



**ANALISIS DE REACTIVIDAD DE LA PROTEINA p26 DEL
VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (AIE)
UTILIZANDO DIFERENTES METODOS DE DIAGNOSTICO**

Tesis de Maestria en Microbiología Molecular

Universidad Nacional de San Martín

ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán

Maestrando: M.V. Mónica Susana Ayerbe

Director: Dr. Marcelo Pecoraro

Codirector: Dr. Guillermo Hernán Sguazza

Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de la Plata
2012

Jurados: Dra. Viviana Malirat, Dr. Carlos Pacífico, Dr. Osvaldo Periolo

Buenos Aires, 14 de diciembre de 2012

Mi agradecimiento a mi director por depositar su confianza en mi aceptándome como tesista y por sus acertados aportes durante el proceso de desarrollo del trabajo.

A mi codirector por su más que infinita paciencia, generosidad y humildad.

A La Cátedra de Virología de La Facultad de la Plata por recibirme durante estos años y a su gente por hacerme sentir como en casa....

A mi familia que comprendió y no cuestionó el tiempo pasado frente a la computadora y en la lectura.

A mi mamá que es mi gran compañera, por escucharme y tratar de interiorizarse sobre la tesis aunque el tema le fuera completamente ajeno y a mi papá que con su ejemplo de tenacidad seguramente contribuyó a que no baje los brazos no solo en este emprendimiento en particular

A mis amigos de la vida y a los amigos y compañeros del trabajo que me alentaron a que termine lo que comencé hace tiempo.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
1.Introducción	3
1.1 Taxonomía	3
1.2 Historia de la enfermedad	3
1.3 Patogenia	4
1.4 Signos clínicos	4
1.5 Lesiones macro y microscópicas	5
1.6 Epizootiología	6
1.7 Transmisión y tropismo tisular	6
1.8 Prevención y control	7
1.9 Diagnóstico	8
1.10 Características del virus	9
1.11 Replicación	11
1.12 Propiedades biológicas y en cultivos celulares	12
1.13 Respuesta inmune	13
1.14 Variaciones genéticas del virus AIE	14
1.15 Situación en Argentina	15
2 Objetivos	18
2.1 Objetivos Generales	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 Materiales y métodos	19
3.1 Obtención de la proteína p26 recombinante.	19
3.2 Producción de antígeno viral en cultivo de células	21
3.3 Obtención del virus concentrado y parcialmente purificado	21
3.4 RT-PCR	22
3.5 Muestras de sueros problemas.	24
3.6 Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).	24
3.7 ELISA de Competición (cELISA)	25
3.8 Western Blot (WB).	26
3.8.1 Preparación de reactivos	26
3.8.2 Electroforesis (SDS-PAGE)	27

3.8.3- Transferencia e inmovilización en membrana de nitrocelulosa y bloqueo	28
3.8.4- Incubación con anticuerpos	28
3.8.5- Revelado e interpretación	29
3.9 - Comparación de la sensibilidad analítica o límite de detección de las técnicas con algunos sueros por dilución a punto final	29
3.10 ELISA Indirecto (iELISA)	29
3.10.1 Principios de la técnica	29
3.10.2- Preparación de reactivos:	30
3.10.3- Pegado del antígeno	30
3.10.4- Bloqueo	30
3.10.5 Incubación con los sueros problema y el anticuerpo secundario	30
3.10.6-Revelado	31
3.10.7 Prueba en damero	31
3.11 Sensibilidad y especificidad comparativas	32
4. Resultados	33
4.1 Obtención de la proteína p26 recombinante	33
4.2 Replicación viral en cultivos celulares	33
4.3 Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)	34
4.4 ELISA de competición (cELISA)	34
4.5 Western Blot (WB)	35
4.6 Comparación de algunos sueros con dilución a punto final	39
4.7 ELISA Indirecto (iELISA)	39
4.8 Análisis estadístico de los resultados	41
4.9 Resultado de los 200 sueros analizados con cada técnica	44
5 Discusión	46
6 Conclusiones	52
7 Referencias	54

RESUMEN

El virus de la Anemia Infecciosa Equina (AIE), perteneciente a la Familia *Retroviridae*, Subfamilia *Orthoretrovirinae*, Genero *Lentivirus*, ocasiona infección persistente en equinos, asnos y mulas (Familia *Equidae*), caracterizada por episodios irregulares de fiebre, depresión y anemia separados por períodos asintomáticos de quiescencia clínica. El virus tiene un genoma ARN de cadena simple con tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica una proteína de 26Kd denominada p26, que es la proteína mayor de la cápside, constituyendo aproximadamente un 40% del total de la proteína del virión.

En 1970, al descubrirse que caballos infectados con AIE poseían anticuerpos precipitantes contra la proteína p26, Coggins y Norcross adaptaron un método confiable para la detección de anticuerpos en sueros de animales infectados denominado: prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) o prueba de Coggins. Esta técnica es la aceptada para tránsito internacional e interno de equinos. El antígeno utilizado en la prueba diagnóstica es preparado a partir de virus parcialmente purificado obtenido de cultivos celulares infectados y posteriormente tratado químicamente para liberar la p26. Este método de producción es de alto costo y bajo rendimiento. Si bien esta técnica ha sido una herramienta diagnóstica certera para la detección de animales infectados a partir de su implementación en los años 70, existen sueros que resultan difíciles de diagnosticar debido a que dan reacciones positivas muy débiles (borderline). En un trabajo previo la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata desarrolló un sistema heterólogo de producción de proteínas, utilizando *Escherichia coli*, para la expresión y purificación de grandes cantidades de proteína p26 recombinante (p26r) de alta calidad. Con el objetivo de analizar la reactividad de la p26r, la proteína fue utilizada como antígeno en diversas técnicas diagnósticas y se comparó su desempeño frente a 200 sueros diagnosticados previamente por las técnicas de IDGA y test de cELISA con equipos comerciales en el laboratorio de DILAB, SENASA. De este modo estos sueros fueron procesados en la Cátedra de Virología utilizando las técnicas de ELISA Indirecta y Western Blot (WB) usando para ambas técnicas la proteína p26r.

Con la técnica de ELISA indirecta se realizaron estudios de factibilidad, que demostraron la necesidad de obtener un antígeno p26r más puro para poder avanzar en la estandarización de la misma.

Con la técnica de WB se obtuvieron resultados comparables a los previamente determinados por las técnicas de IDGA y cELISA y de mayor sensibilidad que la IDGA, pudiendo confirmar o descartar resultados sospechosos o equívocos obtenidos con la IDGA. No obstante, como los sueros fueron enfrentados con un antígeno recombinante a p26, o con antígeno obtenido con métodos que eliminan las glicoproteínas de superficie, sólo se encontró en los sueros positivos la banda correspondiente a esa proteína y no otras bandas a otros antígenos del virus AIE, por lo cual se concluye que, siguiendo los estándares internacionales (DVL, NVSL, APHIS, USDA, USA) para el diagnóstico de AIE, se recomienda incorporar otros antígenos (como mínimo una de las glicoproteínas de superficie del virus) a las tiras del WB, de forma que esta técnica pueda ser usada como método confirmatorio.

ABSTRACT

Equine Infectious Anemia Virus (EIAV), that belongs to the Family *Retroviridae*, Subfamily *Orthoretrovirinae*, Genus *Lentivirus*, gives a persistent infection in equines, donkeys and mules (Family *Equidae*), characterized by irregular episodes of fever, depression and anemia separated by asymptomatic periods of clinical quiescence. The virus has a single stranded RNA genome with three main genes: gag-env and pol. The gag gene encodes the p26 protein, that is the mayor core protein and constitutes approximately 40% of the virion total protein.

In 1970, when it was discovered that equines infected with EIA had precipitant antibodies against p26 protein, Coggins and Norcross adapted a reliable method for the detection of antibodies in infected animal sera named: Agar Gel Immunodiffusion Test (AGID) or Coggins Test. This technique is accepted for international and internal horse movement. The antigen used in the diagnostic test is prepared from partially purified virus obtained from infected cell cultures and afterwards chemically treated to release p26. This production method is expensive and gives a low yield. Notwithstanding that this technique has been an accurate diagnostic tool for the detection of infected animals since it was implemented in the 70s, there are sera difficult to diagnose as they give very weak positive reactions (borderline). In a previous work the Virology Department, Veterinary Sciences Faculty, La Plata University, developed an heterologous system for protein production using *Escherichia coli*, for the expression and purification of large volumes of high quality recombinant p26 protein (p26r). With the goal of analyzing p26r reactivity, the protein was used as antigen in diverse diagnostic tests and its performance was compared against 200 sera that had been already diagnosed by AGID and cELISA tests with commercial kits in DILAB, SENASA laboratory. So the sera were processed in the Virology Department using a Western Blot test (WB) and an Indirect ELISA assay using in both of them p26r.

With the indirect ELISA test factibility studies were carried out that demonstrated the need for a higher purified antigen p26r to be used in the standardization of the method. The WB test gave results comparable to the previously obtained by AGID and cELISA tests, proving to be more sensitive than the AGID, and allowing to confirm or discard doubtful or equivocal results obtained by the AGID. Nonetheless, as the sera were confronted with a recombinant p26 antigen, or with antigen obtained by methods that eliminated the surface glycoproteins, the positive sera only gave one band that corresponded to p26 and no other band to the other antigens of the EIA virus. So it is concluded that, following the international standards (DVL, NVSL, APHIS, USDA, USA) for EIA diagnostic, it is advisable to include other antigens (at least one of the virus surface glycoprotein) in the WB strips so that this test could be used as a confirmatory one.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 TAXONOMIA

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es causada por un virus perteneciente a la Familia: *Retroviridae*, Sufamilia: *Orthoretrovirinae*, Genero: *Lentivirus*. (Clasificación del ICTV. División Virología). Existen 9 especies de lentivirus que pueden ser agrupadas en cinco grupos en base a los huéspedes que infectan: primates (ej. Virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 y el Virus de la inmunodeficiencia del simio), ovejas y cabras (ej. El virus de la artritis encefalitis caprina y el virus Maedi-Visna), felinos (ej. Virus de la inmunodeficiencia felina y el lentivirus del puma), bovinos (ej. Virus de la inmunodeficiencia bovina) y caballos (ej. Virus de la anemia infecciosa equina).

Todos estos virus están compuestos por un genoma de ARN de simple cadena que se replica en la célula huésped mediante transcripción inversa, es decir, mediante la formación de ADN a partir del molde ARN por medio de su ADN polimerasa ARN dependiente (Archer, 1977), lo que los ubicaba históricamente dentro del Grupo VI de la antigua Clasificación de Baltimore.

1.2 HISTORIA DE ESTA ENFERMEDAD

La Anemia Infecciosa Equina, coloquialmente denominada “fiebre de los Pantanos”, ha sido documentada en áreas geográficas diversas. Descrita por primera vez en Francia en 1843 por Ligné, fue la primer enfermedad de equinos en ser asociada a una etiología viral con infección por un “agente filtrable” en 1904 por Valle y Carre, precediendo en varios años el gran descubrimiento de Rous del primer virus tumoral (Leroux, 2004).

Desde 1800 hay datos de la existencia de brotes en el oeste y otras regiones de Estados Unidos y se ensayaron varias pruebas para el diagnóstico de la AIE. A principios de los años 1960, se desarrolló la prueba de precipitina en tubo que resultó poco eficaz. Por otro lado en Japón se implementó un método utilizando la Fijación del Complemento pero sólo detectaba anticuerpos durante pocos meses. (Coggins, 1973).

En los primeros estudios de esta enfermedad, se inocularon ponies con un aislamiento de la cepa Wyoming del virus de la AIE obtenido por replicación en cultivo de leucocitos de equino durante 9 días. Los animales inoculados adquirirían un estado febril a partir de los 5 días y a los 10 días post-inoculación eran sacrificados y se les removía el bazo que luego era procesado para obtener un extracto, el cual reaccionaba en tests de inmunodifusión en gel de agar con suero de equinos sobrevivientes a repetidos desafíos con el virus (Coggins, 1970).

Fue así como los Dres Coggins y Norcross adaptaron la técnica de Inmunodifusión en gel de agar (IDGA) a la detección de anticuerpos contra el virus de la AIE, que sigue vigente como prueba internacionalmente aceptada para tránsito de equinos (Gold Standard). De este modo se reemplazaron las pruebas de inoculación de equinos que eran caras, se desperdiciaban animales y requerían instalaciones para aislamiento.

En Argentina esta enfermedad fue incorporada al artículo 6º del Reglamento General de Policía Sanitaria de los Animales por Decreto N° 991 del 14 de marzo de 1969 debido a que por la naturaleza de la enfermedad, sobre todo en lo concerniente a animales enfermos inaparentes, se consideraba imprescindible evaluar su difusión (De la Sota, 2005).

1.3 PATOGENIA

La transmisión del virus se realiza en forma mecánica por insectos vectores (artrópodos hematófagos) o fuentes iatrogénicas como agujas y jeringas contaminadas. La principal ruta es por insectos de la Familia *Tabanidae*. El virus es transportado en las partes bucales. Se ha clonado y caracterizado un receptor celular funcional para el virus AIE, designado Receptor 1 de Lentivirus equino (R1LE) el cual parece ser suficiente para mediar la infección viral productiva en ausencia de co-receptor y a través de una vía endocítica pH dependiente (Jin, 2005).

Durante la infección se produce hipergamaglobulinemia, en el suero se forman complejos de virus infeccioso y anticuerpo y hay deposición glomerular del tercer componente del Complemento (C3) e inmunoglobulina con actividad antiviral. Las causas de la anemia son complejas. Existe hemólisis intravascular y extravascular y los eritrocitos remanentes tienen mayor fragilidad osmótica, están recubiertos por C3 pero no llevan anticuerpos fácilmente detectables. La anemia se complica posteriormente por una depresión de la producción eritroide en la médula ósea. Los niveles de IgG(T), una subclase de inmunoglobulina del equino disminuye aún en presencia de hipergamaglobulinemia (McGuire, 1976).

Una vez concluido el ciclo viral, el virus de AIE sale de la célula huésped por brotación desde las membranas citoplasmáticas (Montelaro, 1982).

1.4 SIGNOS CLÍNICOS

La enfermedad está caracterizada por tres estadios definidos: agudo, crónico y asintomático de larga duración. El período de incubación está relacionado al título de virus y a factores individuales relacionados al huésped que hacen variar la progresión de la enfermedad (Cullinane, 2007).

La enfermedad aguda inicial (definida como el primer episodio clínico) se observa generalmente entre las 3 y 4 semanas post infección y está asociada con altos niveles de viremia y síntomas

clínicos incluyendo fiebre ($>39^{\circ}\text{C}$ pudiendo llegar a 42°C), diarrea, letargo, edema, pérdida de peso, trombocitopenia ($< 10^5$ plaquetas/ μl de sangre), y anemia. La fagocitosis de anticuerpos, plaquetas recubiertas de complemento y eritrocitos por los macrófagos titulares puede estimular la liberación de citoquinas proinflamatorias que inducen fiebre. Es también posible que la replicación de virus en las mismas células potencie la liberación de citoquinas (Clabough, 1991). Los niveles de ARN viral presentes en el plasma durante la fase aguda fluctúan entre las 10^7 a 10^8 copias de ARN viral por ml de plasma, mientras que en los estadios asintomáticos de la infección el número de copias disminuye a menos de 100 copias por ml (Harrold, 2000). El clearance de la viremia inicial ha sido correlacionado con la aparición de linfocitos T citotóxicos CD8+ y anticuerpos específicos no neutralizantes (Hammond, 1997).

Si bien, algunos equinos infectados pueden experimentar solamente un episodio de anemia, la mayoría de las infecciones progresan a la forma crónica, caracterizada por ciclos repetidos de enfermedad y picos de viremia asociada. Los ciclos agudos de 3 a 7 días de duración, ocurren a intervalos irregulares, separados por semanas o meses, con un promedio de seis a ocho episodios de la enfermedad dentro del primer año post infección. Luego la mayoría de los equinos se tornan asintomáticos para AIE indefinidamente, presumiblemente debido al desarrollo de respuesta inmune protectora del huésped. Sin embargo, estos portadores inaparentes permanecen infectados de por vida manteniendo niveles subclínicos de replicación viral (Leroux, 2001). Esto se debe a la existencia de reservorios tisulares de células que se mantienen productivamente infectados a pesar de los altos niveles de control inmune establecidos por el huésped (Harrold, 2000).

1.5 LESIONES MACRO Y MICROSCOPICAS

Existe daño tisular durante los episodios clínicos de enfermedad que consiste en la reducción de la producción de glóbulos rojos, destrucción de los mismos, glomerulitis, linfadenopatía e infiltración en las áreas intersticiales del hígado y otros órganos por macrófagos y linfocitos (Perryman, 1988 y Montelaro 1999). Algunas lesiones tienen un origen inmune. En los casos agudos los nódulos linfáticos, bazo e hígado están hiperémicos y agrandados. Las células de Kupffer del hígado tienen con frecuencia hemosiderina o eritrocitos (OIE, 2008a).

La anemia está asociada con eritrocitos recubiertos por C3 y la presencia de glomerulonefritis es causada por el depósito de complejos inmunes. Los valores hematológicos están alterados disminuyendo el valor del hematocrito y de hemoglobina (Bakos, 1983).

La tasa de sideroleucocitos (macrófagos conteniendo hemosiderina, catabolito de la hemoglobina) en un equino sano es inferior a 7 por 100.000 leucocitos, mientras que en los días

posteriores a una crisis de AIE ésta puede ser de algunos cientos a 1000 sideroleucocitos por cada 100.000 leucocitos. (Toma, 1990).

1.6 EPIZOOTIOLOGÍA

La AIE es de distribución mundial (Sentsui, 2001) y existe en forma enzoótica en aproximadamente 23% de los países (Bicout, 2006). La transmisión mecánica del virus por artrópodos hematófagos es generalmente aceptada como un factor relevante en la epidemiología del virus (Foil, 1987). Por esto la incidencia de equinos infectados es mucho mayor en climas tropicales y subtropicales, presumiblemente debido a las estaciones más largas y abundantes poblaciones de insectos que actúan como vectores. El tábano cuando comienza su alimentación intenta terminar en el mismo animal u otro cercano transportando el virus en sus partes bucales. (Foil, 1988).

La enfermedad no tiene tendencia a una difusión rápida, pero los casos pueden observarse a gran distancia de un foco inicial (Toma, 1990).

El virus está muy adaptado a los équidos y tiene como reservorio única y exclusivamente a las poblaciones equinas infectadas (De la Sota, 2005).

1.7 TRANSMISIÓN Y TROFISMO TISULAR

La fuente más importante de transmisión viral es la sangre de equinos persistentemente infectados. Los vectores mecánicos son insectos principalmente la llamada mosca de los caballos (*Tabanus fuscicostatus* Hine) y la mosca de los establos o mosca brava (*Stomoxys calcitrans* L) (Bicout, 2006). Se ha documentado en condiciones experimentales la transmisión del virus por medio de tábanos transportando solamente 10ul de sangre extraída a partir de un equino infectado. (Montelaro, 1999).

La existencia de una barrera espacial entre equinos positivos y negativos puede reducir la probabilidad de transmisión y la carga de tábanos de los equinos está influenciada por la localización geográfica de los mismos, esto ha sido demostrado en un estudio prospectivo de 8 años de duración (Foil, 1988). La transmisión también puede ser en forma iatrogénica por transferencia de sangre a través de agujas contaminadas así como instrumental contaminado con sangre y por transfusiones. Se ha demostrado que el virus puede permanecer infeccioso en agujas hipodérmicas por periodos de hasta 96 horas. (Montelaro, 1999).

Puede existir infección del feto en el útero. El título viral es mayor en equinos con signos clínicos y el riesgo de transmisión es más alto en estos animales y mucho menor en los animales portadores con bajo título viral (OIE, 2008a).

Los monocitos sanguíneos son permisivos para el virus AIE pero un paso necesario para la replicación viral es su diferenciación a macrófagos (Clabough Sellon, 1992).

La carga viral en equinos infectados está predominantemente en los macrófagos tisulares del hígado, riñón y bazo y en menor medida en nódulos linfáticos, médula ósea y monocitos circulantes (Montelaro, 1999). Esto fue determinado por estudios de los órganos de equinos infectados experimentalmente utilizando la técnica de inmunofluorescencia directa (McGuire, 1971).

La infección viral subclínica está asociada con reducciones en la carga viral y relativa restricción de la transcripción en los macrófagos tisulares que son altamente permisivos durante la enfermedad aguda. La detección de ARN viral en equinos subclínicamente infectados indica que existe replicación viral durante la infección subclínica. (Oaks, 1998 y Craigo 2009). Esto fue también demostrado en una mula naturalmente infectada. (Spyrou, 2003).

Los reservorios tisulares pueden contener un pool estable de poblaciones virales que presentan niveles bajos de replicación o una población viral latente. Esto podría representar un archivo estable de cuasiespecies que reflejen la historia completa de la infección viral (Craigo, 2005).

1.8 PREVENCIÓN Y CONTROL

La dificultad para lograr el desarrollo de una vacuna efectiva es el alto nivel de variación antigénica que ocurre durante la replicación viral a través de los diferentes estadios de la enfermedad (Craigo, 2009).

Se han evaluado diversas estrategias para desarrollar inmunidad duradera, probándose diferentes tipos de vacunas, con partículas virales inactivadas, a subunidades proteicas, (Issel, 1992), atenuadas, vacunas a ADN y con vectores vivos con diferentes resultados. Entre las variadas estrategias de inmunización, las vacunas atenuadas dieron los máximos niveles de protección, probablemente debido a la presentación continua del antígeno y la maduración de las respuestas inmunes del huésped. Se vio que existe una relación inversa entre el nivel de atenuación y el nivel de protección, indicando que el virus atenuado debe alcanzar un nivel crítico de replicación viral para promover la maduración de las respuestas inmunes y lograr la protección. Esto constituye un equilibrio delicado entre el nivel de atenuación viral necesario y la capacidad de producir respuesta inmune. (Craigo 2005 y 2011). Una variación del 6% de los aminoácidos en las proteínas de la envoltura, de una cepa de descarga con respecto a la cepa vacunal dio un 25% de disminución en la protección y si la divergencia aumentaba al 13% la reducción en la protección era del 50%. Esto destaca la importancia de desarrollar inmunógenos que den un reconocimiento más amplio de las variantes de las glicoproteínas de superficie. (Craigo 2007).

En China se utilizó una vacuna atenuada por más de 100 pasajes en leucocitos de burro, desarrollada en el Instituto de Investigaciones Veterinarias de Harbin. En los demás países nunca se vacunó sino que se realiza el diagnóstico serológico para detectar los animales positivos siendo los mismos, dependiendo de la legislación local vigente, eliminados o identificados como portadores y aislados para cortar la cadena de transmisión.

Se están desarrollando vacunas experimentales con métodos serológicos para diferenciar animales vacunados de los naturalmente infectados. Pero hasta el presente el control de la enfermedad se basa en el diagnóstico serológico para la detección de los animales infectados y el aislamiento o sacrificio de los animales con diagnóstico positivo para prevenir la transmisión posterior (Cappelli, 2011).

1.9 DIAGNÓSTICO

La técnica mundialmente utilizada para el diagnóstico es el test de IDGA, el antígeno era originalmente preparado a partir de bazo equino (Coggins, 1970 y Norcross, 1971) y de leucocitos equinos (Nakajima, 1971) habiéndose demostrado la identidad antigénica entre ambos. (Nakajima, 1972). Posteriormente fue producido a partir de Cultivos Primarios de Feto equino y células de Dermis Equina (Malmquist, 1973). Estos antígenos específicos de grupo derivados del virus AIE de las fuentes antes mencionadas, se han usado ampliamente y aún se siguen utilizando.

De hecho, actualmente la p26, proteína mayor de la cápside del virus AIE, altamente conservada entre variantes antigénicas de aislamientos virales (Chong, 1991), se está produciendo a partir de diferentes sistemas de expresión, como *E. coli* (Birkett, 1997 y Toledo Piza, 2007) o baculovirus recombinantes. (Kong, 1997 y 1998).

Sentsui y Col (2001) demostraron que el antígeno recombinante p26 producido a partir de un sistema de expresión en baculovirus reaccionó prácticamente igual que el antígeno de cultivo celular utilizando suero de equinos infectados experimentalmente con 6 cepas diferentes.

La ventaja del uso del antígeno recombinante es que el antígeno derivado de bazo o de cultivos celulares puede estar contaminado con otras proteínas celulares o derivadas del huésped que pueden producir líneas de precipitación no específicas con anticuerpos contra antígenos diferentes al virus AIE presentes en el suero (Sugiura, 1977, Oliva, 1982 y Kong, 1998). Por otro lado el virus AIE no es fácil de cultivar por lo cual la producción de antígeno a gran escala es costosa, laboriosa y larga. (Alvarez, 2007a)

Otra técnica diagnóstica desarrollada en los años 80 es la cELISA que es de mayor sensibilidad y aunque es una herramienta muy útil, los sueros positivos deben confirmarse por la IDGA. En estos casos, es probable que los niveles de anticuerpos aún no sean detectables por la IDGA ya que los anticuerpos precipitantes aparecen entre los 14 a 45 días post infección (Coggins, 1970 y Cappelli 2011) y por ELISA se detectan antes.

Se puede detectar el ADN proviral por PCR y el ARN viral por la técnica de Retro-transcripción seguida de PCR (RT-PCR). La técnica de PCR puede ser utilizada para la detección de infección en equinos en las siguientes circunstancias:

- Resultados conflictivos en tests serológicos.
- Sospecha de infección pero resultados serológicos negativos o cuestionables.
- Test complementario a la serología para confirmación de resultados positivos.
- Confirmación de infección temprana antes del desarrollo de los anticuerpos al virus AIE.
- Asegurarse que los equinos a utilizar para producción de antisueros o vacunas sean libres de virus AIE
- Confirmación del status del potrillo hijo de madre infectada (OIE, 2008a).

También se han desarrollado técnicas de PCR anidada utilizando primers derivados del gen Gag para aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico (Nagarajan, 2001).

1.10 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

Las partículas virales son de forma esférica, poseen envoltura de naturaleza lipoproteica y tienen un diámetro aproximado de 80 a 120nm. (Tajima, 1969, Nakajima, 1974 y Cheevers, 1977). El genoma viral consiste en dos subunidades de ARN de simple cadena de polaridad positiva de aproximadamente 8.2Kb (Cheevers, 1977) siendo el más pequeño y simple de los lentivirus.

El genoma de estos virus está organizado en tres grandes marcos de lectura que codifican las proteínas estructurales: *gag* que codifica las proteínas P9, P11, P15 y P26, *pol* para la polimerasa viral y otras proteínas de la replicación del DNA y *env* las dos glicoproteínas de la envoltura del virión (Gp90 y Gp 45). Además de las proteínas codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*, comunes a todos los retrovirus, el genoma del virus AIE contiene tres marcos de lectura abiertos (ORFs) adicionales, que codifican proteínas no estructurales que regulan varios aspectos de la replicación viral: Tat y Rev también presentes en otros lentivirus y la proteína S2. Esta última está altamente conservada durante la infección persistente y la delección del gen S2 que la codifica reduce la virulencia y replicación viral. (Li, 1999).

El ORF *tat* está ubicado dentro de la región intergénica *pol-env*, el ORF S2 comienza entre *tat* y *env* y se superpone a la porción amino terminal del gen *env* en un marco de lectura diferente. El

ORF *rev* está cerca del extremo 3' del genoma y se encuentra en un marco de lectura alternativo incluido dentro de la secuencia codificante de Gp45 del gen *env* (Schiltz, 1992).

El genoma viral no es endógeno a los equinos, esto se demostró por primera vez a través de pruebas de hibridación por Rice y Col en 1977 y posteriormente (Rasty, 1990) detectando por la técnica de Southern Blot, ADN proviral en células fetales de riñón equino (FEK) y células fetales de dermis de burro (FDD) infectadas y no en las mismas células no infectadas.

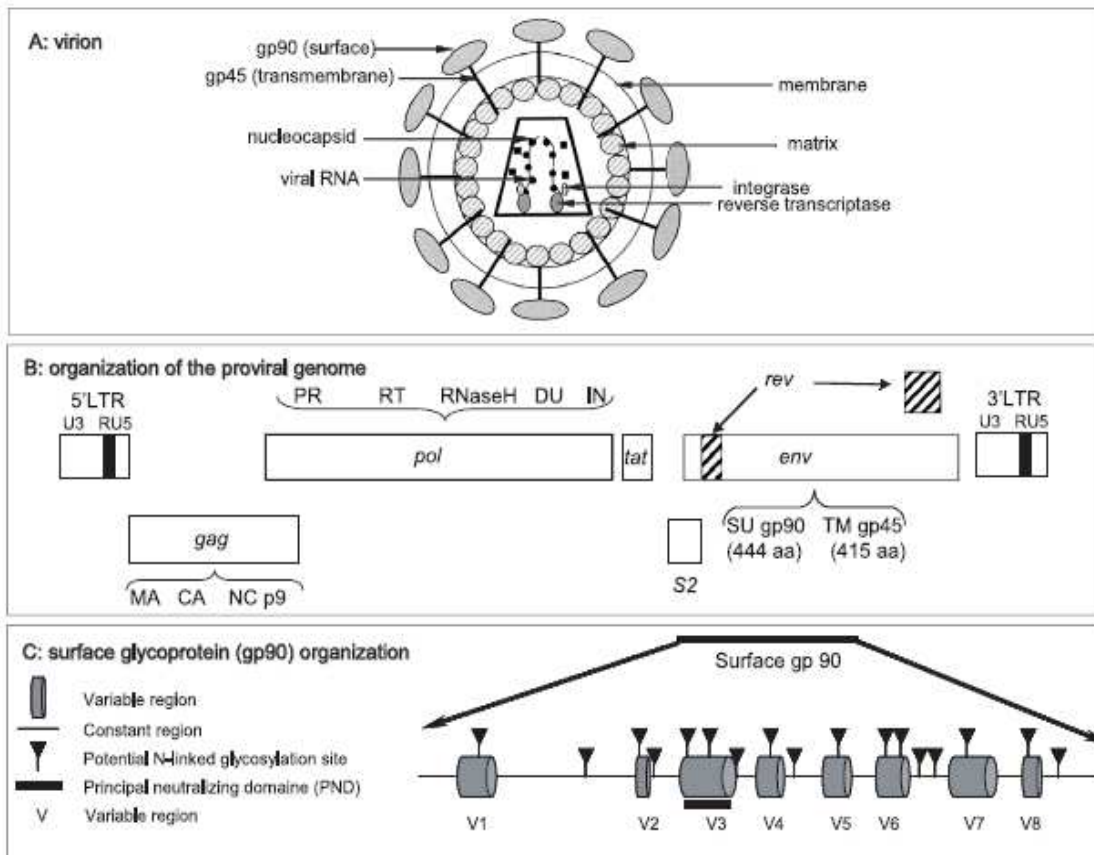


FIGURA 1 Estructura del virión y organización genómica del virus AIE. (Fuente:Leroux 2004)

Los productos de los genes *gag* y *pol* son traducidos desde el ARN mensajero viral. El ensamblado en la membrana plasmática de las proteínas precursoras codificadas por el gen *gag* es esencial para que el virión brote a partir de las células del huésped. La poliproteína precursora de Gag (Pr 55^{gag}) (Hussain, 1988) es clivada por una proteasa en cuatro proteínas estructurales internas mayores del virión maduro: P15 o MA (de la Matriz: ubicada por debajo de la bicapa lipídica del virión), P26 o CA (de la Cápside), y las proteínas de la nucleocápside (NC) P11 y P9. Luego del procesamiento proteolítico de Gag, MA permanece unida a la cara interna de la membrana viral, CA se condensa para formar una cubierta alrededor del complejo NC/ARN.

El clivaje del precursor Gag-Pol del virus AIE (Pr180^{gag/pol}) produce los productos del gen pol que dan lugar a varias actividades enzimáticas incluyendo la Transcriptasa reversa RNasaH (P66) esencial para la conversión del ARN viral en ADN, una proteasa viral (P12) para el procesamiento de las poliproteínas, una dUTPasa (p15) esencial para la replicación del virus en macrófagos sin división derivados del sistema monocítico, que son las células blanco naturales del huésped para la expresión y replicación y, una integrasa.

El gen *env* codifica la glicoproteína de superficie Gp90 y la de transmembrana Gp45, que forman parte de la envoltura viral.

La Gp 90 está muy glicosilada y sujeta a rápida evolución durante el curso de la enfermedad. Las mutaciones están restringidas a regiones variables definidas, V1 a V8. Hay cerca de 300 copias de cada una de las glicoproteínas de envoltura por virión y las proyecciones de la superficie parecen estar compuestas por trímeros de Gp90 y Gp45 (Montelaro, 1999).

Los LTR virales sirven como sitio de iniciación de la transcripción, contienen tres segmentos denominados U3 (único, 3'end), R (Repetido) y U5 (único, 5'end). La región U3 contiene numerosos segmentos importantes para la transcripción viral. Los promotores de los lentivirus están regulados por varios factores celulares (factores de unión al ADN) que interactúan con motivos específicos en la secuencia LTR.

Debido a la composición lipoproteica de la envoltura, los retrovirus son sensibles a solventes orgánicos (éter y cloroformo), a la tripsina y a detergentes no iónicos (desoxicolato, nonidet).

1.11 REPLICACIÓN

La adsorción y entrada de retrovirus a las células blanco requiere la interacción de las glicoproteínas de la envoltura viral con proteínas receptoras celulares específicas. En el caso del virus de la AIE, el receptor celular funcional, denominado receptor 1 del lentivirus equino (ELR1) ha sido recientemente identificado (Zhang, 2005). El ELR1 es una proteína miembro de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). El dominio de unión al ELR1 de la Gp90 del virus AIE es un complejo de secuencias discontinuas localizadas en las dos terceras partes de la porción C-terminal de la misma (Sun, 2008). Una vez dentro del citoplasma de la célula blanco, la transcriptasa reversa viral copia el genoma ARN de cadena simple en un provirus de ADN de cadena doble que es transportado al núcleo y luego integrado en el ADN de la célula huésped. No hay evidencia de traducción del genoma viral que ingresa en esta etapa de la infección. Una vez que el genoma viral se encuentra en el núcleo, la integrasa viral media la incorporación, aparentemente al azar del ADN proviral dentro de los cromosomas celulares. Típicamente hay un total de aproximadamente 10 copias de ADN proviral por cada célula infectada. (Leroux, 2004). Una vez que se integra en el genoma de los monocitos/macrófagos el virus puede permanecer en

forma latente sin expresarse aunque una replicación viral restringida puede permitir que el virus evite la detección inmune y facilitar la diseminación viral como “caballos de Troya” (Oaks, 1998).

La transcripción del ADN proviral por polimerasas celulares produce un patrón complejo de ARN mensajero viral cuyas proporciones relativas pueden variar, dependiendo de la cepa viral y la célula blanco. La transcripción del LTR, sitio de iniciación de la misma, lleva a la producción de un ARN mensajero completo (8.2kb) que codifica las proteínas mayores Gag, Pol y Env y múltiples transcriptos pequeños que codifican las proteínas Tat, S2 y Rev (Leroux, 2004) Rev es una proteína regulatoria que controla la exportación desde el núcleo del pre-ARN mensajero viral uniéndose a una secuencia específica del mismo denominada Elemento de Respuesta a Rev (RRE) (Baccam, 2003).

Las proteínas virales Gag y Env son producidas inicialmente como poliproteínas que se clivan en los componentes maduros por acción de proteasas virales y celulares.

Se conoce poco sobre los mecanismos precisos del ensamblaje viral, pero se asume que sigue el modelo general de los retrovirus donde las glicoproteínas virales de la envoltura son inicialmente insertadas en la membrana plasmática para crear sitios de ensamblaje viral donde la poliproteína Gag es acumulada debajo de la membrana lipídica y clivada en proteínas del virión mientras la partícula viral brota de la superficie celular y es liberada para producir la progenie viral (Montelaro, 1999).

El virus AIE es altamente mutable. La mutación puede ser observada durante la re-adaptación al huésped, durante el pasaje horizontal entre huéspedes y durante la replicación en un único huésped (Payne, 1984).

1.12 PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y EN CULTIVOS CELULARES

Los antígenos virales se detectan en todos los órganos y tejidos en los cuales se hallan macrófagos y los títulos virales son mayores en aquellos órganos con mayor número de estas células. Los aislamientos primarios del virus AIE sólo pueden replicar in Vitro en cultivo de macrófagos obtenidos a partir de monocitos sanguíneos, con producción de efecto citopático. Sin embargo los mismos no se dividen, son difíciles de cultivar, requieren altas concentraciones de suero, son de relativa corta duración (2 semanas) y el efecto citopático es a veces difícil de distinguir de la degeneración celular normal de las células (Klevjer-Anderson, 1978 y Carpenter, 1989).

Ciertas cepas adaptadas a células pueden también replicar en cultivos de dermis equina (DE) o células endoteliales, células fetales de riñón equino (FEK) fibroblastos equinos y líneas celulares de fibroblastos caninos y felinos que son permisivas para las infecciones persistentes con el virus

sin efectos deletéreos aparentes en las células (Shane, 1984, Schiltz, 1992 y Brindley, 2008)). El virus de la AIE utilizaría diferentes receptores para infectar las células fibroblásticas equinas y caninas.

La replicación *in vitro* en un tipo celular particular puede producir la selección de aislamientos de lentivirus que son biológicamente distintos de las poblaciones virales *in vivo* (Carpenter, 1989).

Estudios previos mostraron que la infección por el virus AIE de cultivos de células fetales de dermis de burro (FDD) produjeron una infección citopática, mientras que las células FEK se tornaban en células persistentemente infectadas *in vitro* (Rasty,1990) sin efecto citopático. Las células endoteliales macrovasculares del equino son productivamente infectadas (Maury, 1998).

1.13 RESPUESTA INMUNE

Durante la crisis de infección aguda se produce una rápida replicación viral asociada con fiebre, depresión y destrucción de glóbulos rojos. Las células del linaje monocito/macrófago juegan un rol importante en la respuesta inmune contra los patógenos produciendo factores solubles como citoquinas y quimioquinas. Durante la infección por virus AIE, los niveles de Factor Alfa de Necrosis Tumoral (TNF- α), el factor de transformación del crecimiento de células β (TGF- β) y el Interferón Alpha (IFN- α) que son producidos por los macrófagos y pueden actuar como reguladores negativos de la producción de plaquetas están aumentados en el suero en la etapa aguda antes y durante el desarrollo de trombocitopenia. El TNF- α produce entre otros efectos, fiebre, anorexia y decaimiento. En la médula ósea sus efectos son predominantemente supresivos (Tornquist, 1997).

A diferencia de la mayoría de las infecciones virales, la presencia de anticuerpos séricos es indicativa de una infección en lugar de una exposición al virus en algún momento (Cullinane, 2007).

Una vigorosa respuesta inmune dirigida contra el virión y los antígenos de la membrana celular contribuyen a los signos clínicos y lesiones. El clearance de la viremia inicial ha sido correlacionada con la aparición de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (Hammond, 1997) y anticuerpos específicos no neutralizantes (O'Rourke, 1988). Los anticuerpos neutralizantes específicos para las cuasiespecies virales iniciales aparecen semanas después de la viremia inicial (Hammond 1997). El número, frecuencia y severidad de los ciclos varían entre los equinos, la mayoría de los cuales dejan de producir ciclos en unos pocos meses (8 a 12 post infección) y se tornan portadores asintomáticos de por vida (Fujimiya, 1979).

Numerosas evidencias indican que el control de la replicación viral y enfermedad en los portadores inaparentes está mediada por las respuestas específicas del sistema inmune del huésped que evolucionan durante el primer año post infección para lograr una supresión efectiva sostenida de la replicación viral (Hammond, 2000 y Craigo 2011). A pesar de la falta de signos clínicos estos equinos aún representan una pérdida económica permanente para la industria equina y una fuente de infección para otros caballos.

Se ha demostrado que el stress severo o el tratamiento de los portadores inaparentes con drogas inmunosupresoras pueden causar el recrudecimiento de la viremia y enfermedad, aún después de décadas de quiescencia clínica (Tumas, 1994).

En ensayos de infección utilizando equinos normales y con inmunodeficiencia combinada (CID) que carecen de linfocitos B y T funcionales se demostró que estos últimos no eran capaces de eliminar el virus del plasma lo cual evidencia el rol de las respuestas inmunes específicas en controlar la viremia (Perryman, 1988).

1.14 VARIACIONES GENÉTICAS DEL VIRUS AIE

Los lentivirus exhiben altas tasas de mutación y existen *in vivo* como una población de genotipos virales cercanamente relacionados comúnmente denominados cuasiespecies (Lichtenstein, 1996 y Leroux, 2004).

La naturaleza recurrente del virus de la Anemia Infecciosa Equina ha sido atribuida a las relativamente rápidas variaciones antigénicas del virus durante la infección persistente bajo presiones inmunes selectivas (Montelaro, 1984 y Craigo, 2005) motivo de la ineficacia de los protocolos de vacunación clásicos en brindar protección. También se ha demostrado que aislamientos virales de diferentes episodios clínicos en ponies infectados experimentalmente pueden distinguirse antigénicamente mediante ensayos de neutralización (Salinovich, 1986) Esto se debe principalmente a cambios estructurales significativos en la porción polipeptídica de Gp90, glicoproteína mayor de la envoltura. Esta variación antigénica fue demostrada por primera vez por SDS-PAGE y mapeo de péptidos a partir de cepas obtenidas de diferentes episodios febriles en equinos infectados experimentalmente (Montelaro, 1984) y por secuenciación de las regiones variables de la Gp 90 (Leroux, 1997). Estos cambios no se producían durante la replicación *in vitro*. También fue comprobado por medio de la producción de anticuerpos monoclonales específicos para las glicoproteínas de envoltura demostrándose las alteraciones de los epitopes de las mismas en los aislamientos virales obtenidos durante la infección persistente. (Hussain, 1987). El nivel de variabilidad observado en el virus AIE es compatible con el concepto de que durante la replicación el virus sufre mutaciones puntuales en una frecuencia

relativamente alta, algunas de las cuales resultan en estructuras glicoproteicas y antigenicidad alteradas. Durante la infección persistente surgen variantes virales a nivel de Gp90 que se tornan cada vez más resistentes a la neutralización por los anticuerpos séricos, sugiriendo que los anticuerpos neutralizantes constituyen una fuerza de presión selectiva (Mealey, 2004).

La variación genómica del virus AIE ocurre principalmente en la mitad 3' del ARN que codifica la envoltura, rev y los LRT (Craig, 2009).

En cuanto a las proteínas codificadas a partir del gen gag, las variaciones se presentan de menor a mayor en el siguiente orden: p26>p11>p15>p9 siendo la identidad predecible de los aminoácidos de diferentes cepas de 63,8% para p26, 56,4% para p11, 40,5% para p15 y solo el 28,3% para p9. Esta última la que presenta la mayor divergencia entre aislamientos de diferentes países sugiriendo su utilidad como marcador epidemiológico para investigar el origen y progresión de brotes de la enfermedad. Siendo la p26 el antígeno principal empleado en el diagnóstico por la técnica de IDGA y de ELISA es importante la confirmación de que está relativamente bien conservada entre aislamientos virales de localizaciones geográficas muy diferentes (Cappelli, 2011).

1.15 SITUACIÓN EN ARGENTINA

En Argentina esta enfermedad fue descrita en un haras en la provincia de Buenos Aires y denunciada por Monteverde, J.J y col el 7 de diciembre de 1964 (Monteverde, 1964). La misma es de denuncia obligatoria y se encuentra dentro de un Programa de Lucha (Resolución SAGP y A N° 617/05). La tasa de prevalencia en Argentina varía de 0% al 76%, y demuestra en algunas provincias una intensa actividad viral con una fácil transmisión y amplia difusión, lo cual dificulta la erradicación de la enfermedad en las mismas (De la Sota, 2005) [a].

Los datos de prevalencia son más altos en las Provincias del Norte en donde la enfermedad es enzoótica por diversos factores como las condiciones medioambientales y climáticas, favorecida por la baja frecuencia de controles sanitarios y la no eliminación de los reactores positivos, especialmente los animales asintomáticos (Jacobo, 2004).

De acuerdo a lo establecido por la Resolución 617/05, los animales para tránsito interno deben contar con una certificación de diagnóstico negativo por la técnica de IDGA que tiene dos meses de validez a partir de la fecha de extracción de la sangre, esto es debido a que el período en que tardan los anticuerpos precipitantes para ser detectables varía de 15 a 45 días.

En el país, a pesar de la existencia de normativas oficiales para su control y del esfuerzo colectivo desarrollado por varios sectores en los últimos años, la AIE ha constituido un enigma para muchos propietarios y productores, adquiriendo importancia no solo en relación a pérdidas directas sino también a las limitaciones, necesariamente estrictas, que imponen las exportaciones y el sostenido tráfico del comercio caballar y las actividades ecuestres.

Las diferencias en la prevalencia e incidencia de esta enfermedad dependen de diversos factores, como la región geográfica y sus ecosistemas, la densidad de población de équidos y su dinámica regional, también del nivel socio cultural de sus propietarios y consecuentemente la asistencia sanitaria y profesional de los equinos y por ende del conocimiento o no de la enfermedad, muy en especial de las formas de transmisión. Pero básicamente, el cumplimiento responsable de las medidas de prevención y control, ya sean éstas las impuestas por la autoridad sanitaria oficial o simplemente las de propia incumbencia y responsabilidad del propietario son definitorias.

La morbilidad y la mortalidad vienen determinadas preferentemente por la sensibilidad de la población, es decir, que en los territorios con la enfermedad enzoótica (presente en forma marcada y permanente) predominan los cursos crónicos y latentes, mientras que en regiones limpias o de baja prevalencia pueden prevalecer los cursos graves sobretodo en los primeros brotes de esta enfermedad, tal como aconteció a fines de la década del 60.

En general, existe la creencia que solo los grandes brotes de enfermedades de los animales, con registros de alta mortalidad, acompañados de cuadros clínicos claros y manifiestos son los que originan cuantiosas pérdidas económicas.

La Anemia Infecciosa Equina, en su forma más frecuente de presentación crónica e inaparente, es un claro ejemplo de enfermedad de presentación «poco visible» para el productor, lo que hace posible que, a través de su diseminación insidiosa, solapada y permanente, genere pérdidas regionales por millones de dólares anuales sin que cada productor en particular registre tal magnitud. Esto se expresa mediante el permanente reemplazo y reposición de equinos de trabajo que propone esta enfermedad, y que es lo que provoca tales mermas productivas. Según un estudio realizado en Santa Fe a comienzos de los años 90, en el centro y este de la región ubicada al norte del paralelo 32, el desplazamiento de bovinos provocado por la superpoblación de equinos de trabajo portadores de esta enfermedad – para el cálculo fue considerado que por su bajo rendimiento se requieren para cumplir tareas rurales de dos a tres equinos por uno – era equivalente a 40-50 millones de dólares anuales medidos en kilos de carne bovina.

En esta línea de análisis, si bien no existen antecedentes de ponderación económica similares a lo descrito, debiera tomarse en cuenta que en todo nuestro territorio nacional, el equino es aún hoy una herramienta insustituible, no solo formando parte de la cadena de recolección y distribución de una gran variedad de productos pecuarios y agrícolas primarios - que de otra forma no llegarían luego a ser bienes contabilizables en el mercado, o al menos lo harían generando mayores costos - sino también en relevantes tareas tales como el control de fronteras o las relacionadas con el desarrollo sociocultural de numerosas poblaciones rurales en las cuales el caballo garantiza la asistencia sanitaria y educativa de sus pobladores (De la Sota, 2005. [b].

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

Por lo anteriormente expresado se plantean los siguientes objetivos:

Incrementar la batería de técnicas diagnósticas que permitan aumentar la detección de los animales positivos a esta enfermedad más precozmente para contribuir a cortar la cadena de transmisión.

Poner a punto pruebas alternativas con el fin de confirmar casos de difícil definición.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Producir antígeno en cantidad y calidad suficiente para luego utilizarlo en técnicas de diagnóstico confirmatorias de AIE.

Desarrollar la técnica de ELISA Indirecto y establecer la sensibilidad y la especificidad de la misma.

Poner a punto la técnica de Western Blot y estudiar su posible uso para la confirmación de casos de difícil diagnóstico.

Comparar las técnicas de diagnóstico para esta enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de la proteína p26 recombinante

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó una proteína p26 recombinante previamente obtenida en la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata con la metodología que se describe a continuación: la región genómica que codifica para la proteína p26 completa del virus de la anemia infecciosa equina fue amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde un aislamiento de ADN de un cultivo celular infectado en el cual el virus (cepa *Wyoming*) se encuentra integrado en forma de provirus con los siguientes primers:

p26F 5' GATGCCAATCATGATAGATGGGGCTGGAAACAG 3'

p26R 5' GTTATTAAAGTGCTTTTGCCAATAACATCATCTTTTG 3'.

El producto de amplificación fue posteriormente ligado al vector de clonado rápido pGEM[®]-T Easy (Promega). Con la construcción así obtenida (pGEM-p26), se transformaron bacterias químicamente competentes (*E. coli* JM109) mediante un proceso de shock térmico.

Las bacterias transformadas se seleccionaron en placas de agar LB con ampicilina, mientras que las colonias recombinantes se diferenciaron por el agregado en la placa de Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y X-Gal.

Los clones positivos fueron analizados por digestión con enzimas de restricción para determinar la presencia y la orientación del inserto, estos resultados fueron confirmados por PCR, utilizando un primer con una secuencia perteneciente al vector y un primer de los que se utilizaron para amplificar el inserto originalmente.

Una vez hallado el clon apropiado, el inserto que codifica para la p26 fue escindido del vector de clonado, mediante la digestión con las enzimas de restricción, para su posterior subclonado en el vector de expresión pET22b(+) (Novagen) previamente digerido con las mismas enzimas, esto permitió que el gen de interés se fusione a la secuencia señal *pelB* presente en el vector que permite el direccionamiento de la proteína de interés al espacio periplásmico de la bacteria.

Con el producto de ligación (pET-p26) se transformaron bacterias químicamente competentes (*E. coli* cepa BL21 DE3) que luego fueron plaqueadas en medio selectivo (LB-ampicilina) (Fig. 2).

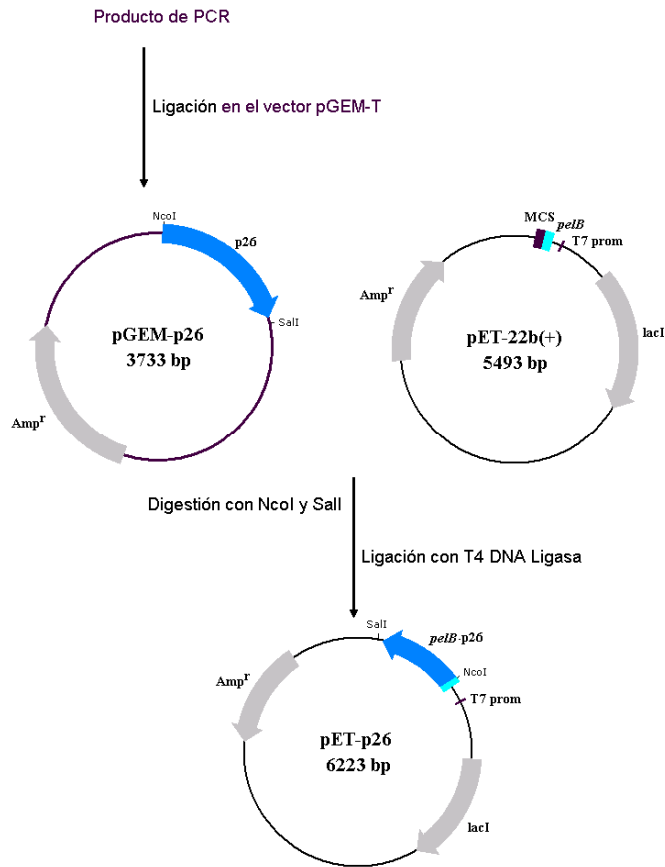


FIGURA 2 Representación esquemática de los pasos de clonado del gen p26.

Para cada una de las colonias obtenidas, se realizó un control de la presencia del inserto que se llevó a cabo por mapeo de restricción con endonucleasas y verificación del patrón de bandas obtenido en geles de agarosa, los resultados obtenidos de esta manera fueron luego confirmados por PCR utilizando los mismos primers con los que se amplificó el fragmento inicialmente.

La expresión de la proteína se llevó a cabo a partir de un cultivo overnight en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina que se inoculó con una colonia previamente identificada como positiva, sobre este cultivo se realizó una dilución 1/100 con medio LB más ampicilina que fue colocado en erlenmeyers con agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm (OD_{600}) de aproximadamente 0.5, momento en el cual se agregó IPTG, que actúa como inductor. Para la purificación de la proteína recombinante expresada, se realizó un tratamiento de shock osmótico, con el fin de liberar las proteínas alojadas en el espacio periplásmico que luego fueron concentradas por precipitación $SO_4(NH_4)_2$ seguida de diálisis exhaustiva contra PBS para eliminar los restos de sales.

Luego, fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y por western blot utilizando anticuerpos policlonales (provenientes de suero de caballos infectados) y un anticuerpo monoclonal, para confirmar la identidad y el tamaño de la proteína obtenida.

3.2 Producción de Antígeno viral en cultivo de células.

Para la obtención del antígeno viral, se infectaron cultivos de células de dermis equina (ED) (gentilmente cedidas por el Dr. Sabal – INTA Castelar) en frascos de 175cm² con un 80% de confluencia. Las células en monocapa fueron inoculadas con 2ml de una dilución viral 1/5 (Cepa Wyoming provista por el USDA, USA).

Una vez agregado el inóculo, las células fueron incubadas en estufa a 37°C durante una hora para permitir la penetración del virus. Posteriormente se completó el volumen de cada uno de los frascos con 50 ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB). El cultivo fue mantenido durante aproximadamente 30 días realizando cambios periódicos del medio cada 10 días. El sobrenadante obtenido en cada uno de los cambios de medio, fue almacenado a -70°C hasta su uso).

3.3 Obtención del virus concentrado y parcialmente purificado:

Parte del sobrenadante previamente obtenido fue utilizado para la purificación del virus por ultracentrifugación. Para obtener un antígeno para utilizar en la técnica de WB se siguió el Protocolo del Diagnostic Virology Laboratory (DVL), National Veterinary Services Laboratories (NVSL), Animal and Plant Health Inspection Services (APHIS), United States Department of Agriculture (USDA), USA. Inicialmente 180 ml del sobrenadante fueron centrifugados a 2500 rpm durante 30 minutos (a 4°C). El sobrenadante obtenido en el paso anterior, fue dividido en 6 tubos de policarbonato de 25 x 89 mm (conteniendo aproximadamente 30 ml por tubo) y se centrifugaron en una Ultracentrífuga (Beckman, Modelo L8-80M) con un rotor de ángulo fijo (Type 50Ti) a 26.000 rpm durante 90 minutos a 5°C.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido en cada uno de los tubos fue resuspendido en 500 µl de PBS por tubo. Luego los tubos fueron incubados durante 1 hora a 4°C para permitir la disgregación total del pellet, obteniéndose aproximadamente 3 ml en total.

Finalmente se realizó una segunda centrifugación sobre un colchón de 4 ml de sacarosa al 20% en 4 tubos de policarbonato de 13 x 51 mm, utilizando un rotor de canasta basculante (SW 28) a 26.000 rpm durante 90 minutos, con el fin de purificar parcialmente y concentrar aun más la muestra. Al igual que en el caso anterior, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido fue resuspendido en un volumen de 250 µl de PBS. El producto final de la concentración fue

chequeado por la técnica de RT-PCR y posteriormente almacenado a -70°C hasta su posterior uso.

3.4 RT-PCR

Pasos: Obtención del ARN

Para la extracción del ARN viral a partir del virus procesado según se describió anteriormente se utilizó el reactivo comercial Trizol[®] (Invitrogen) empleando el siguiente protocolo: En primer lugar se diluyó la muestra 1/10 (450 μl de agua más 50 μl de muestra) y se agregaron 500 μl de Trizol más 220 μl de cloroformo, agitando vigorosamente en vortex durante 10 minutos (para romper la cápside viral). Posteriormente se realizó una centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C . La fase acuosa (superior) fue transferida a un nuevo tubo.

Para precipitar el ARN se agregaron 750 μl de isopropanol mezclándose por inversión, se realizó una incubación a -70°C durante 15 minutos con posterior centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C , descartándose el sobrenadante. Finalmente, se realizó un lavado agregando 500 μl de Etanol al 70%, agitando brevemente en vortex y centrifugando a 10.000 rpm durante 1 minuto a 4°C . Luego de eliminar el sobrenadante se dejó secar en vacío durante 10 minutos y se resuspendió el pellet en 50 μl de agua destilada libre de nucleasas.

Retrotranscripción:

A 14 μl del ARN previamente obtenido, se le agregó 1 μl de Random primers (Fermentas). La mezcla resultante fue incubada a 70°C durante 10 minutos (para deshacer la estructura secundaria del ARN). Posteriormente se agregó la siguiente premezcla:

5 μl de Buffer de reacción (5X)

1 μl (200U) de la enzima M-MLV (transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina moloney) (Marca Promega)

1 μl de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs)

3 μl de agua libre de nucleasas.

La mezcla final resultante (25 μl en total), fue incubada durante 1 hora a 37°C (en este tiempo el molde de ARN pasa a ADN).

Reacción de PCR

A 12,5 μl de PCR Master Mix (Promega) se le agregaron 5 μl del producto de la retrotranscripción previamente obtenido más 6 μl de agua y 0,75 μl de cada uno de los siguientes

primers (que amplifican 650 pb correspondientes a la región genómica que codifica la proteína p26):

Fw GATGCCAATCATGATAGATGGGGCTGGAAACAG

Rv GTTATTAAAGTGCTTTTGCCAATAACATCATCTTTTG

La mezcla resultante (25µl) fue ciclada en un termociclador (XP Thermal Cycler. BIOER TECHNOLOGY, CO LTD) utilizando los siguientes parámetros de ciclado:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5'	1
94°C	45"	30
55°C	45"	
72°C	1'	
72°C	5'	1

Visualización del Producto de la PCR en gel de agarosa

Una vez finalizada la reacción de PCR, 12,5µl de producto de amplificación, fueron sembrados (por duplicado) en un gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE (89mM Tris-HCl, 89mM ácido bórico, 20mM EDTA).

Se pesaron 0,3gr de agarosa que se mezcló con 20ml de buffer TBE que fueron disueltos en microondas.

La solución resultante fue enfriada hasta los 50°C aproximadamente y posteriormente colocada en un formador de geles de 5 x 6.5cm, luego se colocó el peine y se dejó solidificar sobre una superficie nivelada.

Se retiró el peine y se sumergió el gel con buffer TBE dentro de la cuba de electroforesis.

Se sembraron 15µl de cada una de las muestras con 2 µl de buffer de carga (10mM Tris-HCl – pH:7,6; 0.03% de azul de bromofenol y 60% de glicerol) incluyéndose en la siembra un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular.

Se efectuó la corrida electroforética durante 45 minutos aproximadamente a 100V.

Finalmente se realizó la tinción con bromuro de etidio (0.5µg/ml) durante 15 minutos aproximadamente realizándose la lectura de las bandas.

3.5 Muestras de sueros problema

Se utilizaron un total de 200 sueros entre negativos, débiles positivos, positivos, algunos con líneas inespecíficas, los cuales ingresaron para diagnóstico o fueron obtenidos de la seroteca de la Dirección de Laboratorios y Control Técnico (DILAB) donde fueron procesados por las técnicas de IDGA y eELISA. Estos se probaron en su totalidad con proteína p26 recombinante por las técnicas de WB y iELISA y algunos también por la técnica de WB con antígeno obtenido a partir de cultivo celular.

3.6 Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)

La técnica se realizó de acuerdo al Procedimiento Particular de la Coordinación de Virología, DILAB, SENASA utilizando equipos diagnósticos comerciales. Brevemente, la misma consiste en una doble inmunodifusión radial del antígeno (proteína p26) y los anticuerpos contra la anemia infecciosa equina a través de una capa de agar al 1%. La técnica se realiza en placa de petri y se cargan los reactivos (antígeno y suero control que componen el kit y los sueros a probar) en la misma. Se utilizan 6 pocillos periféricos alrededor de un pocillo central. El antígeno se coloca en el pocillo central y el suero control en tres pocillos exteriores alternados. Se siembran los sueros a probar en los tres pocillos restantes. La placa se incubaba en atmósfera de humedad dentro de un rango de temperatura y se realiza la lectura de las líneas de precipitación utilizando una luz puntiforme a las 24-48 hrs.

Interpretación

1. **Negativo:** Aparecen las líneas controles, cuyos extremos se introducen dentro del pocillo con el suero problema en forma recta ó con tendencia a desviarse hacia fuera.
2. **Positivo:** Las líneas controles se unen con la línea que se forma entre el suero problema y el antígeno, formando una línea continua (línea de identidad). Esta línea de identidad se encuentra equidistante entre el antígeno y el suero problema en el caso de ser un suero francamente positivo. Su ubicación depende de la concentración de anticuerpos en el suero problema.
3. **Débilmente Positivo:** Aparecen las líneas controles, cuyos extremos se desvían hacia adentro introduciéndose al pocillo del suero problema en forma curva es decir se verá un acodamiento de la banda.

Rango de posibles reacciones en la IDGA (Test de Coggins)



Posibilidades adicionales :

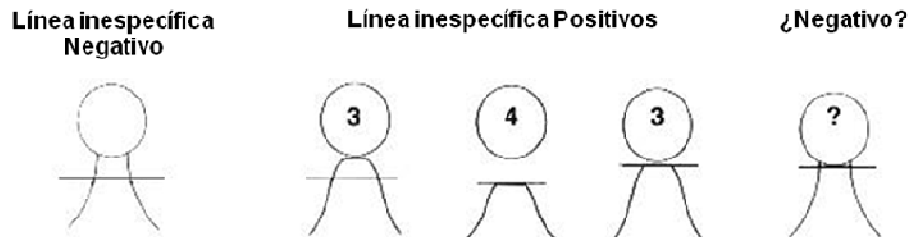


FIGURA 3 Posibles lecturas del test de Coggins. (fuente: USDA.USA)

3.7 ELISA de competición (cELISA)

Se utilizó el kit comercial denominado “Kit de Análisis para la Anemia Infecciosa Equina (EIA-AGID)” del Laboratorio IDEXX, que consta de una placa de microtitulación precubierta con anticuerpos monoclonales específicos para p26, un control negativo y un control positivo, el antígeno conjugado, la solución sustrato y la de frenado. La técnica se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del instructivo provisto por el fabricante, inicialmente se colocaron 100µl de cada uno de los sueros control positivo y negativo en sendos pocillos y 100µl de cada uno de los sueros a probar en los pocillos restantes. Luego se agregaron 50µl de antígeno p26, el cual se encuentra conjugado con la enzima peroxidada del rábano picante (HRP) a cada uno de los pocillos y se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron 5 lavados de la placa con el fin de eliminar la solución residual del conjugado y finalmente se agregaron 100µl de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina), un sustrato cromogénico que reacciona con la peroxidada, a cada pocillo realizándose la lectura a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (la reacción se frena con 100µl de solución de frenado).

Interpretación:

Cuando la muestra de suero tiene anticuerpos contra la proteína p26, estos bloquean la unión del antígeno conjugado y los anticuerpos monoclonales pegados a la placa de microtitulación dando poco o ningún color en las muestras positivas. Por otro lado, si el equino es negativo a AIE (o tiene un nivel de anticuerpos muy bajo), el antígeno conjugado a la peroxidada se puede unir a

los anticuerpos monoclonales pegados a los pocillos de la placa dando un color azul fuerte. El desarrollo de color está inversamente relacionado a la cantidad de anticuerpo a AIE. La intensidad de color en los pocillos con las muestras se compara visualmente con la del pocillo correspondiente al control positivo para interpretar el ensayo.

3.8 Western Blot (WB)

Esta técnica detecta una interacción específica antígeno-anticuerpo mediante la aparición de una banda en un papel de nitrocelulosa que contiene antígeno de AIE separado por electroforesis, al que se une el anticuerpo primario (si está presente en el suero problema). El desarrollo de la banda se da por la acción posterior de un sustrato reconocido por una enzima conjugada al anticuerpo secundario

3.8.1- Preparación de reactivos:

Buffer Tris ClH 1,5M pH 8.8

Tris-Base	18.15gr
Agua	50ml
HCl	csp pH 8.8

Luego llevar a 100ml con agua.

Buffer Tris-HCl 0,5M pH 6.8

Tris-Base	6gr
Agua	50ml
HCl	csp pH 6.8

Luego llevar a 100ml con agua

10% SDS

SDS	10grs.
Agua	100ml

10X Buffer de reservorio

Tris-Base	3.02gr
Glicina	14.4 gr
Agua	csp 100ml

1X Buffer de reservorio

10X Buffer de reservorio	100 ml
10% SDS	10ml
Agua	csp 1L

Azul de Bromofenol al 0.1%

Azul de Bromofenol	10mg
Agua	csp 10ml

Buffer de Carga

Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1.250ml
SDS 10%	2ml
Glicerol	2ml
Azul de Bromofenol 0.1%	100µl
Agua	csp 10ml

Acrilamida-Bisacrilamida

Acrilamida	30gr
Bis-acrilamida	0,8gr
Agua	csp 100ml

Gel de corrida al 12.5%

Acril-Bis	12.5ml
Tris HCl PH 8.8	7.5ml
Agua	9.5ml
10% SDS	0.3ml
10% APS	0.2ml
Temed	20µl

PBS, pH 7,2-7,6:

Na ₂ HPO ₄	1,19grs
NaH ₂ PO ₄ .	0,22grs
NaCl	8,5grs
Agua destilada	c.s.p 1 L
Ajustar el pH a 7,2-7,4 con NaOH	
0,1N o HCl 1N.	

PBS-Tween

PBS	100ml
Tween-20	1ml

Solución de Bloqueo

PBS	100ml
Tween-20	0,1ml
Leche en Polvo	5 grs

Buffer de Blotting

Tris-Base	5.82grs
Glicina	2.93grs
10% SDS	3.75ml
Metanol	200ml
Agua	csp 1L

Gel de apilamiento al 5%

Acril-Bis	0.66ml
Tris HCl PH 6.8	1.25ml
Agua	2.97ml
10% SDS	50ml
10% APS	75µl
Temed	5µl

Solución de Revelado

PBS	100ml
Diaminobencidina	30mg
H ₂ O ₂	30µl

3.8.2- Electroforesis (SDS-PAGE)

Para la electroforesis se utilizaron geles de 6,5cm altura x 8cm de ancho y 0.1cm de espesor. Una vez ensamblados los vidrios fueron cargados con 5ml de la solución del **Gel de corrida al 12.5%** cubriendo cuidadosamente el espacio restante con agua (para favorecer la polimerización y evitar la formación de un menisco en la parte superior del gel), una vez realizado esto se dejó en posición vertical durante 30-45min a temperatura ambiente hasta que polimerizara. Luego se eliminó el agua de la parte superior secando cuidadosamente con papel absorbente el espacio entre ambos vidrios y se cargaron 1.5ml de la solución del **Gel de apilamiento al 5%** (stacking) inmediatamente se colocó un *peine* formador de pocillos (de una calle ancha de 7cm y dos calles pequeñas de 0.5cm en ambos extremos) y se dejó a temperatura ambiente hasta que polimerizara.

Luego se retiró el peine, se colocó el gel en la cuba de electroforesis y se cubrió con **1X Buffer de reservorio**, seguidamente se sembraron 300µl de una mezcla con 150µl de la proteína p26 recombinante (aproximadamente 0.8µg de proteína total cuantificada por espectrometría UV, es decir 0.11µg de proteína por cm de membrana) y 150µl de **Buffer de Carga** (previamente calentada a 100°C durante 5 min) y en una de las calles de los extremos se sembraron 5µl de un marcador de peso molecular preteñido (PageRuler Prestained – Fermentas).

Finalmente, se realizó la corrida a 50 voltios durante un tiempo aproximado de 4 horas, en el caso de correr dos geles simultáneamente se utilizó un voltaje de 80V durante el mismo tiempo.

En algunos casos también se utilizó el antígeno viral producido en cultivo de células con el fin de intentar identificar alguna de las glicoproteínas del virus.

3.8.3- Transferencia e inmovilización en membrana de nitrocelulosa y Bloqueo

Para la transferencia de la proteína se utilizó el sistema de *sandwich semi-húmedo*. Una vez finalizada la corrida electroforética, se cortó un rectángulo de nitrocelulosa de 5x8cm y 6 piezas de papel secante de igual tamaño.

Luego se procedió a la formación del *sándwich*, sobre la placa correspondiente al polo positivo del equipo de transferencia (TransBlot – BioRad) de la siguiente manera: 3 rectángulos de papel secante, la membrana de nitrocelulosa, el gel de corrida (sin el stacking) y otros 3 rectángulos de papel secante (todos previamente humedecidos en **Buffer de Blotting**), luego de realizar el apilamiento de manera prolija para evitar la formación de burbujas, se colocó la tapa del equipo que actúa como polo negativo y se realizó la transferencia a 15V durante media hora.

Una vez finalizada la transferencia de la p26 se retiró la membrana de nitrocelulosa y se la dejó sumergida en **Solución de Bloqueo** a 4°C durante toda la noche.

3.8.4 - Incubación con anticuerpos

Al día siguiente se realizaron tres lavados de la membrana de 5 minutos cada uno en agitación con **PBS-Tween**. Luego la zona de la membrana en la que se había transferido el antígeno, fue cortada en tiras transversales de 0.5cm de ancho (aproximadamente 12 tiras por gel). Luego de rotular cada una de las tiras, fueron colocadas en tubos de ensayo de 1cm de diámetro por 10cm de alto conteniendo 2ml de **Solución de Bloqueo** y 20µl de suero problema (dilución 1/100).

Posteriormente los tubos fueron tapados y colocados en posición horizontal sobre un agitador orbital (cuidando que la solución cubriera la membrana) y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 90 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación las tiras de membrana fueron lavadas nuevamente

(tres lavados de 5min. con **PBS-Tween** en agitación), luego fueron colocadas, todas juntas, en una placa de Petri con el anticuerpo anti-especie (anti-equino conjugado con peroxidasa – Sigma) en dilución 1/500 (10ml de **Solución de Bloqueo** más 20µl del conjugado) incubándose durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

Paralelamente y a modo de control positivo una tira de cada una de las membranas tratadas fue incubada con un anticuerpo monoclonal específico para la p26, en este caso, empleando una dilución 1/500 del mismo (4µl del monoclonal más 2ml de **Solución de Bloqueo**) y un conjugado anti-ratón (marca Sigma) en dilución 1/1000 (2ml de **Solución de Bloqueo** más 2µl del conjugado) en iguales condiciones que las previamente descritas para los sueros problema.

3.8.5- Revelado e interpretación

Finalmente se realizaron otros tres lavados con **PBS-Tween**, se colocaron las tiras de membrana en una nueva caja de Petri conteniendo la **Solución de Revelado** y se dejaron en agitación suave; hasta observar la aparición de bandas de color marrón (aproximadamente 10-15 minutos) y se frenó la reacción sumergiendo las tiras en agua corriente.

La lectura e interpretación de los resultados se llevó a cabo por comparación entre el patrón de bandas obtenido para los sueros problema y el control positivo (monoclonal), utilizando el marcador de peso molecular para confirmar el tamaño de las bandas observadas.

3.9- Comparación de la Sensibilidad analítica o límite de detección de las técnicas con algunos sueros por dilución a punto final:

Para determinar aproximadamente la sensibilidad analítica de cada una de las técnicas previamente descritas (IDGA, cELISA y WB), se realizaron diluciones seriadas en base 2 (desde puro hasta 1/256) de siete sueros que posteriormente fueron analizados por cada una de las técnicas mencionadas.

3.10- ELISA Indirecto (iELISA)

3.10.1- Principios de la técnica:

Para el desarrollo de la misma se sensibilizó con la proteína recombinante una placa de microtitulación y luego de incubación overnight, lavados y bloqueo se colocaron los sueros problema. Si hubiera anticuerpos específicos en los mismos, reaccionarían con el antígeno no siendo eliminados con los lavados posteriores. Al agregarse por último el anticuerpo anti-equino conjugado este se une al anticuerpo primario dando una reacción de color al colocar el sustrato.

3.10.2- Preparación de reactivos:

Buffer de Sensibilización (pH 9.5-9.6)

CO ₃ HNa	4,2grs
CO ₃ Na ₂	5,3grs
Agua	csp 1L

(no usar posteriormente a la semana de preparado)

Buffer de Lavado (PBS-Tween)

PBS	1L
Tween-20	500µl

Buffer de Bloqueo

PBS	100ml
Tween-20	50µl
Leche en polvo	3grs

Solución de Acido Cítrico

Acido Cítrico	5.25grs
Agua	csp 250ml

Buffer Fosfato

PO ₄ HNa ₂ .7H ₂ O	10.72grs
Agua	csp 200ml

Solución de Revelado

Acido Cítrico	6,25ml
Buffer Fosfato	6.25ml
ABTS	3,75mg
H ₂ O ₂	1,25µl
Se prepara en el momento de usar	

3.10.3- Pegado del antígeno

Para el desarrollo de la técnica de ELISA indirecto se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning 3590). Inicialmente se realizó la dilución del antígeno (la proteína p26 recombinante con una concentración de aproximadamente 5,30ng/µl) en **Buffer de Sensibilización** (dilución al medio colocando 100µl de antígeno y 100µl de buffer de pegado por cada pocillo) y se sembraron 200µl de la mezcla en todos los pocillos de la placa que luego fue incubada a 4° C *overnight*.

3.10.4- Bloqueo

Al día siguiente se realizaron tres lavados con **Buffer de lavado** (200µl/ pocillo). Posteriormente se colocaron 100µl de **Buffer de bloqueo** en toda la placa y se llevó la misma a agitación a temperatura ambiente durante 1 hora.

3.10.5- Incubación con los sueros problema y el anticuerpo secundario

Luego se realizaron otros tres lavados con 200µl de **Buffer de lavado**, se colocaron 100µl de **Buffer de bloqueo** en toda la placa y se agregaron 2ul de cada suero quedando los mismos en

una dilución 1/50 (establecida de acuerdo a la dilución óptima obtenida en la prueba en damero inicial. Ver Resultados).

Se llevó 1 hora en agitación a temperatura ambiente efectuándose después tres lavados.

Se preparó el anticuerpo Conjugado (Anti-equino producido en conejo marcado con peroxidasa – Sigma) con una dilución 1:10.000 (1,5µl del conjugado en 15ml de **Buffer de Bloqueo**). Finalmente se pusieron 100 µl de la dilución del conjugado en toda la placa y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora.

3.10.6- Revelado

Se realizaron tres lavados con 200µl de **Buffer de lavado** en cada pocillo. Luego se agregaron 100µl de la Solución de Revelado/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Por ultimo, se realizó la lectura de la placa a 405 nm en un lector (Titertek Multiscan Plus).

3.10.7- Prueba en Damero

Con el fin de determinar cuáles eran las concentraciones óptimas del antígeno y los sueros a analizar se realizó, en una primer etapa, una prueba en damero utilizando diferentes diluciones de la proteína p26 recombinante enfrentadas a diferentes diluciones de un suero claramente positivo a AIE y otro suero negativo a AIE. Ambos previamente probados por las técnicas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), Western Blot (WB) y cELISA. El conjugado se colocó a la dilución óptima previamente establecida en 1:10.000 (según las especificaciones del fabricante). Las diluciones del antígeno y los sueros se realizaron de acuerdo al siguiente esquema:

Columnas 1 a 6: Suero positivo.

Columnas 7 a 12: Suero negativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ag ½ Ac 1/20	Ag ¼ Ac 1/20	Ag 1/8 Ac 1/20	Ag 1/16 Ac 1/20	Ag 1/32 Ac 1/20	Ag 1/64 Ac 1/20	Ag ½ Ac 1/20	Ag ¼ Ac 1/20	Ag 1/8 Ac 1/20	Ag 1/16 Ac 1/20	Ag 1/32 Ac 1/20	Ag 1/64 Ac 1/20
B	Ag ½ Ac 1/40	Ag ¼ Ac 1/40	Ag 1/8 Ac 1/40	Ag 1/16 Ac 1/40	Ag 1/32 Ac 1/40	Ag 1/64 Ac 1/40	Ag ½ Ac 1/40	Ag ¼ Ac 1/40	Ag 1/8 Ac 1/40	Ag 1/16 Ac 1/40	Ag 1/32 Ac 1/40	Ag 1/64 Ac 1/40
C	Ag ½ Ac 1/80	Ag ¼ Ac 1/80	Ag 1/8 Ac 1/80	Ag 1/16 Ac 1/80	Ag 1/32 Ac 1/80	Ag 1/64 Ac 1/80	Ag ½ Ac 1/80	Ag ¼ Ac 1/80	Ag 1/8 Ac 1/80	Ag 1/16 Ac 1/80	Ag 1/32 Ac 1/80	Ag 1/64 Ac 1/80
D	Ag ½ Ac 1/160	Ag ¼ Ac 1/160	Ag 1/8 Ac 1/160	Ag 1/16 Ac 1/160	Ag 1/32 Ac 1/160	Ag 1/64 Ac 1/160	Ag ½ Ac 1/160	Ag ¼ Ac 1/160	Ag 1/8 Ac 1/160	Ag 1/16 Ac 1/160	Ag 1/32 Ac 1/160	Ag 1/64 Ac 1/160
E	Ag ½ Ac 1/320	Ag ¼ Ac 1/320	Ag 1/8 Ac 1/320	Ag 1/16 Ac 1/320	Ag 1/32 Ac 1/320	Ag 1/64 Ac 1/320	Ag ½ Ac 1/320	Ag ¼ Ac 1/320	Ag 1/8 Ac 1/320	Ag 1/16 Ac 1/320	Ag 1/32 Ac 1/320	Ag 1/64 Ac 1/320
F	Ag ½ Ac 1/640	Ag ¼ Ac 1/640	Ag 1/8 Ac 1/640	Ag 1/16 Ac 1/640	Ag 1/32 Ac 1/640	Ag 1/64 Ac 1/640	Ag ½ Ac 1/640	Ag ¼ Ac 1/640	Ag 1/8 Ac 1/640	Ag 1/16 Ac 1/640	Ag 1/32 Ac 1/640	Ag 1/64 Ac 1/640
G	Ag ½ Ac 1/1280	Ag ¼ Ac 1/1280	Ag 1/8 Ac 1/1280	Ag 1/16 Ac 1/1280	Ag 1/32 Ac 1/1280	Ag 1/64 Ac 1/1280	Ag ½ Ac 1/1280	Ag ¼ Ac 1/1280	Ag 1/8 Ac 1/1280	Ag 1/16 Ac 1/1280	Ag 1/32 Ac 1/1280	Ag 1/64 Ac 1/1280
H	Ag ½ Ac 1/2560	Ag ¼ Ac 1/2560	Ag 1/8 Ac 1/2560	Ag 1/16 Ac 1/2560	Ag 1/32 Ac 1/2560	Ag 1/64 Ac 1/2560	Ag ½ Ac 1/2560	Ag ¼ Ac 1/2560	Ag 1/8 Ac 1/2560	Ag 1/16 Ac 1/2560	Ag 1/32 Ac 1/2560	Ag 1/64 Ac 1/2560

Para determinar el punto de corte (cut-off) se procesaron 48 sueros, con diagnóstico previamente definido por IDGA y cELISA (22 positivos y 26 negativos) por duplicado. Posteriormente los valores de absorbancia obtenidos fueron analizados mediante una curva ROC (Receiver Operating Characteristic) utilizando el software MedCalc version 9.3. Una vez determinado el valor de corte, se procesaron los 200 sueros problema.

3.11 Sensibilidad y especificidad comparativas

Una vez examinados los sueros problema por todas las técnicas previamente descritas se realizó una comparación de los resultados obtenidos por medio de tablas de doble entrada de las distintas técnicas contra la técnica de IDGA (considerada como gold standard) y contra el valor verdadero, con la finalidad de evaluar la sensibilidad, especificidad, concordancia y valor Kappa (Software Win Episcopo 2.0) y de esta manera poder estimar la utilidad diagnóstica de cada una.

		RESULTADOS VERDADEROS		
		Negativos	Positivos	
RESULTADOS DE LA TÉCNICA	Negativos	VN	FN (Falsos negativos)	
	Positivos	FP (Falsos positivos)	VP	
				TOTAL

VP: Positivos Verdaderos: resultados (+) por la técnica y resultado verdadero del suero

VN: Negativos Verdaderos: resultados (-) por la técnica y resultado verdadero del suero

Sensibilidad: $VP/(VP+FN)$

Especificidad: $VN/(VN+FP)$

Concordancia: $(VN + VP)/Total$

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de la proteína p26 recombinante

Una vez expresada la proteína recombinante (Sección 3.1), se realizó un proceso de shock osmótico, con el cual se pueden recobrar las proteínas presentes en el espacio periplásmico, sin producir la disrupción de la pared bacteriana, permitiendo de este modo la liberación de la proteína de interés y solamente unas pocas proteínas adicionales. Como control de este método, sobre otra parte del cultivo se llevó a cabo un tratamiento de lisis por calor con el fin de liberar las proteínas totales de las bacterias (presentes tanto en el citoplasma como en el periplasma).

Las muestras así obtenidas, fueron concentradas por precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ seguida de diálisis para eliminar los restos de sales, que luego fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para confirmar la identidad y el tamaño de la proteína obtenida, se realizó un Western Blot, para lo cual, una vez que las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que luego se incubó con anticuerpos policlonales (provenientes de suero de caballos infectados) a continuación se incubó la membrana con un segundo anticuerpo (anti-especie) conjugado con peroxidasa para su posterior revelado por quimioluminiscencia y autoradiografía en placa radiográficas. Estos resultados fueron corroborados por medio de un segundo Western Blot en el que se utilizó un anticuerpo monoclonal (anti-p26) Figura 4.

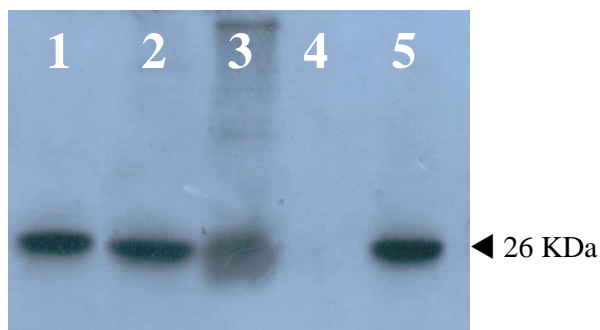


FIGURA 4 Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal (anti-p26)

1-Proteínas del periplasma; 2-Proteínas totales; 3-Control positivo (proteínas virales)
4-Control negativo (bacterias sin el plásmido); 5-Proteínas concentradas con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

4.2 Replicación viral en cultivos celulares

Debido a que el virus de la AIE no produce efecto citopático en las células de dermis equina utilizadas para su propagación, se realizó una RT-PCR (como se describe en el Sección 3.4) con

el fin de corroborar la presencia del virus en el sobrenadante de los cultivos celulares observándose una banda de aproximadamente 650pb (de acuerdo a lo esperado).

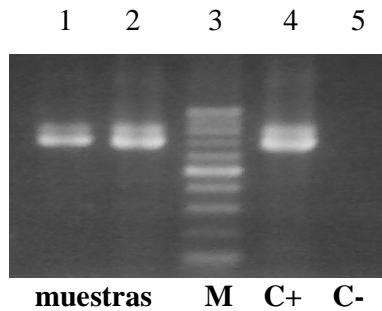


FIGURA 5 RT-PCR:

1 y 2: Muestras sembradas por duplicado; 3: M: Marcador de Peso Molecular
4: C+: Control Positivo; 5: C-: Control Negativo

4.3 Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA): Algunos ejemplos de lecturas de los sueros probados en la Dirección de Laboratorios y Control Técnico (DILAB) SENASA.

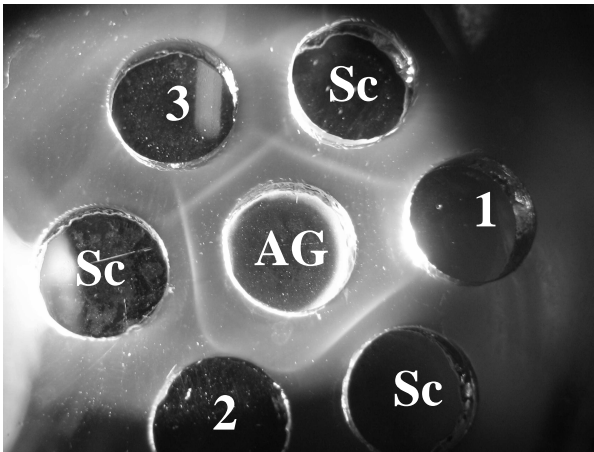


FIGURA 6

Suero 1: negativo, suero 2: débil positivo
Suero 3: negativo (con línea inespecífica)

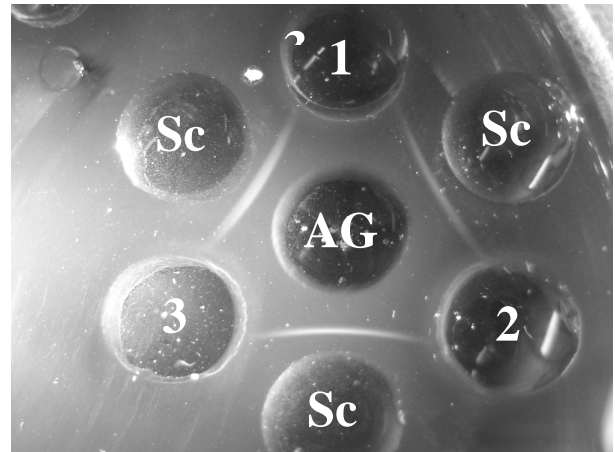


FIGURA 7

Sueros 1, 2 y 3: negativos
Sc: suero Control Positivo y AG: Antígeno

De los 200 sueros analizados por la técnica de IDGA, 139 dieron resultado negativo y 61 fueron positivos.

4.4 ELISA de competición (cELISA)

Para el análisis de los sueros problema por la técnica de cELISA se utilizó un kit comercial, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, tal como se describe en la Sección 3.7. Para la

interpretación de los resultados se realizó una lectura directa de la placa, tomando como criterio de positividad la ausencia de color, mientras que los sueros con un color similar o más intenso que el control positivo fueron considerados negativos (Figura 8). En aquellos casos en los que existiera una sospecha en la lectura directa (color intermedio entre el control positivo y negativo) se realizó una lectura en un lector de placas midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 650nm (DO_{650}). Para considerar válida la prueba, según el instructivo del fabricante, la DO_{650} del control positivo debe ser mayor o igual a 0.15 y a su vez debe ser menor o igual al 70% de la DO_{650} del control negativo, considerando como negativos aquellos sueros con una DO_{650} mayor a la del control positivo de acuerdo a lo indicado en el instructivo que acompaña al kit.

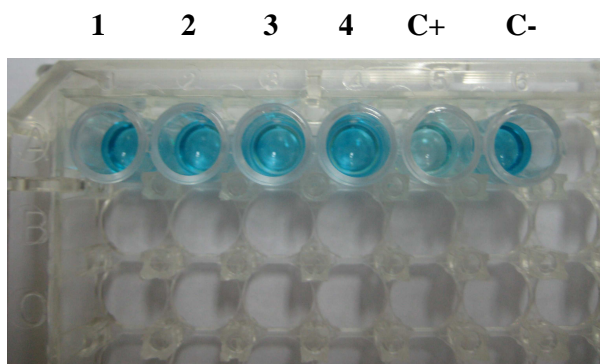


Figura 8 ejemplo de placa de cELISA. C+: control positivo;
C-: control negativo; 1, 2, 3 y 4: sueros problemas (todos negativos)

De los 200 sueros analizados por esta técnica, 136 dieron resultado negativo y 64 fueron positivos (uno de los sueros tuvo resultado sospechoso tanto por lectura directa (color similar al C+) como utilizando el lector (DO apenas superior al C+) y fue considerado positivo, aplicando el mismo criterio que para la IDGA donde algunos sueros fueron de lectura muy débil positiva casi en el límite de detección).

4.5 Western Blot (WB)

Por medio de esta técnica, se detectó una banda de peso molecular correspondiente a 26KDa que fue reconocida específicamente por anticuerpos poli y monoclonales contra el virus de AIE y los resultados obtenidos por la misma fueron luego comparados con los previamente obtenidos por IDGA y cELISA. Se aclara que algunas de las bandas de las figuras que no son tan visibles en las fotos escaneadas se veían más claramente en la lectura directa realizada al final del ensayo.

Figuras -9-10, 11 y 12: WB utilizando proteína p26 recombinante.

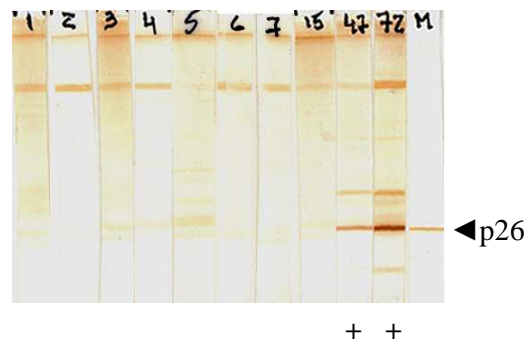


Figura 9 M: anticuerpo monoclonal 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 15: sueros negativos.
47 y 72: sueros positivos

En este caso en los sueros positivos que fueron enfrentados contra el antígeno recombinante, se consideraron como positivos aquellos sueros que reaccionaron específicamente contra la p26 sin contar con la presencia de otros antígenos del virus AIE.

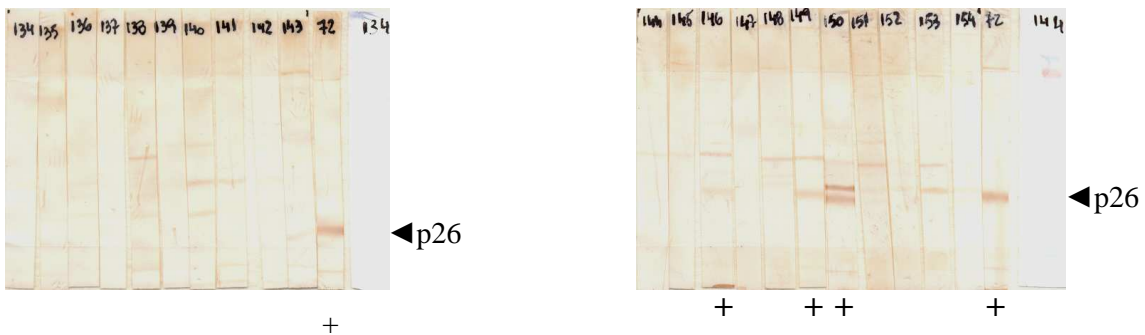


Figura 10 Negativos: 134-135-136-137-138-139-140-141-142-144-145- 147-148-151-152-153-154. Positivos: 146-149-150-72 (control positivo)



Figura 11 Negativos: 155-156-157-158-159-160-161-162-163-143-164-165-166-167-172-173.
Positivos 168-169-170-171(muy débil positivo)-72 (control positivo).

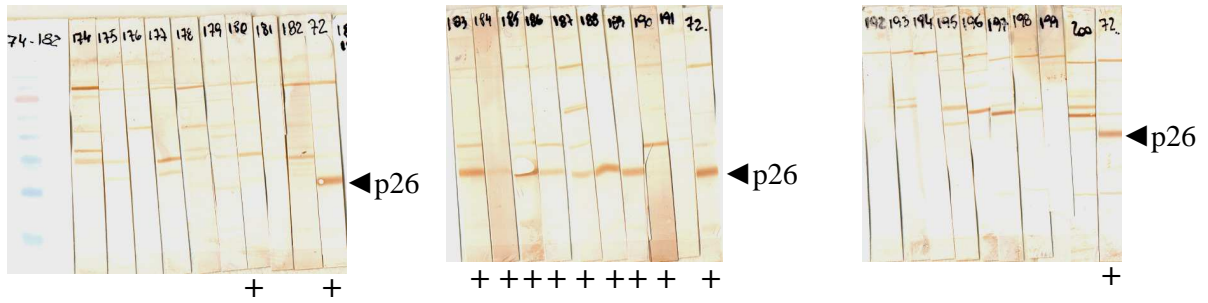


Figura 12 Negativos: códigos 174 al 179-191 al 200, 181 y 182
 Positivos: 180-183 al 190 y 72 (control positivo).

Cuando se utilizó el antígeno obtenido a partir de cultivo celular, descrito en la sección 3.2, se observaron bandas no tan definidas y una mayor cantidad de bandas inespecíficas no visualizándose bandas de las glicoproteínas de superficie. Esto se debió probablemente a que estas glicoproteínas están en menor concentración que la proteína p 26. (Figuras 13, 14 y 15)

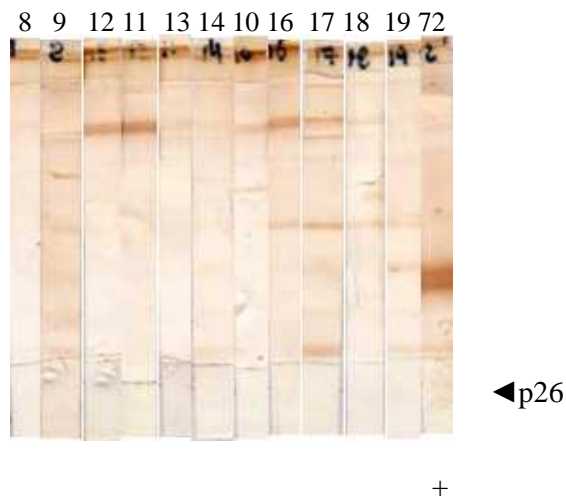


Figura 13 Negativos: 8-9-12-11-13-14-10-16-17-18-19. Positivo: 72 (control positivo).

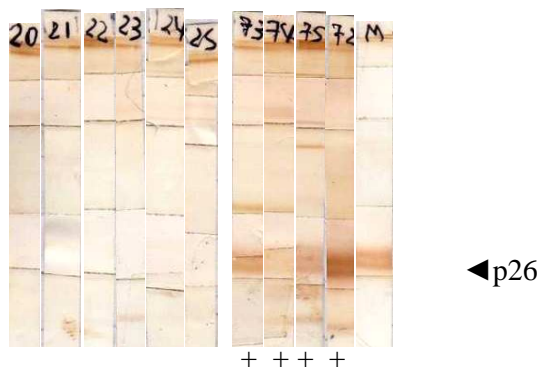


Figura 14 Negativos: 20-21-22-23-24-25. Positivos: 73-74-75-72-M (Monoclonal)

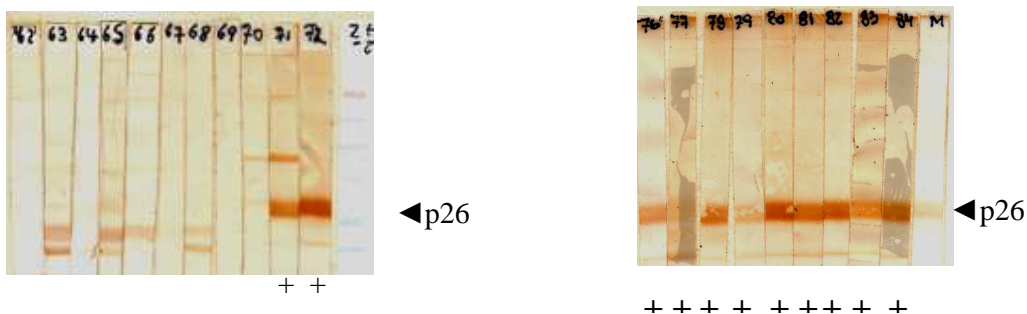


Figura 15 Negativos: 62-63-64-65-66-67-68-69-70 Positivos: 71-76-77-78-79-80-81-82-83-84-
M (monoclonal) y 72 (control positivo).

Posteriormente, con el producto obtenido de la concentración y purificación antes descrita se probaron algunos sueros problema por la técnica de WB para ver si daban los resultados esperados y se obtenían más bandas específicas además de la p26.

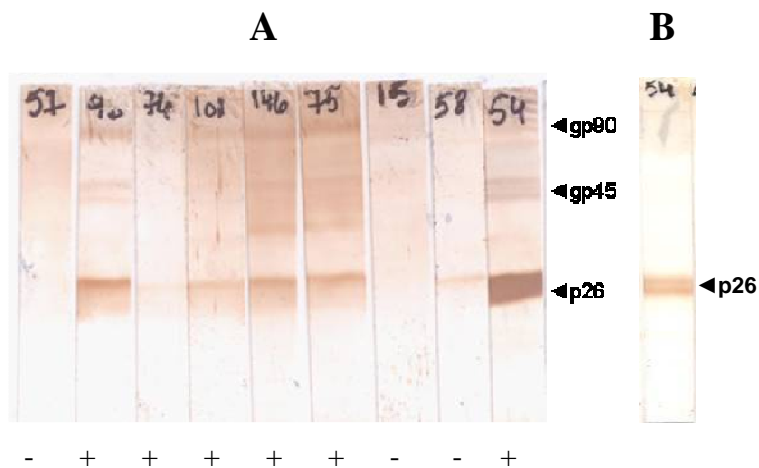


Figura 16 WB de distintos sueros de lectura difícil por alguna de las otras técnicas realizado a partir del virus purificado (A). Utilizando el suero 54 como control positivo contra la proteína recombinante (B).

Al utilizar el antígeno producido en cultivo celular concentrado y parcialmente purificado (descrito en 3.3), se pudo observar la presencia de la banda p26 y de las glicoproteínas de la envoltura viral que no aparecían en los casos anteriores (figura 16-A).

En la tabla 2 (pagina 44) están los resultados de los sueros 74-101-146-75 y 15 con las otras técnicas. El suero 15 fue sospechoso por la técnica de cELISA y 74 y 101 negativos por IDGA.

4.6 Comparación de la Sensibilidad analítica o límite de detección de las técnicas con algunos sueros de la seroteca de DILAB. SENASA por dilución a punto final:

Resultados obtenidos

Tabla 1: está indicado el título hasta el cual los sueros probados dieron positivo por las diferentes técnicas:

	IDGA	cELISA	WB
Nº34	½	1/4	1/16
Nº2	1/8	1/32	1/64
Nº 3	1/16	1/128	1/128
Nº9	1/8	1/32	1/128
Nº10	1/8	1/32	1/256
GATO	1/8	1/64	1/64
Nº13	1/16	1/32	1/64

Como se puede apreciar los 7 sueros se negativizaron en diluciones más bajas por la técnica de IDGA, siendo en general detectables por la técnica de WB a diluciones mayores que por la técnica de cELISA.

4.7 ELISA Indirecto (iELISA)

Primer prueba: en Damero:

Como una primera aproximación, los valores de absorbancia obtenidos en la prueba en damero para las distintas combinaciones de diluciones de antígeno y suero positivo y negativo fueron comparadas entre si.

Densidades ópticas (DO) medidas con el espectofotómetro:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	Ag ½	Ag ¼	Ag 1/8	Ag 1/16	Ag 1/32	Ag 1/64	Ag ½	Ag ¼	Ag 1/8	Ag 1/16	Ag 1/32	Ag 1/64	Suero
A	0,840	0,741	0,642	0,743	0,715	0,627	0,395	0,446	0,465	0,404	0,448	0,416	1/20
B	0,706	0,701	0,661	0,641	0,616	0,563	0,170	0,203	0,258	0,234	0,229	0,247	1/40
C	0,680	0,629	0,655	0,552	0,457	0,441	0,147	0,172	0,186	0,171	0,169	0,193	1/80
D	0,553	0,531	0,544	0,442	0,382	0,333	0,124	0,136	0,144	0,135	0,162	0,156	1/160
E	0,494	0,483	0,409	0,330	0,316	0,314	0,116	0,125	0,130	0,139	0,130	0,130	1/320
F	0,382	0,378	0,300	0,249	0,256	0,235	0,108	0,116	0,117	0,108	0,128	0,126	1/640
G	0,226	0,245	0,212	0,171	0,176	0,165	0,099	0,097	0,099	0,094	0,102	0,113	1/1280
H	0,154	0,177	0,156	0,132	0,163	0,139	0,105	0,107	0,101	0,106	0,121	0,110	1/2560

Para establecer la dilución de uso de los sueros se utilizaron los parámetros fijados por la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, 1989) que considera como tal a aquella dilución en donde se encuentra la mayor diferencia de valores de DO entre el suero positivo y el negativo y se minimiza el valor de lectura inespecífica comprobada con el suero negativo (background), de esta manera fueron considerados:

Positivos (en color verde) los valores de DO mayores a 0.6

Dudosos (en color amarillo) los valores de DO entre 0.6 y 0.35.

Negativos (en color rojo) los valores de DO menores a 0.35.

Posteriormente, se realizó la resta de los valores de absorbancia del suero positivo y negativo para las mismas concentraciones de suero y antígeno (por ejemplo A1-A7 (A1: suero positivo 1/20 + ag 1/2 y A7 suero negativo 1/20 +ag 1/2) , A2-A8, etc) obteniéndose los siguientes valores:

	1 - 7	2 - 8	3 - 9	4 - 10	5 - 11	6 - 12	Dil suero
A	0,445	0,295	0,177	0,339	0,267	0,211	1/20
B	0,536	0,498	0,403	0,407	0,387	0,316	1/40
C	0,533	0,457	0,469	0,381	0,288	0,248	1/80
D	0,429	0,395	0,400	0,307	0,220	0,177	1/160
E	0,378	0,358	0,279	0,191	0,186	0,184	1/320
F	0,274	0,262	0,183	0,141	0,128	0,109	1/640
G	0,127	0,148	0,113	0,077	0,074	0,052	1/1280
H	0,049	0,070	0,055	0,026	0,042	0,029	1/2560
Dil Ag	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	

Luego se buscó la intersección entre las diluciones de antígeno y de antisuero que dan los valores más altos (señalados en verde) lo cual, implica que hay una mayor distancia entre el valor positivo y negativo. Así se pudo determinar la dilución de uso del antígeno y del suero. Es decir en las diluciones 1/2-1/4 del antígeno y las diluciones 1/40 y 1/80 del suero.

Por lo tanto se definió como optima una dilución 1/2 para el antígeno (p26) y 1/50 para los sueros problema.

Finalmente, se procesaron 48 sueros (22 positivos y 26 negativos) por duplicado. Posteriormente los valores de absorbancia obtenidos fueron analizados mediante una curva ROC. De esta manera se fijó el valor de corte en 0.285 con el fin de evitar la presencia de falsos negativos.

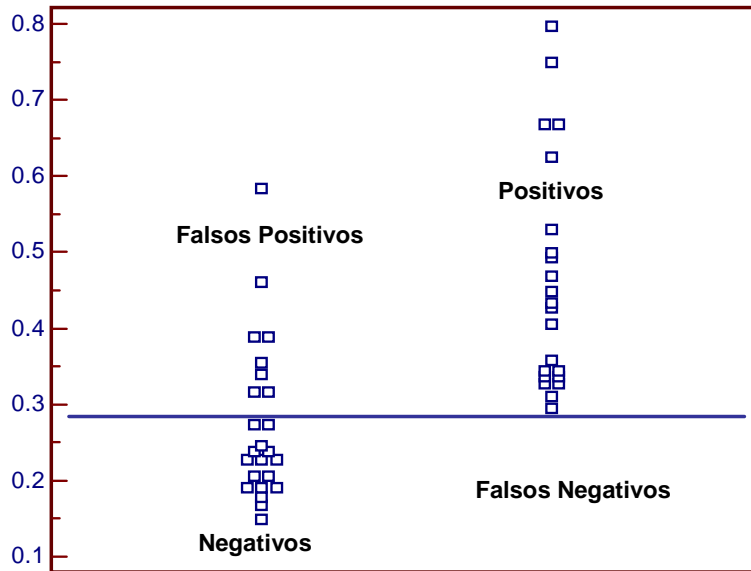


FIGURA 17. DIAGRAMA DE PUNTOS para determinar el valor de corte a emplear en la técnica de iELISA

Como puede observarse en la **Figura 17**, al fijar el valor de corte en 0.285, si bien no se obtuvo ningún falso negativo (FN) la cantidad de falsos positivos (FP) fue relativamente alta, 8 sueros lo que representa un 16.7% de los sueros analizados. Posteriormente utilizando este valor de cut-off se probaron los 200 sueros problema.

En el procesamiento de los mismos con ese valor de corte se observó un porcentaje de falsos positivos (FP) de 19.5% (39/200) aunque se presentó también un suero falso negativo es decir un 0.5 % de FN. (1/200). Evidentemente era necesaria una mejor purificación del antígeno para evitar el alto número de FP que se obtuvieron debido a que se utilizó la p26r ya obtenida previamente en la Cátedra de Virología de la Facultad de la Plata.

4.8 Análisis estadístico de los resultados

Verdaderos negativos	Verdaderos positivos
137	63

Resultados obtenidos con las diferentes técnicas:

Técnicas	Negativos	positivos	Total
IDGA	139	61	200
cELISA	136	64	200
WB	137	63	200
iELISA	98	102	200

Para la comparación de las técnicas se computan los sospechosos como positivos. En la IDGA 3 sueros eran sospechosos y se computaron positivos aunque eran de muy difícil lectura. En la técnica de cELISA, un suero dió sospechoso y se computó como positivo.

Comparación de técnicas con el resultado verdadero:

		Resultado verdadero		Totales
		Negativos	Positivos	
IDGA	Negativos	137	2	139
	Positivos	0	61	61
Totales		137	63	200

Sensibilidad= $61 \times 100 / 61 + 2 = 96,82\%$

Especificidad= $137 \times 100 / 137 + 0 = 100\%$

Concordancia= $61 + 137 / 200 = 0.99$

Kappa=0.977

		Resultado verdadero		Totales
		Negativos	Positivos	
cELISA	Negativos	136	0	136
	Positivos	1	63	64
Totales		137	63	200

Sensibilidad= $63 \times 100 / 63 + 0 = 100\%$

Especificidad= $136 \times 100 / 136 + 1 = 99,27\%$

Concordancia= $136 + 63 / 200 = 0.995$

Kappa=0.988

		Resultado verdadero		Totales
		Negativos	Positivos	
WB	Negativos	137	0	137
	Positivos	0	63	63
Totales		137	63	200

Sensibilidad= $63 \times 100 / 63 + 0 = 100\%$

Especificidad= $137 \times 100 / 137 + 0 = 100\%$

Concordancia= $137 + 63 / 200 = 1$

Kappa= 1

		Resultado verdadero		
		Negativos	Positivos	Totales
iELISA	Negativos	98	1	99
	Positivos	39	62	101
Totales		137	63	200

Sensibilidad= $63 \times 100 / 63 + 1 = 98,4 \%$

Especificidad= $97 \times 100 / 97 + 39 = 71,5\%$

Concordancia= $97 + 63 / 200 = 0,8$

Kappa=0.603

Comparación de técnicas con la técnica Gold Standard (IDGA):

		IDGA		
		Negativos	Positivos	Total
cELISA	Negativos	136	0	136
	Positivos	3	61	64
Totales		139	61	200

Sensibilidad= $61 \times 100 / 61 + 0 = 100\%$

Especificidad= $136 \times 100 / 136 + 3 = 97,84\%$

Concordancia= $136 + 61 / 200 = 0,985$

Kappa=0.965

		IDGA		
		Negativos	Positivos	Totales
WB	Negativos	137	0	137
	Positivos	2	61	63
Totales		139	61	200

Sensibilidad= $61 \times 100 / 0 + 61 = 100\%$

Especificidad= $137 \times 100 / 137 + 2 = 98,56\%$

Concordancia= $137 + 61 / 200 = 0,99$

Kappa=0.977

		IDGA		
		Negativos	Positivos	Totales
iELISA	Negativos	98	1	99
	Positivos	41	60	101
Totales		139	61	200

Sensibilidad= $60 \times 100 / 1 + 60 = 98,3\%$

Especificidad= $98 \times 100 / 98 + 41 = 70,5\%$

Concordancia= $98 + 60 / 200 = 0,79$

Kappa=0.582

Tabla 2: Sueros de difícil lectura por alguna de las técnicas empleadas.

Código	IDGA	cELISA	WB	iELISA	Resultado Verdadero
15	Negativo	sospechoso	Negativo	Negativo	Negativo
74	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
75	Positivo (muy débil)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
98	Positivo (borderline)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
101	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
103	Positivo (borderline)	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
146	Positivo (borderline)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
184	Positivo (muy débil)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
91	Positivo (muy débil)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Aclaración: los resultados sospechosos por IDGA son sueros muy débiles positivos, casi negativos.

Código 103: es un suero talón de Alfort Francia.

Códigos 74 y 101: es el mismo suero recodificado de la Seroteca DILAB: suero muy débil positivo que fue mantenido durante 15 días refrigerado.

Códigos 75 y 146: es el mismo suero recodificado de la Seroteca DILAB.

Código 15: Suero de importación.

Códigos 91, 98 y 184: sueros de Seroteca DILAB

Concordancia e índice Kappa de las diferentes técnicas con el resultado verdadero:

TÉCNICA	CONCORDANCIA	Kappa
IDGA	0,99	0.977
cELISA	0,995	0.988
WB	1	1
iELISA	0,8	0.603

Concordancia e índice Kappa de las técnicas con la técnica gold standard (IDGA)

TECNICA	CONCORDANCIA	Kappa
cELISA	0,985	0.965
WB	0,99	0.877
iELISA	0,79	0.582

4.9 Resultado de los 200 sueros analizados con cada técnica

Tabla 3: Resultado de los 200 sueros analizados con cada técnica

Suero	IDGA	cELISA	WB	IELISA
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	(+)
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	(+)	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	(+)
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	(+)
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	-	-	-	-
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	-	-	-	-
46	-	-	-	-
47	-	-	-	(+)
48	-	-	-	-
49	-	-	-	-
50	-	-	-	-
51	-	-	-	-
52	-	-	-	-
53	-	-	-	(+)
54	+	+	+	+
55	-	-	-	-
56	-	-	-	-
57	-	-	-	-
58	-	-	-	-
59	-	-	-	-
60	-	-	-	(+)
61	-	-	-	(+)
62	-	-	-	-
63	-	-	-	-
64	-	-	-	-
65	-	-	-	(+)
66	-	-	-	(+)
67	-	-	-	-
68	-	-	-	(+)
69	-	-	-	-
70	-	-	-	-
71	+	+	+	+
72	+	+	+	+
73	+	+	+	+
74	(-)	+	+	+
75	+	+	+	+
76	+	+	+	+
77	+	+	+	+
78	+	+	+	+
79	+	+	+	+
80	+	+	+	+
81	+	+	+	+
82	+	+	+	+
83	+	+	+	+
84	+	+	+	+
85	+	+	+	+
86	+	+	+	+
87	+	+	+	+
88	+	+	+	+
89	+	+	+	+
90	+	+	+	+
91	+	+	+	+
92	+	+	+	+
93	+	+	+	+
94	+	+	+	+
95	-	-	-	(+)
96	+	+	+	+
97	+	+	+	+
98	+	+	+	+
99	+	+	+	+
100	+	+	+	+

Suero	IDGA	cELISA	WB	IELISA
101	(-)	+	+	+
102	+	+	+	+
103	+	+	+	(-)
104	+	+	+	+
105	+	+	+	+
106	-	-	-	(+)
107	+	+	+	+
108	+	+	+	+
109	+	+	+	+
110	+	+	+	+
111	-	-	-	-
112	+	+	+	+
113	+	+	+	+
114	+	+	+	+
115	-	-	-	(+)
116	+	+	+	+
117	+	+	+	(+)
118	+	+	+	+
119	+	+	+	+
120	-	-	-	(+)
121	-	-	-	(+)
122	+	+	+	+
123	-	-	-	-
124	+	+	+	+
125	+	+	+	+
126	-	-	-	-
127	-	-	-	(+)
128	-	-	-	-
129	-	-	-	-
130	(-)	-	-	-
131	-	-	-	(+)
132	-	-	-	-
133	-	-	-	(+)
134	-	-	-	-
135	-	-	-	-
136	-	-	-	-
137	-	-	-	-
138	-	-	-	(+)
139	-	-	-	(+)
140	-	-	-	(+)
141	-	-	-	(+)
142	-	-	-	(+)
143	-	-	-	(+)
144	-	-	-	(+)
145	-	-	-	(+)
146	+	+	+	+
147	-	-	-	-
148	-	-	-	(+)
149	+	+	+	+
150	+	+	+	+
151	-	-	-	(+)
152	-	-	-	(+)
153	-	-	-	(+)
154	-	-	-	-
155	-	-	-	-
156	-	-	-	(+)
157	-	-	-	-
158	-	-	-	-
159	-	-	-	-
160	-	-	-	-
161	-	-	-	-
162	-	-	-	-
163	-	-	-	-
164	-	-	-	-
165	-	-	-	(+)
166	-	-	-	-
167	-	-	-	-
168	+	+	+	+
169	+	+	+	+
170	+	+	+	+
171	+	+	+	+
172	-	-	-	(+)
173	-	-	-	-
174	-	-	-	-
175	-	-	-	(+)
176	-	-	-	-
177	-	-	-	-
178	-	-	-	-
179	-	-	-	(+)
180	+	+	+	+
181	-	-	-	-
182	-	-	-	-
183	+	+	+	+
184	+	+	+	+
185	+	+	+	+
186	+	+	+	+
187	+	+	+	+
188	+	+	+	+
189	+	+	+	+
190	+	+	+	+
191	-	-	-	-
192	-	-	-	-
193	-	-	-	-
194	-	-	-	-
195	-	-	-	-
196	-	-	-	(+)
197	-	-	-	-
198	-	-	-	(+)
199	-	-	-	-
200	-	-	-	(+)

Aclaración: (+) o (-): resultado discordante con las demás técnicas.

5 DISCUSIÓN:

La población equina que transita por el país es controlada cada 2 meses debido a la fecha de validez de la certificación diagnóstica establecida en la reglamentación vigente. (Resolución SAG y P 617/05). En cambio hay poblaciones de equinos que al no ser testeadas en cuanto a su status referente a esta enfermedad, pueden constituir reservorios de la infección.

Por otro lado, un bajo porcentaje de equinos, burros y mulas infectados con AIE pueden ser portadores del virus pero no ser detectados en los diagnósticos serológicos de rutina (falso negativos por la técnica de IDGA).

“Normalmente se elaboran nuevos ensayos para mejorar las técnicas existentes. Para demostrar que un nuevo ensayo supone una mejora de una técnica ya existente, debe existir alguna forma de comparación que lo demuestre” (OIE, 2008b).

En los ensayos originales realizados por el Dr. Coggins y col para estudiar la por entonces nueva técnica diagnóstica de IDGA, se realizaron entre otras pruebas, inoculaciones experimentales de 111 equinos con posterior estudio de los signos clínicos y determinación de los anticuerpos por la misma. Como se explica en la discusión de dicho trabajo: “el nivel preciso de exactitud de una técnica, como en el test de inmunodifusión para anticuerpos, solo puede medirse testeando un número infinito de caballos; consecuentemente, siempre existe alguna incertidumbre sobre si la técnica realmente satisface el requerimiento mínimo específico de 95% de confianza. Un nivel del 5% de incertidumbre ha sido adoptado en la mayoría de los campos científicos” (Coggins, 1972).

La evaluación de nuevas técnicas diagnósticas que son más sensibles que las existentes puede ser difícil. Primero, debido a que inevitablemente surgirán discrepancias entre el viejo test y los ensayos nuevos más sensibles. El uso del test ya existente como Standard para determinar el status de infección absoluto puede dar una falsa baja especificidad para el nuevo y más sensible test. Idealmente, debería usarse información adicional como el uso de muestras longitudinales para resolver estas discrepancias (Langemeier, 1996).

De manera inversa, puede suceder que el nuevo test en estudio sea menos sensible que el test en uso. Como ejemplo, en la búsqueda de contar con técnicas rápidas y sencillas se han realizado trabajos de investigación como el del desarrollo de ensayos diagnósticos basados en la polarización de focos fluorescentes (PFF) (Burroughs Tencza, 2000).

Esta técnica permite la lectura en unos pocos minutos y la posible utilización de la misma a campo debido a su sencillez y la estabilidad de los reactivos empleados. En el trabajo mencionado se realizó la comparación entre las técnicas de IDGA y PFF. Si bien la PFF fue altamente específica (100% de especificidad), presentó una menor sensibilidad dando mayor número de falso negativos. (89,4% de sensibilidad). Esto descarta el posible uso de la técnica de PFF para el diagnóstico de AIE, al menos hasta que se aumente la sensibilidad de la misma.

En otros casos la nueva técnica ensayada, puede tener una especificidad inferior a la de la técnica en uso (la considerada como Gold Standard) y podría ser utilizada para el screening de un gran número de muestras. Pero para que la misma sea adecuada para el screening debe tener una sensibilidad igual (o mayor) a la de la Gold Standard y ser capaz de detectar los sospechosos que serán posteriormente confirmados por técnicas más específicas. Por otro lado, tampoco puede tener una muy baja especificidad dando un número alto de falsos positivos porque no sería viable su utilización.

En el presente trabajo se compararon diferentes técnicas con el objetivo de incrementar las herramientas diagnósticas de modo de mejorar la detección de casos positivos a Anemia Infecciosa Equina y poder definir el diagnóstico en sueros con niveles casi indetectables de anticuerpos por la técnica de Inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Posteriormente se realizaron tablas de contingencia comparando los resultados de las diferentes técnicas con el “valor verdadero” conocido de antemano y de las diferentes técnicas con la técnica “Gold Standard” que es la IDGA.

Al comparar la técnica de IDGA contra el WB en nuestro caso se obtuvo un valor de concordancia del 99%. En un trabajo similar (Alvarez, 2007b), comparando los resultados de la técnica de IDGA con un WB basado en el uso de una proteína p26 recombinante encontraron una concordancia entre ambas técnicas del 98.9% (100% de sensibilidad y 98.56% de especificidad). Cuando comparamos la cELISA con la técnica de IDGA la concordancia fue del 98.5% (100 % de sensibilidad y 97.84% de especificidad).

Estos últimos valores son similares a los presentados en otros trabajos como el de Paré y col (2004) donde la comparación de la cELISA y la técnica de IDGA con el kit utilizado en Canadá, fue del 99.7% de sensibilidad relativa y 99.7 % de especificidad relativa y concordancia de 99%, con lectura directa como realizamos nosotros.

Generalmente se recurre a medidas de asociación cuando se quiere evaluar el grado de asociación entre dos variables y no únicamente comprobar analíticamente si existe relación o no entre las mismas. Un caso especial, que se engloba dentro de las medidas de asociación, es la concordancia. Se habla de concordancia cuando se quiere evaluar si dos formas de medir o clasificar la misma característica en una escala categórica concuerdan o no.

El término sensibilidad y especificidad relativa se debe a que realizaron comparaciones entre pruebas y kits diagnósticos sin otra posterior confirmación del status de infección de los animales. De hecho, “el test de IDGA es el único test que ha sido correlacionado con la presencia del virus a través de la prueba de inoculación en equinos” (Cullinane, 2007 y Cappelli, 2011).

Con la técnica de ELISA indirecta se obtuvo un alto número de sueros falsos positivos al intentar obtener un valor de corte y también posteriormente al analizar los 200 sueros, debido a que la proteína recombinante utilizada en el test no estaba suficientemente purificada y otras proteínas contaminantes pueden haberse unido generando reacciones inespecíficas. Al mismo tiempo en la prueba de damero se ve que la sensibilidad no fue satisfactoria. Por estos motivos se decidió no continuar el trabajo con este test de ELISA hasta que se logre una purificación mayor de la proteína o desarrollar un sistema de ELISA de competición con un anticuerpo monoclonal específico para la proteína p26.

Si bien para el WB se utilizó la misma proteína recombinante, en este caso la presencia de bandas inespecíficas no interfirieron con la lectura ya que se consideraron positivos solamente aquellos sueros que dieron una banda a la altura de los 26 KDa.

“La sensibilidad analítica de un ensayo puede evaluarse mediante la cuantificación de la cantidad más pequeña de la sustancia que es detectable en la muestra. Esto puede conseguirse limitando las diluciones de un estándar de concentración conocida de la sustancia a analizar.” (OIE, 2008b).

Teniendo en cuenta este concepto y con el objetivo de poder comparar el límite de detección de anticuerpos por las diferentes técnicas, se probaron diluciones seriadas de algunos sueros con diagnóstico positivo a AIE para estudiar hasta qué dilución de los mismos se obtenían resultados positivos con cada una de ellas.

Álvarez, (2007b) utilizando la técnica de WB desarrollada por ellos a partir de un antígeno p26 recombinante obtuvieron 6 muestras con resultados discordantes con la técnica de IDGA. (6

positivas por rp26WB que fueron 5 negativas y 1 inconclusa por IDGA). Las mismas fueron remitidas al NVSL y dieron las 6 positivas por WB (todas fueron positivas a p26 y a gp90 y 2 de ellas también a gp45).

Por otro lado observaron que diluyendo sueros positivos a AIE el límite de detección de los mismos por WB fue de 1/32 a 1/128 diluciones más altas que los títulos por la técnica de IDGA, siendo similar a lo que observamos al diluir algunos sueros. En nuestro caso fueron probados 7 sueros y se observó que por la técnica de WB fueron diagnosticados como positivas mayores diluciones que por las técnicas de IDGA (1/4 a 1/32 diluciones más altas), por otro lado con el WB el nivel de detección con respecto al cELISA fue también más alto.

En esto último puede influir la agudeza visual y también la subjetividad del operador en cuanto a la observación de la banda correspondiente a la p26 por la técnica de WB, en las progresivas diluciones de los sueros.

En los resultados obtenidos por nosotros con los 200 sueros probados por las diferentes técnicas se aclara que 4 sueros leídos por IDGA que eran de muy difícil lectura (muy débil positivo o sospechoso) se registraron como positivos. Es probable que los mismos fueran diagnosticados como negativos por un laboratorista con menor experiencia arrojando otros resultados en la comparación entre técnicas.

En lo que respecta a los tiempos necesarios para poder emitir el diagnóstico, los mismos son de, aproximadamente 1 hora para la técnica de cELISA, por lo cual, es una técnica de screening de gran utilidad ya que como se ve en nuestras tablas de contingencia, la concordancia con el valor verdadero es del 99,5%.

En cuanto a la técnica de IDGA, si bien son necesarias 48 horas para emitir el diagnóstico, la misma seguirá siendo la técnica Gold Standard por su sencillez de ejecución y especificidad que es del 100% según nuestros valores.

Por último la técnica de WB es la más laboriosa de las tres debido que requiere varias horas de desarrollo y en la actualidad no existe un kit comercial como en el caso del HIV, para el cual WB es la técnica confirmatoria y los sueros con diagnóstico positivo por ELISA son confirmados como tales si reaccionan con la proteína p24 del virus HIV y una o más de las proteínas de envoltura.

WB tiene igual especificidad que la IDGA y alta sensibilidad por lo cual sirve como técnica confirmatoria. Por otro lado los anticuerpos específicos pueden ser detectados en el suero por la técnica de WB a los 10 días post infección. (Clabough Sellon, 1992) lo cual representa un menor período ventana con relación a la técnica de IDGA.

“Si bien las gp90 y gp45 son proteínas que están en baja cantidad en el virus AIE, son antígenos potentes y estimulan proporcionalmente mayores niveles de anticuerpos que el antígeno p26. Como las tres proteínas mayores del virus (gp90, gp45, and p26) tienen determinantes antigénicos de grupo, la cepa prototipo adaptada a células del virus AIE puede ser utilizada en el test de WB para detectar sueros de equinos de diversas áreas geográficas. Luego de la infección los anticuerpos contra gp90 se detectan primero, luego aquellos contra p26. Estas reacciones positivas pueden ser detectadas antes que se observe una reacción IDGA positiva y puede ser evidente luego de la primer viremia pero antes del primer episodio febril asociado con la replicación del virus AIE. En algunos casos el WB ha servido para clarificar el status de equinos con reacciones cuestionables en los tests oficiales de AIE.” (Issel, 1993), pero una dificultad potencial de esta técnica es la presencia de anticuerpos dirigidos contra el determinante interespecie del antígeno p26. Estos anticuerpos pueden aparecer en el equino luego de la exposición a lentivirus relacionados en la naturaleza.

Los genes de la región gag que codifican la proteína están conservados entre diferentes aislamientos virales y entre retrovirus en general, lo cual sea probablemente indicativo de propiedades intrínsecas de la proteína que son vitales para el funcionamiento viral. Muchos estudios han detallado la reactividad cruzada entre la proteína mayor del core de HIV y la proteína análoga del virus AIE, el virus de la inmunodeficiencia simiana y el virus de la inmunodeficiencia bovina. Las reacciones serológicas cruzadas entre lentivirus son probablemente indicativas del reconocimiento del sistema inmune de epitopes conformacionales altamente conservados entre estos retrovirus filogenéticamente relacionados (Langemeier, 1996).

Por la potencial presencia de anticuerpos dirigidos contra el determinante interespecie del antígeno p26, según lo explicado anteriormente, si se obtiene solamente la banda correspondiente a la p26 en un suero sospechoso en ciertos casos podría no ser suficiente para considerar al mismo positivo.

Es por esto que la técnica de WB con detección de la p26 y una o más bandas de las glicoproteínas de envoltura es utilizada como técnica confirmatoria por el DVL, NVSL. USDA, USA así como por el Gluck Equine Research Center, Universidad de Kentucky, USA.

En el presente trabajo, el suero codificado como 15, que daba reacción negativa por la técnica de IDGA y sospechosa por la cELISA, pudo definirse como negativo por la técnica de WB con antígeno recombinante y con el antígeno producido en cultivo celular. Mientras que en el caso de los sueros n° 74 y 101 que resultaron negativos por IDGA y positivos por cELISA, pudieron ser confirmados como positivos al ser analizados por WB.

6 CONCLUSIONES:

Se corroboró que la técnica de cELISA tiene una mayor sensibilidad que la técnica gold Standard (IDGA) como para detectar animales que estén en el periodo ventana con esta última y que la técnica de WB podría ser utilizada para detección precoz debido a que también es más sensible que la técnica de IDGA, aunque por ser más costosa y laboriosa no sería práctica para este uso.

En cuanto objetivo: “Poner a punto pruebas alternativas con el fin de confirmar casos de difícil definición”, pudo lograrse con la técnica de Western Blot que, como se expresó en el párrafo anterior, si bien tiene un costo mayor que las otras dos técnicas disponibles al presente (IDGA y cELISA) tiene, de acuerdo a los resultados obtenidos, una muy buena sensibilidad y especificidad al compararla con los resultados verdaderos de los sueros probados.

Para uno de los objetivos Generales Planteados, “Incrementar la batería de técnicas diagnósticas para aumentar la detección de los animales positivos más precozmente”, se trabajó en el desarrollo de una ELISA indirecta, pero concluimos que la metodología empleada para la purificación del antígeno no fue la más adecuada, y que deberían ajustarse determinados parámetros como ser una mayor purificación del antígeno con el fin de mejorar la técnica y que pudiera tener aplicación diagnóstica.

Con respecto a los objetivos específicos, “comparar distintas técnicas de diagnóstico para esta enfermedad”, de la comparación de las mismas surge que tanto la técnica de cELISA como el WB son las de mayor sensibilidad. Pero como contrapartida el WB presenta una mayor especificidad, lo cual sustenta la utilización de esta última como técnica confirmatoria.

En lo relativo al siguiente objetivo, “producir antígeno en cantidad y calidad suficiente para luego utilizarlo en técnicas de diagnóstico confirmatorias de AIE”, si bien se logró producir antígeno a partir de cultivo celular con posterior purificación parcial y concentración, se pudo obtener sólo una mínima cantidad como para probar algunos sueros y poder visualizar más bandas específicas además de la p26. Es decir que se debe continuar trabajando en mejorar la eficiencia de producción por este método para obtener mayor volumen de antígeno para su uso en la técnica de WB.

En lo referente a la “puesta a punto de la técnica de Western Blot y su posible uso para la confirmación de casos de difícil diagnóstico”, los resultados fueron los esperados. Es decir que el

suero utilizado como control positivo dio la banda a la altura de la p26 y se obtuvieron las bandas correspondientes a las glicoproteínas de superficie.

La tecnología recombinante ofrece muchas ventajas sobre los métodos de producción clásicos debido a que es menos laboriosa, riesgosa y demanda menor tiempo. Pueden obtenerse grandes cantidades de proteínas a bajo costo y sin variación lote a lote. Existe menos probabilidad de contaminación con otras proteínas celulares o derivadas del huésped por ser un antígeno producido en un sistema heterólogo y posteriormente purificado.

Una alternativa al método de producción en cultivos celulares y purificación y concentración podría ser la utilización de sistemas de expresión de otras glicoproteínas del virión (como la gp90 o gp45) para ser posteriormente combinadas con la p26 recombinante previamente obtenida y realizar el WB para su posterior detección. No obstante para la expresión de cualquiera de las glicoproteínas del virus, sería necesario emplear un sistema de expresión eucariota (como baculovirus o levaduras), ya que las bacterias son incapaces de glicosilar, lo cual puede acarrear mayores gastos de producción.

Por lo tanto, el aporte del presente trabajo es sustentar la conveniencia de que, aún aumentando los costos del diagnóstico significativamente, se adopte como técnica de tamizaje en los laboratorios de SENASA (Laboratorio Central y regionales), una técnica más sensible como la cELISA comercial para los relevamientos epidemiológicos de AIE, así como para saneamientos en búsqueda de animales portadores de la enfermedad que tengan títulos serológicos casi indetectables por la técnica de IDGA. Esto permitiría aislar los animales sospechosos o positivos por la técnica de cELISA, luego analizarlos por la técnica IDGA y si dan negativos por esta última técnica, confirmarlos por la técnica de WB una vez implementada la misma en el Organismo Oficial.

7 REFERENCIAS:

Alvarez I, Gutierrez G, Vissani A, Rodriguez S, Barrandeguy M, Trono K. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Vet Microbiol.* 2007[a] Apr 15;121(3-4):344-51.

Alvarez I, Gutierrez G, Ostlund E, Barrandeguy M, Trono K. Western blot assay using recombinant p26 antigen for detection of equine infectious anemia virus-specific antibodies. *Clin Vaccine Immunol.* 2007[b] Dec;14(12):1646-8

Archer B, Crawford T, McGuire T, Frazier M. RNA-Dependent DNA Polymerase Associated with Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*, Apr 1977, p. 16-22. Vol 22, N° 1. American Society for Microbiology.

Baccam P, Thompson RJ, Li Y, Sparks WO, Belshan M, Dorman KS, Wannemuehler Y, Oaks JL, Cornette JL, Carpenter S. Subpopulations of equine infectious anemia virus Rev coexist in vivo and differ in phenotype. *J Virol.* 2003 Nov;77(22):12122-31.

Bakos E, Cabrera R, Gomez ML. Valores Hematológicos en Enfermedades Anemizantes de Equinos de la Provincia de Chaco. *Gac.Vet.Bs Aires*, T.XLV, N° 386-(1983).

Bicout DJ, Carvalho R, Chalvet-Monfray K, Sabatier P. Distribution of equine infectious anemia in horses in the north of Minas Gerais State, Brazil. *J Vet Diagn Invest.* 2006 Sep;18(5):479-82.

Birkett AJ, Yélamos B, Rodríguez-Crespo I, Gavilanes F, Peterson DL. Cloning, expression, purification, and characterization of the major core protein (p26) from equine infectious anemia virus. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Apr 25;1339(1):62-72.

Brindley M, Zhang B, Montelaro R and Maury W. An Equine Infectious Anemia Virus Variant Superinfects Cells through Novel Receptor Interactions. *Journal of virology*, Oct. 2008, p 9425-9432. Vol. 82, N° 19.

Burroughs Tencza S, Islam KR, Kalia V, Nasir MS, Jolley ME, Montelaro RC. Development of a fluorescence polarization-based diagnostic assay for equine infectious anemia virus. *J Clin Microbiol.* 2000 May;38(5):1854-9.

Cappelli K, Capomaccio S, Cook FR, Felicetti M, Marenzoni ML, Coppola G, Verini-Supplizi A, Coletti M, Passamonti F. Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. *J Clin Microbiol.* 2011 Jan;49(1):27-33. Epub 2010 Nov 17.

Carpenter S, Chesebro B. Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus. *J Virol.* 1989 Jun;63(6):2492-6.

Cheevers WP, Archer BG, Crawford TB. Characterization of RNA from equine infectious anemia virus. *J Virol.* 1977 Nov;24(2):489-97.

Chong Y-H, Payne S, Issel Ch, Montelaro R, Rushlow K. Characterization of the Antigenic Domains of the Major Core Protein (p26) of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*, Feb. 1991, p 1007-1012. American Society for Microbiology. Vol 65, N°2.

Clabough D L, Gebhard D, Flaherty MT, Whetter LE, Perry ST, Coggins L, Fuller FJ. Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus. *J Virol.* 1991 Nov;65(11):6242-51.

Clabough Sellon D, Perry S T, Coggins L, Fuller F. Wild-Type Equine Infectious Anemia Virus Replicates in Vivo Predominantly in Tissue Macrophages, Not in Peripheral Blood Monocytes. *Journal of Virology*, Oct 1992, p 5906-5913. American Society for Microbiology. Vol 66, N° 10.

Coggins L, Norcross NL. Immunodiffusion Reaction in Equine Infectious Anemia. *Cornell Vet.* 1970 Apr; 60(2):330-5

Coggins L, Norcross NL, Nusbaum SR. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am J Vet Res.* 1972 Jan;33(1):11-8.

Coggins L. Curso sobre Anemia Infecciosa Equina y su Diagnóstico Serológico. Auspiciado por Johnson & Johnson de Argentina. S.A.C e I. División Veterinaria y Jockey Club de Buenos Aires. Buenos Aires, 1973.

Craig JK, Sturgeon T, Cook Sh, Issel Ch, Leroux C, Montelaro R. Apparent elimination of EIAV ancestral species in a long-term inapparent carrier. *Virology* 344 (2006) 340-353.

Craig JK, Li F, Steckbeck JD, Durkin S, Howe L, Cook SJ, Issel C, Montelaro RC. Discerning an effective balance between equine infectious anemia virus attenuation and vaccine efficacy. *J Virol.* 2005 Mar;79(5):2666-77.

Craig JK, Zhang B, Barnes Sh, Tagmyer T, Cook Sh, Issel Ch, Montelaro R. Envelope variation as a primary determinant of lentiviral vaccine efficacy. *PNAS.* September 18, 2007. Vol 104. n° 38.

Craig JK, Barnes S, Zhang B, Cook SJ, Howe L, Issel CJ, Montelaro RC. An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. *Retrovirology.* 2009 Oct 20;6:95.

Craig JK, Montelaro RC. Equine Infectious Anemia Virus Infection and Immunity: Lesson for AIDS Vaccine Development. *Future Virol.* 2011 Feb;6(2):139-142.

Cullinane A, Quinlivan M, Nelly M, Patterson H, Kenna R, Garvey M, Gildea S, Lyons P, Flynn M, Galvin P, Neylon M, Jankowska K. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Vet Rec.* 2007 Nov 10;161(19):647-52.

De la Sota M, Gonzalez R, Chiricosta A. Contribución a la determinación de la prevalencia de la Anemia Infecciosa Equina en la República Argentina. Dirección de Luchas Sanitarias. SENASA.Revista del Colegio de Veterinarios de la Pcia de Buenos Aires-Año 10-Revista 32. 2005. [a].

De la Sota MD. Manual de Procedimientos para la Anemia Infecciosa Equina (AIE). Dirección de Luchas Sanitarias. Dirección Nacional de Sanidad Animal- 26. 2005. [b].

Foil LD, Adams WV, McManus JM, Issel CJ. Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *J Med Entomol.* 1987 Nov;24(6):613-6.

Foil LD, Adams WV, Mc Manus JM, Issel CJ. Quantifying the Role of Horse Flies as Vectors of Equine Infectious Anemia. Equine Infectious Diseases V. Proceedings of the Fifth International Conference Edited by D.G. Powell. The University Press Of Kentucky. 1988

Fujimiya Y, Perryman LE, Crawford TB. Leukocyte cytotoxicity in a persistent virus infection: presence of direct cytotoxicity but absence of antibody-dependent cellular cytotoxicity in horses infected with equine infectious anemia virus. Infect Immun. 1979 Jun;24(3):628-36.

Hammond SA, Cook SJ, Lichtenstein DL, Issel CJ, Montelaro RC. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. J Virol. 1997 May;71(5):3840-52.

Hammond SA, Li F, McKeon BM Sr, Cook SJ, Issel CJ, Montelaro RC. Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus. J Virol. 2000 Jul;74(13):5968-81.

Harrold SM, Cook SJ, Cook RF, Rushlow KE, Issel CJ, Montelaro RC. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. J Virol. 2000 Apr;74(7):3112-21.

Hussain K, Issel Ch, Schnorr K, Rwambo P, Montelaro R. Antigenic Analysis of Equine Infectious Anemia Virus (EIA) Variants by using Monoclonal Antibodies: Epitopes of Glycoprotein gp90 of EIAV Stimulate Neutralizing Antibodies. Journal of Virology. Oct 1987, p 2956-2961. American Society for Microbiology. Vol 61. N°10.

Hussain K, Issel Ch, Rwambo P, Arnizaut A, Ball J, Schnorr K, Montelaro R. Identification of gag Precursor of Equine Infectious Anaemia Virus with Monoclonal Antibodies to the Major Viral Core Protein, p 26. J.gen. Virol. (1988), 69, 1719-1724.

IAEA, Manual of ELISA, International Atomic Energy Agency publication, joint FAO/IAEA Division, Viena 1989.

Issel CJ, Horohov, D.W, Lea D.F, Adams W.V, Hagius S.D, McManus J.M, Allison A.C, Montelaro R. Efficacy of Inactivated Whole-Virus and Subunit Vaccines in Preventing Infectioun and Disease Caused by Equine Infectious Anemia Virus. Journal of Virology, June 1992, p. 3398-3408. American Society for Microbiology. Vol 66, N° 6.

Issel CJ, Cook RF. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J Vet Diagn Invest.* 1993 Jan;5(1):137-41.

Jacobo RA, Storani CA, Cipolini MF, Miranda AO, Martínez DE, Cardoso RO. Seroprevalencia de anemia infecciosa equina en la Provincia de Corrientes, Argentina. *Rev.Vet.* 15: 2, 62-64, 2004.

Jin Sh, Zhang B, Weisz OA, Montelaro RC. Receptor-mediated entry by equine infectious anemia virus utilizes a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol.* 2005 Dec;79(23):14489-97

Klevjer-Anderson P, Cheevers W.P, Crawford T.B. Characterization of the Infection of Equine Fibroblasts by Equine Infectious Anemia Virus. *Archives of Virology* 60, 279-289 (1979).

Kong XG, Pang H, Sugiura T, Sentsui H, Onodera T, Matsumoto Y, Akashi H. Application of equine infectious anemia virus core proteins produced in a baculovirus expression system to serological diagnosis. *Microbiol Immunol.* 1997;41(12):975-80.

Kong XG, Pang H, Sugiura T, Matsumoto Y, Onodera T, Akashi H. Evaluation of equine infectious anemia virus core proteins produced in a baculovirus expression system in agar gel immunodiffusion test and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Med Sci.* 1998 Dec;60(12):1361-2.

Langemeier JL, Cook SJ, Cook RF, Rushlow KE, Montelaro RC, Issel CJ. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *J Clin Microbiol.* 1996 Jun;34(6):1481-7.

Leroux C, Cadoré JL, Montelaro RC. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us?. *Vet Res.* 2004 Jul-Aug;35(4):485-512.

Leroux C, Issel CJ, Montelaro RC. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J Virol.* 1997 Dec;71(12):9627-39.

Leroux C, Craigo JK, Issel CJ, Montelaro RC. Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. *J Virol.* 2001 May;75(10):4570-83.

Li F, Leroux C, Craig J.K, Cook Sh, Issel Ch, Montelaro R. The S2 Gene of Equine Infectious Anemia Virus is a Highly Conserved Determinant of Viral Replication and Virulence Properties in Experimentally Infected Ponies. *Journal of Virology*, Jan 2000, p 573-579. American Society for Microbiology, Vol 74, N° 1.

Lichtenstein DL, Issel CJ, Montelaro RC. Genomic quasispecies associated with the initiation of infection and disease in ponies experimentally infected with equine infectious anemia virus. *J Virol*. 1996 Jun;70(6):3346-54.

Malmquist WA, Barnett D, Becvar CS. Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1973;42(4):361-70.

Maury W, Oaks JL, Bradley S. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *J Virol*. 1998 Nov;72(11):9291-7.

McGuire TC, Crawford TB, Henson JB. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *Am J Pathol*. 1971 Feb;62(2):283-94.

McGuire TC. Suppression of synthesis of an IgG subclass in a persistent viral infection. *Immunology*. 1976 Jan;30(1):17-24.

Mealey RH, Leib SR, Pownder SL, McGuire TC. Adaptive immunity is the primary force driving selection of equine infectious anemia virus envelope SU variants during acute infection. *J Virol*. 2004 Sep;78(17):9295-305.

Montelaro RC, Lohrey N, Parekh B, Blakeney EW, Issel CJ. Isolation and comparative biochemical properties of the major internal polypeptides of equine infectious anemia virus. *J Virol*. 1982 Jun;42(3):1029-38

Montelaro RC, Parekh B, Orrego A, Issel CJ. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J Biol Chem*. 1984 Aug 25;259(16):10539-44.

Montelaro RC. Equine Infectious Anemia Virus. *Encyclopedia of Virology*. Second Edition. Volume One. 1999. Edited by A.Granoff and R. Webster.

Monteverde JJ, Morán BL, Garbes GV. Anemia Infecciosa Equina. Comunicación Previa. Rev.Med. Vet. (Bs As) (1964) 45, (6).

Nagarajan MM, Simard C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. J Virol Methods. 2001 May;94(1-2):97-109.

Nakajima H, Ushimi Ch. Immunodiffusion Studies of Purified Equine Infectious Anemia Virus. Infection and Immunity, March 1971, p 373-377. American Society for Microbiology. Vol 3, N°3.

Nakajima H, Yoshino T, Ushimi Ch. NOTES. Equine Infectious Anemia Virus from infected Horse Serum. Infection and Immunity, Sept 1974, p 667-668. American Society for Microbiology. Vol 10. N° 3.

Nakajima H, Norcross N, Coggins L. Demonstration of Antigenic Identity Between Purified Equine Infectious Anemia Virus and an Antigen Extracted from Infected Horse Spleen. Infection and Immunity, Sept 1992, p 416-417. American Society for Microbiology. Vol 6, N°3.

Norcross NL, Coggins L. Characterization of an equine infectious anemia antigen extracted from infected horse spleen tissue. Infect Immun. 1971 Nov;4(5):528-31.

Oaks JL, McGuire TC, Ulibarri C, Crawford TB. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. J Virol. 1998 Sep;72(9):7263-9.

OIE Terrestrial Manual 2008[a].Chapter 2.5.6. Equine Infectious Anemia.

OIE Manual de la sobre animales terrestres 2008[b]. Capítulo 1.1.4. Principios de Validación para las pruebas de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas.

Oliva GA, Etcheverrigary ME. Reacciones inespecíficas en la prueba de Coggins para anemia infecciosa equina. Rev.Med. Vet. (Bs.As) 1982; 63 (2)

O'Rourke K, Perryman L, McGuire T. Antiviral, Anti-glycoprotein and Neutralizing Antibodies in Foals with Equine Infectious Anaemia Virus. J.gen.Virol (1988), 69, 667-674.

Paré J, Simard C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Can J Vet Res.* 2004 Oct;68(4):254-8.

Payne S, Parekh B, Montelaro RC, Issel CJ. Genomic alterations associated with persistent infections by equine infectious anaemia virus, a retrovirus. *J Gen Virol.* 1984 Aug;65 (Pt 8):1395-9.

Perryman LE, O'Rourke KI, McGuire TC. Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection. *J Virol.* 1988 Aug;62(8):3073-6.

Rasty S, Dhruva BR, Schiltz RL, Shih DS, Issel CJ, Montelaro RC. Proviral DNA integration and transcriptional patterns of equine infectious anemia virus during persistent and cytopathic infections. *J Virol.* 1990 Jan;64(1):86-95.

Rice N, Simek S, Ryder O, Coggins L. Detection of Proviral DNA in Horse Cells Infected with Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*, June 1978, p 577-583. American Society for Microbiology. Vol 26, N° 3.

Salinovich O, Payne SL, Montelaro RC, Hussain KA, Issel CJ, Schnorr KL. Rapid emergence of novel antigenic and genetic variants of equine infectious anemia virus during persistent infection. *J Virol.* 1986 Jan;57(1):71-80.

Schiltz RL, Shih DS, Rasty S, Montelaro RC, Rushlow KE. Equine infectious anemia virus gene expression: characterization of the RNA splicing pattern and the protein products encoded by open reading frames S1 and S2. *J Virol.* 1992 Jun;66(6):3455-65.

Sentsui H, Inoshima Y, Murakami K, Akashi H, Purevtseren B, Pagmajav O, Sugiura T. Cross reaction of recombinant equine infectious anemia virus antigen to heterologous strains and application for serological survey among horses in the field. *Microbiol Immunol.* 2001;45(1):45-50.

Shane BS, Issel CJ, Montelaro RC. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J Clin Microbiol.* 1984 Mar;19(3):351-5.

Spyrou, V. Papanastassopoulou M, Psychas V, Billinis Ch, Koumbati M, Vlemmas J, Koptopoulos G. Equine Infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Veterinary Microbiology* 95 (2003) 49-59.

Sugiura T, Nakajima H. Purification of Equine Infectious Anemia Virus Antigen by Affinity Chromatography. *Journal of clinical Microbiology*, June 1977, p 635-639. American Society for Microbiology. Vol 5, N°6.

Sun C, Zhang B, Jin J, Montelaro RC. Binding of equine infectious anemia virus to the equine lentivirus receptor-1 is mediated by complex discontinuous sequences in the viral envelope gp90 protein. *J Gen Virol.* 2008 Aug;89(Pt 8):2011-9.

Tarima M, Nakajima H, Ito Y. Electrón Microscopy of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*, Oct 1969, p 521-527.

Toledo Piza AS, Pereira AR, Terreran MT, Mozzer O, Tanuri A, Brandão PE, Richtzenhain LJ. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Prev Vet Med.* 2007 Mar 17;78(3-4):239-45.

Toma B, Eloit M, Savey M. Las enfermedades animals por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int .epiz.*, 1990, 9 (4), 1077-1119.

Tornquist SJ, Oaks JL, Crawford TB. Elevation of cytokines associated with the thrombocytopenia of equine infectious anaemia. *J Gen Virol.* 1997 Oct;78 (Pt 10):2541-8.

Tumas DB, Hines MT, Perryman LE, Davis WC, McGuire TC. Corticosteroid immunosuppression and monoclonal antibody-mediated CD5+ T lymphocyte depletion in normal and equine infectious anaemia virus-carrier horses. *J Gen Virol.* 1994 May;75 (Pt 5):959-68.

Zhang B, Jin S, Jin J, Li F, Montelaro RC. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 12;102(28):9918-23.

