIDADES**

### **I.A. INTRODUCCION**

El virus de la leucosis bovina (VLB) es el agente causal de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) enfermedad de distribución mundial, presente en nuestro país (Miller y col, 1969; Resoagli y col., 2001). La LEB es una enfermedad neoplásica, linfoproliferativa, crónica y de larga incubación. El primer reporte de lesiones atribuibles a LEB fue en Alemania en 1871 por Leisering; pero fue recién en los años '50 y fines de los '60 cuando se determinó que la LEB era causada por un virus (Miller y col., 1969) donde posteriormente se estableció que el linfosarcoma y la linfocitosis persistente se asociaban con la enfermedad.

La LEB fue reportada por primera vez en Argentina en 1968 (Sen y col., 1968), pero su confirmación serológica ocurrió recién en el año 1978. En nuestro país los niveles de prevalencia en rebaños lecheros de diferentes provincias, oscilan entre 33% a 84% al 100% (Trono y col. 2001). En la Unión Europea se han obtenido valores de prevalencia muy bajos que oscilan entre 0,1% al 5 % y se atribuyen a planes vigentes de control y erradicación de la enfermedad. En el continente americano los valores de prevalencia son mucho más altos: en Venezuela se reportó un 49%, en México un 32% y en Florida (EEUU), 48% para explotación lechera y 7% para explotación de carne (Resoagli y col, 2001; Chamiso Pestana, 2005).

La LEB en su presentación tumoral afecta principalmente al ganado bovino adulto, no obstante se pueden infectar animales de cualquier edad, incluso durante el periodo embrionario (transmisión transplacentaria). Por el tipo de explotación, las hembras lecheras viven lo suficiente como para presentar las formas más severas

de la enfermedad (Di Giacomo, 1992). Otras especies naturalmente susceptibles son el búfalo y carpincho. En condiciones experimentales afecta ovejas y cabras, aunque en estas especies el desarrollo y susceptibilidad a la enfermedad es diferente a la del ganado bovino (Schwartz y col., 1994). Se ha tratado de determinar la presencia de anticuerpos específicos contra VLB en camélidos del nuevo mundo, NWC (de su sigla en inglés, New World Camelid). En la Argentina se han realizado relevamientos serológicos en rodeos de camélidos de varias provincias, pero no se han obtenido resultados positivos hasta el momento (Puntel y col., 1999; Puntel M.; 1997). Actualmente existe un reporte de un solo caso de VLB en NWC, una alpaca (Viguña pacos) en el estado de Virginia, Estados Unidos (Lee y col., 2012). Estos datos sustentan la hipótesis que el VLB tiene como únicos hospedadores y reservorio al ganado bovino y que las infecciones en otras especies son accidentales. Dado que un pequeño porcentaje de animales portadores evoluciona a la forma tumoral (1 al 3%) se ha propuesto que existen factores genéticos asociados al huésped que justificarían hipótesis de resistencia y/o susceptibilidad a la evolución clínica (Monti, 2006). Se debe considerar que la linfocitosis persistente se ha propuesto como estadio pretumoral.

La LEB no es una enfermedad zoonótica, pero si se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-proteínas de la cápside en sueros humanos, evidenciando la exposición al virus (Buehring y col., 2003). Un factor que estaría actuando en la baja prevalencia en humanos es la inactivación de la partícula viral por pasteurización de alimentos crudos de consumo como la leche. Aunque no se le asigna a este virus ninguna entidad patológica que afecte a los humanos, no significa que no pudieran existir recombinaciones entre virus humanos y el VLB (Burny y col, 1985) lo que

hasta ahora no se puso en evidencia. Por este motivo, la eliminación del VLB de los alimentos de consumo humano y del medio ambiente es, obviamente, un objetivo deseable.

Esta enfermedad es de tipo linfoproliferativa y afecta a los linfocitos B, donde el provirus se integra al genoma, transformando a los animales infectados en portadores de por vida (Lucas, 1992). Teniendo en cuenta las múltiples vías de transmisión, tanto iatrogénicas como naturales y los mínimos volúmenes de sangre periférica necesarios para transmitir el virus, constituye una enfermedad con un alto potencial de transmisibilidad (Robert y col, 1986; González y col, 2001).

El impacto económico de esta enfermedad radica no solo en las pérdidas directas por los decomisos en frigorífico, sino también en las asociadas al estado de portador del animal, con la disminución en la productividad directa e indirecta tanto en el ganado lechero como en el de carne. (Brenner y col., 1989). También incluyen costos de tratamiento, diagnóstico y servicio veterinario así como los costos de reemplazo temprano (Monti, 2006).

Las pérdidas económicas indirectas más importantes para nuestro país se deben a las restricciones del mercado internacional para comercializar ganado en pie, semen y embriones, sumado a los gastos de recolección de muestras y diagnóstico para cumplir con los requisitos de los países importadores. Las pérdidas económicas han sido valoradas en países como EEUU, donde distintos estudios han arrojado cifras que van de 44 a 144 millones de dólares por año (Da y col., 1993; Pelzer, 1997).

La necesidad de controlar esta enfermedad, que tiene serias pérdidas económicas directas e indirectas para el país, llevó al Servicio Nacional de Sanidad Animal

(SENASA) a reglamentar los requisitos para la obtención de certificación de establecimiento oficialmente libre de LEB a través de la resolución 337/94 (De la Sota, 2004) constituyendo un plan de inscripción voluntaria.

## **I.A.1 ETIOLOGÍA**

### **I.A.1a. Características del virus**

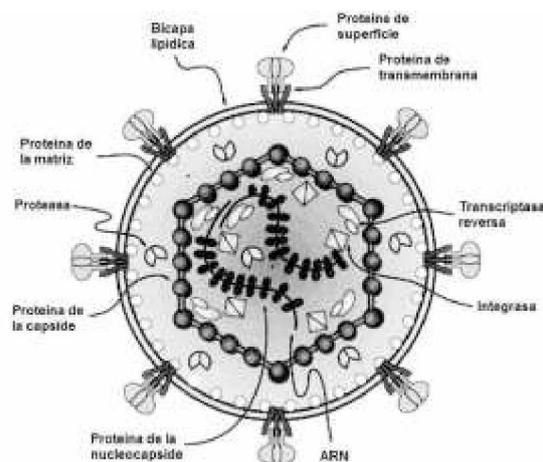
El virus de la Leucosis Bovina es un retrovirus del genero deltaretrovirus, perteneciente a la subfamilia *Oncovirinae* (tipo C) que se encuentra integrado principalmente en el genoma de los linfocitos B (Weiss, 2006). Los deltaretrovirus también incluyen a los virus Linfotrópicos de Células T Humanas tipo I y II (HTLV I y II), los recientemente descubiertos HTLV III y IV y el Virus de la Leucemia de Células T de los Simios (STLV). Comparaciones filogenéticas entre el VLB y los virus linfotrópicos-T de los primates tienen una diferencia del 42% (Gillet y col., 2007; Pomier y col., 2008). Particularmente el HTVL I y el VLB comparten epítopes de los antígenos de la cápside codificados en el gen *gag*, lo que los relaciona estrechamente en la evolución de los deltavirus. La organización genómica y las funciones de los genes son marcadamente similares, sumado a los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* requeridos para la síntesis de la partícula viral, ambos genomas contienen regiones particulares que codifican proteínas regulatorias (Florins y col., 2009). Estas proteínas regulatorias interfieren en el ciclo celular, apoptosis y procesos de reparación del ADN, dando lugar a una expansión clonal persistente de células infectadas (Pomier y col., 2008).

Los retrovirus son únicos en su especie ya que se los encuentra en estado de ARN o ADN (provirus). Su polimerasa es una transcriptasa reversa responsable de

transcribir el ARN viral en ADN proviral, que es integrado al genoma celular (provirus), transformando al animal en portador de por vida. Esta enzima está desprovista de la actividad exonucleasa 3' que genera un rango de error que respalda la variabilidad genética característica de la mayoría de los retrovirus (Pomier y col., 2008) lo que constituye una férrea estrategia de evasión al ataque del sistema inmune. En cambio el VLB forma un subgrupo diferenciado dentro de los retrovirus ya que la variabilidad dentro de los genes *pol* y *env* es menor del 6% lo que indica un alto grado de conservación entre las cepas estudiadas (Liscursi y col. 2003; Gillet y col., 2007).

El VLB es envuelto, de simetría icosaédrica y mide entre 60 a 125 nm de diámetro.

Está compuesto por proteínas estructurales que envuelven y se relacionan con el ARN viral. En la **figura I.A.1.** se puede observar un esquema del virus.



**Fig. I.A.1.:** Virus de la Leucosis Enzoótica Bovina. Esquema de la sección transversal de la partícula viral (modificado de Monti G., 2005).

El genoma es "diploide", está formado por dos cadenas idénticas de ARN de sentido positivo, no complementarias, asociadas a la proteína estructural interna no glicosilada de la nucleocapside (p12) y a varias copias de la polimerasa transcriptasa reversa (Gillet y col. 2007).

Las proteínas estructurales internas no glicosiladas restantes pertenecen a la matriz (p15) y a la capsida (p24). La proteína p15, formada por 109 aa, se relaciona tanto con el ARN como con la envoltura viral. La p24, proteína neutra y moderadamente hidrofóbica, es la más importante del core del VLB, está formada por 642 aa y presenta 2 epítopes identificados por anticuerpos monoclonales (Burny y col., 1985). A esta proteína, se la encuentra formando dímeros homólogos y complejos con la p10. La p12 es una proteína de 69 aa rica en prolina, que está íntimamente unida al ARN viral (Gillet y col., 2007).

La envoltura del virus está formada por una doble membrana lipídica originada en el proceso de gemación que se da en la célula infectada. Las proteínas que se encuentran insertadas en esta estructura son la proteína de transmembrana (gp30) y la proteína glicosilada de superficie (gp51). La gp51, formada por 268 aa, es la proteína más abundante de la envoltura y cuenta con 8 determinantes antigénicos identificados por anticuerpos monoclonales (sitios A al H) (Bruck y col. D., 1984) de los cuales 3 son altamente conservados (F, G y H) y están involucrados en la infectividad del virus y su habilidad para inducir sincitios en las células blanco (Lamb, 2008).

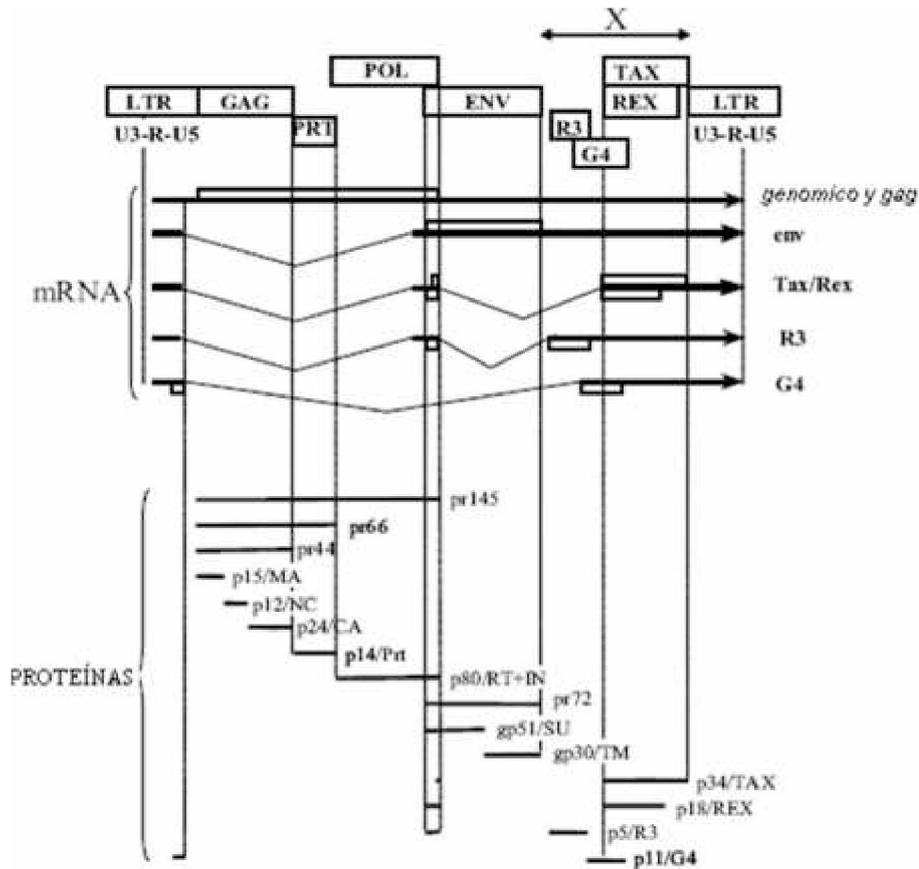
La gp30 es una proteína de transmembrana de 214 aa que muestra características estructurales típicas de las proteínas de transmembrana de los virus tipo C (Burny y

col., 1985). El extremo N-terminal de la gp30 se inserta en la capa bilipídica y se transforma en el soporte que fija la gp51 a la superficie, conformando así un complejo gp30/gp51, involucrado en el reconocimiento de receptores virales en las células blanco. La gp30 también se relaciona con la p15 de la matriz proteica. Tanto las proteínas que conforman el complejo gp30/gp51 como la proteína estructural p24 son altamente inmunogénicas y capaces de desarrollar una potente respuesta inmune (González y col., 1988; Van der Maaten y Miller, 1990; Monti y col., 2005).

### **I.A.1b** Genoma

El genoma contiene genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) (Sagata y col.1985. Beier y col., 2001) y no estructurales o reguladores seguidos de una región X donde se ubican los genes reguladores denominados Tax, Rex, R3 y G4 (Luciw y Leung, 1994. Alexandersen y col., 1993). La estructura del provirus del VLB, sus genes, transcritos ARN y proteínas virales se detallan en la **figura. I.A.2**.

El ADN resultante de la transcripción reversa (provirus), se integra al genoma del hospedador, y se lo puede encontrar en 1 a 3 copias por célula, ubicados en forma aleatoria (Tajima y col. 1998). Así integrado, el provirus está flanqueado por segmentos denominados LTR (Long Terminal Repeat), sitio donde se da lugar el inicio de la transcripción viral. Cada LTR consta de 3 regiones: U3, R y U5. Los genes codificados en esta región tienen funciones regulatorias de la transcripción viral relacionadas, por ejemplo, con la familia de proteínas kappa B (NF kB), regulatorias de la activación celular (Gillet y col., 2007).



**Fig. I.A.2: Estructura del provirus del VLB: genes, transcritos ARN y proteínas virales.**

El provirus está flanqueado por dos secuencias idénticas de TLR y contiene los marcos abiertos de lectura para gag, prt (proteasa), pol y env. Una región X que codifica para Tax, Rex, R3 y G4, ubicada entre el env y el TLR 3'. El transcripto ARN genómico sirve como templado para la expresión de los precursores de gag-prt-pol (pr145, pr66 y pr44) que son procesadas en proteínas estructurales y enzimas: p15 de la matriz (MA), p24 o capsido (CA), p12 nucleocapsido (NC), p14 o proteasa (PRT) y p80 (RT/IN) que contiene la transcriptasa reversa, ARNasa H y la integrasa. Un intrón largo correspondiente a gag-prt-pol es escindido para permitir la transcripción del env. Después de la traducción, el precursor pr72 es clivado en dos subunidades: gp51 glicoproteína extracelular (SU) y la gp30 glicoproteína de transmembrana. Para generar ARNm de Tax/Rex es clivado un segundo intrón. Dos ARNs menores fueron identificados por RT/PCR que codifican a p5 (R3) y p11 (G4). (Modificado Gillet y col., 2007).

El gen *gag* codifica la síntesis de un polipéptido precursor, p44. Este precursor es escindido por acción de la proteasa p14 en las proteínas estructurales no glicosiladas que conforman la partícula viral, p15, p24 y p12. La sobreexpresión de la poliproteína Gag, en células mamíferas, es la responsable de generar "virus-like particles" (Miller y col. 1969; Gillet y col., 2007). La proteasa p14 está codificada en el gen PRT situado en la región que se encuentra entre los genes *gag* y *pol* (Gillet y col. 2007).

El gen *pol* da origen a un transcrito gag-pol-prot que luego de ser clivado por parte de la p14 da origen a la transcriptasa reversa, una polimerasa ADN-ARN dependiente (que presenta tanto actividad ADN polimerasa como la RNAsa H) y una integrasa. (Schwartz, 1994; Florins y col., 2007).

El gen *env* codifica las proteínas que se insertan en la envoltura viral. Se transcribe a un precursor pr72, poliproteína que es clivada en las proteínas estructurales glicosiladas gp30 y gp51, que se encuentran asociadas por uniones disulfuro para conformar el complejo gp30/gp51 (Gillet y col., 2007).

La región X contiene las secuencias codificantes para varias proteínas regulatorias. Los marcos de lectura de los genes R3 y G4 pertenecen a una región intermedia entre los genes de la envoltura y los otros genes regulatorios, *tax/rex*. La proteína G4 estaría involucrada en los procesos de transformación celular. La R3 estaría relacionada con la represión de la actividad de Rex. Tanto R3 como G4 no son indispensables para la infectividad *in vivo* pero se requiere de ellos para el mantenimiento de la carga viral. La integridad de los genes R3 y G4 contribuyen

significativamente en una propagación eficiente del virus en el hospedador (Florins y col., 2007; Gillet y col., 2007).

Los productos de la región Rex controlan el procesamiento del ARNm, son responsables de la translocación al citoplasma y la estabilización del mismo (Gillet y col., 2007).

El gen *tax* está caracterizado como el factor más importante requerido para la replicación viral y la patogénesis. Activa la transcripción directa de LTR y es el responsable de la inmortalización de células de cultivo primario *in vitro*. Tax es una proteína con función de activador transcripcional de la expresión viral, codificada en el extremo 3' de la región X. Es una proteína rica en prolina y leucina, altamente conservada entre los diferentes aislamientos y es reconocida por linfocitos T y B. Para su actividad necesita la secuencia de la región U3. Conjuntamente con la proteína inhibidora de la apoptosis, Bcl-2 y otros oncogenes, estaría involucrada en la transformación celular e inicio de la tumorigénesis. La transformación celular estaría favorecida por la actividad inhibitoria que ejerce Tax en los procesos de reparación del ADN, así como el acúmulo de grandes cantidades del factor nuclear kappa B (Schwartz y col., 1994; Gillet y col., 2007, Florins y col., 2007).

### **I.A.1c** Ciclo viral

#### Célula blanco

Se ha determinado que el VLB tiene afinidad por los linfocitos B (LB) que expresan IgM de superficie, principalmente LB1 CD5 +, subpoblaciones B 1a y LB1b CD11+ y en menor medida LB2 o linfocitos B convencionales. Estos LB1 han demostrado tener una particular susceptibilidad a proliferar y se los puede encontrar aumentados

en número en las primeras etapas de la infección en ovejas. En menor medida el provirus puede localizarse en linfocitos, granulocitos y monocitos. Esta falta de restricción celular también se ve reflejada *in vitro*, ya que se ha podido infectar líneas celulares como D17, células HeLa y células MDBK de origen canino, humano y bovino respectivamente (Schwartz y col., 1994, Debacq y col., 2004).

En ovejas la linfocitosis se caracteriza por ser casi exclusivamente LB1 CD11b+. Este subtipo se encuentra casi ausente en casi todos los órganos linfáticos, pero está presente en forma importante en sangre periférica y en la zona marginal del Bazo (Florins y col. 2007).

Los estudios realizados sobre las inmunoglobulinas de linfocitos LB1 infectados señalan la presencia de IgM y en menor medida IgG. La IgM es funcional y presenta poliespecificidad que con el tiempo puede cambiar su especificidad hacia autoantígenos (Gillet y col., 2007).

### Replicación

Las proteínas de la superficie viral reconocen receptores en los linfocitos B, aun no han sido identificados. Este proceso se denomina adsorción (Lavanya y col., 2008).

La decapsidación ocurre cuando, una vez adsorbida a la membrana celular, se funde la bicapa lipídica viral a la membrana celular y se libera la nucleocápside en el citoplasma. En el momento que la transcriptasa reversa es liberada en el citoplasma, comienza a producir copias de ADN doble hebra a partir de ARN viral. Una vez transportadas al núcleo, entre 1 a 5 copias de ADN proviral son insertadas al azar, mediante la acción de la integrasa viral y pasa a denominarse provirus. El ADN viral o provirus así integrado permanece estable y silente durante mucho tiempo

transformándose en la forma viral comúnmente detectable en animales persistentemente infectados. En la **figura I.A.3** se puede observar un gráfico el ciclo viral.

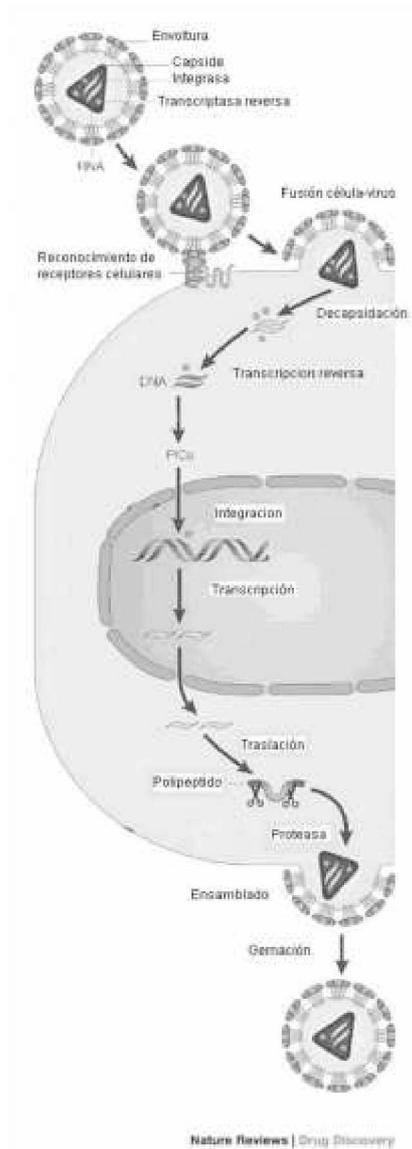


Fig. I.A.3 Ciclo viral em retrovirus. Adaptado de Pommier y col., 2005

El VLB comparte con otros virus del género deltavirus dos formas de expansión viral. Una incluye el proceso de transcripción reversa durante el ciclo replicativo viral que tiene lugar cuando una célula blanco es infectada durante la primo infección. La otra vía es la mitótica, donde el virus integrado se propaga/disemina durante la expansión clonal de la célula blanco. Ambas vías ocurren simultáneamente, sobre todo en los primeros estadios de la infección, en el periodo de seroconversión. La diseminación viral por la vía mitótica es la responsable de la mayoría de la carga viral (entendida como carga de provirus) durante el período asintomático, fase asintomática con linfocitosis persistente y/o fase tumoral (Florins y col., 2007)

La replicación viral, vía producción de viriones, que infectan nuevas células blanco parece ocurrir casi exclusivamente durante un corto período que le sigue a la primoinfección. Algunos autores especulan que es posible que el ciclo replicativo siga ocurriendo constantemente pero no contribuye a aumentar la carga proviral, probablemente debido a la eficiente respuesta inmune que elimina a las células infectadas donde replicaría el virus permitiendo solo la expansión mitótica de las células que portan el provirus (Florins y col., 2007b; Florins y col., 2007<sup>a</sup>; Pomier y col., 2008). Esta hipótesis se contrapone con los trabajos de Ferrer (Ferrer, 1989), donde se demuestra que pasado el período de primoinfección la replicación viral es inhibida por una proteína plasmática no inmunoglobulina.

## **I.A.2 ANIMALES SUSCEPTIBLES Y TRANSMISIÓN**

El ganado bovino doméstico es el hospedador natural de VLB. El búfalo y los carpinchos se infectan naturalmente pudiendo ser considerados reservorios salvajes del virus. La transmisión experimental se ha llevado a cabo en varias especies

animales como conejos, ratas, gallinas y cabras, pero solo en ovejas se ha logrado desarrollar la enfermedad (Burny y col., 1985; Monti y col., 2005). Las ovejas presentan un período de latencia relativamente corto, entre 6 meses a 4 años post-infección, mientras que en bovinos es entre 4 a 10 años (Miremi y col., 2007) El 100% de los ovinos infectados desarrollan tumores, en bovinos solo el 5% de los infectados desarrollan tumores y mueren (Burny y col. 1985). El hecho que las ovejas no sean el hospedador natural de la LEB y no hayan co-evolucionado con el virus, podría explicar por qué en este caso la enfermedad es mucho más aguda (Florins y col., 2008). Estas características hacen a las ovejas el modelo experimental por excelencia para el estudio de la LEB y, a pesar de las marcadas diferencias, también es el modelo experimental para comprender la tumorigénesis inducida por HTVL I (Florins y col., 2007; Merimi y col., 2007).

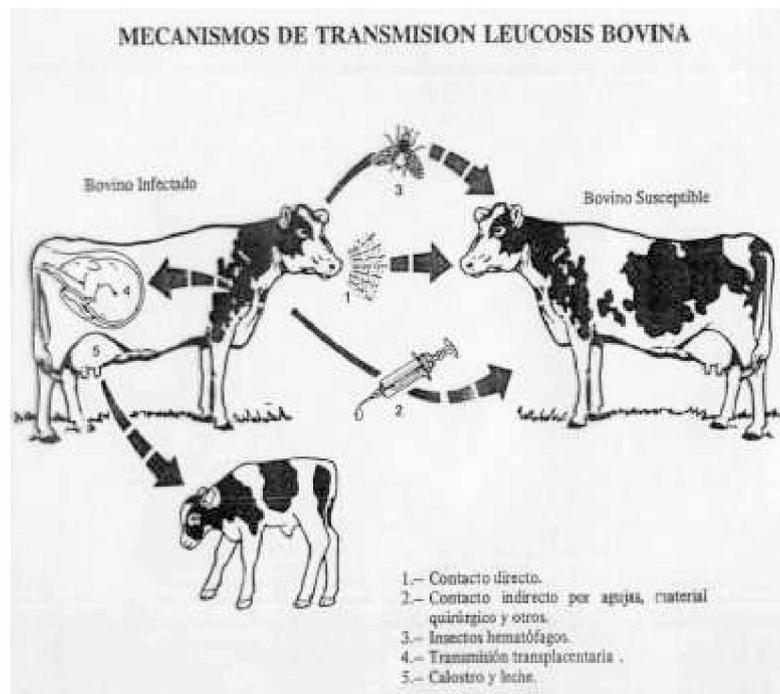
La transmisión del VLB puede ser horizontal o transplacentaria (**Fig.: I.A.4**). Los animales portadores asintomáticos son la principal fuente de contagio en los rodeos (Gonzalez y col. 1988). La LEB se transmite horizontalmente a través de la transferencia de células infectadas. La dificultad de determinar el estadio de viremia establece que las células infectadas con VLB (LB1-LB2-macrofagos-monocitos-linfocitos) presentes en la leche y en la sangre conforman el mejor vehículo para la transmisión natural.

La transmisión horizontal iatrogénica es la más importante, como ocurre en las prácticas veterinarias que involucren sangrado, donde pequeños volúmenes de sangre (2-5 ul) pueden transmitir la infección (Gonzalez y col., 2001). Las maniobras involucradas son: aplicación de vacunas o medicamentos, descorne, tatuaje,

marcación auricular, venipuntura sin cambiar agujas, tacto rectal, entre otras, realizadas sin los cuidados higiénicos correspondientes (Johnson, 1985.;

Hopkins y DiGiacomo, 1997). El contacto directo prolongado entre animales infectados y sanos es considerado un factor de riesgo que se ve incrementado en rodeos con alta prevalencia y alta carga de animales por superficie (Monti y col., 2005).

Aunque experimentalmente se comprobó que insectos hematófagos como los tábanos y las moscas de los cuernos son vectores de la LEB, el mecanismo de transmisión por picaduras de estos insectos es una vía que no reviste mucha importancia, aunque debería tenerse en cuenta en regiones que presenten alta densidad de estos insectos (Ohshima y col., 1981; Perino y col., 1990).



**Fig.: I.A.4.: Transmisión del VLB**

La transmisión transplacentaria no es tan importante como la horizontal iatrogénica, aunque hay autores que han reportado un 18% de los terneros nacidos de madres infectadas con VLB presentan anticuerpos específicos (Chamizo Pestana, 2005). La forma de confirmar si los terneros presentan anticuerpos específicos propios es realizar serología previo a que tomen calostro o por la técnica de PCR para determinar la presencia del provirus en sangre periférica.

La transmisión transplacentaria ocurre principalmente durante el estado de linfocitosis de la madre. La detección de anticuerpos específicos y de provirus en los recién nacidos determina que la infección tiene lugar durante la segunda mitad de la gestación (Marcovecchio y col., 2006; Monti, 2006).

El contagio postnatal en recién nacidos es posible y se debe a la ingesta de calostro de madres infectadas durante las primeras horas de vida. No obstante esta vía de contagio sucede en raras ocasiones. Se especula que los anticuerpos maternos neutralizarían al virus en los primeros estadios de la infección (De la Sota M., 2004; Monti, 2006).

La LEB no parece ser transmitida por transferencia de óvulos o embriones provenientes de hembras infectadas, no obstante la vía iatrogénica no se descarta en este tipo de maniobra y durante el servicio natural el riesgo lo revisten las microlesiones con transferencia de sangre (Monti, 2006).

Por último, en bovinos, la resistencia y susceptibilidad a la progresión de la enfermedad han sido asociadas al polimorfismo en los genes que codifican para el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Lamont y col., 1998). El Antígeno Linfocitario Bovino, BoLA (Bovine Lymphocyte Antigen) hace referencia al complejo

mayor de histocompatibilidad de la especie bovina (*Bos taurus* and *Bos indicus*). El polimorfismo en el gen del CMH tipo II BoLA-DRB3.2 está relacionado con la resistencia o susceptibilidad a desarrollar linfocitosis persistente (LP) y linfosarcoma. En particular la resistencia en la raza Holstein parece depender de los alelos BoLA-DRB3.2 11, 23 y 28 y la susceptibilidad de los alelos BoLA-DRB3.2 8, 16, 22 y 24. Concretamente se determinó una fuerte relación entre el alelo DRB3.2 \* 11 y la resistencia genética a la LP en esta raza y se correlaciona con un perfil de baja carga proviral. De esta observación se plantea la posibilidad que los bovinos que presenten este alelo y un perfil de baja carga proviral fueran incapaces de transmitir LEB en condiciones de manejo estándar (Juliarena y col., 2007; Juliarena y col., 2008).

Las diferencias entre susceptibilidad o resistencia a la progresión de la enfermedad, se traducen en cambios de aminoácidos a nivel del sitio de unión de los péptidos en el CMH tipo II, dando lugar a diferencias en unión y orientación que toman los péptidos-epitopes, por lo tanto serán presentados a los efectores del sistema inmune adaptativo de tal forma que favorecerán una mejor o peor respuesta inmune estimulando el estado de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad (Lewin y col., 1988; Xu y col., 1993; Panei y col., 2009). Los estudios del polimorfismo en el CMH son una herramienta de importancia para determinar marcadores genéticos de resistencia y poder realizar selección genética como complemento a los procedimientos convencionales de control, sobretodo en rodeos de alta prevalencia (Juliarena y col., 2008).

También se ha demostrado que la susceptibilidad a LP está asociada a polimorfismos en la región promotora del gen de FNT  $\alpha$ - (alelo -824G)

(Konnai y col. 2006).

### **I.A.3 RELACIÓN VIRUS-HOSPEDADOR**

#### **I.A.3a Estrategias de evasión del sistema inmune y persistencia.**

El largo período de latencia de la LEB es el mecanismo por el cual el virus restringe la expresión de sus genes y se mantiene latente en su forma integrada de provirus en las células infectadas. Se ha demostrado la presencia de una proteína plasmática no inmunoglobulina responsable de la inhibición de la replicación viral (Ferrer y col., 1989). Esta es una de las maneras postuladas para explicar como el virus es capaz de mantener bajos los niveles de expresión viral *in vivo*. En este contexto las proteínas virales son indetectables inclusive por pruebas de alta sensibilidad y especificidad como el western blot o citometría de flujo. Los transcritos, como mRNA de *tax/rex*, se detectan en muy baja frecuencia. De todos modos la vigorosa respuesta inmune antiviral que se instaura luego de la primo-infección indicaría que, al menos la expresión viral ocurre en alguna subpoblación de LB, las cuales son eficientemente eliminadas por el sistema inmune (Florins y col., 2007b; Gillet y col., 2007; Merimi y col., 2007; Florins y col., 2012).

Otra forma de evasión es la vía de replicación mitótica del virus. La inducción de la expansión clonal de los linfocitos B (LB) portadores del provirus provoca el aumento de la carga proviral y diseminación en forma pasiva, sin expresión viral, por lo tanto no detectables por el sistema inmune (**Fig.: I.A.5**). La integración del ADN viral activaría los mecanismos de mitosis que llevan a la linfocitosis persistente

considerada una etapa pretumoral, mecanismos en los que estarían involucrados la mutación del supresor de tumores p53 y la proteína Bcl-2 (Achachi y col., 2008).

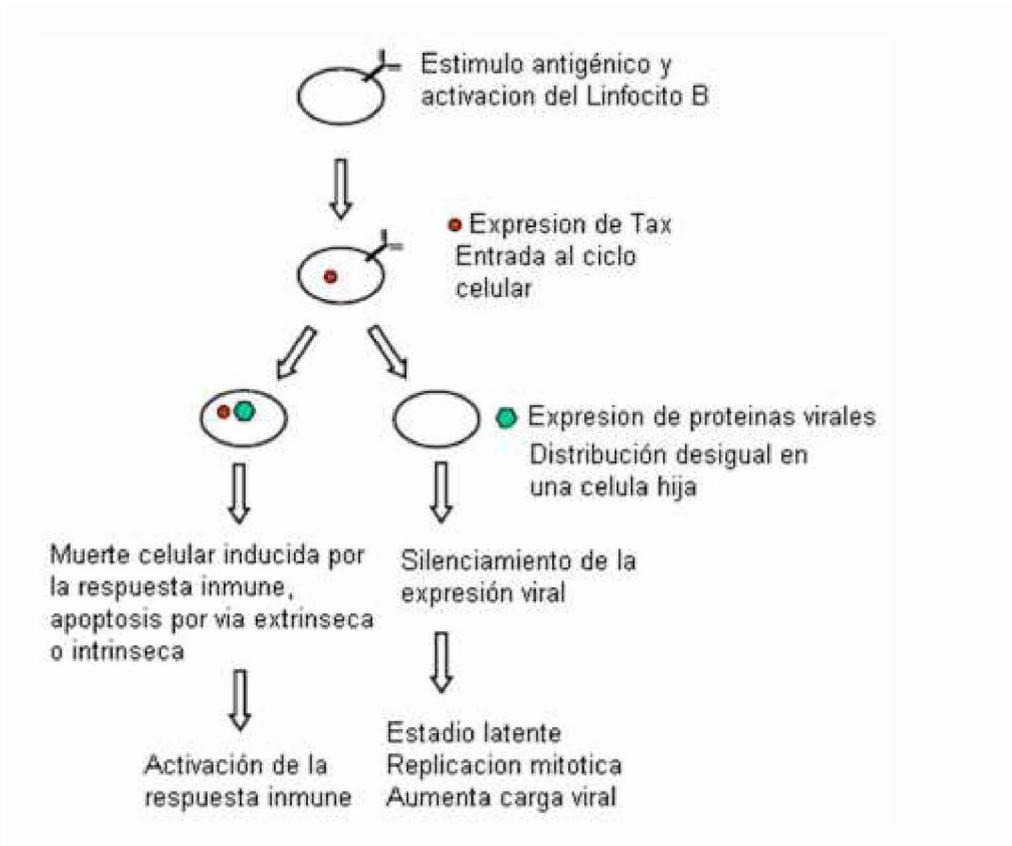


Fig Fig.: I.A.5.: Hipótesis del mecanismo de replicación del VLB (modificado de Gillet y col., 2007).

La activación normal del LB requiere de varios estímulos que involucran activación del Receptor del Linfocito B (BCR), moléculas de co-estimulo, citoquinas y hasta autoantígenos. Una vez infectada, los LB son estimulados para proliferar, la proteína Tax y HBZ, serían los responsables de este proceso (Tajima y col. 2002). La hipótesis que proponen Gillet y col. plantea que durante la mitosis hay una distribución desigual de las proteínas virales generando una célula hija que contiene y expresa proteínas virales, y otra que solo contiene al provirus integrado (Gillet y col. 2007). Otra posibilidad es que una de las células hijas silencie la expresión viral

por acción de factores de inhibición viral (como la p30 en HTLV I, no descubierto aún el homólogo en LEB) como la proteína plasmática inhibidora descubierta por Ferrer (Ferrer y col., 1989) Así, la célula que expresa proteínas virales será reconocida por el sistema inmune y eliminada por mecanismos intrínsecos o extrínsecos de apoptosis, y a la vez serán responsables de la respuesta humoral. Las células donde la expresión viral ha sido silenciada o perdieron las proteínas virales después de la mitosis, entran en un estadio de reposo o silente y de esta manera son capaces de evadir la respuesta inmune y sobrevivir.

La inhibición de la apoptosis es otra forma de evasión. La apoptosis es un mecanismo esencial para la eliminación de células infectadas o tumorales, desencadenado por efectores celulares del sistema inmune, así como señales internas o externas de daño o transformación (Abbas A., 2008). En las ovejas la inhibición de este proceso altera el equilibrio entre la proliferación y muerte celular modificando la homeostasis llevando por último a la leucosis. Esta protección contra la apoptosis parece ser adquirida temprano en el estadio asintomático y persiste durante las etapas de linfocitosis y linfosarcoma (Willems y col., 2000). El rol de la apoptosis en la LEB es muy diferente en bovino. Los niveles de apoptosis son similares entre animales no infectados e infectados con VLB, indicando que la homeostasis celular no se ve demasiado alterada en los estadios tempranos de la infección. El Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (FNT  $\alpha$ ) y sus receptores estarían involucrados en la inducción y supresión de la apoptosis. Una hipótesis postula que durante las fases iniciales de la LEB los linfocitos B expresan mayor cantidad de receptores FNT R1 (inducción) que de FNT R2 (supresión) por lo que al ser estimulados con FNT  $\alpha$ , se induce la apoptosis eliminando las células infectadas.

Durante la etapa de linfocitosis persistente, los LB expresan mayor cantidad de FNT R2 haciéndose menos propensas a la apoptosis inducida por FNT  $\alpha$  (Willems y col., 2000; Gillet y col., 2007).

### **I.A.3b** Respuesta inmune del hospedador

La transmisión natural o iatrogénica pone en contacto a las células portadoras de VLB con el sistema inmune del hospedador. Los procesos que se desencadenan luego de la primo infección no están completamente establecidos aún, de todos modos la resultante del reconocimiento de células infectadas origina una fuerte respuesta celular y humoral (Kabeya y col., 2001. Florins y col., 2007).

La respuesta celular innata se desencadena tempranamente a través las NK, NKT y macrófagos aunque los linfocitos T  $\gamma\delta$ , especialmente abundantes en el rumiante (Pennimpe, 2004; Tizard, 2006), son responsables de la actividad citotóxica contra células infectadas con VLB, aunque en menor medida también actúan los LT CD8+ citotóxicos. La fuerte respuesta humoral y citotóxica es inducida rápidamente después de la primo infección. Sondas respuestas perduran y se amplifican a lo largo de la vida del animal lo que sugiere, para algunos autores, que el sistema inmune es constantemente estimulado por antígenos virales (Florins y col., 2007<sup>a</sup>). La seroconversión se hace evidente entre la semana 3 a 11 post infección (Debacq y col., 2004).

La infección viral se relaciona con la sobre-expresión de citoquinas asociadas a la actividad celular, FNT $\alpha$  e INF $\gamma$ . Ambos con origen doble, durante la respuesta innata a través de la activación de los linfocitos de la inmunidad innata, células naturalmente asesinas o natural killer (NK) y NKT, así como macrófagos , y por los

LT colaboradores (subpoblación Th1) y LT citotóxicos en la respuesta adaptativa (Gillet y col. 2007).

Las citoquinas son polipéptidos biológicamente activos que controlan, entre otras cosas el crecimiento y diferenciación de Linfocitos T y B. El afinado equilibrio entre las citoquinas se ve notoriamente desregulado en diferentes estadios de la LEB, este desorden contribuiría a la progresión de la enfermedad (Yakobson y col. 2000; Kabeya y col., 2001). Durante el periodo de linfocitosis los niveles de IL6 están significativamente elevados lo que favorecería una fuerte disminución de la expresión de antígenos virales, contribuyendo con el largo periodo de latencia (Meirom y col., 1997). La larga duración de cada uno de los períodos de la enfermedad sugiere que el VLB modula la respuesta inmune en su provecho (Kabeya y col., 2001). Aunque, los datos sobre la dinámica de las citoquinas son discutidos, algunos autores demostraron el aumento de ciertas citoquinas como IL2 e INF $\gamma$  en animales positivos sin signos, como en animales con linfocitosis persistente (LP), serían los responsables de retraso en la aparición de este último período (Keefe y col., 1997; Yakobson y col. 2000). Otros afirman que la síntesis de estas citoquinas están disminuidas y que junto con la disminución de otras citoquinas como IL1, FNT $\alpha$  sintetizadas por los LT colaboradores se asocia a la progresión de la infección por VLB (Altreuther y col., 2001; Amills y col., 2002). Las funciones de TNF alfa en el curso de la infección VLB no han sido plenamente establecidas hasta el momento. Estudios han determinado que, tempranamente, en la fase inicial de la infección aumenta la expresión del FNT  $\alpha$ , contribuyendo a la eliminación de las células infectadas con VLB. También en esta etapa temprana de infección los linfocitos B particularmente expresan mayor cantidad de receptores

para FNT  $\alpha$  RI, que están asociados a dominios de muerte, por lo tanto cuando la célula es estimulada por FNT  $\alpha$ , se induce la muerte por apoptosis con la eliminación de la célula infectada. Los mismos investigadores han determinado que las células mononucleares de sangre periférica provenientes de animales infectados con VLB que presentan linfocitosis persistente, expresan mucha más cantidad del receptor RII para FNT  $\alpha$ , que el receptor RI, y la estimulación con FNT  $\alpha$  induciría la proliferación linfocitaria responsable del desarrollo de la leucosis (Kabeya y col., 1999). De todos modos el rol de estas citoquinas durante la patogénesis de la enfermedad sigue sin ser esclarecido en su totalidad.

Los estudios sobre la respuesta inmune, tanto humoral como celular, tuvieron su auge en la década de los '90, época en que se investigaron diferentes clases de vacunas para controlar esta enfermedad. Estos estudios postularon que la respuesta inmune mediada por células contra el VLB contribuye a la supresión de la replicación y conduce a la demora de la progresión de la enfermedad (Kabeya y col., 2001). A pesar que no es posible la detección directa de antígenos virales en ningún estadio de la enfermedad, el VLB genera una fuerte respuesta humoral sostenida en el tiempo con altos niveles de anticuerpos citotóxicos (Burny y col., 1985; Heeney y col., 1988). Como mencionamos anteriormente, algunos autores postulan que el aumento de los niveles de anticuerpos parece ser estimulado por la persistencia del virus y la replicación, dando como resultado una respuesta humoral detectable durante toda la vida del animal (Florins y col., 2007a).

Las proteínas estructurales p24 y gp51 son potentes inmunógenos y los anticuerpos contra ellos pueden ser detectados en la mayoría de los animales infectados con el VLB. En animales experimentalmente infectados los anticuerpos anti-gp51 parecen

ser los primeros en aparecer y en títulos consistentemente más altos que los anticuerpos anti-p24 (Portelle y col., 1983; Gonzalez y col., 1999b.; Monti y col., 2005). Otros autores encontraron que pruebas de alta sensibilidad son capaces de detectar anticuerpos anti-p24 días antes a la aparición de anticuerpos anti-gp51 y en igual o mayor título (Kittelberger y col., 1999; Gonzalez y col., 2001). El isotipo varia según el estadio de la enfermedad, en animales asintomáticos se han detectado anticuerpos IgM e IgG1 anti p24 y gp51, mientras que la IgA aparece en animales con linfoma (Heeney y col.,1988).

#### **I.A.4 SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD**

La enfermedad tiene 3 presentaciones dependiendo del grado de susceptibilidad del hospedador y del tiempo transcurrido, su estado de resistencia inmune, factores ambientales y la dosis infectante del virus (Burny y col, 1985; Monti 2005).

La mayoría de los bovinos infectados permanecen asintomáticos de por vida. Esta etapa asintomática se considera la primera etapa de la enfermedad y se caracteriza por no manifestar signos clínicos y presentar anticuerpos específicos en sangre contra los inmunógenos principales. Los animales que permanecen en este estadio son portadores latentes de la infección (Florins y col., 2008).

Aproximadamente un tercio de los infectados con VLB desarrollan linfocitosis persistente (LP) como único signo detectable. Esta etapa se caracteriza por el aumento permanente y estable de LB constituyendo una etapa linfoproliferativa benigna considerada, por algunos autores, una condición previa a la etapa tumoral (Chamiso Pestana E.G., 2005). En los frotis de sangre periférica de estos animales

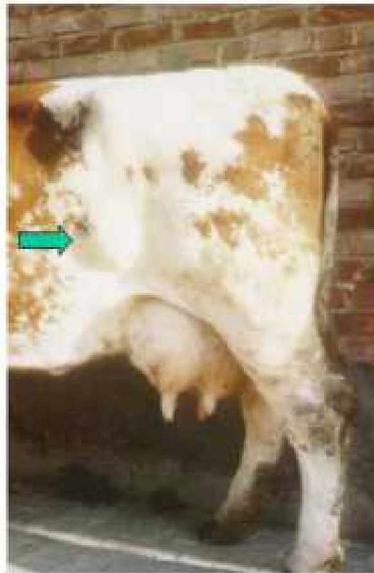
se observó por primera vez (Panei C y col., 2013) imágenes compatibles con las "sombras de Gumprecht" (Gumprecht shadows, en inglés) citadas por primera vez en humanos por Gumprecht F. en 1896 (Macdonald D., 2003), comunes en pacientes con leucemias linfocítica crónicas. Esta imagen hace referencia a alteraciones protéica del citoesqueleto celular con la consiguiente pérdida de integridad y rigidez de la membrana celular dando lugar a la ruptura de las mismas con la aparición del citado hallazgo citológico.

La proliferación celular se debe a la expansión policlonal de los LB infectados y de los no infectados, estos últimos como respuesta al estímulo constante de antígenos del VLB. Este aumento se traduce en un desbalance en la fórmula linfocitaria donde los LB protagonizan un aumento del orden del 40 al 90% (Gillet y col., 2007). La mayoría de los linfocitos infectados mantienen su morfología normal aunque se ha reportado cambios en el tamaño, aumento del número de moléculas de superficie como IgM y CMH tipo II (Chamiso Pestana, 2005; Florins y col., 2007b), lo cual se asociaría a alteraciones descritas anteriormente (Panei C., y col., 2013).

El desarrollo de tumores es un evento poco común en bovinos ya que menos del 5% de los animales infectados desarrollaran leucemia, linfosarcoma y/o linfoma. No obstante, entre el 10 y 30% de los animales con LP desarrollan tumores. Los signos generales del linfosarcoma tienen un inicio insidioso con disminución de la producción acompañado de deterioro progresivo del estado físico que lleva a la muerte del individuo. En un 5-10% de los casos se manifiestan como hiperagudos con la muerte del animal como único signo (Burny y col. 1985).

El linfosarcoma es el resultado de la proliferación y acumulación local de linfocitos B en diferentes tejidos como bazo, abomaso, corazón, riñones, piel y pulmones entre otros (Chamizo Pestana, 2005).

La hipertrofia de los nódulos linfáticos representa el 75 al 90% de los casos. Se presenta en ganglios superficiales pero es más frecuente la afección de órganos linfáticos viscerales como por ejemplo ilíacos, mesentéricos, intratorácicos. Estos animales así afectados no presentan signos salvo que los tumores estén interfiriendo con la función de otro órgano (**Fig.: I.A.6**).



**Fig.: I.A.6:** Tumor inducido por VLB (Florins A., 2007a).

### **I.A.5 DIAGNÓSTICO**

Para el diagnóstico de la LEB se cuenta con métodos directos e indirectos. Dado que es una entidad con gran variedad de signos, la combinación de métodos

diagnósticos dependerá del estadio de la enfermedad en el que se encuentre el animal, así como de factores señalados en la historia del plantel.

#### Métodos directos

Los métodos directos que revelan la presencia de signos compatibles con la LEB son los exámenes clínicos, histopatológicos y hematológicos. Los hallazgos clínicos típicos causados por el VLB deben diferenciarse de la clínica de tuberculosis, paratuberculosis y actinobacilosis.

El aislamiento viral constituye el método directo por excelencia. En el caso de VLB la detección del virus por aislamiento no es un método de rutina ya que los niveles de expresión viral son bajos y la propagación del virus resulta difícil de lograr. Por esto y para su aislamiento es necesario co-cultivar los linfocitos del animal sospechado con otras células de oveja para poder observar el efecto citopatogénico típico de esta enfermedad (sincitios) (Kittelberger y col., 1999; Kuckleburg y col., 2003).

Los métodos directos moleculares basados en la técnica PCR detectan ADN proviral y dependiendo de la muestra, tienen alta concordancia con datos serológicos.

Desde los intentos preliminares en la puesta a punto de la técnica de PCR simple (Marsolais y col., 1994, Trono y col., 2001) y el desarrollo de sus diferentes variantes como duplex PCR (Martin y col., 2001; Mohammadabadi y col., 2011) PCR-RFLP (restriction fragment length Polymorphism) (Felmer y col., 2006), RT-PCR y nested PCR (Kuckleburg y col., 2003; Heenemann y col., 2012) y BLV CoCoMo qPCR (Jimba y col., 2010) el objetivo del diseño no fue sustituir otros métodos diagnósticos, sino constituirlos como complemento útil para la detección temprana de la LEB. La técnica de PCR es el método directo de elección para diferenciar

infección de la transferencia pasiva de anticuerpos maternos en bovinos menores de 6 meses y para corroborar infección en carcasas de matadero donde otras muestras son difíciles de recolectar (Kuckleburg y col., 2003; Felmer y col., 2006; Teifke y col., 2008).

#### Métodos indirectos

Para identificar y confirmar animales infectados por VLB, en cualquiera de sus presentaciones (portador asintomático, linfocitosis persistente o forma tumoral), se necesitan pruebas serológicas (Merk & Co., 2009).

Al momento de realizar una prueba serológica se debe tener en cuenta la presencia de anticuerpos maternos en terneros menores de 6 meses que hayan calostrado de hembras infectadas. En las hembras gestantes la disminución fisiológica de la concentración sérica de inmunoglobulinas durante los 15 días previos al parto (Pennimpede E.F.F., 2004; Tizard I.R., 2009) lleva a un diagnóstico erróneo. Trabajos específicos en LEB demostraron que las hembras gestantes y en periodo de lactancia, lapso comprendido entre el último mes de gestación y 2 a 3 meses postparto, tienen una disminución de la concentración de anticuerpos específicos (Burridge y col., 1982; Rama y col. 2012).

Por último es primordial relacionar las características operativas, como sensibilidad y especificidad, de las diferentes pruebas serológicas con la prevalencia vigente de la enfermedad.

Desde la década de los '70 se han desarrollado diferentes métodos serodiagnósticos para LEB tales como inmunofluorescencia indirecta (Ferrer y col., 1975), contrainmunolectroforesis (Poli y col., 1980), fijación de complemento

(Miller y Van der Maaten y col., 1974), radioinmunoensayo (Levy y col., 1977), que no han logrado resultados ventajosos debido a sus características operativas, requerimiento de equipamiento especial, manipulación de elementos radiactivos y no muy adecuados para su implementación como pruebas tamiz para procesar gran número de muestras al mismo tiempo.

La virusneutralización se basa en la habilidad de los anticuerpos en inhibir los efectos citopáticos del VLB en cultivos celulares. Esta prueba incluye algunas variantes como la inhibición de sincitios y el test de la policariositosis temprana (Monti G., 2005), aunque las mismas no son pruebas utilizadas de rutina para el diagnóstico.

La prueba de DIDA para la detección de animales infectados con VLB, desarrollada en la década de los '70, fue el primer método serológico aceptado por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (Miller y col., 1977; Simard y col., 2000) y la prueba oficialmente reconocida por el SENASA para la certificación de rodeos libres (resolución 337/94) y la exportación de ganado en pie (De La Sota M., 2004). La DIDA detecta principalmente anticuerpos anti-gp51 (Monti y col., 2005). Es una prueba de alta especificidad, de bajo costo, rápida y fácil de realizar, pero cuyas desventajas mayores son la baja sensibilidad, tiempo requerido para la lectura e interpretación de resultados (48-72hs) y la incapacidad de detectar anticuerpos en leche (Simard y col., 2000; OIE, 2004). Los antígenos utilizados para esta prueba son tanto antígeno crudo proveniente de líneas celulares FLK persistentemente infectado con VLB, como así también antígenos recombinantes (Seong In Lim y col., 2009). La sensibilidad analítica de la prueba esta en el orden de 30 ug/ ml, que indica cantidad de reactante necesaria para ser detectado por esta prueba

(Pennimpede E.F.F., 2004 y Gomez-Lucia E., 2007). Esta característica operativa podría ser la responsable de la baja sensibilidad epidemiológica de la prueba. Para un mismo tipo de antígeno, cuyo protocolo de obtención se basa en una purificación estándar básica, diferentes autores arrojan valores de sensibilidad tales como 67% - 79.7% - 86% y una especificidad del 92% - 99% - 100% (Trono y col., 2001; Seong In Lim y col., 2009; Martin y col., 2001 respectivamente). Más específicamente y tomando como referencia estándar una prueba inmunoenzimática sobre membrana, Choi y col., 2002, determinó, comparado con western blot para comprobar la presencia de anticuerpos anti-p24, que la técnica de DIDA obtuvo una sensibilidad del 61% y especificidad del 98% y en el western blot para gp51 la sensibilidad y especificidad fueron del 87% y 78% respectivamente.

Las pruebas primarias, como el ELISA, son de elección para el diagnóstico serológico dada su alta sensibilidad (detectan 0.0005 µg/ml de reactante), su fácil realización y lectura objetiva, con la ventaja de poder procesar simultáneamente un gran número de muestras (Pennimpede E.F.F., 2004 y Gomez-Lucia E., 2007).

A finales de la década de los '70 y principios de los '80 se empiezan a desarrollar las pruebas de ELISA para el diagnóstico de LEB. Desde entonces se han diseñado diferentes tipos de tests de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos anti-VLB.

Se han diseñado ELISAs indirectos, Poli y col., 1981 como Gielkens y col., 1981, utilizaron antígeno nativo parcialmente purificado correspondiente a la gp 51, el cual fue adsorbido directamente en la placa. El inconveniente observado en este tipo de ELISA indirecto, fueron los altos valores de background asociados principalmente a

contaminantes no virales producto de la preparación del antígeno de VLB a partir de cultivo celular el cual constituye una mezcla de antígenos virales y restos de cultivo celular (Nguyen y col., 1993). Para resolver este inconveniente, evitar la necesidad de purificar la proteína inmunogénica y mejorar la performance del ELISA se desarrollaron una serie de ELISAs de captura. En estos sistemas de captura se adsorben anticuerpos monoclonales anti-gp51 para adsorber de forma indirecta y específica la glicoproteína que esta formando parte de la mezcla de antígenos de la preparación viral no purificada (Portetelle y col.,1983; Nguyen y col., 1993). Otros autores para aumentar la especificidad del ELISA de captura, utilizaron como conjugado anticuerpo monoclonal anti-IgG1 marcado (Florent y col.,1988). También se desarrollaron ELISAs donde se adsorbe antígeno crudo purificado obtenido por centrifugación/precipitación (Gonzalez y col. 1999; Trono y col. 2001).

Se desarrollaron ELISAs de competencia o bloqueo donde la glicoproteína gp51 es adsorbida a la placa por la presencia de anticuerpo monoclonal anti-gp51 (Knapen y col., 1994; Portetelle y col.,1989) o por suero policlonal específico (Gutierrez y col., 2001; Monti y col., 2005) y la fase de competencia se lleva a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-gp51 en todos los casos. También se ha desarrollado un ELISA indirecto que utiliza como antígeno diagnóstico gp51 recombinante producida en sistemas de expresión de baculovirus (Russo y col., 1998; Giuseppe y col., 2004).

Las técnicas de ELISA para detectar anticuerpos anti-gp51 han sido diseñadas para ser utilizadas con muestras individuales o pool, tanto de suero como de leche (Bruck y col., 1984; Portetelle y col., 1983; Florent y col.,1988; Knapen y col., 1994; Nguyen Vy col., 1993; Gonzalez y col. 2006). Así mismo se han desarrollado adaptaciones

de ELISA sobre membrana, dot blot y western blot para gp51 y p24 (Walker y col., 1987; Llamas y col., 1999; Gonzalez y col. 1999b).

Las características operativas de los ELISAs indirectos para determinar la presencia de anticuerpos anti-gp51 son muy buenas con respecto a la técnica de DIDA. La sensibilidad están en el orden del 97% y la especificidad del 98% (Trono y col., 2001; Olechnowitz y col., 1990; Gonzalez y col., 2007)

También se desarrollaron varios ELISAs para determinar infección por VLB por la presencia de anticuerpos anti-p24 tanto en leche como en suero. Los primeros ELISAs fueron de captura a partir de la utilización de anticuerpos monoclonales para adsorber indirectamente la proteína p24 partiendo de preparaciones antigénicas crudas preparadas a partir de cultivo de FLK-VLB (De Boer y col., 1987; Kittelberger y col., 1999; . Rodák y col., 1997), algunos utilizaron anticuerpo monoclonal como conjugado (De Boer y col., 1989).

Una vez desarrolladas las técnicas moleculares para la producción de proteínas recombinantes se utilizaron sistemas bacterianos para la producción de la proteína p24 (Juliarena y col., 2007; Gutierrez y col., 2009) y nuestro grupo de trabajo produjo proteína p24 recombinante en sistema de expresión de baculovirus para su utilización en diagnóstico (Larsen y col., 2013).

La prueba de western blot también fue probada como técnica diagnóstica tanto con antígeno crudo (Kittelberger y col., 1996) como con proteína recombinante producida en sistema bacteriano (Bicka y col., 2001).

Por último también se desarrolló un ELISA directo de captura para determinar la presencia de la proteína p24 en cultivos tempranos de células mononucleares de sangre periférica (van der Heuvel y col., 2003).

Las pruebas más utilizadas actualmente son la doble inmunodifusión en gel de agar (DIDA) y ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (Gielkens y col., 1981; Poli y col., 1981; Gauthier y col., 1982; Bruck y col., 1984; Simad y col., 2000; Gonzalez y col., 2001; Trono y col., 2001; Monti y col., 2005).

Hasta el momento no hay publicaciones que describan el desarrollo de un ELISA que contenga como antígeno diagnóstico la mezcla de las dos proteínas recombinantes y más inmunogénicas del virus, p24 y gp51.

En comparación con el DIDA, la prueba de ELISA provee resultados objetivos, tiene la ventaja de ser altamente sensible y específica, tener alta reproducibilidad, como así también es una prueba rápida y sencilla de realizar (Simad C. y col., 2000; Gonzalez E.T. y col., 2001).

#### **I.A.6 CONTROL Y ERRADICACIÓN**

En varios países europeos se han llevado a cabo programas de control y erradicación que establecen las pruebas diagnósticas, su frecuencia y eliminación de los reactores. Estos planes tienen especial éxito en países con baja prevalencia o donde el estado compensa la eliminación de los reactores (Merck 2009). En nuestro país se ha implementado un sistema voluntario de erradicación de la LEB

(resolución N° 337/94 SENASA), que establece las normas y procedimientos para la certificación de establecimientos libres de leucosis (SENASA 2006). En primera instancia se debe hacer el diagnóstico de la situación inicial por medio de DIDA a todos los animales del rodeo mayores de 6 meses. De esta manera se puede clasificar el rodeo en "libre" o "infectado". Para mantener a los rodeos en la categoría "libre" se deberán realizar seguimientos serológicos anuales a modo de recertificación y mantener un estricto control en las medidas higiénico-sanitarias cuando conviven animales positivos y negativos a la enfermedad y control sobre ingreso de animales para minimizar los riesgos de contagio (De la Sota M., 2004).

En el caso de pertenecer a la categoría infectado, los rodeos son clasificados según la prevalencia de infección en:

- 1- Clase A: rodeos con 1 a 15 % de reactores.
- 2- Clase B: rodeos con 15 a 30 % de reactores.
- 3- Clase C: rodeos con mayor de 30 % de reactores.

La metodología a seguir para el control y la erradicación dependerá de: la edad de los animales afectados, el porcentaje de animales infectados en el rodeo, la infraestructura del establecimiento, las prácticas de manejo y las posibilidades económicas del productor (De la Sota, 2004).

Existen varios métodos de control y erradicación para esta enfermedad. Todos surgen de la interrelación entre el profundo entendimiento de la patogenia de la enfermedad, el contexto socioeconómico y el compromiso estatal y privado.

Para implementar un plan de control y erradicación para la LEB hay varios factores a tener en cuenta. La erradicación se puede llevar a delante poniendo en prácticas 3 estrategias básicas que van de la más drástica, eliminación del animal positivo a VLB, pasando a las menos radicales como segregación o manejo de los animales positivos a VLB (Rodríguez y col. 2011).

La primera, eliminación de los animales positivos, es una estrategia, que a pesar de ser muy efectiva, como se comprobó en Europa Occidental (Deren y col., 2003; Acaite, 2007), tiene varias desventajas que la hacen inaplicable en países en vías de desarrollo o subdesarrollados con altas prevalencias (Nuotio y col. 2003). Una vez diagnosticados como animales positivos a VLB, ya sea por métodos directos (PCR) o indirectos (serología o signos clínicos) o combinación de algunos, se debe proceder a la inmediata remoción de los casos positivos con destino al sacrificio.

La alta prevalencia en países donde la gran limitante es económica, no es viable implementar planes de erradicación que contemplen una compensación monetaria estatal que subsidie la pérdida de animales reactivos. En nuestro país esta es una estrategia que podría implementarse en rodeos clase A, con prevalencia menor al 10%. Complementariamente a las estrictas medidas de manejo higiénico-sanitarias, se debe realizar diagnóstico serológico cada 3 meses para eliminar a los reactivos. Una vez que todos los animales del rodeo tengan dos diagnósticos negativos consecutivos, el establecimiento podrá declararse libre de leucosis, a partir de lo cual se realizará un control anual. Todos los bovinos que se incorporen deben ser serológicamente negativos y se mantendrán aislados del resto durante 3 meses. Si al cabo de este período se confirman serológicamente negativos podrán incorporarse al rodeo (De la Sota M., 2004).

Otra desventaja a tener en cuenta es la pérdida del potencial genético y reproductivo de los animales eliminados. Sin embargo, esta estrategia puede ser considerada en situación de cabaña de pedigrí que tienen un elevado potencial genético, así como para atender las exigencias internacionales para la exportación a países libres de LEB (Rodríguez y col. 2011). Finalmente para que esta estrategia tenga éxito el compromiso estatal debe ser fuerte y sostenido en el tiempo, apoyado en el subsidio, ya que de lo contrario estas políticas fallan como se ha podido comprobar en países con USA, Canadá, Japón y en nuestro país (Rodríguez y col. 2011).

La segunda estrategia de control implica la segregación de animales positivos a LEB con el objetivo de reducir los costos del sacrificio de los animales infectados (Ruppanner y col.1983). La correcta clasificación de los animales infectados y animales sanos, es clave para esta estrategia, ya que se deben implementar el confinamiento en rebaños de animales seropositivos y seronegativos, estrictamente separados. Debe tenerse en cuenta el manejo por separado y de forma independiente y secuencial, de los 2 rodeos, con énfasis en la correcta desinfección de los equipos y herramientas no descartables de uso común. La ventaja de esta estrategia es la reducción del costo que implica la eliminación de reactores y reposición de animales negativos. A pesar que solo una rigurosa implementación asegura el éxito, existen ejemplos de saneamiento con reducción de prevalencia a erradicación de la enfermedad (Shettigara y col., 1986; Shettigara y col., 1989). La gran desventaja es el desafío que supone el manejo de dos rodeos en simultáneo; la necesidad de disponer de mayor espacio; que debe hacer frente al constante riesgo de reintroducción de animales infectados y el tiempo que puede insumir llegar a los objetivos impuestos, siendo mucho más lenta que la primer estrategia de eliminación

de reactores. Las estrategias de eliminación y segregación de animales infectados requieren la correcta y periódica identificación de los animales infectados. El diagnóstico pasó por varias etapas en función de las pruebas disponibles y aprobadas por los organismos de regulación oficial. Actualmente se utilizan la técnica de AGID o ELISA de rutina como pruebas oficiales para programas nacionales o para el comercio internacional (OIE, 2008; resolución N° 337/94 SENASA).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia de anticuerpos anti-VLB no implica necesariamente que los animales estén infectados y viceversa. Es el caso de resultados falsos negativos durante el periodo de latencia de la LEB, así como falsos positivos en aquellos terneros no infectados que hayan calostrado y tengan anticuerpos anti-VLB debido a los anticuerpos maternos (OIE, 2008; Lassauzet y col., 1991). En este último caso el diagnóstico por PCR es una alternativa al diagnóstico serológico (Jimba y col., 2010). Se ha determinado que la carga proviral (CPV) en sangre periférica es un marcador predictivo de riesgo de transmisión de la LEB. Por lo tanto, la CPV se puede utilizar como criterio para discriminar y eliminar o segregar animales altamente infecciosos (Juliarena y col., 2007). Gutierrez y col., propusieron que el ELISA-p24 recombinante que desarrollaron tiene correlación con la CPV, siendo esta prueba diagnóstica una herramienta muy útil para implementar en este método de control por segregación de animales positivos a LEB (Gutierrez y col. 2012).

Juliarena y col. 2007 proponen una variante de la estrategia de segregación y eliminación aplicando los criterios de selección genética. Como primer medida se clasifican a los animales infectados en 2 perfiles de infección: 1) el perfil

caracterizado por tener alta carga proviral (ACP) y altos títulos de anticuerpos contra el VLB, convirtiéndolos en animales con mayor potencial infeccioso y 2) el perfil caracterizado por presentar una baja carga proviral (BCP) y bajos títulos de anticuerpos, que representan a los animales con menor riesgo de transmitir la enfermedad. El estudio de los factores determinantes de un perfil u otro, indica que hay asociación altamente significativa entre estos perfiles de infección y el polimorfismo del gen BoLA DRB3.2. La selección genética representa una excelente herramienta para aplicar cuando se decide comenzar un emprendimiento tambero. La aplicación de la selección genética en un rodeo establecido se basa en la elección de animales de reemplazo que lleven el marcador de resistencia. En la Fase 1 se reemplazan animales con perfil ACP por animales portadores del alelo de resistencia y en la Fase 2 se reemplazan a los animales de perfil BCP que aún queden, por animales libres de VLB. La posibilidad que los animales libres se infecten por contacto con animales BCP es muy remota si se tiene en cuenta las medidas higiénico-sanitarias básicas de manejo. Una vez que hayan dado dos exámenes serológicos negativos consecutivos con intervalo de 2 o 3 meses, el rodeo es declarado libre de infección por el VLB (Juliarena M.A., 2008).

La estrategia que propone al manejo como única herramienta de gestión correctiva para saneamiento de un rodeo, tiene como objetivo limitar la transferencia de células infectadas con VLB presentes en la sangre, la leche, secreciones, jeringas o instrumentos quirúrgicos. Las siguientes son prácticas veterinarias básicas y esenciales para evitar la transmisión iatrogénica del agente e indispensables para implementar un plan de saneamiento basado exclusivamente en el manejo : (I) Eliminar la práctica de reutilización de agujas y jeringas durante la vacunación y/o

protocolos terapéuticos; (II) Utilización de guantes descartables en las maniobras obstétricas; (III) utilización de material descartable (o al menos la limpieza y desinfección o esterilización del material reutilizable e instrumentos quirúrgicos) en maniobras que impliquen sangrado como descorne, tatuajes, cauterización, castración o colocación de caravana; (IV) utilizar calostro o leche entera de vacas no infectadas para alimentación en guacheras, utilización de calostro pasteurizado de vacas infectadas con BLV o sustituto de la leche; (V) la eliminación de insectos, particularmente en las zonas rurales densamente pobladas (zonas de ordeño, graneros) con el fin de minimizar la transmisión potencial entre animales a través de vectores; (VII) realizar inseminación natural y / o artificial y transferencia de embriones a partir de animales libres de VLB. **(Cuadro nº I.A.1)**

ESTRATEGIA	BASES DEL PROGRAMA DE CONTROL	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>ELIMINACION DE REACTORES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Correcta identificación de animales reactores a VLB y sacrificio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método de eficacia comprobada</li> <li>• Se requiere un mínimo de inversión en instalaciones</li> <li>• La condición de libre a VLB puede lograrse en un periodo de tiempo relativamente corto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se requiere políticas de compensación estatal para cumplir el objetivo</li> <li>• Requiere vigilancia permanente</li> <li>• Estrategia impracticable en función de los niveles iniciales de prevalencia y costos prohibitivos.</li> </ul>
<b>SEPARACIÓN DE REACTORES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detectar ganado reactor y no reactor a VLB y aislar en rebaños separados</li> <li>• Manejo por separado de Animales infectados y no Infectados en el mismo establecimiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No necesita reemplazo por sacrificio de reactores a VLB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidades estructurales y operativas para la estricta separación de animales reactores de no reactores</li> <li>• Aumenta los costos debido a la duplicación de instalaciones y equipamiento.</li> <li>• Requiere vigilancia</li> </ul>

			permanente <ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidad de compromiso a largo plazo para lograr los objetivos del programa</li> </ul>
<b>MANEJO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toma de medidas de bioseguridad y gestión para minimizar la exposición de los animales al VLB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rentable</li> <li>• No necesita reemplazo por sacrificio de reactores a VLB</li> <li>• Sólo requiere un mínimo de inversión en instalaciones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy laborioso</li> <li>• Requiere estricto apego a las rigurosas medidas implementadas</li> <li>• Necesidad de compromiso a largo plazo para lograr los objetivos del programa</li> <li>• Susceptible a factor humano y ambiental.</li> </ul>

**Cuadro nº I.A.1:** Cuadro sinóptico de las 3 estrategias de eliminación de reactores a VLB (adaptado a partir de Gurierrez y col., 2011)

Estas medidas deben ser apuntaladas con medidas de prevención del reingreso del agente al rodeo. Por lo tanto se debe evitar la introducción de animales infectados realizando pruebas diagnósticas y poniendo a los animales en cuarentena, implementar la separación de animales según edad y minimizar los movimientos de los rodeos. Utilizar jaulas individuales para terneros recién nacidos y limitar el acceso a los visitantes del exterior.

Las ventajas de la estrategia de saneamiento por manejo es la rentabilidad, no hay descapitalización por eliminación del ganado, no se requiere inversión en instalaciones ni en diagnóstico periódico de los animales.

La gran desventaja radica en que este es un programa muy laborioso y supeditado al medio ambiente y variables humanas. Por esto el compromiso con el programa debe tomarse a largo plazo y ser estrictos en su aplicación.

### I.A.7 INMUNOPROFILAXIS

La transferencia pasiva de la inmunidad en la LEB está dada por los anticuerpos maternos que adquieren los terneros a través del calostro de madres portadoras del virus. Estos anticuerpos son predominantemente anti-gp51 y brindaría la protección durante los primeros meses de vida desempeñando la función de primera barrera contra la infección (Mammerickx M., 1980).

En la década de los 80 se investigó el desarrollo de vacunas inactivadas a partir de líneas celulares persistentemente infectadas. Estas vacunas inducen una fuerte respuesta humoral neutralizante que frente a desafíos con altas dosis no protegían a los animales vacunados (Miller y col., 1983; Fukuyama y col., 1993). En la misma época se enfocaron esfuerzos en desarrollar vacunas a base de extractos celulares de tumores de animales infectados con VLB con las que tampoco se logró protección y tenían el riesgo adicional de ser potencialmente infectantes (Gutierrez y col., 2011). También se investigaron vacunas a subunidades, las proteínas inmunogénicas purificadas utilizadas fueron gp51 y p24, con y sin adyuvante. Estas vacunas solo dan respuesta humoral que resultó insuficiente para lograr protección (Onuma y col., 1984; Burkhardt y col., 1989; Merza y col., 1991).

El vector Virus vaccinia recombinante (VVR) se utilizó como vehículo para la inmunización contra BLV en varias experiencias. En un ensayo con VVR que solo incluía el gen para la proteína gp51 no se generó respuesta inmune ni protección contra VLB ni en ovejas, ni conejos (Portetelle y col. 1991; Kumar y col. 1990). Sin embargo el VVR que contiene el gen *env* completo (VVR-*env*) que codifica tanto la glicoproteína gp51 como gp30 produce una fuerte respuesta humoral neutralizante

en conejos y ovejas (Portetelle y col., 1991; Gatei y col., 1993; Kumar y col., 1990). Por el contrario en experiencia similares empleando VVR-*env*, no se detectaron anticuerpos neutralizantes específicos y sólo confirió una protección parcial en ovejas después del desafío (Ohishi y col., 1991). Igualmente en este y otros trabajos se redujo la carga proviral de VLB en los animales vacunados, efecto relacionado con una respuesta inmune eficiente mediada por linfocitos T colaboradores Tipo1 y citotóxicos. Desafortunadamente estas vacunas a VVR-*env* como también vacunas que contienen tanto los genes *env* como *pol* y *gag*, no dieron resultados satisfactorios en bovino (Gutierrez y col., 2011; Ohishi y col., 1992).

Se ensayaron asimismo, vacunas basadas en péptidos sintéticos, monovalentes, polivalentes, con o sin adyuvantes. Algunas produjeron buenas respuestas humorales y celulares, pero todas fallaron en dar protección (Callebaut y col., 1994; Ohishi y col., 1992; Mateo y col., 2001). Según Gutierrez y col., 2011, las vacunas basadas en péptidos sintéticos mostraron bajo rendimiento, posiblemente debido a la pérdida de la estructura estereoquímica nativa de los epítopes. Asimismo las vacunas a ADN no dieron resultados satisfactorios ya que no generaron protección inmune alguna (Usui y col., 2003; Van den Broeke y col., 2010).

Todas las vacunas mencionadas no lograron inducir en los animales una respuesta protectora, debido a una estimulación insuficiente o la generación de una respuesta inmune de corta duración. A pesar de los riesgos de reversión y la integración permanente del genoma viral, se han investigado vacunas atenuadas mutantes, deletadas o retrovirus híbridos en distintos modelos de animales de laboratorio (Willems y col., 1993; Boris-Lawrie y col., 1995; Boris-Lawrie y col., 1997; Florins y col. 2007a). Estas vacunas no fueron exitosas en inducir una respuesta inmune

protectora. Para este fin los esfuerzos en el desarrollo de vacunas se centraron en el diseño de provirus atenuados para una infección competitiva, basándose en la conservación de los factores virales como fuente permanente de estímulo del sistema inmune.

También se crearon virus híbridos que contenían los genes *gag-pol* y *env* de VLB y los genes regulatorios del retrovirus simple, el virus de la necrosis esplénica, el cual pudo replicar *in vitro* y fue infeccioso e inmunogénico en ratas y conejos. (Boris-Lawrie y Temin, 1995 ; Boris-Lawrie y col., 1997). También se trabajó en virus del VLB deletados a los que se le sustrajeron genes no relacionados con la infección pero necesarios para la correcta replicación (Willems y col., 1993; Willems y col., 2000; Willems y col., 1997).

Las cepas vacunales mutantes que dieron buenos resultados preliminares son pBLV6073 y pBLVDX, ya que fueron capaces de ser infectantes, reproducirse a niveles bajos y suscitar una respuesta inmune semejante al VLB de campo. Estas vacunas confirieron protección a largo plazo en ovinos y bovinos frente al desafío con la cepa wild type de LEB (Kerkhofs y col., 2000; Reichert y col., 2000). Algunos de los objetivos de este tipo de vacuna es lograr que interfiera con el ciclo viral y propagación del virus de campo en rebaños de vacas infectadas, que se reduzca el número de células VLB positivas en leche para disminuir la eficiencia de la transmisión del virus a los terneros. Estos terneros estarían protegidos por la transferencia pasiva de la inmunidad. Actualmente se llevan a cabo ensayos de desafío en animales estabulados en los cuales se pudo constatar en forma preliminar que la cepa vacunal no fue transmitida a la descendencia (Trono K., 2013). Una desventaja que supone este tipo de vacunas es la reversión a la

patogenicidad. Conceptualmente, esta reversión sólo sería posible mediante recombinación con otra cepa de VLB. Dado que en áreas endémicas la gran mayoría de los bovinos están infectados, el riesgo es que una fracción de los animales vacunados se infecte con un virus de tipo salvaje, proceso que ocurre frecuentemente. Hasta ahora no se determinaron recombinaciones de virus de campo y cepas atenuadas, aún en condiciones forzadas (Kerkhofs y col.,2000; Reichert y col., 2000). Existen ensayos en curso con el objetivo de evaluar la eficacia y seguridad de esta estrategia de infección competitiva en condiciones reales a campo. Hasta al momento no existen vacunas comerciales contra VLB.

## **I.B FUNDAMENTOS DE LA ELECCIÓN DEL TEMA.**

En la Leucosis Enzotica Bovina, más del 60% de los animales infectados se transforman en portadores asintomáticos de por vida y solo podrán ser detectados a través del empleo de pruebas inmunodiagnósticas indirectas y/o técnicas más sofisticadas y onerosas como las técnicas moleculares (PCR).

Para demostrar la presencia de anticuerpos específicos, la utilización en conjunto de las dos proteínas más inmunogénicas del virus de la LEB (p24 y gp51) como antígeno de una prueba inmunoenzimática como el ELISA indirecto sería de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad. El empleo de técnicas de producción de proteínas recombinantes son, en la actualidad, de gran utilidad para desarrollar técnicas que cuenten con antígenos diagnósticos de mayor calidad. Estos antígenos podrían incrementar las características operativas de las pruebas, sensibilidad y especificidad, las cuales al ser incluidas en una secuencia diagnóstica, podrían ser empleadas para estrategias de control y erradicación de la enfermedad.

Unas de las pruebas aprobadas por la OIE y el SENASA para el diagnóstico de LEB es el ELISA indirecto. Los ELISAs aprobados detectan únicamente anticuerpos anti gp51.

La producción de las proteínas antigénicas p24 y gp51 por métodos convencionales a partir de cultivo celular de FLK persistentemente infectadas con VLB es laboriosa, de alto costo y de bajo rendimiento. Los antígenos resultantes son poco purificados e insuficiente en cantidad, si se los compara con las nuevas tecnologías de ADN recombinante.

En este estudio, la inclusión de la proteína p24 como antígeno diagnóstico en una prueba de ELISA, se fundamenta en las publicaciones que sustentan el desarrollo de la respuesta inmune contra la proteína p24 del VLB (Gauthier y col., 1982; Molly y col., 1990; Kittelberger y col., 1999; Gonzalez y col., 2001), donde los anticuerpos anti-p24 no serían detectados por los métodos oficiales de diagnóstico de rutina como el DIDA o kits comerciales de ELISA. Se ha reportado que en animales experimental y naturalmente infectados con el VLB la respuesta humoral se caracteriza por la aparición temprana de anticuerpos anti-gp51 (Bex y col., 1979; Mammerickx y col., 1980). Sin embargo y en contraposición a lo expresado precedentemente, hay autores que determinaron en animales experimentalmente infectados, la respuesta humoral contra la proteína p24 antecede a la gp51 (Gauthier y col., 1982; Molly y col., 1990; Gonzalez y col., 2001). Otras experiencias comprobaron que la respuesta anti-p24 en animales naturalmente infectados desarrolla altos títulos y en ocasiones es exclusiva (Kittelberger y col., 1999) y persistentes en el tiempo.

Contar con p24 recombinante para la detección de anticuerpos anti-p24 podría ser de especial utilidad, como antígeno diagnóstico para una prueba confirmatoria futura, en campañas de erradicación avanzadas donde es más probable la aparición de reactores falsos positivos a pruebas que utilicen solo la gp51 como antígeno diagnóstico (Kittelberger y col., 1999).

Otra utilidad está asociada a que muchas de las vacunas que se han probado a la fecha, están basadas en la utilización de la glicoproteína gp51 como único inmunógeno, por lo tanto contar con pruebas específicas que detecten anticuerpos

anti-24 constituirían una herramienta capaz de discriminar entre animales infectados y vacunados (Daniel R.C.W., 1993; Kittelberger R., 1999; Kerkhofs P., 2000).

La prueba de ELISA indirecto, ampliamente utilizada para el diagnóstico serológico, representa una buena alternativa a la prueba de referencia y oficial como lo es el DIDA, no solo por su mejores valores de performance intrínsecos (sensibilidad y especificidad) sino también rapidez y objetividad. Hasta ahora no se ha descrito un ELISA indirecto que incluya las 2 proteínas inmunogénicas mas importantes (gp51 y p24).

### **I.C. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

La producción por métodos recombinantes de las proteínas más inmunogénicas del VLB, p24 y gp51, y su utilización en forma conjunta como antígeno diagnóstico nos permite desarrollar una prueba de ELISA indirecto que es capaz de detectar eficientemente los anticuerpos específicos contra la LEB.

### **I.D. OBJETIVOS.**

#### **I.D.a** Objetivo general.

- 1) Producir las proteínas inmunogénicas del VLB, p24 y gp51, en forma recombinante empleando una tecnología biomolecular adecuada para cada una de ellas.
- 2) Desarrollar un ELISA indirecto que contenga ambas proteínas, para ser utilizado en el diagnóstico de la enfermedad.

#### **I.D.b** Objetivos específicos.

##### *Producción de proteína recombinante p24*

Emplear una tecnología biomolecular eficiente para producir la proteína recombinante p24 para su aplicación al diagnóstico de la enfermedad.

- 1-Sistema de baculovirus.

- Clonar el gen completo que codifica para la proteína p24 y expresarlo en células de insectos infectadas con el baculovirus recombinante.
- Producir y purificar la proteína p24 recombinante y estudiar *in vitro* su comportamiento antigénico por la prueba de western blot.

## 2-Sistema bacteriano.

- Clonar el gen completo que codifica para la proteína p24 y expresarlo en el sistema bacteriano de *E.coli*.
- Producir y purificar la proteína p24 recombinante y estudiar *in vitro* su comportamiento antigénico por la prueba de western blot.

## *Producción de la glicoproteína recombinante gp51*

Emplear una tecnología biomolecular eficiente para producir la proteína recombinante gp51 para su aplicación al diagnóstico de la enfermedad.

### 1- Sistema de baculovirus.

- Clonar el gen completo que codifica para la glicoproteína gp51 y expresarlo en células de insectos infectadas con el baculovirus recombinante.
- Producir y purificar la glicoproteína gp51 recombinante y estudio *in vitro* de su comportamiento antigénico por la prueba de western blot.

***Prueba diagnóstica inmunoenzimática***

Desarrollar y puesta a punto de una prueba de ELISA indirecto que contenga ambas proteínas recombinantes, gp51 y p24.

## **CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DEL VLB**

#### **II.A CÉLULAS Y VIRUS.**

Para la extracción del gen de interés se utilizó la línea celular FLK-VLB (fetal lumb kidney) persistentemente infectada con virus de la leucosis bovina (VLB) cedida por National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japón, las que fueron mantenidas en medio MEM suplementado (ver Anexo I 17).

Para la expresión de la proteína de interés se emplearon líneas celulares de insectos, *Spodoptera frugiperda Sf9* y *Trichoplusia ni* High Five, ambas mantenidas en medio de cultivo TC-100 (Gibco BRL, USA) con el agregado de penicilina-estreptomicina y 10% de SFB (Suero Fetal Bovino).

#### **II.B PRODUCCION DE LA PROTEINA p24 DEL VLB**

##### **II.B.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p24 DEL VLB EN EL SISTEMA BACTERIANO.**

##### **II.B.1a EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE CÉLULAS FLK-VLB Y OBTENCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA p24 POR LA TÉCNICA DE PCR.**

La extracción de ADN genómico de las células FLK-VLB se realizó con el *kit* comercial *Wizard Plus Miniprep DNA Purification System* (Promega, USA). Para su inserción en el vector pQE-30 *QIA Express vector*<sup>®</sup>, el gen fue amplificado por la

técnica de PCR utilizando un par de primers diseñados de acuerdo a la secuencia de referencia (Sagata y col., 1985). El primer Forp24 5'–GGC GGA TCC ATG CCA ATC ATA TCT GAA-3' incluye el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI (secuencia subrayada). El primer Revp24 5'- GGC AAG CTT TAG AGA AGT GCA GGC TGT- '3 incluye el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind*III (secuencia subrayada). Ambos sitios de reconocimiento de enzimas se encuentran en el área de múltiple clonado del vector pQE-30.

Para la realización de la técnica de PCR se preparó una solución madre de un volumen final de 50 µl, conteniendo agua destilada estéril; 5 µl de buffer 10X ; 3 µl Cl<sub>2</sub>Mg 25 mM; 1,25 µl dNTP's (Mix); 0.5 µl 10 mM de cada uno de los primers; la polimerasa empleada fue la *Phusion*® *High-Fidelity* (Finnzymes) 0.5 µl y se utilizó como molde 1 µl de la muestra de DNA genómico. Finalmente se siguieron las siguientes condiciones de ciclado: una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 50°C y 2 minuto a 72°C, correspondientes a la desnaturalización, hibridización y extensión de los primers respectivamente; y por último, 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

La corrida electroforética del producto de la PCR (pPCR), se realizó en gel de agarosa al 1.3% (ver anexo I 1 y 2), se tiñó con bromuro de etidio (ver anexo I, 3) y a continuación se lo colocó en el transiluminador UV para la visualización de las bandas específicas.

### **II.B.1b** Construcción del vector pQE-30 *QIA Express System de QIAGEN*®.

Se utilizó el vector pQE-30 *QIA Express vector*® (*QIAGEN*) que expresa las proteínas marcadas con 6xHis en *E. coli*. El pQE se basa en el transcripción del promotor T5

dos de bajo número de copias, sus características más relevantes se detallan a continuación (**Fig.: II.B.1**).



**Fig.: II.B.1** Esquema del vector pQE-30 QIA Express vector® (QIAGEN) y sus características.

### II.B.1c Clonado del gen de la proteína p24 en el vector pQE-30 QIA Express vector®

Se realizó la doble digestión del vector pQE-30 QIA Express vector®, 100 ng (5  $\mu$ l) del plásmido fueron digeridos simultáneamente con 1UI (4ul) *Hind*III (Promega USA.), 1UI (4ul) *Bam*HI (Promega USA), 5  $\mu$ l de Buffer E (10X), 2  $\mu$ l de seroalbúmina bovina (BSA 100X) y 30  $\mu$ l de agua tridestilada esteril, para un volumen final de reacción de 50  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 37°C toda la noche.

El producto de digestión denominado pQE30-24-*Bam*HI/*Hind*III, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,3%, teñido con una solución de bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV.

Paralelamente, una vez purificado el pPCR-p24, se le realizó la doble digestión para lo cual se tomaron 100 ng (4 µl) del producto, que fueron digeridos simultáneamente con 1UI (4ul) *Hind*III (Promega USA), 1UI (4ul) *Bam*HI (Promega USA), 5 µl de Buffer E (10X) y 2 µl de seroalbúmina bovina (BSA 100X) para un volumen final de reacción de 50 µl. La mezcla se incubó a 37°C toda la noche.

A partir del gel de agarosa se realizó la purificación individual de los productos de la doble digestión (pQE-30 *Bam*HI/*Hind*III, pPCR-p24 *Bam*HI/*Hind*III) utilizando el *kit* comercial *Wizard SV Gel and pPCR Clean Up system* (Promega, USA).

#### **II.B.1d** Ligación del vector pQE-30 *Bam*HI/*Hind*III y el pPCR-p24 *Bam*HI/*Hind*III.

El cálculo de los reactivos para la reacción de ligación se realizó según lo sugiere Promega, (USA) en la hoja técnica de la Ligasa T4.

(Concentración estimada del vector en µg/µl) x (kb del inserto) x (Relación inserto:vector)

( kb del vector)

Para la reacción de ligación se utilizó 0,5 UI la enzima T4 ligasa (Promega, USA), que se combinaron con 75 ng de inserto y 25 ng de vector, manteniéndose una relación inserto/vector de 3:1. La reacción se realizó a 15°C durante 10 hs.

**II.B.1e** Transformación de *E. coli* M15 [pREP4] con el producto de la ligación pQE-30-p24.

Con el producto de ligación denominado pQE-30-p24, se transformaron células competentes *E.coli* M15 [pREP4] (QIAGEN, USA) (ver anexo II, 3). Brevemente se tomaron 100 µl de un cultivo fresco de *E.coli* M15 [pREP4] competentes en medio LB (Luria Bertani- Difco, BD Biosciences, Francia) con kanamicina (25 µg/ml) y se añadieron 5 µl del producto de ligación pQE-30-p24. La mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos. Se realizó el shock térmico a 42°C durante 90 segundos y por último se mantuvieron 5 minutos en hielo. A continuación se procedió a agregar 900 µl de medio SOC (ver anexo I. 4) y se incubó en agitación a 37°C por 90 minutos. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se descartaron 600 µl del sobrenadante y se sembraron 300 µl de la transformación en una placa de medio LB con kanamicina (25 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml), se incubó toda una noche a 37°C.

A continuación se seleccionaron las colonias blancas resistentes a kanamicina y se corroboró la presencia del gen de interés por la técnica de PCR utilizando los primers específicos mencionados en el punto **II.B.1a**. Las colonias positivas a PCR se conservaron en glicerol a -70°C.

**II.B.1f** Secuenciación

La construcción del vector pQE-30-p24, correspondiente a la colonia nº 2, se envió para realizar su secuenciación, utilizando los primers comerciales del vector pQ30 (indicados en el manual *The QIAexpressionist, QIAGEN 2003*) y confirmar la

correcta inserción del producto de amplificación en marco de lectura. La secuencia obtenida se analizó en el programa BLAST.

### **II.B.1g EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE LA p24 RECOMBINANTE POR LA TÉCNICA DE SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.**

#### **II.B.1h Cultivo de expresión a pequeña escala**

Se realizó un repique de la colonia nº 2 en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). El cultivo se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche. Luego, 2,5 ml del inóculo fue incubado a 37°C en agitación a 190 rpm durante 2 hs en un Erlenmeyer de 125 cm<sup>3</sup> conteniendo 50 ml de LB / ampicilina (100 µg/ml) / kanamicina (25 µg/ml). Cuando la Densidad Óptica (DO) alcanzó aproximadamente un valor de 0,6 se procedió a la inducción con IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside-SIGMA, USA) a una concentración final de 1 mM. El cultivo fue incubado a 37°C en agitación a 150 rpm durante 4 hs. Finalmente, la totalidad del cultivo fue centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos.

#### **II.B.1i Análisis por SDS-PAGE.**

Una alícuota del sobrenadante y células obtenidas del cultivo inducido de *E.coli* M15 [pREP4] fueron resuspendidas en igual volumen de *buffer* de muestra en condiciones de reducción por la presencia de 2-Me (ver anexo I 5). Se realizó la técnica de SDS-PAGE y Western blot. Brevemente, las proteínas fueron desnaturalizadas y reducidas por calor mediante el calentamiento de las muestras a 95 °C por 5 minutos. La preparación del gel de siembra y de resolución se realizaron

de acuerdo al anexo II 4. Se sembraron 20 µl de muestra y 5 µl de marcador de peso molecular preteñido (Page Ruler Fermentas SM 0671). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 1 hora. La preparación del *buffer* tris-glicina utilizado para la electroforesis se detalla en el anexo I 6. Se destinó un gel para la electrotransferencia y otro para tinción con azul brillante de Coomasie (ver anexo I 7 y 8).

### **II.B.1j** Análisis por Western blot.

Para la electrotransferencia se utilizó una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) (Bio-Rad. USA). de 22 µm previamente tratada con metanol. La transferencia se realizó a 15 V durante 30 minutos en un *TransBlot-SD Semi-Dry transfer cell* (Bio-Rad. USA). El *buffer* utilizado para la electrotransferencia se detalla en el anexo I 9. Una vez realizada la electrotransferencia, la membrana fue bloqueada toda una noche a 4°C en solución de bloqueo (ver anexo I 10). La membrana de nitrocelulosa fue lavada por 5 minutos 3 veces en solución de lavado (ver anexo I 11). Como suero primario positivo se utilizó al suero control E4 (Veterinary Laboratorios Agency. New Haw, Adelestope Surrey. UK) y como suero control negativo se utilizó un pool de sueros negativos control de la seroteca del laboratorio de Virología. La membrana se incubó con los sueros primarios diluidos 1/100 en solución de bloqueo por 1 hora a 37°C en suave agitación. Una vez finalizada la incubación la membrana se lavó por 5 minutos 3 veces en solución de lavado en agitación suave. Luego se incubó 1 hora a 37°C con un suero conjugado anti-IgG de bovino hecho en cabra marcado con peroxidasa (SIGMA, USA) diluido 1/5000 en solución de bloqueo. Posteriormente se procedió al lavado y se reveló con 20 µl de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato y con 30 mg de cromógeno

diaminobencidina (DAB, WAKOPURE Chemical Industries, Japón) en 100 ml de PBS.

## **II.B.1k PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA P24 RECOMBINANTES EN EL SISTEMA BACTERIANO.**

### **II.B.1I Cultivo de expresión a gran escala**

Se realizó un repique de la colonia nº2 en 50 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). El cultivo se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche. Luego, 20 ml del inóculo fue incubado a 37°C en agitación a 190 rpm durante 2 hs en un Erlenmeyer de 1000 cm<sup>3</sup> conteniendo 400 ml de LB / ampicilina (100 µg/ml) / kanamicina (25 µg/ml). Cuando la densidad óptica (DO) alcanzó aproximadamente un valor de 0,6 se procedió a la inducción con IPTG (SIGMA, USA) a una concentración final de 1 mM. El cultivo fue incubado a 37°C en agitación a 150 rpm durante 4 hs. Finalmente, la totalidad del cultivo fue centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos.

Se tomaron muestras previo a la inducción, a los 90 minutos y 4 horas post inducción, así como del sobrenadante y del pellet de células bacterianas.

**II.B.1m** Purificación de la proteína p24 recombinante en condiciones nativas por cromatografía de PSEUDOafinidad por diferencia de pH.

El pellet celular (denominada fracción A) fue resuspendido en 3ml buffer PO<sub>4</sub> pH7 (anexo I 12) y se agregó lisozima a una concentración final del 1 mg/ml. La mezcla fue incubada 30 minutos a 37°C y posteriormente sonicada (6 series a 200-300 V de

una duración de 10 segundos cada una, con intervalos entre ellas de 10 segundos). El lisado obtenido se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Se guardaron muestras del sobrenadante (fracción C) y del pellet (fracción B), resuspendido en 1 ml de buffer PO<sub>4</sub> pH7, para su posterior análisis.

Con el sobrenadante obtenido se procedió a realizar la purificación en batch. Se realizó la absorción en 1 ml de 50% Ni-NTA agarosa (QIAGEN, USA) en un tubo Falcon de 15 ml. La mezcla fue incubada en agitación suave a 4°C durante 60 minutos. Este proceso de adsorción se repitió varias veces hasta completar el volumen obtenido de la fracción C. Una vez descartado el sobrenadante (fracción D), la resina NTA-Ni-p24 fue lavada 4 veces con 4 ml de buffer de lavado PO<sub>4</sub> pH7 (anexo I 12) y en cada caso el material fue recolectado en tubos individuales, el sobrenadante de lavado se denominó fracción E. Por último se efectuó el proceso de elusión. La primer elusión se realizó con 1 ml de buffer de elusión PO<sub>4</sub> pH6 (anexo I 13), se incubó 5 minuto invirtiendo suavemente el tubo y posterior se centrifugó a 5000 rpm 1 minuto. Este proceso se repitió dos veces más con buffer de elusión PO<sub>4</sub> pH5 y pH4 cada vez (anexo I 14 y 15 respectivamente). Con el buffer de elusión PO<sub>4</sub> pH4 se realizaron 2 lavados. En cada paso del proceso de elusión el material fue recolectado en tubos individuales. Las fracciones del proceso de purificación fue analizada por SDS-PAGE. La concentración de proteína en cada una de las fracciones recolectadas fue medida en un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (Bio-Rad, USA) a 280nm y comparado con patrón de seroalbumina de concentración conocida (ver anexo I 16).

## II.B.2 EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p24 DEL VLB

### II.B.2a EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE CÉLULAS FLK-VLB Y OBTENCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA p24 POR LA TÉCNICA DE PCR.

La extracción de ADN genómico de las células FLK-VLB se realizó con el *kit* comercial *Wizard Plus Miniprep DNA Purification System* (Promega, USA). El gen que codifica para la proteína p24 del VLB, de 642 pb, fue amplificado por la técnica de PCR utilizando un par de primers diseñados de acuerdo a la secuencia de referencia (Sagata y col., 1985), que para el clonado en el vector pENTR™ /D-TOPO® se incluyó, en el diseño del primer forward, la secuencia CACC necesaria para el clonado direccionado en el extremo 5'. Forp24', 5'-CAC CAT GCC AAT CAT ATC TGA A-3'. El primer reverse utilizado fue Revp24 5'- GGC AAG CTT TAG AGA AGT GCA GGC TGT- 3'

Para la realización de la técnica de PCR se preparó una solución madre de un volumen final de 50 µl, conteniendo agua destilada estéril; 5 µl de buffer 10X ; 3 µl Cl<sub>2</sub>Mg 25 mM; 1,25 µl dNTP's (Mix); 0.5 µl 10 mM de cada uno de los primers; la polimerasa empleada fue la *Phusion® High-Fidelity* (Finnzymes) 0.5 µl y se utilizó como molde 1 µl de la muestra de DNA genómico. Finalmente se siguieron las

siguientes condiciones de ciclado: una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C, correspondientes a la desnaturalización, hibridación y extensión de los primers respectivamente; y por último, 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

La corrida electroforética del producto de la PCR, se realizó en gel de agarosa al 1.3% (ver anexo I1), se tiñó con bromuro de etidio (ver anexo I, 3) y a continuación se lo colocó en el transiluminador UV para la visualización de las bandas específicas.

**II.B.2b** Construcción del vector pENTR™ /D TOPO® - p24 para el sistema *BaculoDirect™ GST Gateway®*.

La tecnología del sistema *Gateway®* para el sistema *BaculoDirect™ GST*, es un método basado en la propiedad que posee el sitio específico de recombinación del bacteriófago lambda, *attL1* y *attL2*, que permite un clonado direccionado, rápido y eficiente del producto de PCR en el vector de entrada para el sistema *Gateway®*. El vector de entrada elegido fue el pENTR™ /D-TOPO® que presenta las siguientes características **Fig.: II.B.2**



Fig.: II.B.2: esquema del vector pENTR™ /D-TOPO® y sus características del pENTR™ /D-TOPO®

El ADN lineal del *BaculoDirect™ GST* contiene sitios de recombinación *attR1* y *attR2* ubicados en locus *polh*, junto con el gen de la timidina kinasa del virus herpes simplex (HSV1 tk) y el gen LacZ ubicados entre los sitios *attR*. Durante la reacción de recombinación *in vitro* los sitios *attR* del ADN viral se recombinan con los sitios *attL* del vector de transferencia pENTR™/D-TOPO® recombinante con la consiguiente integración del gen de interés en el genoma viral. El ADN viral recombinante es directamente transfectado a las células de insectos y los virus recombinantes son aislados por el uso de un nucleósido análogo selectivo, ganciclovir. El ganciclovir es fosforilado enzimáticamente por la HSV1 tk (presente solamente en los virus no recombinados) lo que resulta en la incorporación de este nucleósido en el ADN inhibiendo la replicación.

### II.B.2c Clonado del gen de la proteína p24 en el vector pENTR™ /D-TOPO®.

El producto de PCR-p24 que incluye la secuencia CACC para el clonado direccional en el vector (obtenido en el punto II.B.2a) se sometió a una electroforesis, en gel de agarosa al 1,3%, se coloreó con una solución de bromuro de etidio (ver anexo I 3) y se purificó del gel utilizando el *kit* comercial *Wizard SV Gel and pPCR Clean Up system* (Promega, USA). Una vez purificado el producto de PCR-p24 fue sometido a una nueva electroforesis y se estimó la concentración del producto en 50 ng/μl por comparación con marcador de 100pb (Promega, USA). El pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> posee una concentración estimada en 20 ng/μl. La proporción molar (**molar:ratio**) elegida para el clonado del producto de PCR en el vector fue de 5:1. Para tal fin se utilizaron 2 μl del producto de PCR, 1 μl del vector, 1 μl de solución salina (ver anexo I 18) y 2 μl de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 6 μl. La mezcla se incubó 20 minutos a temperatura ambiente.

**II.B.2d** Transformación en *E.coli* NEB 5-alpha *E. coli* competentes con la construcción pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-p24.

Con la construcción pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-p24 se transformaron células *E.coli* NEB 5-alpha *E. coli* competentes (New England. Biolab) (ver anexo II 3). Se inocularon 2 μl de la construcción pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-p24 en 100 μl de células, se mantuvieron en hielo durante 30 segundos, el shock térmico se realizó a 42°C durante 30 segundos y por último se mantuvieron 15 minutos en hielo. A continuación se agregó 250 μl de medio SOC (ver Anexo I 4) y se incubó en agitación 1 hora a 37°C. Posteriormente se sembraron 100 μl de la transformación en una placa de LB Difco (BD Biosciences, Francia) con kanamicina 50 μg/ml y se incubó toda la noche a 37°C.

Luego de la transformación e incubación en medio selectivo, se seleccionaron colonias blancas al azar y se realizó un subcultivo de 24 horas. Finalizada la incubación se realizó la extracción de ADN plasmídico con *kit* comercial *Wizard Plus Miniprep DNA* (Promega, USA). El ADN purificado se resuspendió en 20 µl de *buffer* TE pH8 (ver Anexo I 19).

A continuación se seleccionaron las colonias blancas resistentes a kanamicina y se corroboró la presencia del gen de interés por la técnica de PCR utilizando los primers específicos mencionados en el punto 1. Las colonias positivas a PCR se conservaron en glicerol a -70°C.

#### **II.B.2e** Secuenciación

La construcción del vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-p24, correspondiente a la colonia n° 2, se envió para realizar su secuenciación, utilizando los primer M13 y confirmar la correcta inserción del producto de amplificación de 647pb en marco de lectura. La secuencia obtenida se analizó en el programa BLAST.

#### **II.B.2f** Midiprep del vector pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup> -p24

Una vez realizada la secuenciación de la colonia elegida, se realizó una Midiprep con el objetivo de conseguir calidad y cantidad suficiente del vector para la generación del baculovirus recombinante. Se cultivaron 50 ml de la colonia n°2 por 24 hs a 37°C. El cultivo se centrifugó a 3750 rpm 1 minutos a 4°C. Una vez descartado el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 2ml de Solución I (anexo I 5a) se agregó 100 µl de cloroformo y se incubó a temperatura ambiente (TA) por 2 minutos. Finalizada la incubación se añadió 2 ml de la solución II (anexo I 5b), se mezcló por inversión suave del tubo y se incubó 5 minutos a TA.

Seguidamente se agregaron 2 ml de la solución III (anexo I 5c), se mezcló por inversión suave del tubo y se incubó 10 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm 10 minutos a 4°C. Se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionaron 6 ml de isopropanol. La mezcla se incubó 5 minutos a -20°C. Luego se procedió a centrifugar a 3750 rpm por 10 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante se resuspendió el pellet con 500 µl de buffer TE, se agregó 10 µl de ARNasa (1 µg/ml) (RNase A, Promega) y la mezcla se incubó a 55°C durante 20 minutos. Seguidamente se realizó una extracción con cloroformo, se agregó 550 µl de isopropanol, se mezcló y se incubó a -20°C por 5 minutos. Se centrifugó a 13.000 rpm por 2 minutos y una vez descartado el sobrenadante, el pellet fue lavado con etanol 70%. Finalmente se resuspendió en 150 µl de buffer TE y se sometió una muestra a una electroforesis en gel de agarosa al 1.3% y tinción con bromuro de etidio para su visualización en el transiluminador UV.

La concentración del pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup> -p24 así purificado se realizó por espectrofotometría

**II.B.2g** Generación del baculovirus recombinante mediante la reacción de recombinación entre el pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup> -p24 y el ADN lineal de baculovirus.

Como indica el fabricante, para la reacción de recombinación se mezcló 10 µl de ADN lineal de baculovirus con una concentración estimada de 300 ng/ul, 1 µl del pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup> -p24 y 5 µl de *Buffer TE pH8* para un volumen final de 16 µl. Posteriormente se agregaron 4 µl de la mezcla comercial de enzimas que cataliza la reacción de recombinación (*LR Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme Mix for BaculoDirect<sup>TM</sup>*) y se incubó entre 2 horas a 25°C.

**II.B.2h** Transfección de las células de insecto con el baculovirus recombinante y generación de stock viral P1.

En una placa de 6 pocillos (Greiner Bio-One BioScience, USA) se sembraron células *Sf 9* en una concentración aproximada de  $9 \times 10^5$  por pocilio con 2 ml de medio Sf900 II (*Gibco*). Se cultivaron a 27°C hasta obtener las células en fase logarítmica con una concentración aproximada de  $2 \times 10^6$  células/ml con un 90% de confluencia. De esta placa se tomaron aproximadamente  $8 \times 10^5$  células *Sf 9* y se sembraron en pocillos que contenían 2 ml de medio Grace's (*GIBCO*, Invitrogen, UK). Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la adherencia de las células.

Para la transfección se diluyó 8 µl de la reacción de recombinación que contiene el baculovirus recombinante obtenido en el punto II.3 3c, en 100 µl de medio Grace's no suplementado. Por otro lado se preparó el reactivo de transfección, *Cellfectin II Reagent*<sup>®</sup> (Invitrogen) que provee los liposomas, diluido 1/10 en medio Grace's no suplementado. Se tomaron 100 µl de cada preparación y la mezcla resultante se incubó entre 35 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación la totalidad de la mezcla baculovirus recombinante-liposomas se agregó a las células *Sf9* y se incubó 3 horas a 27°C. Posteriormente se removió la mezcla añadida a las células y se agregó 2 ml de medio de crecimiento Sf900 II 10% SFB. Las células así transfectadas se incubaron a 27°C durante 72 horas, tiempo en el que se realizaron observaciones periódicas para detectar signos de infección como pérdida de la forma celular con aumento del diámetro celular, desprendimiento parcial de las células, cese del crecimiento celular y por último muerte celular con presencia de solución de continuidad en la monocapa celular.

### **II.B.2i** Amplificación del stock viral P1 y generación de stock viral P2

El sobrenadante de la transfección (P1) posee un bajo título viral debido a los efectos negativos que tiene sobre las células la utilización ganciclovir como método selectivo. El título viral suele estar en el rango de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  de unidades formadoras de placa (ufp/ml) por lo que es conveniente realizar un segundo pasaje para obtener el stock viral P2 de mayor título.

Con este propósito se infectó una monocapa de células *Sf 9* ( $2 \times 10^6$  células/ml) con un 90% de confluencia.

Las células infectadas se incubaron 48 horas a 27°C. Al finalizar el tiempo de incubación se recolectó el sobrenadante, se rotuló como stock viral P2 y se conservó protegido de la luz a 4°C. También se conservaron las células para realizar un análisis preliminar de la producción de la proteína recombinante por SDS-PAGE.

### **II.B.2j** Ensayo en placa para aislar los clones del baculovirus recombinantes.

Los clones positivos de baculovirus recombinante para la proteína p24 fueron seleccionados mediante la técnica de ensayo en placa. Se cultivaron células *Sf 9* en placa de 6 pocillos con una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml, la cual fue incubada 20 minutos a 27°C. A partir del sobrenadante P2 del bácmido recombinante se prepararon 6 diluciones seriadas ( $10^{-3}$ - $10^{-8}$ ) en medio Grace's. El medio de crecimiento de la placa fue removido y se adicionaron 1 ml de cada dilución viral. La placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el inóculo fue removido de cada pocillo y reemplazado por 2 ml de medio de plaqueo (ver anexo I 21). La placa fue incubada entre 10 días a 27°C. Una vez constatados los signos característicos de las placas de lisis, estas fueron removidas con pipeta Pasteur,

colocadas cada una por separado en un tubo *ependorf* con 500  $\mu$ l de medio Grace's y centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos para eliminar los detritos celulares. Posteriormente con 100  $\mu$ l del sobrenadante obtenido se sembró una nueva placa de 6 pocillos con células *Sf 9* a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml, en medio de cultivo TC100 (USBiological, USA) y 10 % de SFB. La placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente y finalmente se agregó 3 ml de medio TC100 suplementado con 2% SFB. Al cabo de 72 horas de incubación a 27°C, se recolectó tanto el sobrenadante como las células de cada pocilio y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se conservaron a 4°C.

## **II.B.2k EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE LA P24 RECOMBINANTE POR LA TÉCNICA DE SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.**

### **II.B.2I Análisis por SDS-PAGE.**

Una alícuota del sobrenadante y células obtenidas del cultivo de células *Sf 9* infectado con stock viral P2 fueron lisadas en igual volumen de *buffer* de muestra en condiciones de reducción por la presencia de 2Me (ver anexo I 5). Se realizó la técnica de SDS-PAGE y Western blot. Brevemente, las proteínas fueron desnaturalizadas y reducidas por calor mediante el calentamiento de las muestras a 95 °C por 5 minutos. La preparación del gel de siembra y de resolución se realizaron de acuerdo al anexo II 4. Se sembraron 20  $\mu$ l de muestra y 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular preteñido (Page Ruler Fermentas SM 0671). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 1 hora. La preparación del *buffer* tris-glicina utilizado para la electroforesis se detalla en el anexo I 10. Se destinó un gel para la

electrotransferencia y otro para tinción con azul brillante de Coomasie (ver anexo I 7 y 8).

### **II.B.2m** Análisis por Western blot.

Para la electrotransferencia se utilizó una membrana de de PVDF (Bio-Rad. USA) de 22  $\mu\text{m}$  previamente tratada con metanol. La transferencia se realizó a 15 V durante 30 minutos en un *TransBlot-SD Semi-Dry transfer cell* (Bio-Rad. USA). El *buffer* utilizado para la electrotransferencia se detalla en el anexo I 9. Una vez realizada la electrotransferencia, la membrana fue bloqueada toda una noche a 4°C en solución de bloqueo (ver anexo I 10). La membrana de nitrocelulosa fue lavada por 5 minutos 3 veces en solución de lavado (ver anexo I 11). Como suero primario positivo se utilizó al suero control E4 (Veterinary Laboratories Agency. New Haw, Adelestone Surrey. UK) y como suero control negativo se utilizó un pool de sueros negativos control de la seroteca del laboratorio de virología. La membrana se incubó con los sueros primarios diluidos 1/100 en solución de bloqueo por 1 hora a 37°C en suave agitación. Una vez finalizada la incubación la membrana se lavó por 5 minutos 3 veces en solución de lavado en agitación suave. Luego se incubó 1 hora a 37°C con un suero conjugado anti-IgG de bovino hecho en cabra marcado con peroxidasa (SIGMA, USA) diluido 1/5000 en solución de bloqueo. Posteriormente se procedió al lavado y se reveló con 20  $\mu\text{l}$  de agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como sustrato y con 30 mg de cromógeno diaminobencidina (DAB, WAKOPURE Chemical Industries, Japón) en 100 ml de PBS.

## II.C. PRODUCCION DE LA PROTEINA gp51 DEL VLB

### II.C.1 EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE gp51 DEL VLB

Si bien un segmento de la secuencia de producción de proteína recombinante en este sistema fue ya descrita para el punto nº II.B.2 decidimos repetir el protocolo para un mejor comprensión de la secuencia total de producción llevada a cabo para esta proteína recombinante.

#### II.C.1a EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE CÉLULAS FLK-VLB Y OBTENCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA gp51 POR LA TÉCNICA DE PCR.

La extracción de ADN genómico de las células FLK-VLB se realizó con el *kit* comercial *Wizard Plus Miniprep DNA Purification System* (Promega, USA). Para su inserción en el vector de clonado pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>, el gen que codifica para la proteína gp51 del VLB, fue amplificado por la técnica de PCR utilizando un par de primers diseñados de acuerdo a la secuencia de referencia (Sagata y col., 1985). En el diseño del primer forward se incluyó la secuencia CACC necesaria para el clonado direccionado en el extremo 5': Forgp51 5'-CAC CAT GCC TAA AGA ACG A-3'. Primer reverse: Revgp51 5'- CCG GGT AGG AGG GGC GGA- 3'.

Para la realización de la técnica de PCR se preparó una solución madre de un volumen final de 50 µl, conteniendo agua destilada estéril; 5 µl de buffer 10X ; 3 µl Cl<sub>2</sub>Mg 25 mM; 1,25 µl dNTP's (Mix); 0.5 µl 10 mM de cada uno de los primers; la

polimerasa empleada fue la *Phusion® High-Fidelity* (Finnzymes) 0.5 µl y se utilizó como molde 1 µl de la muestra de DNA genómico. Finalmente se siguieron las siguientes condiciones de ciclado: una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 55°C y 2 minutos a 72°C, correspondientes a la desnaturalización, hibridización y extensión de los primers respectivamente; y por último, 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

La corrida electroforética se realizó en gel de agarosa al 1.3% (anexo I1), se tiñó con bromuro de etidio y a continuación se lo colocó en el transiluminador UV para la visualización de las bandas específicas.

#### **II.C.1b** CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pENTR™ /D TOPO® - gp51 PARA EL SISTEMA *BaculoDirect™ GST Gateway®*.

Las características del sistema *Gateway®* para el sistema *BaculoDirect™ GST* y el grafico esquemático se describen en el punto **II.B.2** para p24.

#### **II.C.1c** CLONADO DEL GEN DE LA PROTEÍNA gp51 EN EL VECTOR pENTR™ /D-TOPO®.

El producto de PCR-gp51 (pPCR-gp51) que incluye la secuencia CACC para el clonado direccional en el vector (obtenido en el punto II.C.1a) se sometió a una electroforesis, en gel de agarosa al 1,3%, se coloreó con una solución de bromuro de etidio (ver anexo I 3) y se purificó del gel utilizando el *kit* comercial *Wizard SV Gel and pPCR Clean Up system* (Promega, USA). Una vez purificado el producto de PCR-gp51 fue sometido a una nueva electroforesis y se estimó la concentración del producto por comparación con marcador de 100pb (Promega, USA). La proporción

molar (**molar:ratio**) elegida para el clonado del producto de PCR en el vector fue de 5:1, se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen.UK).

**II.C.1d** Transformación en *E. coli* NEB 5-alpha competentes con la construcción pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51.

Con la construcción pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 se transformaron células NEB 5-alpha *E. coli* competentes (New England Biolab) (ver anexo II 3). Se inocularon 2 µl de la construcción pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 en 100 µl de células, se mantuvieron en hielo durante 10-15 minutos, el shock térmico se realizó a 42°C durante 30 segundos y por último se mantuvieron 2 minutos en hielo. A continuación se agregó 250 µl de medio SOC (ver Anexo I 4) y se incubó en agitación 1 hora a 37°C. Posteriormente se sembraron 100 µl de la transformación en una placa de LB Difco (BD Biosciences, Francia) con kanamicina 50 µg/ml y se incubó toda la noche a 37°C. Luego de la transformación e incubación en medio selectivo, se seleccionaron 10 colonias blancas al azar y se realizó un subcultivo de 24 horas. Finalizada la incubación se realizó la extracción de ADN plasmídico con *kit* comercial *Wizard Plus Miniprep DNA* (Promega, USA). El ADN purificado se resuspendió en 20 µl de *buffer* TE pH8 (ver Anexo I 19). Para corroborar la presencia del gen de interés se realizó la técnica de PCR como en el punto **II.B.1a**.

La construcción del vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51, correspondiente a la colonia nº5, se envió para realizar su secuenciación, utilizando los primer M13 y confirmar la correcta inserción del producto de amplificación de 894pb en marco de lectura. La secuencia obtenida se analizó en el programa BLAST.

### **II.C.1e** Secuenciación

La construcción del vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51, correspondiente a la colonia n° 5, se envió para realizar su secuenciación, utilizando los primer M13 y confirmar la correcta inserción del producto de amplificación de 642pb en marco de lectura. La secuencia obtenida se analizó en el programa BLAST.

### **II.C.1f** Midiprep del vector pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup> -gp51.

Una vez comprobada la homología la secuencia del vector clonado se realizó una Midiprep de las colonias elegidas, con el objetivo de conseguir calidad y cantidad suficiente de vector para la generación del baculovirus recombinante. Se cultivaron 50 ml de la colonia n°5 por 24 hs a 37°C. El cultivo se centrifugó a 3750 rpm 1 minutos a 4°C. Una vez descartado el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 2ml de Solución I (anexo I 5a) se agregó 100 µl de cloroformo y se incubó a temperatura ambiente (TA) por 2 minutos. Finalizada la incubación se añadió 2 ml de la solución II (anexo I 5b), se mezcló por inversión suave del tubo y se incubó 5 minutos a TA. Seguidamente se agregaron 2 ml de la solución III (anexo I 5c), se mezcló por inversión suave del tubo y se incubó 10 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm 10 minutos a 4°C. Se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionaron 6 ml de isopropanol. La mezcla se incubó 5 minutos a -20°C. Luego se procedió a centrifugar a 3750 rpm por 10 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante se resuspendió el pellet con 500 µl de buffer TE, se agregó 10 µl de ARNasa (1 µg/ml) (RNase A, Promega) y la mezcla se incubó a 55°C durante 20 minutos. Seguidamente se realizó una extracción con cloroformo, se agregó 550 µl de isopropanol, se mezcló y se incubó a -20°C por 5 minutos. Se

centrifugó a 13.000 rpm por 2 minutos y una vez descartado el sobrenadante, el pellet fue lavado con etanol 70%. Finalmente se resuspendió en 150 µl de buffer TE.

La concentración del pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 así purificado se realizó por espectrofotometría.

**II.C.2** Generación del baculovirus recombinante mediante la reacción de recombinación entre el EL pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 y el ADN lineal de baculovirus.

Para la reacción de recombinación se utilizó pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 de la colonia n°5 con una concentración estimada de 328 ng/ul. La mezcla comercial de enzimas que se utilizó fue *LR Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme Mix for BaculoDirect<sup>TM</sup>*. La reacción de recombinación se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen.UK).

**II.C.2a** Transfección de las células de insecto con el baculovirus recombinante y generación de stock viral P1.

En una placa de 6 pocillos (Greiner Bio-One BioScience, USA) se sembraron células *Sf 9* en una concentración aproximada de  $9 \times 10^5$  por pocilio con 2 ml de medio Sf900 II (GIBCO, Invitrogen. UK). Se cultivaron a 27°C hasta obtener las células en fase logarítmica con una concentración aproximada de  $2 \times 10^6$  células/ml con un 90% de confluencia. De esta placa se tomaron aproximadamente  $8 \times 10^5$  células *Sf 9* y se sembraron en pocillos que contenían 2 ml de medio Grace's (GIBCO, Invitrogen, UK). Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la adherencia de las células.

Para la transfección se diluyó 8 µl de la reacción de recombinación que contiene el baculovirus recombinante obtenido en el punto II.3.2c, en 100 µl de medio Grace's no suplementado. Por otro lado se preparó el reactivo de transfección, *Cellfectin II Reagent*<sup>®</sup> (Invitrogen. UK) que provee los liposomas, diluido 1/10 en medio Grace's. Se tomaron 100 µl de cada preparación y la mezcla resultante se incubó entre 25 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación la totalidad de la mezcla baculovirus recombinante-liposomas se agregó a las células Sf9 y se incubó 3 horas a 27°C. Posteriormente se removi6 la mezcla a6adida a las c6elulas y se agreg6 2 ml de medio de crecimiento Sf900 II. Las c6elulas as6 transfectadas se incubaron a 27°C durante 72 horas, tiempo en el que se realizaron observaciones peri6dicas para detectar signos de infecci6n como p6rdida de la forma celular con aumento del di6metro celular, desprendimiento parcial de las c6elulas, cese del crecimiento celular y por ultimo muerte celular con presencia de soluci6n de continuidad en la monocapa celular.

#### **II.C.2b** Amplificaci6n del stock viral P1 y generaci6n del stock viral P2.

Los efectos negativos del ganciclovir sobre las c6elulas hace necesaria la amplificaci6n del t6tulo viral a partir del sobrenadante de la Transfecci6n P1 (ver secci6n II.3.2d). Por esta raz6n se realiz6 un segundo pasaje para obtener el stock viral P2 de mayor t6tulo.

Con este prop6sito se infect6 una monocapa de c6elulas Sf9 ( $2 \times 10^6$  c6elulas/ml) con un 90% de confluencia.

Las células infectadas se incubaron 48 horas a 27°C. Al finalizar el tiempo de incubación se recolectó el sobrenadante, se rotuló como stock viral P2 y se conservó protegido de la luz a 4°C.

### **II.C.2c** Ensayo en placa para aislar los clones del baculovirus recombinantes.

Los clones positivos de baculovirus recombinante para la proteína gp51 fueron seleccionados mediante la técnica de ensayo en placa a partir del stock viral P2. Se cultivaron células *Sf 9* en placa de 6 pocillos con una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml, la cual fue incubada 20 minutos a 27°C. A partir del sobrenadante P2 del baculovirus recombinante se prepararon 6 diluciones seriadas ( $10^{-3}$ - $10^{-8}$ ) en medio Grace's. El medio de crecimiento de la placa fue removido y se adicionaron 1 ml de cada dilución viral. La placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el inóculo fue removido de cada pocilio y reemplazado por 2 ml de medio de plaqueo (ver anexo I 2). La placa fue incubada entre 7 a 10 días a 27°C. Una vez constatados los signos característicos de las placas de lisis, estas fueron removidas con pipeta Pasteur, colocadas cada una por separado en un tubo *ependorf* con 500  $\mu$ l de medio Grace's y centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos para eliminar los detritos celulares. Posteriormente con 100  $\mu$ l del sobrenadante obtenido se sembró una nueva placa de 6 pocillos con células *Sf 9* a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml, en medio de cultivo TC100 (USBiological, USA) y 10 % de SFB. La placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente y finalmente se agregó 3 ml de medio TC100 suplementado con 2% SFB. Al cabo de 72 horas de incubación a 27°C, se recolectó tanto el sobrenadante como las células de cada

pocilio y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se conservaron a 4°C. Una alícuota de cada sobrenadante y los pellets celulares se procesaron para analizar la expresión de la proteína recombinante gp51 por la técnica de SDS-PAGE y Western blot.

### **II.C.3 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE LA gp51 RECOMBINANTE POR LA TÉCNICA DE SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.**

#### **II.C.3a Análisis por SDS-PAGE**

Una alícuota del sobrenadante y células obtenidas del cultivo de células *Sf 9* infectado con stock viral P2 fueron lisadas en igual volumen de *buffer* de muestra en condiciones de reducción (ver anexo I 5). Las proteínas fueron desnaturalizadas y reducidas por calor mediante el calentamiento de las muestras a 95 °C por 5 minutos.

La preparación del gel de siembra y de resolución se realizaron de acuerdo al anexo II 4. Se sembraron 20 µl de muestra y 5 µl de marcador de peso molecular preteñido (Page Ruler Fermentas SM 0671). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 1 hora. La preparación del *buffer* tris-glicina utilizado para la electroforesis se detalla en el anexo I 9. Se destinó un gel para la electrotransferencia y otro para tinción con azul brillante de Coomassie (ver anexo I 6 y 7).

#### **II.C.3b Análisis por Western blot**

Para la electrotransferencia se utilizó una membrana de PVDF (Bio-Rad. USA) de 22 µm previamente tratada con metanol. La transferencia se realizó a 15 V durante 30 minutos en un *TransBlot-SD Semi-Dry transfer cell* (Bio-Rad. USA). El *buffer*

utilizado para la electrotransferencia se detalla en el anexo I 9. Una vez realizada la electrotransferencia, la membrana fue bloqueada toda una noche a 4°C en solución de bloqueo (ver anexo I 10). La membrana de nitrocelulosa fue lavada por 5 minutos 3 veces en solución de lavado (ver anexo I 11). Como suero primario positivo se utilizó al suero control E4 (Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Adelestone Surrey, UK) y como suero control negativo se utilizó un pool de sueros negativos control de la seroteca del laboratorio de virología. La membrana se incubó con los sueros primarios diluidos 1/100 en solución de bloqueo por 1 hora a 37°C en suave agitación. Una vez finalizada la incubación la membrana se lavó por 5 minutos 3 veces en solución de lavado en agitación suave. Luego se incubó 1 hora a 37°C con un suero conjugado anti-IgG de bovino hecho en cabra marcado con peroxidasa (SIGMA, USA) diluido 1/5000 en solución de bloqueo. Posteriormente se procedió al lavado y se reveló con 20 µl de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato y con 30 mg de cromógeno diaminobencidina (DAB, WAKOPURE Chemical Industries, Japón) en 100 ml de PBS.

#### **II.C.4** Titulación viral por conteo de placas de lisis.

Se cultivaron células Sf9 en placa de 6 pocillos como fue descrito en el punto II.C.1f. A partir del sobrenadante de los clones elegidos, se prepararon 8 diluciones seriadas ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) en medio Grace's. Se removió el medio de cultivo y se agregó 1 ml de cada dilución viral. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el inóculo fue removido de cada pocilio para ser reemplazado por 2 ml de medio de plaqueo (ver anexo I 21). La placa fue incubada durante 7-10 días a 27°C y luego se procedió a la tinción de las placas de lisis con rojo neutro (colorante

vital) para lograr una mejor visualización y conteo de las mismas (ver anexo I 22). Los sobrenadantes, una vez titulados, fueron guardados a 4°C como virus *stock*.

## **II.C.5 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EL SISTEMA CÉLULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS.**

### **II.C.5a Producción**

Para la producción de la proteína recombinante gp51, se utilizaron células de insecto Hi5. Estas células fueron cultivadas en frascos de 250 cm<sup>3</sup> utilizando medio TC100 con el agregado del 10% de SFB. Cuando la monocapa llegó a una densidad de  $2 \times 10^6$  cel/ml fue infectada con el *stock* viral Baculovirus-gp51 a una MOI de 5 obtenido en el punto II.3.4. Las células fueron incubadas durante 72 hs a 27°C. Luego el sobrenadante y las células infectadas fueron recolectadas y centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min. Las células así tratadas fueron resuspendidas con 1 ml de buffer PO<sub>4</sub>pH7 (anexo I 12) y se denominaron Fracción A para su identificación en la secuencia de purificación.

### **II.C.5b Purificación.**

Previo a la purificación de las proteínas, se realizó un tratamiento previo de las células infectadas con Baculovirus-gp51 con el objetivo de liberar la proteína de las células. A la Fracción A se le agregó 0,3% de Sodium Dodecyl Sulfate al 10% (SDS, Promega, USA) y 1% de 2-Me (Merck, Alemania). Una vez homogenizado se procedió a romper las células por pasaje en jeringa. Se realizaron 10 pasajes con aguja de calibre 25G seguidos de 10 pasajes por aguja de calibre 27G.

Posteriormente se centrifugó a 15.000 rpm 15 minutos. El pellet resultante se denominó Fracción B y al sobrenadante Fracción C. Con esta última se procedió a realizar la purificación en batch por cromatografía de pseudo afinidad. Tres ml de la Fracción C fueron mezclados con 1 ml de 50% Ni-NTA agarosa (QIAGEN, USA) en un tubo de 15 ml. La mezcla fue incubada en agitación suave a 4°C durante 60 minutos. Una vez descartado el sobrenadante (denominado Fracción D), la resina NTA-Ni-gp51 fue lavada 4 veces con 4 ml de buffer de lavado (anexo I 12) y en cada caso el material fue recolectado en tubos individuales designándoles el nombre de Fracción E 1-4. Por último se efectuó el proceso de elusión. La primer elusión se realizó con 1 ml de Buffer de elusión PO<sub>4</sub> pH6 (anexo I 13), se incubó 1 minuto invirtiendo suavemente el tubo y posterior se centrifugó a 5000 rpm 1 minuto. Este proceso se repitió dos veces más con buffer de elusión PO<sub>4</sub> pH5 y pH4 cada vez (anexo I 14 y 15 respectivamente). En cada paso del proceso de elusión el material fue recolectado en tubos individuales designándoles el nombre de Fracción F, G y H, respectivamente. La concentración de proteína en cada una de las fracciones recolectadas fue medida en un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (Bio-Rad, USA). Cada una de las fracciones fue analizada por SDS-PAGE.

## **DESARROLLO DEL ENSAYO DEL ELISA INDIRECTO**

### **II.D.1. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE ELISA p24r/gp51r**

Las proteínas recombinantes purificadas se utilizaron como antígeno para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecto. En una primera etapa, como parte de

la validación del ensayo de ELISA, se realizó la optimización y estandarización de los reactivos por la técnica de damero, se ensayaron tres pruebas: dos pruebas de ELISA independientes para p24r y gp51r y una integrada: ELISA p24r/gp51r.

Todas las pruebas se realizaron en placas de 96 pocillos (*Nunc Immuno Plate PolySorb, InterMed. Dinamarca*).

#### **II.D.1.a** Obtención de sueros y definición de patrón estándar

Los sueros bovinos utilizados para la prueba de ELISA p24r/gp51r fueron obtenidos del banco de sueros de la Cátedra de Virología, FCV, UNLP. 270 sueros fueron sometidos a 2 pruebas diagnósticas reconocidas como oficiales por la autoridad sanitaria nacional (SENASA): la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), (kit producido por Laboratorio de Virología FCV-UNLP) y una prueba ELISA comercial (VMRD. USA). Se eligieron aquellos sueros que respondieron positivos o negativos a ambas pruebas, denominándose doble positivos (DP) y dobles negativos (DN) respectivamente, constituyendo el patrón estándar. Las pruebas de IDGA y ELISA comercial VMRD se llevaron a cabo de acuerdo a lo estipulado por el fabricante.

#### **II.D.1.b** Titulación de reactivos para el ELISA p24r por la técnica de damero.

Para determinar la concentración óptima de p24r se sensibilizó una placa con diferentes diluciones del antígeno en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 (ver anexo I 24). Se sembraron 100 µl de las siguientes concentraciones expresadas en ug/ml: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.5 y 0.25. El antígeno fue fijado a la placa toda la noche a 4°C en cámara húmeda. El exceso de antígeno fue eliminado por 3 lavados con la solución de lavado (ver anexo I 26) y se agregaron 120 µl de la solución de bloqueo (ver

anexol 25) en cada pocilio. La placa fue incubada durante 1 hora a 37°C en estufa. Finalizada la incubación, se lavó 3 veces con la solución de lavado. Luego del bloqueo, las diferentes concentraciones del antígeno se enfrentaron con cuatro diluciones de sueros control positivo y negativo diluidos en base logarítmica 2 comenzando por 1/25. Este esquema se realizó por duplicado en la misma placa y se grafica en la **Fig.: II.D.1**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	Ag en µg/ml ▶	10	5	2.5	1.25	0.5	0.25		10	5	2.5	1.25	0.5	0.25
Suero control POSITIVO	1/25	<input type="checkbox"/>	A											
	1/50	<input type="checkbox"/>	B											
	1/100	<input type="checkbox"/>	C											
	1/200	<input type="checkbox"/>	D											
Suero control NEGATIVO	1/25	<input type="checkbox"/>	E											
	1/50	<input type="checkbox"/>	F											
	1/100	<input type="checkbox"/>	G											
	1/200	<input type="checkbox"/>	H											

**Fig.: II.D.1:** Esquema de la distribución de los reactivos en la prueba de damero.

La placa fue incubada a 37°C en estufa durante 1 hora. Luego se lavó 3 veces con solución de lavado y posteriormente, se adicionó, 100 µl/pocillo de una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-bovino hecho en conejo, conjugado con peroxidasa (SIGMA, USA). Finalizada la incubación en estufa durante 1 hora a 37°C, se realizaron 3 lavados para eliminar el exceso de conjugado. Por último se agregaron

100 µl del sistema revelador (ver anexo I 27) realizándose la lectura transcurridos 15, 20, 30 y 40 minutos en un lector de multiplacas Titertek Multiskan con filtro de 405nm.

**II.D.1.c** Titulación de reactivos para el ELISA gp51r por la técnica de damero.

Para titular la concentración óptima de gp51r como antígeno, se sensibilizó una placa respetando el mismo esquema de concentraciones de antígeno y diluciones de los sueros control del punto anterior. Los parámetros generales del ELISA también se llevaron a cabo teniendo en cuenta el protocolo anterior.

**II.D.1.d** Titulación de reactivos para el ELISA p24r/gp51r por la técnica de damero.

Basándonos en los resultados obtenidos en la titulación de los antígenos individuales y su comportamiento frente a las diluciones séricas testeadas en los dos puntos previos, se realizó una técnica en damero utilizando dos combinaciones de antígenos. Brevemente las diluciones de los sueros control positivo y negativo fueron 1/50, 1/100 y 1/200. Se realizaron las lecturas a los 15, 20, 30 y 40 minutos. Este esquema se realizó por duplicado en la misma placa y se grafica en la **Fig.: II.D.2.**

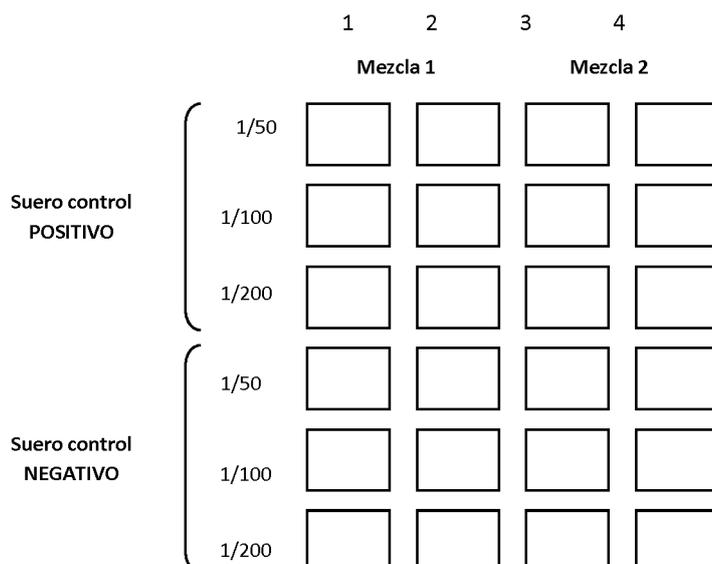


Fig.: II.D.2: Esquema de la distribución de los reactivos en la prueba de damero para el ELISA p24r/gp51r.

### II.D.1.e PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE ELISA p24r/gp51r.

Luego de escoger la combinación de antígenos más adecuada para el ELISA p24r/gp51r, las proteínas recombinantes se diluyeron en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 (ver anexo I 24) y se sembró 100 µl/pocillo. El antígeno fue fijado a la placa toda la noche a 4°C en cámara húmeda. El exceso de antígeno fue eliminado por 3 lavados con la solución de lavado (ver anexo I 26) y se agregaron 150 µl de la solución de bloqueo (ver anexo I 25) en cada pocillo. La placa fue incubada durante 1 hora a 37°C en estufa. Finalizada la incubación, se lavó 3 veces con la solución de lavado. Luego del bloqueo se colocaron 100 µl de cada suero problema diluido en los pocillos correspondientes. Se probaron 4 diluciones diferentes, 1/200, 1/100, 1/50 y 1/25. El mismo procedimiento se realizó para los

sueros controles. La placa fue incubada a 37°C en estufa durante 1 hora. Luego se lavó la placa 3 veces con la solución de lavado y posteriormente, se adicionó, 100 µl/pocillo de una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-bovino hecho en conejo, conjugado con peroxidasa (SIGMA, USA). Finalizada la incubación en estufa durante 1 hora a 37°C, se realizaron 3 lavados para eliminar el exceso de conjugado. Por último se agregaron 100 µl del sistema revelador (ver anexo I 27) realizándose la lectura transcurridos 15, 20, 30 y 40 minutos en un lector de multiplacas Titertek Multiskan con filtro de 405nm.

Los resultados de la prueba de damero se valoraron calculando el "Binding Ratio" (BR) (Crowther J., 2009). El mismo se obtiene realizando la división de la absorbancia del suero control positivo por el valor del suero control negativo a la misma dilución, concentración de antígeno y al mismo tiempo de lectura.

#### **II.D.1.f ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ELISA p24r/gp51r**

Una vez realizados los diferentes dameros y escogidas la composición de la mezcla de antígenos para el ELISA p24r/gp51r se procedió a valorar la sensibilidad y especificidad, tomando como mayor umbral el mayor porcentaje de sueros correctamente clasificados

### **II.D.1.g INTERPRETACIÓN DE DATOS Y NORMALIZACIÓN**

Para la realización de cálculos y análisis de resultados se normalizaron las lecturas de absorbancia como valores de porcentajes de seropositividad estimados en base a la siguiente fórmula para la OD normalizada ( $OD_N$ ) (Sanchez y col., 2002):

$$OD_N = OD - Nt / Pst - Nt.$$

OD es el valor de absorbancia de la muestra.

Nt es el promedio de los sueros negativos.

Pst es el promedio de los sueros positivos.

### **II.D.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los cálculos estadísticos se procesaron mediante el programa Stata SE 11 (Stata Corporation, College Station, Texas, Estados Unidos) y TG-ROC (Two Graphic Receiver Operating Characteristic) (Xu H., y col., 1997).

#### **II.D.2.a Repetibilidad intraplaca**

Se realizó un análisis preliminar de repetibilidad basados en el trabajo de Sanchez y col., 2002. Incluyó el análisis de varianza para evaluar la posible fuente de variación de tiempo de lectura, repetibilidad intra placa, para lo cual se analizaron 48 sueros totales por duplicado en la misma placa.

También se determinó el coeficiente de variación (CV: desviación estándar de las réplicas ÷ media de las mismas) como indica el Capítulo de Principios y métodos de

validación de las pruebas diagnósticas de las enfermedades infecciosas de la OIE (2012).

La comparación de réplicas intraplaca se realizó por medio del “coeficiente de concordancia” (CCC) para determinar el grado de acuerdo entre las dos lecturas del mismo suero. El valor de CCC puede oscilar de “cero” a “uno”, indicando el “cero” como ausencia de correlación y el “uno” como la correlación óptima. Como complemento al CCC se realizó un gráfico de límites de acuerdo en donde se presenta la curva óptima y los límites de dispersión al 95% de confianza ( $IC_{95\%}$ ), siendo deseable que todos los valores predichos coincidan sobre el valor cero del gráfico, de no ser así, es deseable que ningún valor sobrepase los  $IC_{95\%}$  preestablecidos.

También se determinó el coeficiente de variación (CV: desviación estándar de las réplicas ÷ media de las mismas) como indica el Capítulo de Principios y métodos de validación de las pruebas diagnósticas de las enfermedades infecciosas de la OIE (2012).

#### **II.D.2.b** Determinación del punto de corte

Para la determinación del valor de corte de la prueba de ELISA p24r/gp51r se analizaron los valores normalizados aplicando la metodología de curvas ROC (Dohoo I., 2010). Con esta metodología se obtuvo un gráfico de pares de sensibilidad y especificidad para diferentes valores de corte, con lo cual se confeccionó una curva característica operativa del receptor o curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Para la selección del valor de corte apropiado se tuvo en

cuenta los valores de sensibilidad, especificidad correspondientes al mayor porcentaje de sueros correctamente clasificados (idéntico resultado por ambas pruebas, patrón estandar y ELISA p24r/gp51r) y en relación a los valores óptimos que debería tener la prueba diagnóstica.

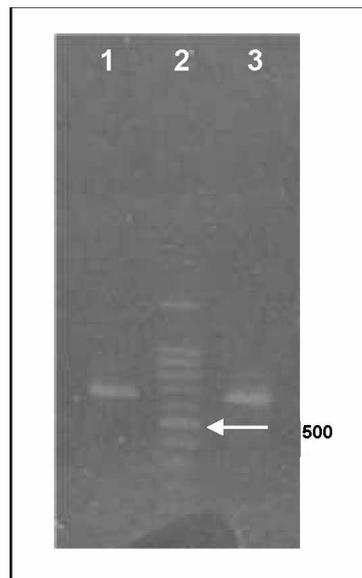
Con los datos resultantes de la estandarización de la técnica se determinó el número de muestras según la OIE en "Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas" (OIE 2009) a partir de una tabla confeccionada según la sensibilidad o especificidad esperada con una confianza conocida (90%) y un error del 5%.

## CAPITULO III RESULTADOS

### PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES DEL VLB

#### III.A EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p24 DEL VLB EN EL SISTEMA BACTERIANO.

A partir de FLK-VLB se logró amplificar con éxito el gen de 647 pb que codifica para la proteína p24 completa. El producto de PCR-p24 fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa al 1,3% donde se visualizó una banda que se corresponde con el peso molecular buscado (**Fig.: III.A.1**).



**Fig.: III.A.1:** Electroforesis del producto de PCR-p24 en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

1: Producto de PCR-p24. 2: Marcador 100pb (Promega, USA). 3: Control positivo de PCR.

El vector pQE-30 fue sometido a doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y el producto purificado de la digestión fue sometido a una

electroforesis en gel de agarosa al 1,3% donde se visualizó una banda que corresponde al peso esperado (3460 pb) (**Fig.: III.A.2**).

Se estimó la concentración del vector en 25ng/μl.

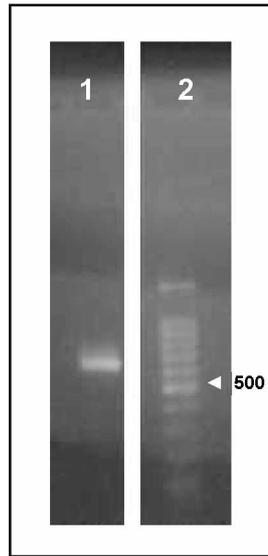


**Fig.: III.A.2:** Electroforesis del producto de la doble digestión, pQE-30 *Bam*HI/*Hind*III purificado, en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

1: Marcador Lambda Eco/*Hind*III. 2: pQE30 *Bam*HI/*Hind*III. 3: Marcador 1K (Promega, USA).

El producto de PCR-p24 purificado fue sometido a doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio reveló la presencia de una banda de aproximadamente 647 pb que coincide con el tamaño esperado (**Fig.: III.A.3**).

Por comparación con el fragmento de 500pb del ladder, que se comporta como banda de referencia, se estimó la concentración del inserto en 50ng/μl.



**Fig.: III.A.3:** Electroforesis del producto de la doble digestión, p24 *Bam*HI/*Hind*III purificado, en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

**1:** p24 *Bam*HI /*Hind*III. **2:** Marcador 100pb (Promega, USA).

Una vez realizada la reacción de ligación se transformaron células *E. coli* M15 [pREP4] competentes, con el vector pQE-30-p24 recombinante (**Fig.: III.A.4**).

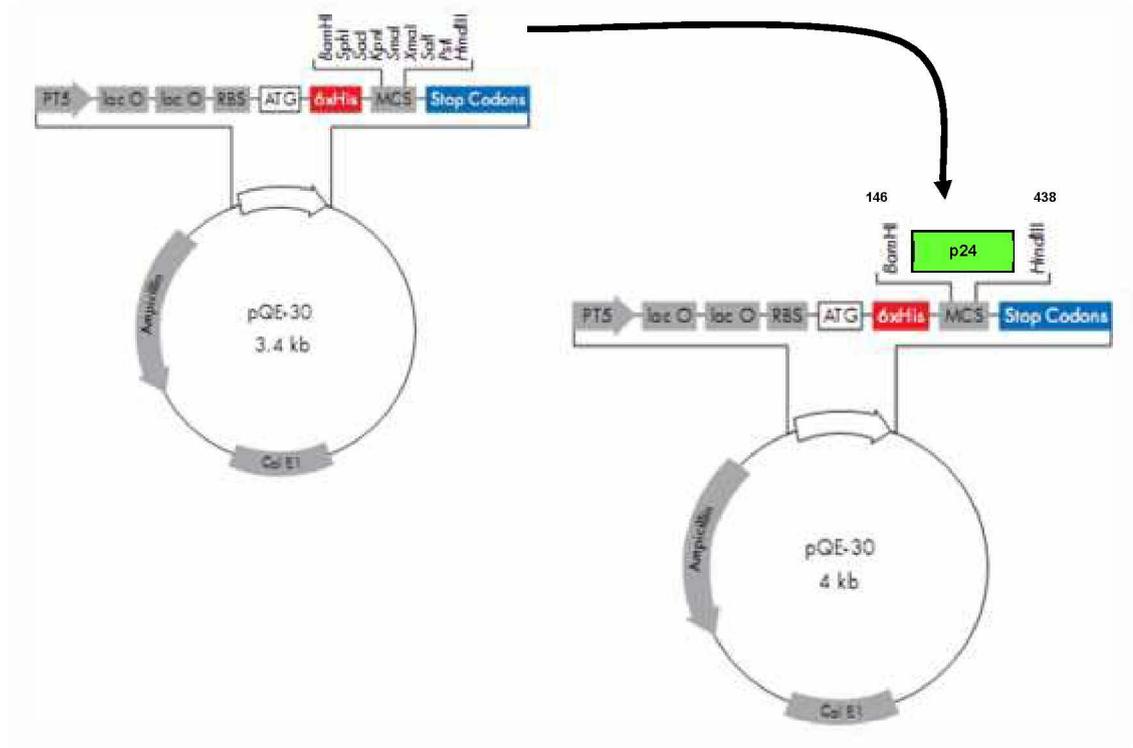
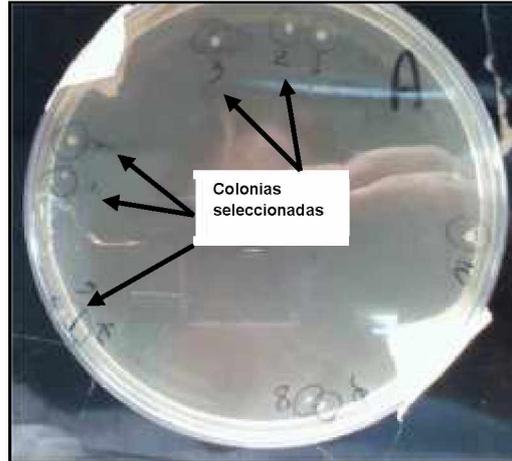


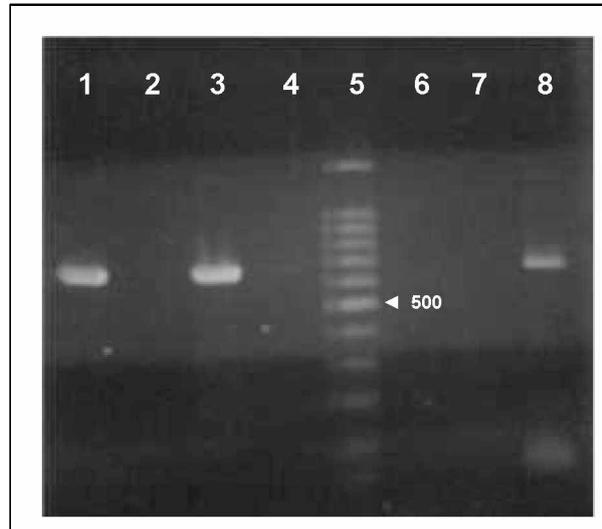
Fig.: III.A.4: Esquema de la construcción pQE-30-p24.

Posteriormente se seleccionaron 5 colonias blancas resistentes a los antibióticos kanamicina y ampicilina (Fig.: III.A.5).



**Fig.: III.A.5:** Placa de medio LB con kanamicina (25 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml). Las colonias nº 2, 3, 4 y 5 fueron seleccionadas para seguir con el protocolo.

Las colonias seleccionadas fueron evaluadas por la técnica de PCR con los primers específicos para determinar la presencia del gen de interés. El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio reveló la presencia de una banda de aproximadamente 647 pb que coincide con el tamaño esperado para las colonias 2 y 4 (**Fig.: III.A.6**).



**Fig.: III.A.6.:** Electroforesis del producto de PCR de las colonias de *E. coli* M15 [pREP4] transformadas con el vector pQE-30-p24 recombinante. Gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

1: Colonia nº 2. 2: Colonia nº 3. 3: Colonia nº 4. 4: Colonia nº 5. 5: Marcador 100pb (Promega, USA). 6: Colonia nº6. 7: Control negativo. 8: Control positivo de PCR.

Se seleccionó la colonia nº2 para realizar su secuenciación. La secuencia obtenida, revelo la presencia del codón de iniciación ATG, manteniendo de esta manera el marco de lectura correspondiente.

```

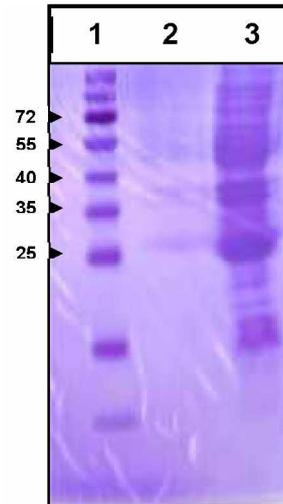
[ATG]CCAATCATATCTGAAGGGAATCGCAACCGCCATCGTGCTTGGGCACTCCGAGAATTACAAGA
TATCAAAAAGGAAATTGAAAATAAGGCACCGGGTTCGCAAGTATGGATACAAACACTACGACTTG
CAATCCTGCAGGCCGACCCTACTCCGGCTGACCTAGAACAACCTTTGCCAATATATTGCTTCCCCG
GTCGACCAAACGGCCCATATGACCAGCCTAACGGCAGCAATAGCCGCCGCTGAAGCGGCCAAC
ACCCTCCAGGGTTTTAACCCCAAACGGGACCCTAACCCAACAATCAGCTCAGCCCAACGCCG

```

GGGATCTTAGAAGTCAATATCAAAACCTCTGGCTTCAGGCCTGGAAAAATCTCCCTACTCGTCCTT  
CAGTACAACCTTGGTCCACCATCGTCCAAGGCCCGCCGAAAGCTATGTAGAGTTTGTCAACCG  
GTTACAAATTTTCATTAGCTGACAACCTTCCCGACGGAGTCCCTAAGGAACCCATTATTGACTCCCT  
TAGTTATGCAAATGCTAACAGAGAGTGCCAGCAAATTTTGCAGGGGCGAGGCCTAGTGGCCGCC  
CCGGTGGGGCAAAAACCTGCAGGCTTGCGCACATTGGGCCCCCAAGGTGAAACAGCCTGCACTTC  
T

Colocada la secuencia en el programa BLAST arrojó un 99% de homologación con Bovine leukemia virus cell-line FLK-BLV subclone pBLV913, complete genome. Sequence ID: EF600696.1 y 98% de homologación con Bovine leukemia virus complete genome (Sagata y col 1985). Sequence ID: K02120.1 del GenBank.

Para la evaluación de la expresión de p24 recombinante se realizó un cultivo a pequeña escala de la colonia nº2. El pellet y sobrenadante de cultivo inducido se evaluaron por las técnicas de SDS-PAGE y western blot. La tinción con azul brillante de Coomassie reveló la presencia de una banda de peso molecular correspondiente a la proteína p24 en la muestra del pellet celular del cultivo inducido. No se detectó banda específica de la proteína en el sobrenadante de cultivo (**Fig.: III.A.7**).



**Fig.: III.A.7:** Electroforesis en SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida, del cultivo de la colonia nº 2 de *E. coli* M15 [pREP4] inducido con IPTG. Tinción con Azul brillante de Coomasie.

1: Marcador de peso molecular (Fermentas). 2: Muestra de sobrenadante de cultivo inducido. 3: Fracción A, Muestra de pellet de cultivo inducido.

Con la técnica del western blot se demostró la antigenicidad de la proteína p24 recombinante contra los suero control positivo E4. Asimismo se reconocen proteínas propias de las *E. coli* M15 [pREP4] transformadas. No se observó reactividad contra la p24 recombinante al enfrentarla con un pool de sueros control negativos **Fig.: III.A.8).**

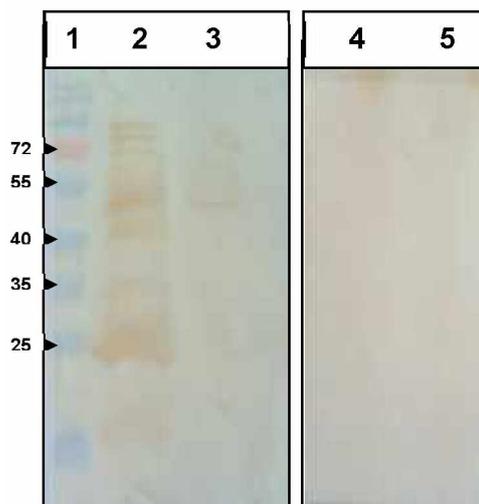


Fig.: III.A.8: Western blot del cultivo de la colonia nº 2 de *E. coli* M15 [pREP4] inducido con IPTG.

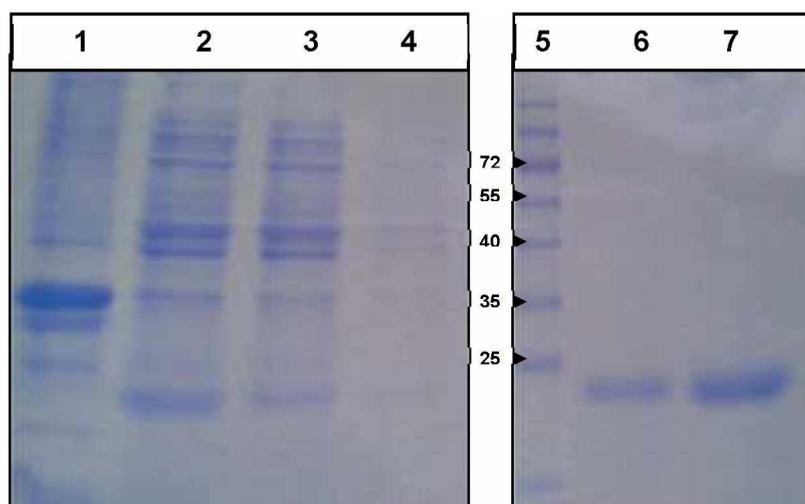
**1:** Marcador de peso molecular (Fermentas). **2 y 4:** Fracción A, Muestra de pellet de cultivo inducido Muestra de sobrenadante de cultivo inducido. **3 y 5:** Muestra de sobrenadante de cultivo inducido. Las muestras 2 y 3 se incubaron con suero control positivo E4. Las muestras 4 y 5 se incubaron con suero control negativo.

Una vez corroborada la presencia y antigenicidad de la proteína recombinante se procedió a realizar un cultivo de expresión a gran escala de la colonia seleccionada como se indicó en Materiales y Métodos y finalmente la purificación de la p24 recombinante. Se tomaron muestras de las distintas etapas de los procesos de inducción del cultivo, tratamiento de lisis, liberación de la proteína y su purificación, que fueron sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida. La tinción con azul brillante de Coomasie de las muestras del proceso de inducción solo revelan la presencia de la proteína p24 recombinante en el pellet celular del cultivo inducido, no así en las muestra de cultivo pre-inducción.

El sobrenadante como el pellet resultantes del tratamiento de lisis por sonicación de la fracción celular del cultivo inducido demostraron contener a la proteína p24 recombinante (calle nº 2 **Fig.: III.A.9**) no así el sobrenadante del producto de lisis (calle nº 1 **Fig.: III.A.9**).

A la tinción se observa que los sobrenadantes de absorción y primer lavado, no revela la presencia de la proteína p24 recombinante (calle nº 3 y 4 respectivamente **Fig.: III.A.9**).

La proteína p24 recombinante se observa claramente concentrada y purificada en el producto de elusión con buffer PO<sub>4</sub> pH4 (calle 6 y 7 **Fig.: III.A.9**). Por comparación con patrón de seroalbumina de concentración conocida se estimó la concentración del primer eluato en 150 µg/ml y el segundo eluato en 400µg/ml.



**Fig.: III.A.9.** Electroforesis en SDS-PAGE al 12,5% de poliácridamida, de muestras de cultivo de *E. coli* M15 [pREP4], colonia nº 2 inducida.

1.: Pellet del sonicado. 2: Sobrenadante del sonicado. 3: Sobrenadante de adsorción. 4: Sobrenadante del primer lavado. 5: Marcador de peso molecular (Fermentas). 6: Primer eluato con buffer PO<sub>4</sub> pH4. 7: Segundo eluato con buffer PO<sub>4</sub> pH4.

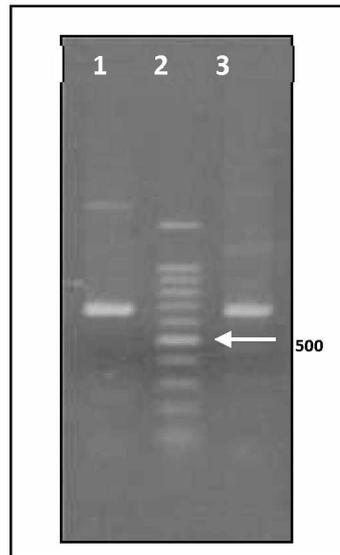
Así mismo se determinó la concentración proteica de diferentes fracciones de la purificación descritas en la tabla siguiente. (**Tabla nº III.A.1**)

PURIFICACION	
Fracción	ug/ml
SN post adsorción	0.040
Lavado nº 1	0.021
Primer eluato	0.194
Segundo eluato	0.347

**Tabla nº III.A.1.** Determinación de a concentración proteica de las diferentes fracciones de purificación.

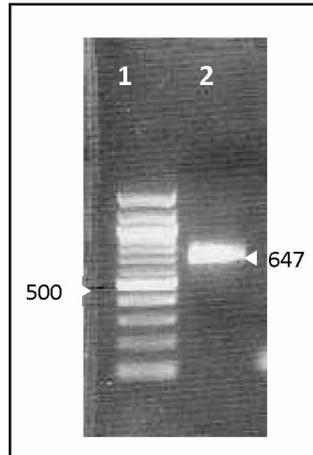
### III.B EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p24 DEL VLB

A partir de células FLK-VLB se logró amplificar con éxito el fragmento de 647 pb que codifica para la proteína p24 completa. El producto de PCR-p24 fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa al 1,3% donde se visualizó una banda que se corresponde con el peso molecular buscado (**Fig.: III.B.1**).



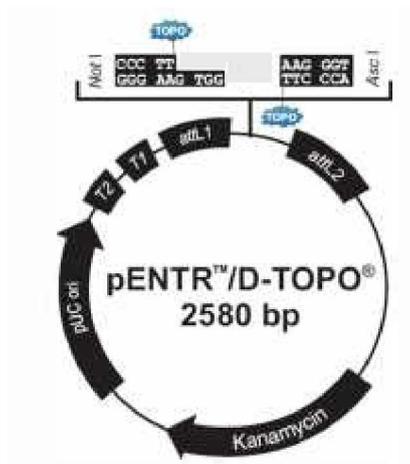
**Fig.: III.B.1:** Electroforesis del producto de PCR-p24 en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio. (FOTO 112307) **1:** Producto de PCR-p24. **2:** Marcador 100pb (Promega, USA). **3:** Control positivo de PCR.

El producto de PCR cuyo extremo 5' incluye la secuencia CACC necesaria para el clonado direccionado en el vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen, UK) fue purificado según lo expresado en materiales y métodos punto **II.B** (**Fig.: III.B.2**). La construcción obtenida se grafica en la figura nº III.B.3 .



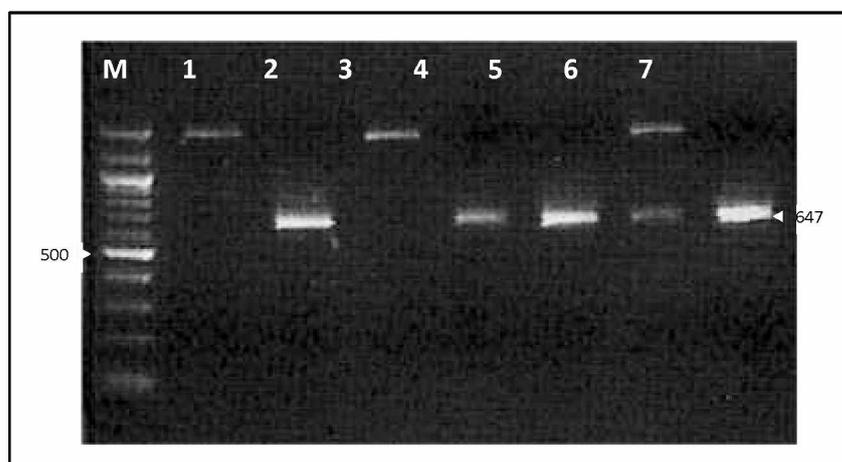
**Fig.: III.B.2:** Electroforesis del producto de PCR-p24 con primers específicos para el clonado direccional en el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>. Gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

1: Marcador 100pb (Promega, USA). 2: producto de PCR-p24.



**Fig.: III.B.3:** Esquema de la construcción pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-p24.

Una vez clonado del producto de PCR-p24 en el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> se transformaron células *E.coli* Top10 competentes con el pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-p24 recombinante. Se eligieron 6 colonias blancas que fueron evaluadas por la técnica de PCR con primers específicos para determinar la presencia del gen de interés. Se estableció que las colonias número 2, 4 y 5 fueron positivas a PCR y por lo tanto llevaban el gen de interés. La colonia n° 6 al presentar 2 bandas fue descartada (**Fig.: III.B.4**).



**Fig.: III.B.4:** Electroforesis del producto de PCR de colonias de *E. coli* Top10 transformadas con el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-p24 recombinante, en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

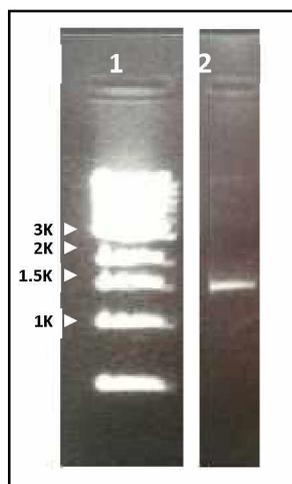
M: Marcador 100pb (Promega, USA). 1-6: colonias 1-6 respectivamente. 7: Control positivo de PCR.

Una vez identificada la presencia del vector pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup>-p24 en las colonias, se seleccionó la colonia n°2 para realizar su secuenciación. La secuencia obtenida, reveló la presencia del codón de iniciación ATG, manteniendo de esta manera el marco de lectura correspondiente.

**ATG**CCAATCATATCTGAAGGGAATCGCAACCGCCATCGTGCTTGGGCACTCCGAGAATTACAAGA  
 TATCAAAAAGGAAATTGAAAATAAGGCACCGGGTTCGCAAGTATGGATACAAACACTACGACTTG  
 CAATCCTGCAGGCCGACCCTACTCCGGCTGACCTAGAACAACCTTTGCCAATATATTGCTTCCCCG  
 GTCGACCAAACGGCCCATATGACCAGCCTAACGGCAGCAATAGCCGCCGCTGAAGCGGCCAAC  
 ACCCTCCAGGGTTTTAACCCCCAAAACGGGACCCTAACCCAACAATCAGCTCAGCCCAACGCCG  
 GGGATCTTAGAAGTCAATATCAAAACCTCTGGCTTCAGGCCTGGAAAAATCTCCCTACTCGTCCTT  
 CAGTACAACCTTGGTCCACCATCGTCCAAGGCCCGCCGAAAGCTATGTAGAGTTTGTCAACCG  
 GTTACAAATTTCATTAGCTGACAACCTTCCCGACGGAGTCCCTAAGGAACCCATTATTGACTCCCT  
 TAGTTATGCAAATGCTAACAGAGAGTGCCAGCAAATTTTGCAGGGGCGAGGCCTAGTGGCCGCC  
 CCGGTGGGGCAAAAACCTGCAGGCTTGCGCACATTGGGCCCCCAAGGTGAAACAGCCTGCACTTC  
 T

Colocada la secuencia en el programa BLAST arrojó un 99% de homología con Bovine leukemia virus cell-line FLK-BLV subclone pBLV913, complete genome. Sequence ID: EF600696.1 del GenBank y 98% de homologación con Bovine leukemia virus complete genome (Sagata y col 1985). Sequence ID: K02120.1 del GenBank.

Atendiendo este resultado, se realizó una Midiprep de la colonia seleccionada con el objetivo de purificar el vector de entrada pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-p24 recombinante en cantidad suficiente (**Fig.: III.B.5**) para ser utilizado en la reacción de recombinación entre éste y el ADN lineal del baculovirus.



**Fig.: III.B.5:** Electroforesis del producto de la Midiprep de un cultivo de colonias de *E. coli* Top10 transformadas con el vector pENTR™/D-TOPO®-p24 recombinante, en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

1: Marcador 1k (Invitrogen, USA). 2: Vector pENTR™/D-TOPO®-p24 recombinante purificado colonia nº2.

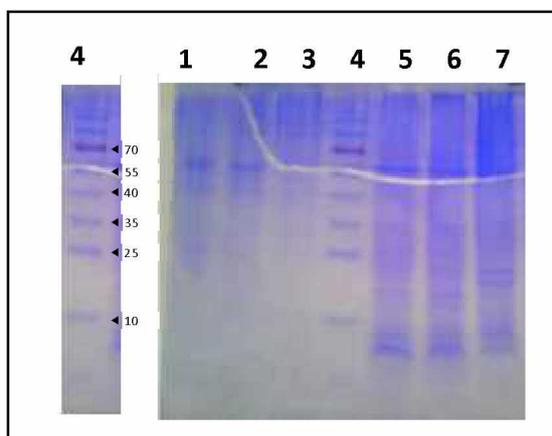
La concentración del pENTR™/D-TOPO®-p24 se obtuvo por espectrofotometría arrojando un valor de 303 ng/μl.

Realizada la recombinación entre el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®-p24 recombinante y el ADN lineal del baculovirus se efectuó la transfección de células Sf9 con el baculovirus–p24 recombinante. Al cabo de 72 horas de incubación se observaron signos de infección en el cultivo, a partir del cual se obtuvo el stock viral P1. Posteriormente se amplificó el stock viral P1 y se obtuvo un stock viral P2. Con el stock viral P2 se realizó un ensayo de placa de lisis del que se obtuvieron clones aislados del baculovirus–p24 recombinante **Figura III.B.6.**



**Fig.: III.B.6:** Placas de lisis para aislamiento de clon

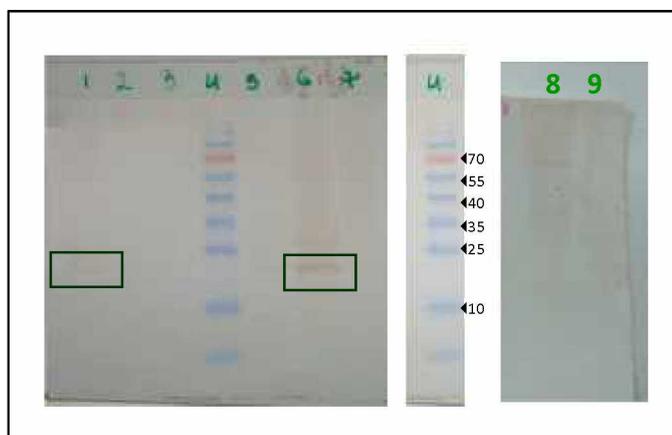
Para la evaluación de la expresión de la proteína recombinante la técnica de SDS-PAGE se realizó con células Sf9 infectadas con clones aislados por ensayo de placa baculovirus-p24 recombinante obtenido por recombinación con el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®-p24, la tinción con azul brillante de Coomassie no reveló la presencia fehaciente de una banda correspondiente a la proteína recombinante p24 (**Fig.: III.B.7**), sin embargo se decidió proseguir con la técnica de Western blot.



**Fig.: III.B.7:** Electroforesis en SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida, de muestras de cultivo de células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus-p24 recombinante realizado por el sistema de expresión BaculoDirect™ GST Gateway®.

**1:** Sobrenadante de cultivo Sf9 infectado con baculovirus recombinante, clon nº2. **2:** Sobrenadante de cultivo Sf9 infectado con baculovirus recombinante, clon nº 1. **3:** Sobrenadante de cultivo Sf9 control sin infectar. **4:** PageRule prestained protein ladder plus (Fermentas). **5:** Células de cultivo Sf9 infectado con baculovirus recombinante, clon nº 1. **6:** Células de cultivo Sf9 infectado con baculovirus recombinante, clon nº 2. **7:** Células de cultivo Sf9 control sin infectar.

La expresión de la proteína recombinante p24 se evaluó por la técnica de Western blot la cual evidenció la presencia y antigenicidad de la proteína p24 recombinante frente a un suero control positivo internacional E4 tanto en el sobrenadante como en las células Sf9 infectadas con baculovirus-p24 recombinante (**Fig.: III.B.8**).



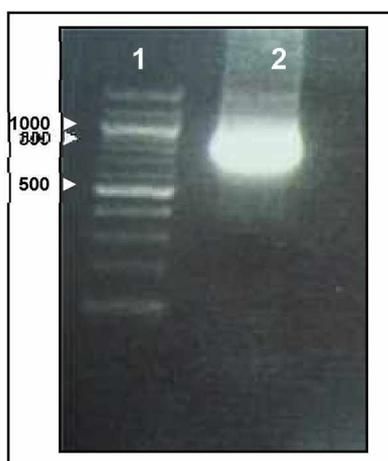
**Fig.: III.B.8:** Western blot de muestras de cultivo de células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus-p24 recombinante obtenido por el sistema de expresión BaculoDirect™ GST Gateway®.

**1:** Sobrenadante de cultivo Sf9 infectado con baculovirus recombinante, clon nº2. **2:** Sobrenadante de cultivo Sf9 infectado con baculovirus recombinante, clon nº 1. **3:** Sobrenadante de cultivo Sf9 control sin infectar. **4:** PageRule prestained protein ladder plus (Fermentas). **5:** Células de cultivo Sf9 infectado con baculovirus

recombinante, clon nº 1. **6:** Células de cultivo Sf9 infectado con baculovirus recombinante, clon nº 2. **7:** Células de cultivo Sf9 control sin infectar. Las muestras 1 a 7 se incubaron con suero control positivo E4. **8:** Células de cultivo Sf9 infectado con baculovirus recombinante, clon nº2. **9:** Células de cultivo Sf9 control sin infectar. Las muestras 8 y 9 se incubaron con suero control negativo.

### III.C EXPRESIÓN EN BACULOVIRUS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE gp51 DEL VLB

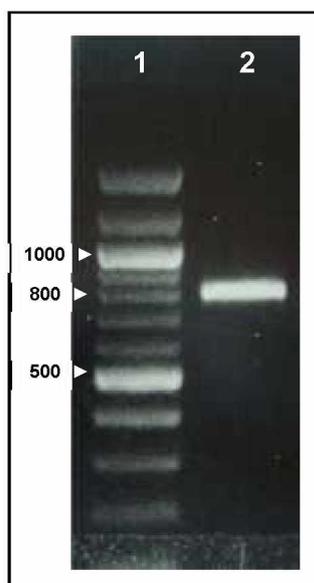
Para la construcción del vector pENTR™ /D TOPO® -gp51 recombinante se tomó el producto de PCR-gp51 cuyo extremo 5' incluye la secuencia CACC necesaria para el clonado direccionado en el vector y fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa al 1,3% donde se visualizó una banda del peso molecular esperado (894 pb) (**Fig.: III.C.1**).



**Fig.: III.C.1:** Electroforesis del producto de PCR-gp51 con primers específicos para el clonado direccional en el vector pENTR™/D-TOPO®. Gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

**1:** Marcador 100pb (Promega, USA). **2:** Producto de PCR-gp51.

El producto de PCR-gp51 fue purificado y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,3% donde se visualizó una banda que corresponde al gen con el tamaño esperado (894 pb) (**Fig.: III.C.2**).

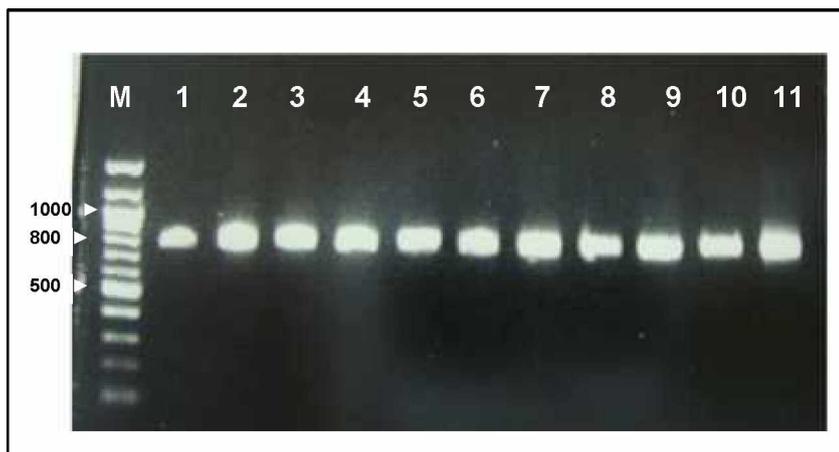


**Fig.: III.C.2:** Electroforesis del producto de PCR-gp51 purificado en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

1: Marcador 100pb (Promega, USA). 2: producto de PCR-gp51.

Una vez realizado el clonado del producto de PCR-gp51 en el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> se transformaron células *E.coli* NEB 5-*alpha* competentes con el pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 recombinante.

Se eligieron 10 colonias blancas que fueron evaluadas por la técnica de PCR con primers específicos para determinar la presencia del gen de interés (**Fig.: III.C.3**).



**Fig.: III.C.3:** Electroforesis del producto de PCR de colonias de *E. coli* NEB 5-alpha transformadas con el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 recombinante, en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

M: Marcador 100pb (Promega, USA). 1-10: colonias 1-10 respectivamente. 11: Control positivo de PCR.

Una vez identificada la presencia del vector pENTR<sup>TM</sup> /D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 en las colonias, se seleccionó la colonia n<sup>o</sup>5 para realizar su secuenciación. La secuencia obtenida, reveló la presencia del codón de iniciación ATG, manteniendo de esta manera el marco de lectura correspondiente.

```

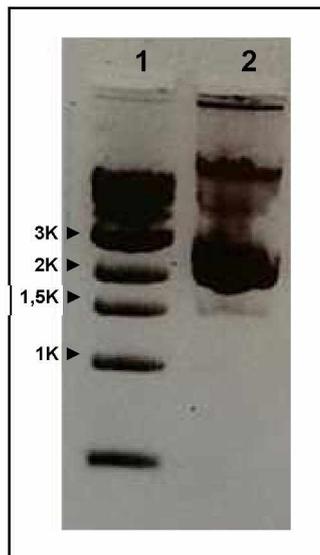
ATGCCTAAAGAACGACGGTCCCGAAGACGCCACAACCGATCATCAGATGGGTAAGTCTCACTC
TCACTCTCCTCGCTCTCTCTCGGCCATCCAGACTTGGAGATGCTCCCTGTCCCTAGGAAACCAA
CAATGGATGACAGCATATAACCAAGAGGCAAAATTTCCATCTCCATTGACCAAATACTAGAGGCT
CATAATCAGTCACCTTTCTGTGCCAAGTCTCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCT
AAGATCTACTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGCGCCGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATAT
GATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCACTGGGACAATG
CCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCTGCATCTCAAACAAT
GTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTAC
ATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCTGACTTTCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTC

```

AGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGA  
ACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGACCCG  
GCCTCGCCCTCCCGGACGCCCAAATCTTCTGGGTCAACTCGTCCTCGTTTAACACCACCCAAGG  
ATGGCACCACCCTTCCCAGAGGTTGTTGTTCAATGTTTCTCAAGGCAACGCCTTGTTATTACCTCC  
TATCTCCCTGGTTAATCTCTCTACGGCTTCCTCCGCCCTCCTACCCGG

Colocada la secuencia en el programa BLAST arrojó un 99% de homologación con Bovine leukemia virus cell-line FLK-BLV subclone pBLV913, complete genome. Sequence ID: EF600696.1 del GenBank y 99% de homologación con Bovine leukemia virus complete genome (Sagata y col 1985). Sequence ID: K02120.1 del GenBank.

Atendiendo este resultado se procedió a realizar la MIDIprep de la colonia nº5 (**Fig.: III.C.4**).



**Fig.: III.C.4:** Electroforesis del producto de la Midiprep de un cultivo de colonias de *E. coli* NEB 5-alpha transformadas con el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 recombinante, en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio.

1: Marcador 1k (Invitrogen, USA). 2: Vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 recombinante purificado colonia nº5.

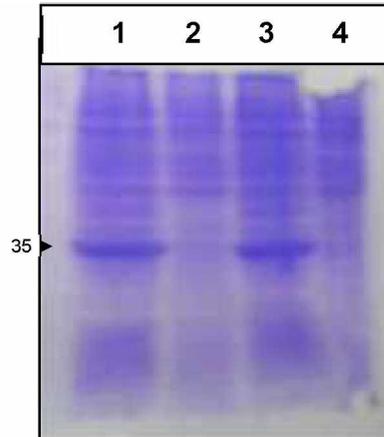
La concentración del pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup>-gp51 se obtuvo por espectrofotometría arrojando un valor de 328.0 ng/μl para la Midiprep de la colonia nº5.

Realizada la reacción de recombinación se efectuó la transfección de células Sf9. Al cabo de 72 hs de incubación se observaron signos de infección en el cultivo, a partir del cual se obtuvo el stock viral P1. Posteriormente se amplificó el stock viral P1 y se obtuvo un stock viral P2. Con el stock viral P2 se realizó un ensayo de placa de lisis del que se obtuvieron clones aislados del baculovirus (**Fig.: III.C.5**).



Fig.: III.C.5: Placas de lisis para el aislamiento de clon recombinante.

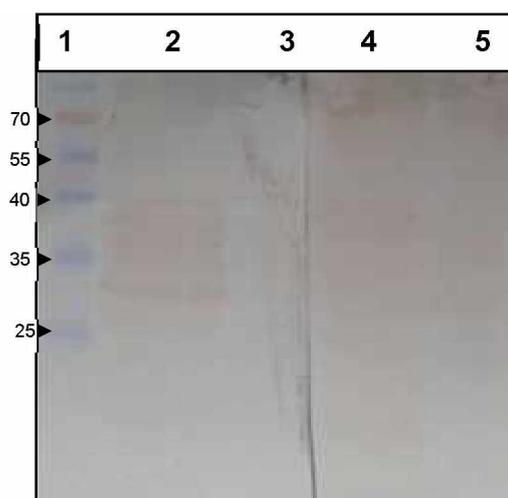
Para la evaluación de la expresión de la proteína gp51 recombinante por la técnica de SDS-PAGE se realizó con células Sf9 infectadas con clones aislados de baculovirus-gp51 recombinante. La tinción con azul brillante de Coomassie reveló la presencia de una banda de peso molecular aproximado a 34 kDA. Esta banda no fue detectada en la muestra correspondiente al control de células sin infectar (**Fig.: III.C.6**).



**Fig.: III.C.6:** Electroforesis en SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida, de muestras de cultivo de células de insecto Hi5 infectadas con baculovirus-gp51 recombinante obtenido por el sistema de expresión BaculoDirect™ GST Gateway®.

**1:** Células de cultivo Hi5 infectado con el baculovirus-gp51 recombinante Clon nº 1. **2:** Sobrenadante de cultivo Hi5 infectado con el baculovirus-gp51 recombinante Clon nº 1. **3:** Células de cultivo Hi5 infectado con el baculovirus-gp51 recombinante Clon nº 2. **4:** Sobrenadante de cultivo Hi5 infectado con el baculovirus-gp51 recombinante Clon nº2.

La expresión de la proteína recombinante gp51 se evaluó por la técnica de Western blot la cual evidenció la presencia y antigenicidad de una serie de bandas comprendidas entre los pesos molecular 34 kDa y 40 kDa (**Fig.: III.C.7**).



**Fig.: III.C.7:** Western blot de muestras de cultivo de células de insecto Hi5 infectadas con baculovirus-gp51 recombinante obtenido por el sistema de expresión BaculoDirect™ GST Gateway®.

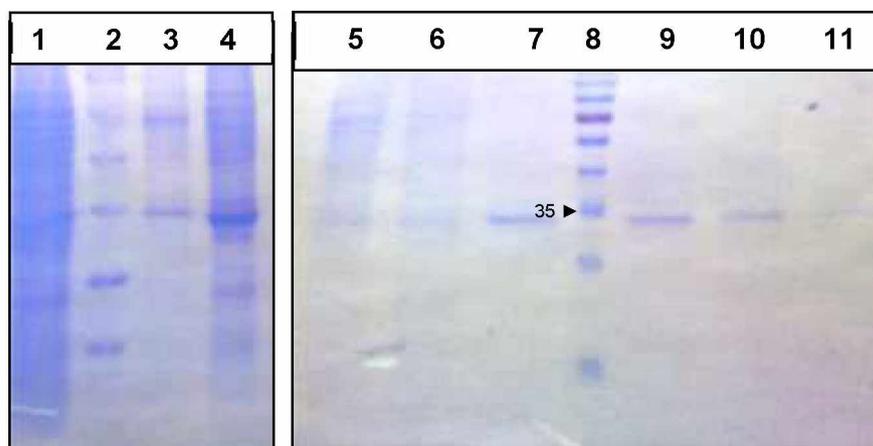
**1:** Marcador de peso molecular (Fermentas). **2 y 4:** Células de cultivo Hi5 infectado con el baculovirus-gp51 recombinante. **3 y 5:** Control de células Hi5 sin infectar. Las muestras 2 y 3 se incubaron con suero control positivo E4. Las muestras 4 y 5 se incubaron con suero control negativo.

Posteriormente, mediante la misma técnica de ensayo de placa de lisis, se determinó el título viral del clon seleccionado. El conteo de placas de lisis mediante la tinción de las mismas con una solución de rojo neutro, determinó un título de  $1 \times 10^7$  ufp/ml del stock viral.

Tanto el sobrenadante como el pellet resultantes del tratamiento de lisis de la fracción celular del cultivo de células de insecto infectadas con stock viral de baculovirus gp51 recombinante demostraron contener a la proteína gp51 recombinante (**Fig.: III.C.8** calle nº 3 y nº 4 respectivamente).

La tinción de las distintas fracciones obtenidas en los pasos de la purificación por diferencia de pH reveló la presencia de la proteína en todos los sobrenadantes de

elución (**Fig.: III.C.8** calle n° 7, n°9, n°10 y n°11) menos en los sobrenadantes de post adsorción y de los sucesivos lavados (**Fig.: III.C.8** calle n° 5 y n°6). La proteína gp51 recombinante se observa claramente concentrada y purificada en los diferentes sobrenadante de la elución (**Fig.: III.C.8** calle n°7, n°9, n°10 y n°11). Por comparación con patrón de seroalbumina de concentración conocida se estimó la concentración del primer y segundo eluato en 50 µg/ml y el tercero en 25 µg/ml.



**Fig.: III.C.8:** Electroforesis en SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida, del cultivo de células Hi5 infectadas con baculovirus-gp51 recombinante y fracciones del proceso de purificación. Tinción con Azul brillante de Coomasie.

**1:** Células de cultivo de células Hi5 infectadas con baculovirus-gp51 recombinante. **2:** Marcador de peso molecular (Fermentas). **3:** Sobrenadante del tratamiento con 0,3% de SDS y 1% de 2Me. **4:** Pellet resultante del tratamiento con 0,3% de SDS y 1% de 2Me. **5:** Sobrenadante post-adsorción en resina NiNTA. **6:** Primer lavado de la resina NiNTA-gp51r. **7:** Primer eluato con buffer de elución PO<sub>4</sub> pH6. **9:** Segundo eluato con buffer de elución PO<sub>4</sub> pH5. **10 y 11:** tercer y cuarto eluato con buffer de elución PO<sub>4</sub> pH4.

### III.D DESARROLLO DEL ELISA INDIRECTO

Se procesaron 270 sueros por las pruebas de IDGA (UNLP) y ELISA (VMRD, USA) de los cuales resultaron doble positivos y dobles negativos 97 y 100 respectivamente. Estos fueron escogidos como sueros estándar para realizar las pruebas de ELISA p24r/gp51r.

Las proteínas recombinantes y purificadas p24 y gp51 fueron utilizadas como antígeno para el desarrollo de una prueba de ELISA p24r/gp51r. Mediante la titulación de los reactivos por separado en damero, se establecieron las concentraciones de prueba para realizar el ensayo de damero del ELISA p24r/gp51r. Así mismo se realizó la titulación de los demás reactivos y tiempos de incubación y lavado.

Las concentraciones óptimas de cada una de las proteínas recombinantes p24r y gp51r, se eligieron en función del poder de discriminación entre sueros control positivo y negativo. **Figura III.D.1** y **Figura III.D.2** respectivamente.

Sueros +/-	p24r µg/ml					
	10	5	2.5	1.25	0.5	0.25
1/25	2.217	2.213	<b>2.077</b>	1.947	1.921	0,916
1/50	2.591	2.926	<b>2.884</b>	2.481	2,155	1,048
1/100	<b>2.902</b>	<b>2.591</b>	<b>3.223</b>	<b>2.707</b>	<b>2,57</b>	<b>2,347</b>
1/200	2.902	3.254	<b>3.830</b>	3.103	3.830	0,493

**Fig.: III.D.1:** Resultado del damero para ELISAp24r a los 20 minutos de lectura. Los valores que se presentan aquí corresponde al valor de BR (a la división de la OD que arrojó el suero positivo y la OD del suero negativo que representa las veces que el valor negativo está contenido en el positivo).

Suero s +/-	gp51 µg/ml					
	10	5	2.5	1.25	0.5	0.25
1/25	1,422	1,519	1,348	1,121	1,457	1,891
1/50	1,289	1,567	1,324	1,256	1,217	1,630
1/100	1,717	1,672	1,506	1,548	1,657	1,998
1/200	1,444	1,622	1,681	1,488	1,417	1,574

Fig.: III.D.2: Resultado del damero para ELISA gp50r a los 20 minutos de lectura. Los valores que se presentan aquí corresponden al valor de BR (a la división de la OD que arrojó el suero positivo y la OD del suero negativo que representa las veces que el valor negativo está contenido en el positivo).

Una vez seleccionadas las concentraciones óptimas de ambas proteínas recombinantes, se realizó una prueba de damero para el ELISA p24r/gp51r que incluye dos mezclas diferentes de antígeno. La mezcla nº 1 está compuesta por 250 ng/pocillo de p24r y 50 ng/pocillo de gp51r; y la mezcla nº 2 está compuesta por 250 ng/pocillo de p24r y 25 ng/pocillo de gp51r. Las diluciones de los sueros control positivo y negativo para este damero fueron 1/50, 1/100 y 1/200. Las lecturas se realizaron a los 15, 20, 30 y 40 minutos. Este esquema se realizó por duplicado en la misma placa y se grafica en términos de BR en la **figura nº III.D.3**.

Lectura	Sueros +/-	MEZCLA 1		MEZCLA 2	
15 min.	1/50	1,1704	1,6425	2,4587	2,0888
	1/100	2,0416	1,3055	2,0334	1,5250
	1/200	1,8299	2,8060	2,1142	2,6854
20 min.	1/50	1,5976	1,5301	2,3888	2,0947
	1/100	2,1133	1,7777	3,0391	3,0191
	1/200	3,2178	3,0118	4,3183	5,1975
30min.	1/50	2,0515	1,8537	2,0571	2,0018
	1/100	2,7157	2,2709	2,7784	3,0529
	1/200	3,8967	3,8393	4,0920	4,8431
40min.	1/50	1,9572	1,9277	2,0023	2,0175
	1/100	2,4651	2,3883	2,6894	2,8972
	1/200	3,7565	3,7796	4,0640	4,3265

Fig.: III.D.3: Resultado del damero para ELISA p24r/gp51r. Los valores que se presentan aquí corresponden a los BR: a la división de la OD que arrojó el suero positivo y la OD del suero negativo que representa cuantas veces el valor negativo está contenido en el positivo.

Una vez evaluado el damero para ELISA p24r/gp51r se establecieron los siguientes parámetros para realizar la puesta a punto del mismo:

- 1- La dilución de uso de los sueros problemas se estableció en 1/100.
- 2- Se escogió la mezcla nº 2 compuesta por 250 ng/pocillo de p24r y 25 ng/pocillo de gp51r como antígeno diagnóstico.
- 3- El tiempo de lectura se mantuvo en 15, 20, 30 y 40 minutos.
- 4- Se utilizaron valores normalizados para el análisis estadístico

Los sueros bovinos estándar, fueron utilizados como muestras problema en la prueba de ELISA p24r/gp51r.

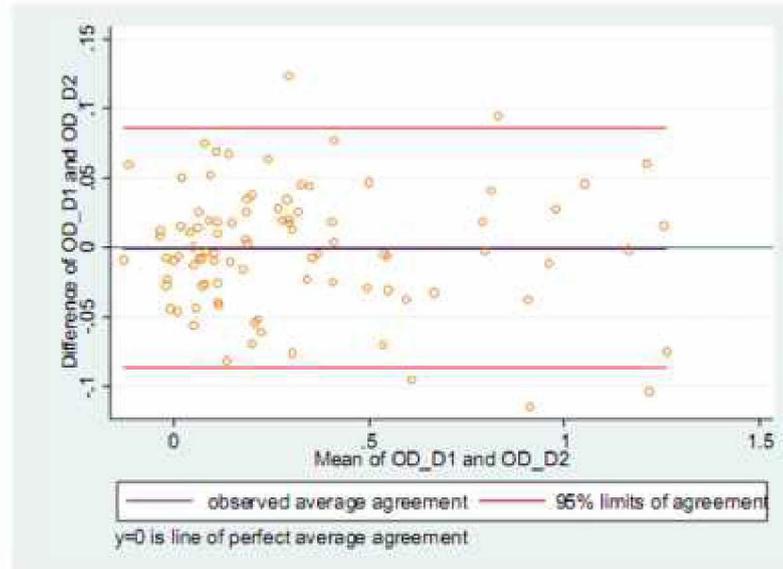
Se realizaron dos placas de ELISA p24r/gp51r con un día de diferencia, para determinar el grado de acuerdo. El coeficiente de concordancia (CCC) entre las 2 lecturas (pocillo 1 y pocillo 2) del mismo suero en la misma placa fue de 0.992 de CCC ( $p < 0.05$ ). **Tabla nº III.D.1**

Concordance correlation coefficient (Lin, 1989, 2000):						
rho_c	SE(rho_c)	obs	[ 95% CI ]		P	CI type
0.992	0.002	92	0.989	0.995	0.000	asymptotic
			0.988	0.995	0.000	z-transform
Pearson's r = 0.992 Pr(r = 0) = 0.000 C_b = rho_c/r = 1.000						
Reduced major axis: Slope = 0.990 Intercept = 0.003						
Difference = od_d1 - od_d2						
Difference		95% Limits Of Agreement				
Average	Std Dev.	(Bland & Altman, 1986)				
-0.000	0.044	-0.087		0.086		
Correlation between difference and mean = -0.082						
Bradley-Blackwood F = 0.312 (P = 0.73252)						

**Tabla nº III.D.1:** CCC para determinar la repetibilidad intraplaca. Grupo A de sueros .

Como complemento al CCC se realizó un gráfico de límites de acuerdo en donde se presenta la curva óptima, aquella que coincide con el valor "cero" del eje "y", así como los límites de dispersión al 95% de confianza (**Gráfico nº1**). En el mismo puede observarse una deseable proximidad entre la recta óptima y el nivel de

acuerdo observado; como así también que 5 valores quedan fuera de los límites de acuerdo.



**Gráfico nº1:** gráfico de límites de acuerdo

También se calculó el coeficiente de variación para 48 sueros del primer ensayo cuyos resultados se observan en la tabla nº III.D.1a.

Coeficiente de variación				
Lectura	10'	20'	30'	40'
MAX	20,39967	19,18736	14,38004	12,79831
MIN	0,032896	0,081910	0,063632	0,069312

**Tabla nº III.D.1a:** Coeficiente de variación para determinar la repetibilidad intraplaca. 48 sueros del Grupo A de sueros . Max: máxima variación. Min: mínima variación.

Según el análisis de los valores corregidos de OD mediante el programa Stata SE 11 (Stata Corporation, College Station, Texas, Estados Unidos), la selección del valor de corte se buscó según el valor de porcentaje de sueros correctamente clasificados, para este grupo de sueros fue 86.96%. Este valor se corresponde a una sensibilidad del 86.96% y una especificidad del 86.96%. (**Tabla nº III.D.2**).

. roctab gold\_od\_40, detail graph summary

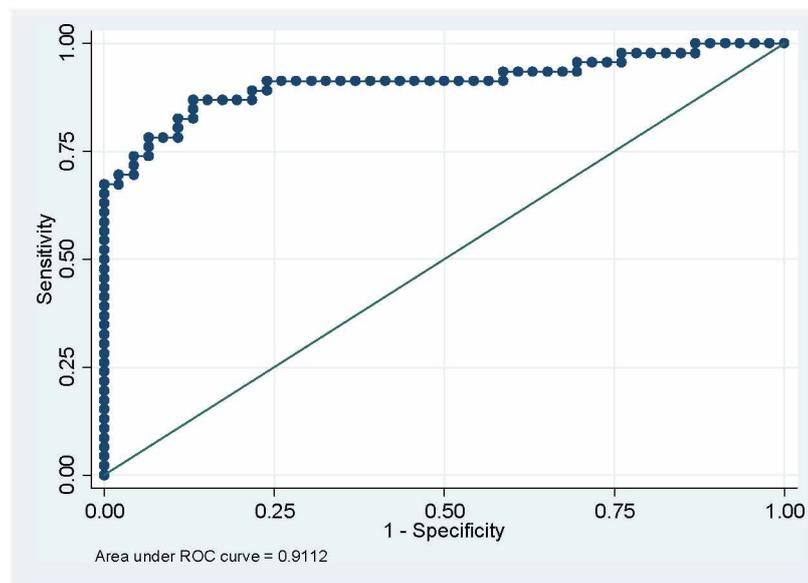
Detailed report of Sensitivity and Specificity

Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
( >= -.0577937 )	100.00%	0.00%	50.00%	1.0000	
( >= -.0558515 )	100.00%	2.17%	51.09%	1.0222	0.0000
( >= -.0540203 )	100.00%	4.35%	52.17%	1.0455	0.0000
( >= -.0202819 )	100.00%	6.52%	53.26%	1.0698	0.0000
( >= -.0170079 )	100.00%	8.70%	54.35%	1.0952	0.0000
( >= -.016675 )	100.00%	10.87%	55.43%	1.1220	0.0000
( >= -.0161201 )	100.00%	13.04%	56.52%	1.1500	0.0000
( >= -.0101826 )	97.83%	13.04%	55.43%	1.1250	0.1667
( >= -.0067421 )	97.83%	15.22%	56.52%	1.1538	0.1429
( >= -.0064092 )	97.83%	17.39%	57.61%	1.1842	0.1250
( >= -.0034127 )	97.83%	19.57%	58.70%	1.2162	0.1111
( >= .0050219 )	97.83%	21.74%	59.78%	1.2500	0.1000
( >= .0096831 )	97.83%	23.91%	60.87%	1.2857	0.0909
( >= .0178403 )	95.65%	23.91%	59.78%	1.2571	0.1818
( >= .0262749 )	95.65%	26.09%	60.87%	1.2941	0.1667
( >= .0270518 )	95.65%	28.26%	61.96%	1.3333	0.1538
( >= .0302702 )	95.65%	30.43%	63.04%	1.3750	0.1429
( >= .0326009 )	93.48%	30.43%	61.96%	1.3438	0.2143
( >= .0340436 )	93.48%	32.61%	63.04%	1.3871	0.2000
( >= .0404251 )	93.48%	34.78%	64.13%	1.4333	0.1875
( >= .0405915 )	93.48%	36.96%	65.22%	1.4828	0.1765
( >= .0458077 )	93.48%	39.13%	66.30%	1.5357	0.1667
( >= .0460851 )	93.48%	41.30%	67.39%	1.5926	0.1579
( >= .0463626 )	91.30%	41.30%	66.30%	1.5556	0.2105
( >= .0499695 )	91.30%	43.48%	67.39%	1.6154	0.2000
( >= .0513013 )	91.30%	45.65%	68.48%	1.6800	0.1905
( >= .0624549 )	91.30%	47.83%	69.57%	1.7500	0.1818
( >= .0680595 )	91.30%	50.00%	70.65%	1.8261	0.1739
( >= .0763831 )	91.30%	52.17%	71.74%	1.9091	0.1667
( >= .0833749 )	91.30%	54.35%	72.83%	2.0000	0.1600
( >= .0908107 )	91.30%	56.52%	73.91%	2.1000	0.1538
( >= .0919205 )	91.30%	58.70%	75.00%	2.2105	0.1481
( >= .0935298 )	91.30%	60.87%	76.09%	2.3333	0.1429
( >= .0937517 )	91.30%	63.04%	77.17%	2.4706	0.1379
( >= .0962488 )	91.30%	65.22%	78.26%	2.6250	0.1333
( >= .0971922 )	91.30%	67.39%	79.35%	2.8000	0.1290
( >= .0989124 )	91.30%	69.57%	80.43%	3.0000	0.1250
( >= .1118972 )	91.30%	71.74%	81.52%	3.2308	0.1212
( >= .1217191 )	91.30%	73.91%	82.61%	3.5000	0.1176
( >= .1227179 )	91.30%	76.09%	83.70%	3.8182	0.1143
( >= .1250485 )	89.13%	76.09%	82.61%	3.7273	0.1429
( >= .1332057 )	89.13%	78.26%	83.70%	4.1000	0.1389
( >= .1413629 )	86.96%	78.26%	82.61%	4.0000	0.1667
( >= .1432495 )	86.96%	80.43%	83.70%	4.4444	0.1622
( >= .1481327 )	86.96%	82.61%	84.78%	5.0000	0.1579
( >= .1525152 )	86.96%	84.78%	85.87%	5.7143	0.1538
( >= .1848677 )	86.96%	86.96%	86.96%	6.6667	0.1500
( >= .2114478 )	84.78%	86.96%	85.87%	6.5000	0.1750
( >= .2380279 )	82.61%	86.96%	84.78%	6.3333	0.2000
( >= .2447422 )	82.61%	89.13%	85.87%	7.6000	0.1951
( >= .2581155 )	80.43%	89.13%	84.78%	7.4000	0.2195
( >= .2701015 )	78.26%	89.13%	83.70%	7.2000	0.2439
( >= .2722657 )	78.26%	91.30%	84.78%	9.0000	0.2381
( >= .276594 )	78.26%	93.48%	85.87%	12.0000	0.2326
( >= .2884135 )	76.09%	93.48%	84.78%	11.6667	0.2558
( >= .2891904 )	73.91%	93.48%	83.70%	11.3333	0.2791
( >= .2909106 )	73.91%	95.65%	84.78%	17.0000	0.2727
( >= .2925198 )	71.74%	95.65%	83.70%	16.5000	0.2955
( >= .2948504 )	69.57%	95.65%	82.61%	16.0000	0.3182
( >= .2985683 )	69.57%	97.83%	83.70%	32.0000	0.3111
( >= .3056712 )	67.39%	97.83%	82.61%	31.0000	0.3333
( >= .3189335 )	67.39%	100.00%	83.70%		0.3261
( >= .3224294 )	65.22%	100.00%	82.61%		0.3478
( >= .337079 )	63.04%	100.00%	81.52%		0.3696
( >= .3446812 )	60.87%	100.00%	80.43%		0.3913
( >= .3500638 )	58.70%	100.00%	79.35%		0.4130
( >= .3813052 )	56.52%	100.00%	78.26%		0.4348
( >= .3861883 )	54.35%	100.00%	77.17%		0.4565
( >= .391127 )	52.17%	100.00%	76.09%		0.4783
( >= .4139892 )	50.00%	100.00%	75.00%		0.5000
( >= .5210865 )	47.83%	100.00%	73.91%		0.5217
( >= .5372344 )	45.65%	100.00%	72.83%		0.5435
( >= .5805172 )	43.48%	100.00%	71.74%		0.5652
( >= .6290162 )	41.30%	100.00%	70.65%		0.5870
( >= .669247 )	39.13%	100.00%	69.57%		0.6087
( >= .6897786 )	36.96%	100.00%	68.48%		0.6304
( >= .7507075 )	34.78%	100.00%	67.39%		0.6522
( >= .7691305 )	32.61%	100.00%	66.30%		0.6739
( >= .7808945 )	30.43%	100.00%	65.22%		0.6957
( >= .8102491 )	28.26%	100.00%	64.13%		0.7174
( >= .8634648 )	26.09%	100.00%	63.04%		0.7391
( >= .9384329 )	23.91%	100.00%	61.96%		0.7609
( >= .9410965 )	21.74%	100.00%	60.87%		0.7826
( >= .94376 )	19.57%	100.00%	59.78%		0.8043
( >= .9769436 )	17.39%	100.00%	58.70%		0.8261
( >= 1.011403 )	15.22%	100.00%	57.61%		0.8478
( >= 1.0998 )	13.04%	100.00%	56.52%		0.8696
( >= 1.104073 )	10.87%	100.00%	55.43%		0.8913
( >= 1.140586 )	8.70%	100.00%	54.35%		0.9130
( >= 1.148022 )	6.52%	100.00%	53.26%		0.9348
( >= 1.183203 )	4.35%	100.00%	52.17%		0.9565
( >= 1.203291 )	2.17%	100.00%	51.09%		0.9783
( > 1.203291 )	0.00%	100.00%	50.00%		1.0000

Obs	ROC Area	Std. Err.	—Asymptotic Normal— [95% Conf. Interval]	
92	0.9112	0.0329	0.84676	0.97554

**Tabla n° III.D.2:** Tabla ROC. Sueros dilución 1/100. Lectura a los 40 minutos.

El área bajo la curva ROC arrojó un valor de 0.91 el cual puede considerarse alto, con intervalos de confianza al 95% de 0.84 a 0.97 (**Grafico n° III.D.2**).



**Grafico n° III.D.2:** Curva ROC. Sueros dilución 1/100. Lectura a los 40 minutos.

Observando los valores de sensibilidad y especificidad correspondiente al porcentaje mas alto de clasificación correcta de la experiencia antes mencionada se decide realizar la misma experiencia pero utilizando 2 diluciones menos, 1/25 y 1/50, en una placa con el objetivo de mejorar los parámetros antes mencionados en base a un posible aumento de la lectura de OD para cada suero positivo y poder de esta manera mejorar la discriminación diagnóstica.

Como se observa en la tabla nº pipipi para la dilución 1/50 el valor de porcentaje de sueros correctamente clasificados fue de 91.30% que se corresponde a una sensibilidad del 86.96% y una especificidad del 95.65% **Tabla nº III.D.3**. El área bajo la curva ROC arrojó un valor de 0.94 el cual puede considerarse alto, con intervalos de confianza al 95% de 0.87 a 1 **grafico nº III.D.3**.

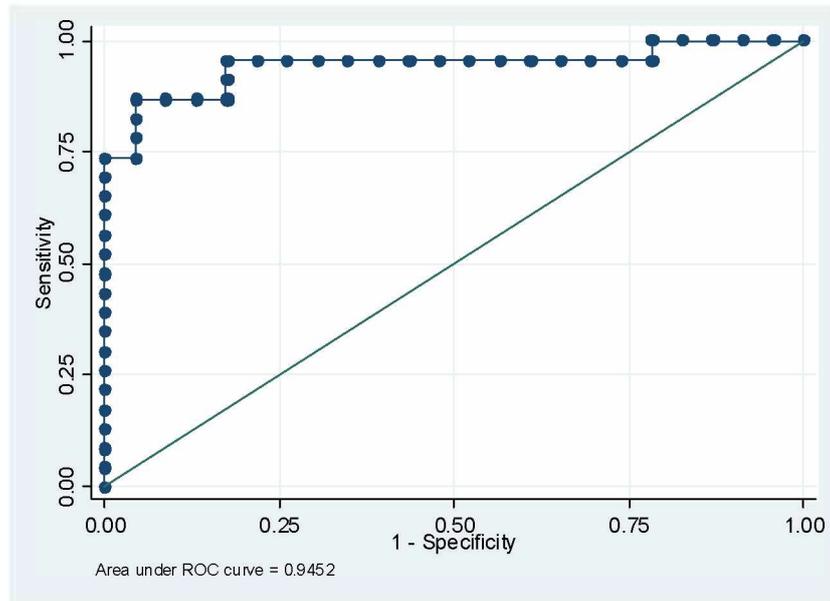
. roctab gold d40 if dilucion == 50, detail graph summary

detailed report of Sensitivity and Specificity

cutpoint	sensitivity	specificity	correctly classified	LR+	LR-
( >= -.3507479 )	100.00%	0.00%	50.00%	1.0000	
( >= -.3259162 )	100.00%	4.35%	52.17%	1.0455	0.0000
( >= -.2932311 )	100.00%	8.70%	54.35%	1.0952	0.0000
( >= -.2822363 )	100.00%	13.04%	56.52%	1.1500	0.0000
( >= -.2820868 )	100.00%	17.39%	58.70%	1.2105	0.0000
( >= -.2333957 )	100.00%	21.74%	60.87%	1.2778	0.0000
( >= -.2262154 )	95.65%	21.74%	58.70%	1.2222	0.2000
( >= -.2006357 )	95.65%	26.09%	60.87%	1.2941	0.1667
( >= -.1673523 )	95.65%	30.43%	63.04%	1.3750	0.1429
( >= -.157629 )	95.65%	34.78%	65.22%	1.4667	0.1250
( >= -.1381077 )	95.65%	39.13%	67.39%	1.5714	0.1111
( >= -.1231488 )	95.65%	43.48%	69.57%	1.6923	0.1000
( >= -.1150711 )	95.65%	47.83%	71.74%	1.8333	0.0909
( >= -.1114809 )	95.65%	52.17%	73.91%	2.0000	0.0833
( >= -.1020568 )	95.65%	56.52%	76.09%	2.2000	0.0769
( >= -.092558 )	95.65%	60.87%	78.26%	2.4444	0.0714
( >= -.05 )	95.65%	65.22%	80.43%	2.7500	0.0667
( >= -.0363874 )	95.65%	69.57%	82.61%	3.1429	0.0625
( >= -.0058714 )	95.65%	73.91%	84.78%	3.6667	0.0588
( >= .05 )	95.65%	78.26%	86.96%	4.4000	0.0556
( >= .1847794 )	95.65%	82.61%	89.13%	5.5000	0.0526
( >= .1903141 )	91.30%	82.61%	86.96%	5.2500	0.1053
( >= .2022064 )	86.96%	82.61%	84.78%	5.0000	0.1579
( >= .2176141 )	86.96%	86.96%	86.96%	6.6667	0.1500
( >= .2212042 )	86.96%	91.30%	89.13%	10.0000	0.1429
( >= .2306283 )	86.96%	95.65%	91.30%	20.0000	0.1364
( >= .2312266 )	82.61%	95.65%	89.13%	19.0000	0.1818
( >= .2711668 )	78.26%	95.65%	86.96%	18.0000	0.2273
( >= .2819372 )	73.91%	95.65%	84.78%	17.0000	0.2727
( >= .3730367 )	73.91%	100.00%	86.96%		0.2609
( >= .404899 )	69.57%	100.00%	84.78%		0.3043
( >= .4297307 )	65.22%	100.00%	82.61%		0.3478
( >= .4396036 )	60.87%	100.00%	80.43%		0.3913
( >= .4716904 )	56.52%	100.00%	78.26%		0.4348
( >= .4888183 )	52.17%	100.00%	76.09%		0.4783
( >= .4960733 )	47.83%	100.00%	73.91%		0.5217
( >= .5186612 )	43.48%	100.00%	71.74%		0.5652
( >= .6510471 )	39.13%	100.00%	69.57%		0.6087
( >= .7345176 )	34.78%	100.00%	67.39%		0.6522
( >= .7749065 )	30.43%	100.00%	65.22%		0.6957
( >= .8120045 )	26.09%	100.00%	63.04%		0.7391
( >= .8145475 )	21.74%	100.00%	60.87%		0.7826
( >= .9144727 )	17.39%	100.00%	58.70%		0.8261
( >= 1.041473 )	13.04%	100.00%	56.52%		0.8696
( >= 1.066978 )	8.70%	100.00%	54.35%		0.9130
( >= 1.104899 )	4.35%	100.00%	52.17%		0.9565
( > 1.104899 )	0.00%	100.00%	50.00%		1.0000

obs	ROC Area	std. Err.	—Asymptotic Normal— [95% Conf. Interval]	
46	0.9452	0.0368	0.87302	1.00000

**Tabla nº III.D.3:** Tabla ROC. Diluciones 1/50. Lectura a los 40 minutos.



**Grafico nº III.D.3.:** Curva ROC. Sueros dilución 1/50. Lectura a los 40 minutos.

Para la dilución 1/25, como se observa en la **tabla nº III.D.4** el valor de porcentaje de sueros correctamente clasificados fue de 93.48% que se corresponde a una sensibilidad del 95.65% y una especificidad del 91.30%. El área bajo la curva ROC arrojó un valor de 0.95, con intervalos de confianza al 95% de 0.89 a 1 **grafico nº III.D.4.**

```
. roctab gold d40 if dilucion == 25
```

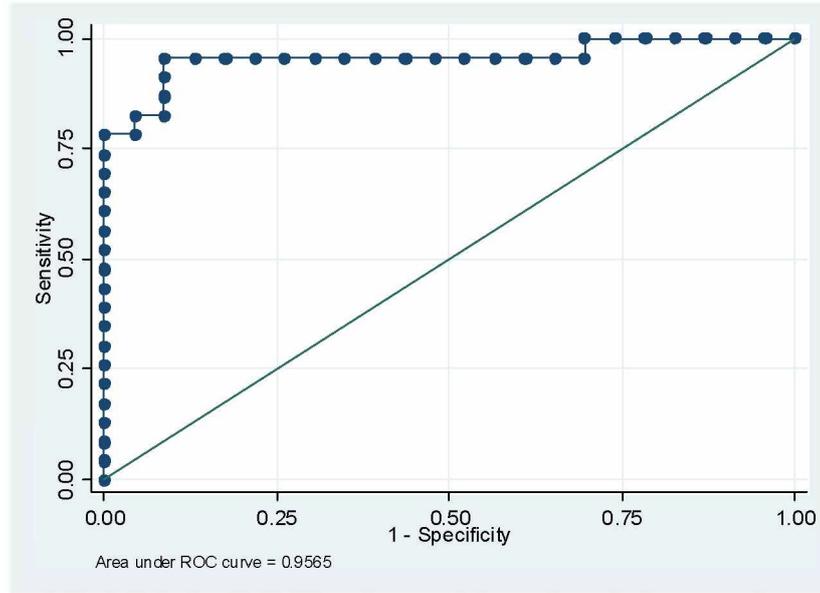
obs	ROC Area	Std. Err.	—Asymptotic Normal— [95% Conf. Interval]	
46	0.9565	0.0322	0.89336	1.00000

```
. roctab gold d40 if dilucion == 25, detail graph summary
```

Detailed report of sensitivity and specificity

Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
( >= -.1412491 )	100.00%	0.00%	50.00%	1.0000	
( >= -.0804413 )	100.00%	4.35%	52.17%	1.0455	0.0000
( >= -.0660808 )	100.00%	8.70%	54.35%	1.0952	0.0000
( >= -.0569559 )	100.00%	13.04%	56.52%	1.1500	0.0000
( >= -.0363126 )	100.00%	17.39%	58.70%	1.2105	0.0000
( >= -.0104338 )	100.00%	21.74%	60.87%	1.2778	0.0000
( >= .007816 )	100.00%	26.09%	63.04%	1.3529	0.0000
( >= .0213538 )	100.00%	30.43%	65.22%	1.4375	0.0000
( >= .0619671 )	95.65%	30.43%	63.04%	1.3750	0.1429
( >= .0788706 )	95.65%	34.78%	65.22%	1.4667	0.1250
( >= .0805161 )	95.65%	39.13%	67.39%	1.5714	0.1111
( >= .0915108 )	95.65%	43.48%	69.57%	1.6923	0.1000
( >= .11911 )	95.65%	47.83%	71.74%	1.8333	0.0909
( >= .1380329 )	95.65%	52.17%	73.91%	2.0000	0.0833
( >= .1793194 )	95.65%	56.52%	76.09%	2.2000	0.0769
( >= .2185116 )	95.65%	60.87%	78.26%	2.4444	0.0714
( >= .2523186 )	95.65%	65.22%	80.43%	2.7500	0.0667
( >= .2589005 )	95.65%	69.57%	82.61%	3.1429	0.0625
( >= .2675767 )	95.65%	73.91%	84.78%	3.6667	0.0588
( >= .2867988 )	95.65%	78.26%	86.96%	4.4000	0.0556
( >= .4043007 )	95.65%	82.61%	89.13%	5.5000	0.0526
( >= .4538893 )	95.65%	86.96%	91.30%	7.3333	0.0500
( >= .4574046 )	95.65%	91.30%	93.48%	11.0000	0.0476
( >= .465632 )	91.30%	91.30%	91.30%	10.5000	0.0952
( >= .5193343 )	86.96%	91.30%	89.13%	10.0000	0.1429
( >= .5469334 )	82.61%	91.30%	86.96%	9.5000	0.1905
( >= .6691474 )	82.61%	95.65%	89.13%	19.0000	0.1818
( >= .6824607 )	78.26%	95.65%	86.96%	18.0000	0.2273
( >= .6938295 )	78.26%	100.00%	89.13%		0.2174
( >= .6991399 )	73.91%	100.00%	86.96%		0.2609
( >= .734368 )	69.57%	100.00%	84.78%		0.3043
( >= .7852281 )	65.22%	100.00%	82.61%		0.3478
( >= .8059462 )	60.87%	100.00%	80.43%		0.3913
( >= .8306283 )	56.52%	100.00%	78.26%		0.4348
( >= .8312266 )	52.17%	100.00%	76.09%		0.4783
( >= .9054974 )	47.83%	100.00%	73.91%		0.5217
( >= .9473822 )	43.48%	100.00%	71.74%		0.5652
( >= .9582274 )	39.13%	100.00%	69.57%		0.6087
( >= 1.030703 )	34.78%	100.00%	67.39%		0.6522
( >= 1.035415 )	30.43%	100.00%	65.22%		0.6957
( >= 1.038482 )	26.09%	100.00%	63.04%		0.7391
( >= 1.052393 )	21.74%	100.00%	60.87%		0.7826
( >= 1.151496 )	17.39%	100.00%	58.70%		0.8261
( >= 1.178721 )	13.04%	100.00%	56.52%		0.8696
( >= 1.205123 )	8.70%	100.00%	54.35%		0.9130
( >= 1.21365 )	4.35%	100.00%	52.17%		0.9565
( > 1.21365 )	0.00%	100.00%	50.00%		1.0000

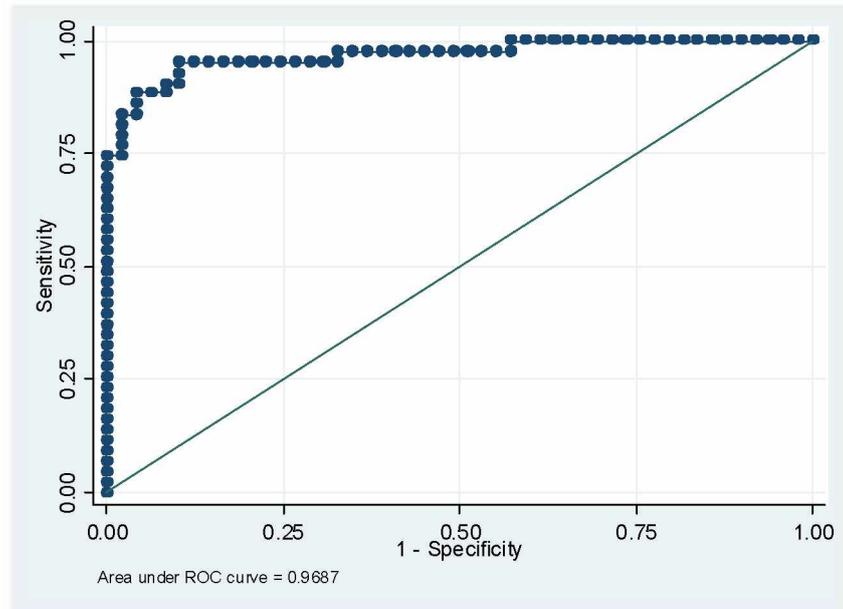
Tabla nº III.D.4: Tabla ROC. Diluciones 1/25. Lectura a los 40 minutos.



**Grafico nº III.D.4:** Curva ROC. Sueros dilución 1/25. Lectura a los 40 minutos.

Debido a los resultados ya descritos se decide realizar el lote de sueros restantes con dilución 1/25.

El análisis estadístico arroja el valor de sueros correctamente clasificados mas alto en 92.39% con un area bajo la curva ROC 0.96 (IC<sub>95%</sub> 0.91-1) 1 **grafico nº III.D.5**. La aplicación de este criterio permite identificar 2 posibles valores de corte con sus correspondientes valores de sensibilidad y especificidad **Tabla ROC nº III.D.5**.



**Grafico nº III.D.5:** Curva ROC. Sueros dilución 1/25. Lectura a los 40 minutos.

```
. use "E:\Leucosis Ale Larsen\sueros finales para la tesis 20140505.dta"
. drop in 93/94
(2 observations deleted)
. roctab gold pp_od_40, detail graph summary
```

Detailed report of Sensitivity and Specificity

Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
( >= -1.371806 )	100.00%	0.00%	46.74%	1.0000	
( >= -1.371555 )	100.00%	2.04%	47.83%	1.0208	0.0000
( >= -1.37072 )	100.00%	4.08%	48.91%	1.0426	0.0000
( >= -1.369384 )	100.00%	6.12%	50.00%	1.0652	0.0000
( >= -1.365208 )	100.00%	8.16%	51.09%	1.0889	0.0000
( >= -1.278353 )	100.00%	10.20%	52.17%	1.1136	0.0000
( >= -1.263404 )	100.00%	12.24%	53.26%	1.1395	0.0000
( >= -1.255804 )	100.00%	14.29%	54.35%	1.1667	0.0000
( >= -1.4402873 )	100.00%	16.33%	55.43%	1.1951	0.0000
( >= -1.347837 )	100.00%	18.37%	56.52%	1.2250	0.0000
( >= -1.3461667 )	100.00%	20.41%	57.61%	1.2564	0.0000
( >= -1.3242966 )	100.00%	22.45%	58.70%	1.2895	0.0000
( >= -1.2710038 )	100.00%	24.49%	59.78%	1.3243	0.0000
( >= -1.2602254 )	100.00%	26.53%	60.87%	1.3611	0.0000
( >= -1.2450942 )	100.00%	28.57%	61.96%	1.4000	0.0000
( >= -1.2354795 )	100.00%	30.61%	63.04%	1.4412	0.0000
( >= -1.2137284 )	100.00%	32.65%	64.13%	1.4848	0.0000
( >= -1.1975948 )	100.00%	34.69%	65.22%	1.5313	0.0000
( >= -1.1924169 )	100.00%	36.73%	66.30%	1.5806	0.0000
( >= -1.1864607 )	100.00%	38.78%	67.39%	1.6333	0.0000
( >= -1.1672315 )	100.00%	40.82%	68.48%	1.6897	0.0000
( >= -1.1529671 )	100.00%	42.86%	69.57%	1.7500	0.0000
( >= -1.1175046 )	97.67%	42.86%	68.48%	1.7093	0.0543
( >= -1.1101742 )	97.67%	44.90%	69.57%	1.7726	0.0518
( >= -1.1025555 )	97.67%	46.94%	70.65%	1.8408	0.0495
( >= -1.0923635 )	97.67%	48.98%	71.74%	1.9144	0.0475
( >= -1.0906297 )	97.67%	51.02%	72.83%	1.9942	0.0456
( >= -1.0790448 )	97.67%	53.06%	73.91%	2.0809	0.0438
( >= -1.0499645 )	97.67%	55.10%	75.00%	2.1755	0.0422
( >= -1.030026 )	97.67%	57.14%	76.09%	2.2791	0.0407
( >= -1.0134762 )	97.67%	59.18%	77.17%	2.3930	0.0393
( >= -1.0212126 )	97.67%	61.22%	78.26%	2.5190	0.0380
( >= -1.0315684 )	97.67%	63.27%	79.35%	2.6589	0.0368
( >= -1.0547719 )	97.67%	65.31%	80.43%	2.8153	0.0356
( >= -1.0659763 )	97.67%	67.35%	81.52%	2.9913	0.0345
( >= -1.081844 )	95.35%	67.35%	80.43%	2.9201	0.0691
( >= -1.0903933 )	95.35%	69.39%	81.52%	3.1147	0.0670
( >= -1.0973284 )	95.35%	71.43%	82.61%	3.3372	0.0651
( >= -1.1064702 )	95.35%	73.47%	83.70%	3.5939	0.0633
( >= -1.1267239 )	95.35%	75.51%	84.78%	3.8934	0.0616
( >= -1.146284 )	95.35%	77.55%	85.87%	4.2474	0.0600
( >= -1.1826457 )	95.35%	79.59%	86.96%	4.6721	0.0584
( >= -1.234174 )	95.35%	81.63%	88.04%	5.1912	0.0570
( >= -1.250532 )	95.35%	83.67%	89.13%	5.8401	0.0556
( >= -1.2900451 )	95.35%	85.71%	90.22%	6.6744	0.0543
( >= -1.3027819 )	95.35%	87.76%	91.30%	7.7868	0.0530
( >= -1.3064859 )	95.35%	89.80%	92.39%	9.3442	0.0518
( >= -1.3151549 )	93.02%	89.80%	91.30%	9.1163	0.0777
( >= -1.3353098 )	90.70%	89.80%	90.22%	8.8884	0.1036
( >= -1.3717393 )	90.70%	91.84%	91.30%	11.1105	0.1013
( >= -1.4008196 )	88.37%	91.84%	90.22%	10.8256	0.1266
( >= -1.3093556 )	88.37%	93.88%	91.30%	14.4341	0.1239
( >= -1.5295926 )	88.37%	95.92%	92.39%	21.6512	0.1212
( >= -1.340922 )	86.05%	95.92%	91.30%	21.0814	0.1455
( >= -1.5436205 )	83.72%	95.92%	90.22%	20.5116	0.1697
( >= -1.5555993 )	83.72%	97.96%	91.30%	41.0232	0.1662
( >= -1.5611947 )	81.40%	97.96%	90.22%	39.8837	0.1899
( >= -1.5810089 )	79.07%	97.96%	89.13%	38.7442	0.2137
( >= -1.5983135 )	76.74%	97.96%	88.04%	37.6046	0.2374
( >= -1.6195089 )	74.42%	97.96%	86.96%	36.4651	0.2611
( >= -1.6486554 )	74.42%	100.00%	88.04%		0.2558
( >= -1.6519032 )	72.09%	100.00%	86.96%		0.2791
( >= -1.6737332 )	69.77%	100.00%	85.87%		0.3023
( >= -1.6855687 )	67.44%	100.00%	84.78%		0.3256
( >= -1.692918 )	65.12%	100.00%	83.70%		0.3488
( >= -1.6997399 )	62.79%	100.00%	82.61%		0.3721
( >= -1.7003704 )	60.47%	100.00%	81.52%		0.3953
( >= -1.7786272 )	58.14%	100.00%	80.43%		0.4186
( >= -1.8227599 )	55.81%	100.00%	79.35%		0.4419
( >= -1.8341871 )	53.49%	100.00%	78.26%		0.4651
( >= -1.868298 )	51.16%	100.00%	77.17%		0.4884
( >= -1.8723902 )	48.84%	100.00%	76.09%		0.5116
( >= -1.8802405 )	46.51%	100.00%	75.00%		0.5349
( >= -1.8939369 )	44.19%	100.00%	73.91%		0.5581
( >= -1.9072992 )	41.86%	100.00%	72.83%		0.5814
( >= -1.9105524 )	39.53%	100.00%	71.74%		0.6047
( >= -1.9137297 )	37.21%	100.00%	70.65%		0.6279
( >= -1.9155174 )	34.88%	100.00%	69.57%		0.6512
( >= -1.9187485 )	32.56%	100.00%	68.48%		0.6744
( >= -1.9200768 )	30.23%	100.00%	67.39%		0.6977
( >= -1.9334069 )	27.91%	100.00%	66.30%		0.7209
( >= -1.9426257 )	25.58%	100.00%	65.22%		0.7442
( >= -1.9517288 )	23.26%	100.00%	64.13%		0.7674
( >= -1.9546518 )	20.93%	100.00%	63.04%		0.7907
( >= -1.9724403 )	18.60%	100.00%	61.96%		0.8140
( >= -1.003925 )	16.28%	100.00%	60.87%		0.8372
( >= -1.012444 )	13.95%	100.00%	59.78%		0.8605
( >= -1.037828 )	11.63%	100.00%	58.70%		0.8837
( >= -1.066514 )	9.30%	100.00%	57.61%		0.9070
( >= -1.094334 )	6.98%	100.00%	56.52%		0.9302
( >= -1.099298 )	4.65%	100.00%	55.43%		0.9535
( >= -1.103318 )	2.33%	100.00%	54.35%		0.9767
( >= -1.103318 )	0.00%	100.00%	53.26%		1.0000

obs	ROC Area	std. Err.	—Asymptotic Normal— [95% Conf. Interval]	
92	0.9687	0.0168	0.93581	1.00000

**Tabla nº III.D.5:** Tabla ROC. Diluciones 1/25. Lectura a los 40 minutos.

Según el porcentaje de correcta clasificación más alto se tomaron los dos valores de corte, CutOff 0.5, Cut Off 0.3 y acuerdo a los mismos se elaboran dos tablas de doble entrada (**Tabla nº III.D.6** y **Tabla nº III.D.7**), y un gráfico comparando ambos simultáneamente (**Grafico nº III.D.6**).

		CutOff 0.5		
		Neg	Pos	Total
Gold	Neg	46	3	49
	Pos	5	38	43
	Total	51	41	92

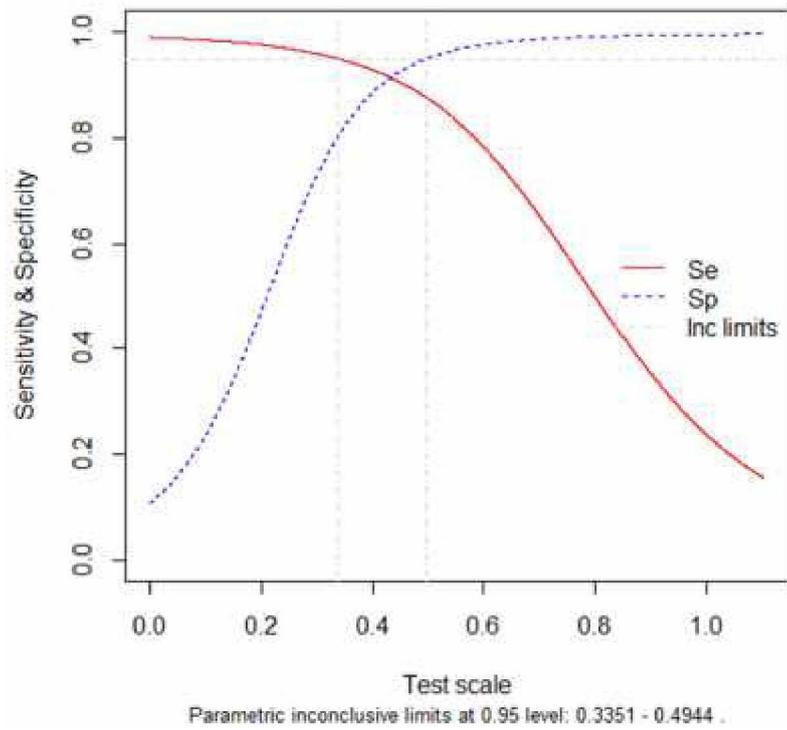
SS: 88.37%. ES: 95.35%

**Tabla nº III.D.6:** Tabla de doble entrada CutOff 0.5. Diluciones 1/25. Lectura a los 40 minutos.

		CutOff 0.3		
		Neg	Pos	Total
Gold	Neg	43	6	49
	Pos	2	41	43
	Total	45	47	92

SS: 95.35% ES: 89.80%.

**Tabla nº III.D.7:** Tabla de doble entrada CutOff 0.3. Diluciones 1/25. Lectura a los 40 minutos.



**Grafico n° III.D.6:** Ss y ES relativos calculados por el método paramétrito para ambos valores de corte por medio de TG-ROC.

## ANEXO I

Preparación de materiales y soluciones

### **1- Preparación de geles de agarosa:**

1,3% agarosa - Biodynamics, Argentina - *buffer* Tris-borato - EDTA 0,5X.

### **2- Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X:**

0,045M Tris base - Invitrogen, USA -

0,045M ácido bórico - Invitrogen, USA -

0,001M de EDTA - Merck, Argentina –

### **3- Solución stock de bromuro de etidio (10mg/ml):**

3gr de bromuro de etidio - SIGMA, USA - en 300ml de agua tridestilada.

- A partir de la solución *stock* se prepara la solución de trabajo 0,1µg/ml

### **4- Medio SOC:**

En 950ml de agua tridestilada disolver:

20gr triptona - Invitrogen, USA -

5gr extracto de levadura - Invitrogen, USA -

0,5gr de NaCl - Merck, Argentina -

- Disolver en agitación y agregar 10ml de una solución 250mM KCl - Invitrogen, USA

- Ajustar el pH a 7 con 5N de NaOH - Merck, Argentina -

- Esterilizar en autoclave

- Agregar 5ml de una solución 2M de MgCl<sub>2</sub> - Invitrogen, USA -

- Agregar 20ml de una solución estéril 1M de glucosa - WAKOPURE Chemical Industries, Japón -

**5- 2X buffer de muestra SDS-PAGE:**

0,09M Tris-HCl pH 6.8

20% glicerol - WAKOPURE Chemical Industries, Japón -

2% SDS - WAKOPURE Chemical Industries, Japón -

5% de β-mercaptoetanol - Merck-Schuchardt, Alemania - para condiciones reductoras

0,02% azul de bromofenol - WAKOPURE Chemical Industries, Japón -

**6- Buffer tris-glicina para electroforesis:**

25mM Tris base - Invitrogen, USA -

250mM glicina - GIBCO, BRL, USA -

0,1% SDS - WAKOPURE Chemical Industries, Japón -

**7- Solución de azul brillante de Coomassie 0,1%:**

0,5gr azul brillante de Coomassie - SIGMA, USA -

208,3ml metanol - Mallinckrodt Chemicals, USA -

208,3ml agua tridestilada

83,3ml ácido acético glacial - JT Baker, México

**8- Solución decolorante para geles de SDS-PAGE:**

10% ácido acético glacial - JT Baker, México -

30% metanol - Mallinckrodt Chemicals, USA -

60% agua tridestilada-

**9- Buffer para la electrotransferencia:**

25mM Tris base - Invitrogen, USA -

192mM glicina - GIBCO, BRL, USA -

20% metanol - Mallinckrodt Chemicals, USA -

**10- Buffer de bloqueo:**

PBS + 0,025% Tween-20-

4% p/v de leche descremada -Gibco-BD Bioscience, Francia-

**11- Solución de lavado:**

PBS de Tween 20 al 0.1% v/v- WAKOPURE Chemical Industries, Japón –

**12- Buffer para purificación en condiciones nativas a pH7:**

1Buffer de lisis (purificación de proteínas en sistema bacteriano):

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - Merck, Argentina -

500 mM NaCl - Merck, Argentina -

- Ajustar el pH a 8 con NaOH

**13- Buffer para purificación en condiciones nativas a pH6:**

1 Buffer de lisis (purificación de proteínas en sistema bacteriano):

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - Merck, Argentina -

500 mM NaCl - Merck, Argentina -

- Ajustar el pH a 6 con NaOH

**14- Buffer para purificación en condiciones nativas a pH5:**

1 Buffer de lisis (purificación de proteínas en sistema bacteriano):

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - Merck, Argentina -

500 mM NaCl - Merck, Argentina -

- Ajustar el pH a 5 con NaOH

**15- Buffer para purificación en condiciones nativas a pH4:**

1 Buffer de lisis (purificación de proteínas en sistema bacteriano):

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - Merck, Argentina -

500 mM NaCl - Merck, Argentina -

- Ajustar el pH a 4 con NaOH

**16-Calibre o Patron de PM de seroalbumina bovina**

Seroalbumina bovina -Merck, Argentina-

En agua tridestilada

**17- Medio Esencial Mínimo Suplementado (MEMS):**

Medio Mínimo Esencial (MEM)

0,3 mg/ml de glutamina

200 UI/ml de penicilina

0,5 mg/ml de estreptomicina

20 UI/ml de nistatina

10% de suero fetal bovino (SFB)

Ajustar el pH a 7,2 con bicarbonato de sodio al 7,5%

**20- Soluciones de la miniprep**

**a-Solución I**

15 mM Tris-HCl pH 8.0 - Invitrogen, USA -

10 mM EDTA- Merck, Argentina –

100 µg/ml ARNasa A

**b-Solución II**

0.2 N NaOH

1% SDS filtrado -WAKOPURE Chemical Industries, Japón-

**c-Solución III**

3 M Acetato de potasio pH 5.5

Autoclavar y almacenar a 4°C

**18- Solución salina para el clonado en pENTR™ /D-TOPO® (Invitrogen)**

300 mM NaCl - Merck, Argentina -

15mM MgCl<sub>2</sub> - Merck, Argentina -

**19- TE buffer pH 8.0**

10 mM Tris-Cl pH 8.0 - Invitrogen, USA -

1 mM EDTA - Merck, Argentina -

**21- Medio de plaqueo para ensayo en placa:**

30ml de medio Grace's - GIBCO, Invitrogen, UK -

2% SFB - Bioser, Argentina -

10ml de una solución de agarosa estéril al 4% - SIGMA,USA

**22- Colorante Rojo Neutro**

rojo neutro - WAKOPURE Chemical Industries, Japón. 1mg/ml

**23-PBS Buffer fosfato salino pH: 7,4:**

137 mM NaCl - Merck, Argentina -

2.7 mM KCl - Invitrogen, USA -

10 mM NaHPO - Merck, Argentina -

2mM KHHPO - Merck, Argentina -

- Ajustar el pH a 7.4 con HCl - JT Baker, México -

- Esterilizar en autoclave

**24-Buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6:**

50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - Invitrogen, USA -

50mM NaHCO<sub>3</sub> - Invitrogen, USA -

**25- Solución de lavado para ELISA:**

PBS + 0,05% Tween-20

**26- Solución diluyente para ELISA:**

PBS + 0,05% Tween-20

**27- Solución de bloqueo para ELISA:**

PBS + 0,025% Tween-20 + 0.5% p/v leche en polvo descremada (Skim Milk, DB-Difco, Francia)

**28- Revelador para ELISA:**

0,1M (50ml) ácido cítrico - Merck, Argentina -

0,2M (50ml) PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> - Invitrogen, USA -

10μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30vol

30mg ABTS (2,2' azino-bis (3ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) - SIGMA, USA –

## ANEXO II

Procedimiento y protocolos

### **1- Preparación de geles de agarosa:**

1,3% agarosa - Biodynamics, Argentina - *buffer* Tris-borato - EDTA 0,5X.

### **2- Cepas bacterianas utilizadas:**

En este trabajo se han utilizados varias cepas bacterianas, de acuerdo a las especificaciones de los manuales de los vectores utilizados.

- *E.coli* DH10Bac

- *E.coli* cepa Top10

### **3- Competencia química para bacterias:**

- Tomar una colonia aislada y cultivar en 10ml de LB durante toda la noche a 37°C en agitación.

- Realizar una dilución 1/100, incubar 2:15hs a 37°C en agitación.

- Tomar 500µl del cultivo y centrifugar a 3000rpm a 4°C durante 5min.

- Descartar el sobrenadante.

- Resuspender en 2ml de 100mM de MgCl<sub>2</sub> a 4°C.

- Centrifugar a 3000rpm a 4°C durante 5min.

- Descartar el sobrenadante.

- Resuspender en 1ml de 100mM de MgCl<sub>2</sub> a 4°C.

- Incubar 15min a 0°C.
- Centrifugar a 3000rpm a 4°C durante 5min.
- Descartar el sobrenadante.
- Resuspender en 1ml de 100mM de Cl<sub>2</sub>Ca - Merck, Argentina - a 4°C.
- Incubar 15min a 0°C.
- Centrifugar a 3000rpm a 4°C durante 5min.
- Descartar el sobrenadante.
- Resuspender en 1ml de una solución mixta de 100mM de Cl<sub>2</sub>Ca y 100mM de MgCl<sub>2</sub> a 4°C.
- Incubar 15min a 0°C.
- Agregar el 20% de glicerol - WAKOPURE Chemical Industries, Japón -.
- Alicuotar 200µl de las bacterias competentes y guardar a -70°C.

#### **4. Gel de poliacrilamida para SDS-PAGE**

Resolución (12,5%)		Siembra	
30% Bis/archilamida (29:1)	6.25 ml	30% Bis/Archilamida (29:1)	0.66 ml
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	3.75 ml	1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
10% SDS (pH 7.2)	150 µl	10% SDS (pH 7.2)	50 µl
H <sub>2</sub> O tridestilada	4.75 ml	H <sub>2</sub> O tridestilada	3 ml
10% APS	100 µl	10% APS	75 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl

***5- Tinción con rojo neutro:***

- Agregar a cada pocilio 0,5ml de una solución 1mg/ml de rojo neutro - WAKOPURE Chemical Industries, Jap
  
- Incubar 1 h a temperatura ambiente
  
- Eliminar el exceso de solución por inversión.

## CAPITULO V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Atendiendo la disparidad en la prevalencia de la enfermedad los dos tipos de explotación del ganado vacuno (explotación lechera y de carne) que reflejan las características de la enfermedad y se traducen en la disminución de la productividad del ganado y las pérdidas económicas indirectas por restricción del mercado internacional (Brenner y col., 1989; Pelzer y col., 1997) se hace necesario contar con herramientas de diagnóstico cada vez más sensibles, específicas y económicamente factibles de realizar en grandes poblaciones de animales para un control epidemiológico de la enfermedad.

Las proteínas estructurales p24 y gp51 son potentes inmunógenos y los anticuerpos contra ellos pueden ser detectados en la mayoría de los animales infectados con el VLB. En diferentes experiencias (Molly y col., 1990; Kittelberger y col., 1999; Gonzalez y col., 2001; Gutierrez y col., 2009), se demostró que a través de pruebas de alta sensibilidad fueron capaces de detectar anticuerpos anti-p24 días antes a la aparición de anticuerpos anti-gp51, donde el título de anticuerpos anti-p24 es igual o mayor al título de gp51. Teniendo en cuenta esta dinámica de anticuerpos, durante la respuesta inmune contra el VLB, la producción y persistencia de anticuerpos específicos anti-gp51 y anti-p24 es de por vida (González y col, 1988; Van der Maaten y col., 1990; Monti G., 2005), esta características hacen de las dos proteínas mas inmunogénicas, el antígeno perfecto para ser incluido en una prueba diagnóstica.

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo evaluar el potencial diagnóstico de las proteínas recombinantes p24 y gp51 del VLB en conjunto, como antígeno diagnóstico para un ensayo de ELISA indirecto.

Se utilizaron dos sistemas de producción para la proteína recombinante p24, el sistema de baculovirus en células de insecto y el sistema bacteriano en *E. coli*. Para la proteína gp51 recombinante se empleó el sistema de baculovirus exclusivamente.

El sistema de expresión en baculovirus es ampliamente utilizado en el campo de la investigación para el desarrollo de nuevas estrategias de producción de proteínas recombinantes para uso diagnóstico o como inmunógeno. La producción de antígenos virales en células de insectos por clonado en baculovirus, es una alternativa a la producción en sistemas bacterianos. Las ventajas que presenta este sistema son principalmente la eliminación de reacciones cruzadas potenciales, ya que el baculovirus carece de proteínas que puedan ser reconocidas por el sistema inmune, eliminando la posibilidad de resultados falsos positivos. La transcripción de codones empleados en los sistemas eucariotas y las correctas modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas eucariotas (plegamiento, formación de uniones disulfuro, oligomerización, glicosilación, clivaje proteolítico) aseguran el mantenimiento de la actividad biológica y características inmunogénicas de la proteína resultante; las características de bioseguridad del método y sobretodo la capacidad de producir grandes cantidades de proteína altamente homogénea son una importante ventaja (Hu Y., 2005). Todas estas características hacen de este sistema de expresión un sistema adecuado y muy ventajoso para la producción de proteínas recombinantes para ser utilizarlas como antígeno diagnóstico.

La producción del p24 y gp51 recombinante se llevó a cabo en células de insecto empleando tecnología de *GST Gateway*® para el sistema de expresión *BaculoDirect*™. La ventaja de este sistema radica en la eliminación del paso de transposición y selección en bacterias, evitando el paso crítico de la purificación por miniprep del ADN viral, por la transferencia directa del gen de interés, clonado en el vector de transferencia, al ADN viral. Esta estrategia preserva el ADN viral en mejores condiciones, lo que permite obtener un inóculo de mejor calidad, con mayor probabilidad de éxito en la transfección a las células de insecto.

Para todos los ensayos de producción de proteína recombinante en este sistema, el ADN del gen que codifica para la proteína p24 y gp51 se obtuvo mediante la técnica de PCR, a partir del ADN genómico de células FLK crónicamente infectadas con VLB. Una vez realizada la reacción de recombinación *in vitro* que permite la transferencia directa del gen en cuestión, incluido en los vectores de transferencia pENTR™ /D TOPO®, al ADN linearizado del baculovirus, se infectaron células de insecto, aislandose baculovirus recombinantes por ensayo en placa.

En la evaluación de la síntesis de proteína p24 en las células de insectos Sf9 por la técnica de SDS-PAGE, la tinción con azul brillante de Coomassie no reveló la presencia fehaciente de la banda correspondiente a la proteína recombinante p24, al proseguir con la técnica de Western blot, se comprobó la presencia y autenticidad antigénica de la proteína recombinante p24 frente a un suero control positivo internacional E4 tanto en el sobrenadante como en las células Sf9 infectadas con el baculovirus-p24 recombinante. La no evidencia de la proteína recombinante p24 en

el gel de poliacrilamida nos da un indicio de la posible baja expresión de la proteína en este sistema. Es así como investigamos la expresión de la proteína p24 recombinante en sistema bacteriano el vector pQE-30 *QIA Express vector*<sup>®</sup> (QIAGEN) que expresa las proteínas marcadas con 6xHis en *E. coli*, facilitando su purificación.

Con el producto p24 de PCR clonado exitosamente en el vector pQE-30 y la secuencia homologada correctamente, se transformaron *E. coli* M15 [pREP4] con el producto de la ligación pQE-30-p24. Las pruebas de SDS-PAGE y Western blot de las colonias elegidas, demostraron la presencia y antigenicidad de la proteína p24 recombinante; continuándose con la producción y purificación de la misma que alcanzó una concentración aproximada de 200 µg/ml en el batch unificado de los productos de elusión.

Para la producción de gp51 recombinante en células de insecto se utilizó la misma tecnología empleada para la producción de p24 recombinante y la secuencia homologada correctamente en el sistema BLAST. Logrado el baculovirus gp51 recombinante, se infectaron células de insecto Sf9 obteniendo el stock viral utilizado para la producción de la proteína.

Si bien se evidenció la presencia y antigenicidad de la proteína recombinante gp51, por la técnica de SDS-PAGE y Western blot, esta última técnica reveló la presencia de varias fracciones proteicas cuyos pesos moleculares oscilan de 34 kDa a 50 kDa aproximadamente. Todas estas proteínas o fracciones proteicas que migraron más rápido que la gp51 nativa podrían representar moléculas parcialmente glicosiladas, que de todos modos fueron reconocidas por el suero control manteniendo su

carácter de antigenicidad a pesar de la glicosilación incompleta. Situaciones similares fueron reportadas en trabajos previos por Giuseppe y col. (2004) en sistema de baculovirus. A la observación podemos inferir que la fracción más abundante es la que corresponde a la banda ubicada a la altura del control de peso molecular de 35kDa lo que indicaría que la mayor parte de esta mezcla de proteínas recombinantes estaría dada por la proteína menos o no glicosilada. Este perfil proteico se volvió a observar en el western blot, corroborando la identidad antigénica de todas las fracciones proteicas frente a un suero policlonal. Así mismo datos no mostrados en este trabajo, revelaron que todas las fracciones parcialmente glicosiladas de la gp51 recombinante aquí producida, fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal anti el epitope secuencial D-D'. Continuando con la producción y purificación de la proteína gp51 recombinante se alcanzó una concentración de 50 µg/ml.

El sistema de baculovirus fue el elegido para la producción de la proteína empleada en la prueba de ELISA indirecto, debido a la probada antigenicidad de la misma a pesar de la incompleta glicosilación, infiriendo que en el sistema bacteriano nos encontraríamos básicamente con un resultado similar, por lo cual sobre la base de lo observado decidimos continuar con el sistema de producción en células de insecto.

Para el desarrollo de la prueba de ELISA indirecto se ensayaron como antígenos las proteínas recombinantes purificadas, optimizadas y estandarizadas por la técnica de damero, que determinaron la concentración de uso del antígeno y la dilución de uso

de los sueros. Se ensayaron tres pruebas: dos pruebas de ELISA independientes para p24r y gp51r y una integrada: ELISA p24r/gp51r.

Pudimos comprobar que las placas de 96 pocillos (*Nunc Immuno Plate PolySorb, InterMed. Dinamarca*) fueron las únicas adecuadas para la sensibilización de las mismas con nuestros antígenos diagnóstico. La antigenicidad de ambas proteínas recombinantes empleadas conjuntamente se mantuvo durante el proceso de puesta a punto de los reactivos para la prueba de ELISA indirecto.

Los sueros bovinos analizados por la prueba de ELISA p24r/gp51r, fueron clasificados por dos pruebas oficiales (IDGA-kit producido por Laboratorio de Virología FCV-UNLP y ELISA-VMRD. USA) utilizándose aquellos que arrojaron resultados positivos y negativos a ambas pruebas.

Por el análisis de los resultados de los daderos se concluyó que un BR alto a una concentración dentro de los parámetros sugeridos por Crowther R. (Crowther R., 2009) determinaron la concentración de 2.5 ug/ml para p24r y para gp51r de 0.25 ug/ml. Estas concentraciones de antígenos se mantuvieron a lo largo de todos los ensayos. Para la realización de los cálculos y análisis de los resultados, se normalizaron los valores de absorbancia como valores de porcentajes de seropositividad.

De acuerdo al resumen de los estadísticos presentados en las tablas nº III.D.1 y nº III.D.1a y nº III.D.1b (análisis de CCC y CV respectivamente) los niveles de repetibilidad intraplaca se encuentran dentro de los valores establecidos para los estándar internacionales.

A través de los diferentes ensayos del ELISA p24r/gp51r donde se utilizaron diferentes diluciones de sueros, 1/100 1/50 y 1/25 se consiguió mejorar la performance de la prueba obteniendo, obteniendo mejoras en la SS y ES regido por el porcentaje de correcta clasificación más alto, acompañado por un coeficiente de verosimilitud 11. **Tabla nº IV.1**

Dilución	COff	SS%	ES%	CC%	CV+
A1/100	0.184	86.96	86.96	86.96	6.6
B1/50	1.643	86.96	95.65	91.30	20
D1/25	0.30	95.65	91.30	93.48	9.34
ELISA p24r/gp51r. Lectura a los 40 mint					

**Tabla nº IV.1:** Análisis estadístico por TG-ROC para los ensayos de ELISA p24r/gp51r. A-D: número de ensayo. COff: punto de corte; SD: sensibilidad diagnostica; ED: especificidad diagnostica; CC: Correcta clasificación. CV: coeficiente de verosimilitud.

Con el objetivo de revalidar los resultados obtenidos se determinó en número de muestras a procesar según el Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres (OIE, 2013) **Tabla nº IV.2**, donde se sugiere el numero teórico de muestras o sueros provenientes de animales con estado de infección conocido, requerido para establecer la sensibilidad y especificidad diagnostica con un grado de confianza conocido.

Teniendo en cuenta el valor de sensibilidad del 95.65% obtenido para el ensayo a una dilución 1/25 (ensayo C) se determinó el número de muestras a procesar con un 5% de error estimado y con un intervalo de confianza del 90%.

**Tabla 1. Cantidad teórica de muestras procedentes de animales cuyo estado de infección se sabe, necesaria para establecer las estimaciones de sensibilidad (DSe) y especificidad (DSp) diagnósticas con un nivel conocido de confianza**

Estimación de DSe o DSp	2% de error permitido en la estimación de la DSe y la DSp						5% de error permitido en la estimación de la DSe y la DSp					
	Confianza						Confianza					
	75%	80%	85%	90%	95%	99%	75%	80%	85%	90%	95%	99%
90%	257	389	475	610	854	1493	41	59	76	96	138	239
92%	210	302	389	466	707	1221	34	48	62	75	113	195
94%	161	232	298	382	542	935	26	37	48	61	87	150
95%	136	196	251	372	456	788	22	31	40	60	73	126
96%	110	158	203	260	369	637	18	25	32	42	59	102
97%	83	119	154	197	279	483	13	19	25	32	45	77
98%	56	80	103	133	188	325	9	13	16	21	30	52
99%	28	41	52	67	85	164	4	7	8	11	15	26

□ Porcentaje de error permitido en la estimación de la DSe o la DSp = 2% en el conjunto de la izquierda y 5% en el conjunto de la derecha. Para calcular el número de muestras necesario para errores del 1%, 3% y 4% en la estimación de la DSe y la DSp, se multiplica el número de muestras del conjunto de la izquierda de la tabla por un factor de 4.0, 0.44 y 0.25, respectivamente.

**Tabla nº IV.2:** Número teórico de muestras, de animales con estado de infección conocido, necesario para estimar sensibilidad (DSe<sup>+</sup>) y especificidad (DSp<sup>+</sup>) diagnósticas en base a la probable Dse o Dsp y a un nivel de confianza y margen de error deseados. (+: por sus siglas en inglés: diagnostic sensibility, diagnostic specificity)

En nuestro estudio se analizan un total de 92 sueros. El análisis estadístico arroja el valor de sueros correctamente clasificados más alto en 92.39%. Para el valor de corte de 0.3 la sensibilidad fue de 95.35% y la especificidad del 89.80%. Para el valor de corte de 0.5 la sensibilidad fue de 88.37% y la especificidad del 95.35%.

De acuerdo a la correcta clasificación diagnóstica de los sueros se plantean dos situaciones posibles con diferentes resultados de SS y ES. La elección de uno u otro valor o de un tercer valor comprendido entre los mismos, dependerá de la posible aplicación de la herramienta diagnóstica en la rutina de laboratorio. Si se deseara

una herramienta de alta SS deberíamos seleccionar el valor 0.3 y si en cambio deseáramos alta ES seleccionaríamos el valor de 0.5.

La Organización mundial para la Salud Animal (OIE) determina que las pruebas para el diagnóstico de LEB son el IDGA y ELISA Indirecto. En nuestro país la autoridad sanitaria acepta estas dos pruebas oficiales de acreditación, pero hasta el momento no existe ELISA comerciales de producción nacional. El objetivo de desarrollar una prueba diagnóstica que incluya a la proteína gp51 y p24, esta última hasta ahora no incluida en ninguna prueba comercial, es mejorar la SS y ES en el diagnóstico.

Atendiendo la disparidad en la prevalencia de la enfermedad entre los dos tipos de explotación del ganado vacuno (lechera y de carne) que reflejan las características de la enfermedad y se traducen en la disminución de la productividad del ganado y las pérdidas económicas indirectas por restricción del mercado internacional (Brenner y col., 1989; Pelzer y col., 1997) se hace necesario contar con herramientas de diagnóstico cada vez más sensibles, específicas y económicamente factibles de realizar en grandes poblaciones de animales para un control epidemiológico de la enfermedad.

Del análisis de los resultados podemos concluir que el ELISA p24/gp51 podría ser considerado como una alternativa válida al IDGA para el diagnóstico de LEB. Sin embargo se deberían analizar un mayor número de muestras para convalidar los valores preliminares obtenidos en este estudio y darle robustez a esta sugerencia.

## **BIBLIOGRAFIA**