



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**Trabajo Final Integrador**

**ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO DE VETERINARIO LABORATORIO**

**Comparación entre Inmunodifusión en gel de agar y western blot  
como métodos de diagnóstico serológico para la detección del  
virus de la leucosis enzoótica bovina en sueros de la zona de  
Zarcero, Costa Rica.**

AUTOR: Med. Vet. Ana María Bolaños Chaves

DIRECTOR: Dr. Carlos Javier Panei

CODIRECTOR: Dra. Alejandra Larsen

## ÍNDICE

A-INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo general.....	1
Objetivos específicos.....	2
B-PLANEAMIENTO DEL TEMA/PROBLEMA.....	1
B.1 Ciclo viral.....	4
B.2 Transmisión viral.....	5
B.3 Signos clínicos.....	6
B.4 Respuesta inmune humoral.....	8
B.5 Diagnóstico.....	8
HIPOTESIS DE TRABAJO.....	10
C-DESARROLLO DEL TRABAJO.....	11
C.1 Toma de Muestra.....	11
C.2 Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).....	12
C.3 Western Blot (WB).....	13
C.3.1 Obtención de la p24r en sistema baculovirus.....	20
C.3.2 Cultivo bacteriano para la expresión de la p24r del VLB.....	20
Western Blot.....	22
C.4 RESULTADOS.....	15
D-CONCLUSIONES.....	36
E-BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXOS.....	29

## *Abreviaturas*

**aa:** aminoácido

**ac:** anticuerpo

**ACP:** alta carga proviral

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**Ag:** antígeno

**BCP:** baja carga proviral

**BSA:** seroalbúmina bovina

**C:** citosina

**C':** complemento

**°C:** grados centígrados

**CD4+:** linfocito T colaboradoras

**CD8+:** linfocito T citotóxicos

**cél:** célula/s

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

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

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

**DO:** densidad óptica

**CPV:** carga proviral

**Da:** Dalton

**ELISA:** "EnzymeLinkedImmunoassay"

**E4:** suero control positivo de referencia

**Fc:** fragmento constante

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

**G:** guanina

**gr:** gramo/s

**gp51:** glicoproteína 51

**h/hs:** hora/s

**IDGA:** Inmunodifusión en gel de agar

**IF:** inmunofluorescencia

**IgA:** inmunoglobulina A

**IgG:** inmunoglobulina G

**IgM:** inmunoglobulina M

**IPTG:** isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido

**Kb:** kilobases

**kDa:** kilo Dalton

**L-B:** Luria-Bertani

**LB:** linfocitos B

**LT:** linfocitos T

**LTR:** repetición terminal repeat

**M:** molar

**mg:** miligramo/s

**min:** minuto/s

**mM:** milimolar

**ml:** mililitro/s

**MOI:** multiplicidad de infección

**ng:** nanogramo/s

**NK:** células "Natural Killer"

**nm:** nanómetro/s

**Ni-NTA:** nickel-nitrilotriaceticacid

**OIE:** Oficina Internacional de Epizootias

**pb:** pares de bases

**PBS:** buffer fosfato salino

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

**pmol:** picomolar

**p24:** proteína 24

**RI:** respuesta inmune

**rpm:** revoluciones por minuto

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

**seg:** segundo/s

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

**SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad Animal y calidad Agroalimentaria

**SFB:** suero fetal bovino

**T:** timina

**UI:** unidades internacionales

**UV:** ultravioleta

**V:** voltios

**µg:** microgramo/s

**µl:** microlitro/s

**µM:** micromolar

**VLB:** Virus de la leucosis bovina

**W:** Watt

## ***A- INTRODUCCION***

El motivo de la elección de la temática propuesta se debe a la importancia que tiene la leucosis enzoótica bovina en mi país (Costa Rica), donde estudios realizados por Romero y col, 2015 y González, 2014 demostraron pérdidas significadas por esta enfermedad en la producción lechera. El efecto negativo estimado sobre la cantidad de leche producida a 305 días fue estimada en 654 kg menos de leche.

En Costa Rica hay aproximadamente 14355 fincas productoras de leche, con un total de 173433 cabezas de ganado, de las cuales el 93% de los animales son hembras. Considerando la seroprevalencia por ELISA de leucosis del 41,0% (Beita, 2008), se podría estimar un total de 66420 vacas seropositivas al virus (González, 2012).

El virus de la leucemia bovina (VLB) fue diagnosticado y reportado por primera vez en Costa Rica en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional en el año de 1976 (González, 1977). Sin embargo, en 1995 se aisló y caracterizó por primera vez el virus en Costa Rica, el cual no presentó diferencia con el aislado reportado en los Estados Unidos (Jiménez y col., 1995). Estos resultados anteriormente mencionados motivaron la elección del tema para este trabajo de especialización.

### **Objetivo general**

Realizar y analizar por western blot (WB) como prueba complementaria a la prueba de Inmunodifusión en gel de agar (IDGA) el diagnóstico serológico de la leucosis enzoótica bovina (LEB) en vacas lecheras de la zona de Zarcero, Costa Rica.

### **Objetivos específicos**

- Realizar un muestreo de vacas lecheras en producción en la zona de Zarcero, Costa Rica.
- Realizar el diagnóstico de VLB mediante IDGA.
- Expresar y purificar la proteína p24 recombinante (p24r) del VLB en sistema bacteriano.
- Realizar WB con la proteína p24r como antígeno, utilizando sueros controles positivos, dudosos y negativos a la prueba de IDGA.

## ***B - PLANEAMIENTO DEL TEMA/PROBLEMA***

El virus de la leucemia bovina (VLB), pertenece a la familia Retroviridae, Subfamilia Oncovirinae (Tipo C) y al género Deltaretrovirus (Ferrer y col; 1975). Este género también incluye a los virus de la leucemia humana HTLV I y HTLV II (Human T Lymphocyte Virus), como así también al virus de leucemia de los simios STLV I (Simian T-Lymphocyte Virus) (Meertens y col., 2002). El VLB se encuentra integrado principalmente en el genoma de los linfocitos B (Weiss, 2006), linfocitos T (CD4+, CD8+) monocitos y polimorfonucleares (Panei y col., 2013). Poseen una transcriptasa reversa responsable de transcribir el ARN viral en ADN proviral, que les posibilita integrarse al genoma de su célula huésped, denominándose “provirus”. Una vez el provirus insertado en el genoma del animal se mantiene como portador de por vida (Pomier y col., 2008).

El VLB es un virus envuelto, de simetría icosaédrica y mide entre 60 a 125 nm de diámetro. Está compuesto por proteínas estructurales que envuelven y se relacionan con el ARN viral. El genoma es “diploide”, está formado por dos cadenas idénticas de ARN de sentido positivo, no complementarias, asociadas a la proteína estructural interna no glicosilada de la nucleocapside (p12) y a varias copias de la enzima transcriptasa reversa (Gillet y col. 2007).

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



La envoltura del virus está formada por una doble membrana lipídica originada en el proceso de gemación que se da en la célula infectada. Las proteínas que se encuentran insertadas en esta estructura son la proteína de transmembrana (gp30) y la proteína glicosilada de superficie (gp51). La gp51, formada por 268 aa, es la proteína más abundante de la envoltura y cuenta con 8 determinantes antigénicos identificados por anticuerpos monoclonales (sitios A al H) (Bruck y col., 1984)

La gp30 es una proteína de transmembrana de 214 aa que muestra características estructurales típicas de las proteínas de transmembrana de los virus tipo C (Burny y col., 1985). El extremo N-terminal de la gp30 se inserta en la capa bilipídica y se transforma en el soporte que fija la gp51 a la superficie, conformando así un complejo gp30/gp51, involucrado en el reconocimiento de receptores virales en las células blanco. La gp30 también se relaciona con la p15 de la matriz proteica. Tanto las proteínas que conforman el complejo gp30/gp51 como la proteína estructural p24 son altamente inmunogénicas y capaces de desarrollar una potente respuesta inmune (González y col., 1988; Monti y col., 2005).

El virión es muy frágil en el medio ambiente, se inactiva por exposición a rayos ultravioleta, calor durante 30 minutos a 56°C o por 1 minuto a 60°C y por pasteurización. La envoltura viral está conformada por lípidos, haciéndola susceptible a solventes orgánicos.

### **B.1 Ciclo viral**

El ciclo viral del VLB es similar al de otros retrovirus. La interacción entre las proteínas de la cubierta en la superficie del virus y su receptor desencadena la liberación de la nucleocápside en el citoplasma de la célula infectada (Coffin, 1997). Este virus puede infectar también a otras células presentadoras de antígenos como son los macrófagos y las células dendríticas (Tajima y Aida, 2002). Después de la pérdida de la envoltura, el ARN viral se transcribe a través de la transcriptasa reversa a ADN de doble cadena. Esta copia

de ADN es transportada al núcleo e integrada en el genoma de la célula huésped mediante la enzima integrasa. El ADN viral integrado a su célula huésped se lo denomina “provirus” y se caracteriza por ser estable pudiendo ser transcrito por la maquinaria de la célula huésped. La transcripción del provirus conduce a la producción, por una parte, de ARN genómico necesario para la formación de nuevos virus y por otra parte, de los ARN mensajeros (ARNm) para la síntesis de proteínas estructurales y proteínas regulatorias virales. La traducción tiene lugar en los ribosomas de las células. Después de una etapa de maduración en el retículo endoplasmático rugoso, algunas proteínas son glicosiladas en las vesículas del aparato de Golgi. Este complejo proteico (gp51-gp30) se inserta en la membrana celular. Por otra parte, las proteínas estructurales rodean las dos copias del ARN genómico para formar la nucleocápside, que poco a poco se reunirán con las proteínas virales presentes en la membrana plasmática. Nuevas partículas virales, se liberan de la célula huésped por gemación a través de la membrana celular y pueden infectar nuevas células. La replicación viral en el VLB, vía producción de viriones que infectan nuevas células blanco, parece ocurrir casi exclusivamente durante el corto período que le sigue a la primoinfección. La otra vía de replicación del VLB es la mitótica, donde el virus integrado (provirus) en el linfocito B se multiplica durante la expansión clonal de esta célula blanco infectada (Florins y col., 2007; Florins y col., 2008).

## **B.2 Transmisión viral**

La transmisión natural del virus se produce principalmente a través de las células infectadas donde se encuentra el material genético viral integrado (provirus), (Mammerix y col., 1987). Teniendo en cuenta el tropismo celular del VLB, la sangre es una fuente importante de infección, principalmente en la práctica veterinaria, como es el descornado, el tatuaje y el uso de jeringas contaminadas (Kohara y col., 2006). También la transmisión del VLB puede ocurrir por la picadura de insectos hematófagos, aunque algunos de ellos se

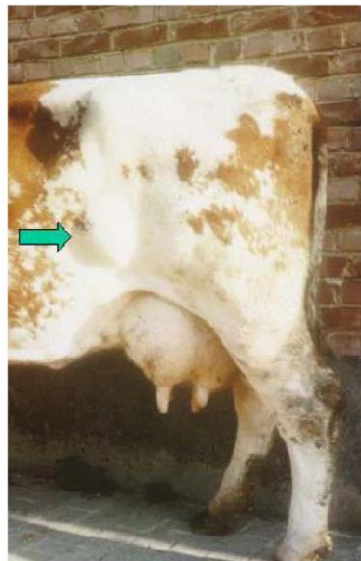
encuentran todavía en discusión (Panei y col., 2019). Sin embargo, la transmisión también puede ocurrir *in utero*, (Transmisión vertical). Esta probabilidad de infección transplacentaria estaría aumentada en aquellos animales que se encuentran en el estado de linfocitosis persistente (Burrige y col., 1982). Los terneros lactantes en los primeros tres días de vida, en la cual está aumentada la permeabilidad de la mucosa digestiva, podrían infectarse a partir de la ingesta de leche de madres positivas.

### **B.3 Signos clínicos**

La enfermedad tiene 3 presentaciones dependiendo del grado de susceptibilidad del hospedador y del tiempo transcurrido, su estado de resistencia inmune, factores ambientales y la dosis infectante del virus (Burny y col, 1985; Monti, 2005). La mayoría de los bovinos infectados permanecen asintomáticos de por vida. Esta primera etapa asintomática de la enfermedad se caracteriza por no manifestar signos clínicos y presentar serología positiva contra los inmunógenos principales. Los animales que permanecen en este estadio son portadores y fuente de infección para el rodeo de por vida (Florins y col., 2008). Aproximadamente un tercio de los infectados con VLB desarrollan como único signo detectable linfocitosis persistente (LP), etapa linfoproliferativa, con aumento permanente y estable de linfocitos B (LB) (Chamizo, 2005). La proliferación celular se debe a la expansión policlonal de los LB infectados y de los no infectados estimulados constante por antígenos del VLB. Este aumento se traduce en un desbalance en la fórmula linfocitaria donde los LB protagonizan un aumento del orden del 40 al 90% (Gillet y col., 2007). La mayoría de los linfocitos infectados mantienen su morfología normal aunque se han reportado cambios (Chamizo, 2005; Florins y col., 2007). En frotis de sangre periférica de estos animales se observó imágenes compatibles con las denominadas "sombras de Gumprecht". (Panei y col., 2013) citadas por primera vez en humanos comunes en pacientes con leucemias linfocítica crónicas (Gumprecht, 1896).

El desarrollo de tumores, evento poco común en bovinos, se da entre un 0.5-5% de los animales infectados, el cual lleva al desarrollo de leucemia, linfosarcoma y/o linfoma.. Los signos generales del linfosarcoma tienen un inicio insidioso con disminución de la producción acompañada de deterioro progresivo del estado físico que lleva a la muerte del individuo. En un 5-10% de los casos se manifiestan como hiperagudos con la muerte del animal como único signo (Burny y col., 1985).

La hipertrofia de los nódulos linfáticos representa el 75 al 90% de los casos. Se presenta en ganglios superficiales pero es más frecuente la afección de órganos linfáticos viscerales como por ejemplo ilíacos, mesentéricos, intratorácicos. Estos animales así afectados no presentan signos salvo que los tumores estén interfiriendo con la función de otro órgano, (figura 1).



**Figura 1:** Tumor inducido por VLB (Florins y col 2007).

#### **B.4 Respuesta inmune humoral**

A pesar que hasta el momento no es posible la detección directa de antígenos virales en ningún estadio de la enfermedad, el VLB genera una fuerte respuesta humoral sostenida en el tiempo con altos niveles de anticuerpos citotóxicos (Burny y col., 1985; Heeney y col., 1988). Algunos autores postulan que el aumento de los niveles de anticuerpos parece ser estimulado por la persistencia del virus y la replicación, dando como resultado una respuesta humoral detectable durante toda la vida del animal (Florins y col., 2007).

Las proteínas estructurales p24 y gp51 son potentes inmunógenos y los anticuerpos contra ellos pueden ser detectados en la mayoría de los animales infectados con el VLB. En animales experimentalmente infectados, los anticuerpos anti-gp51 parecen ser los primeros en aparecer y en títulos consistentemente más altos que los anticuerpos anti-p24 (Portetelle y col., 1983; González y col., 1999b.; Monti y col., 2005). Otros autores encontraron que pruebas de alta sensibilidad son capaces de detectar anticuerpos anti-p24 días antes a la aparición de anticuerpos anti-gp51 y en igual o mayor título (Kittelberger y col., 1996; González y col., 2001 y Gutiérrez y col., 2001).

#### **B.5 Diagnóstico**

Los hallazgos clínicos típicos causados por el VLB no son patognomónicos de la enfermedad por lo tanto deben diferenciarse de la clínica de otras enfermedades en el bovino. El aislamiento viral constituye el método directo por excelencia, son embargo, en el caso de VLB no es un método de rutina ya que los niveles de expresión viral son bajos y la propagación del virus resulta difícil de lograr (Kittelberger y col., 1999; Kuckleburg y col., 2003). Las técnicas de PCR y sus variantes (RFLP-PCR, RT-PCR, nested PCR y BLV-CoCoMo-qPCR) son método de mayor sensibilidad para corroborar infección en carcasas

de matadero donde otras muestras son difíciles de recolectar (Kuckleburg y col., 2003; Felmer y col, 2006).

La prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) para la detección de animales infectados con VLB, desarrollada en la década de los '70, fue el primer método serológico aceptado por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (Miller y col., 1977; Simard y col., 2000). La sensibilidad analítica de la prueba está en el orden de 30-300 ug/ ml para antígenos crudos, e indica cantidad de reactante necesaria para ser detectado por esta prueba (Pennimpede, 2004 y Gomez y col., 2007). Tomando como referencia una prueba de western blot (WB) detectando la presencia de anticuerpos anti-p24 (Choi y col., 2002), y comparándola con una prueba de IDGA, esta última presentó una sensibilidad que la técnica de IDGA obtuvo una sensibilidad del 61% y especificidad del 98%. El test de IDGA difundido en todo el mundo después de la década de los 80 con la finalidad de realizar estudios epidemiológicos y de control de la enfermedad por ser un método específico, más sensible y práctico que la hematología. Su mayor ventaja es que se puede realizar a campo sin necesidad de mucha infraestructura. (Johnson y Kaneene, 1992). A pesar de que la prueba IDGA es un método simple de realizar, como se mencionó tiene un alto nivel de especificidad (Monke y col., 1992), y una sensibilidad que puede ser baja (hasta un 75%), sumado a que su interpretación es subjetiva en particular en el caso de reacciones débiles y depende de la experiencia del operador que realiza la prueba y hace la lectura definitiva (Klintevall y col., 1991).

Las pruebas de WB, es una prueba de elección para el diagnóstico serológico confirmatorio de diferentes enfermedades infecciosas dada su alta sensibilidad. La p24 fue utilizada como antígeno para la prueba de WB como técnica diagnóstica tanto con antígeno crudo (Kittelberger y col., 1996) como con proteína recombinante producida en sistema bacteriano (Bicka y col., 2001). Su utilización en la detección y elaboración de programas de saneamiento en establecimientos positivos a VLB es sumamente relevante, sobre todo

para la confirmación de aquellos animales que el IDGA y el ELISA no detectan (Yeon y col., 2002; Doltz y Moreno; 1999). Debido a que el WB emplea antígenos que se separan electroforéticamente y se pueden identificar por su movilidad en comparación con los marcadores conocidos, evita la confusión o interferencia por proteínas no antigénicas (Yeon y col., 2002; Doltz y Moreno, 1999).

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

La importancia sanitaria que tiene la LEB en el los rodeos lecheros, es sumamente importante la implementación de diagnósticos confirmatorios de la enfermedad, y más aún cuando estos animales están destinados a exportación o están bajo algún programa de control sanitario de LEB.

### **Hipótesis del trabajo:**

El Western Blot (WB) realizado con la p24r, como prueba complementaria, permite la detección de los sueros dudosos a la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), utilizándose como prueba confirmatoria para la detección de LEB

## *C- Desarrollo del trabajo*

### **C.1 Toma de muestras**

Las muestras se obtuvieron de cinco fincas lecheras del distrito Zarcero del cantón de Alfaro Ruiz de la provincia de Alajuela, Costa Rica. Esta zona fue elegida debido a que la ganadería lechera es una de sus principales actividades, (figuras 2A y 2B). Los animales muestreados pertenecen a la raza Holstein y a la raza jersey Jersey lseleccionadas al azar. Se utilizó el sistema Vacutainer® sin anticoagulante y se seleccionó la vena coccígea tomándose las medidas de cuidado y bioseguridad pertinentes (figura 2C).

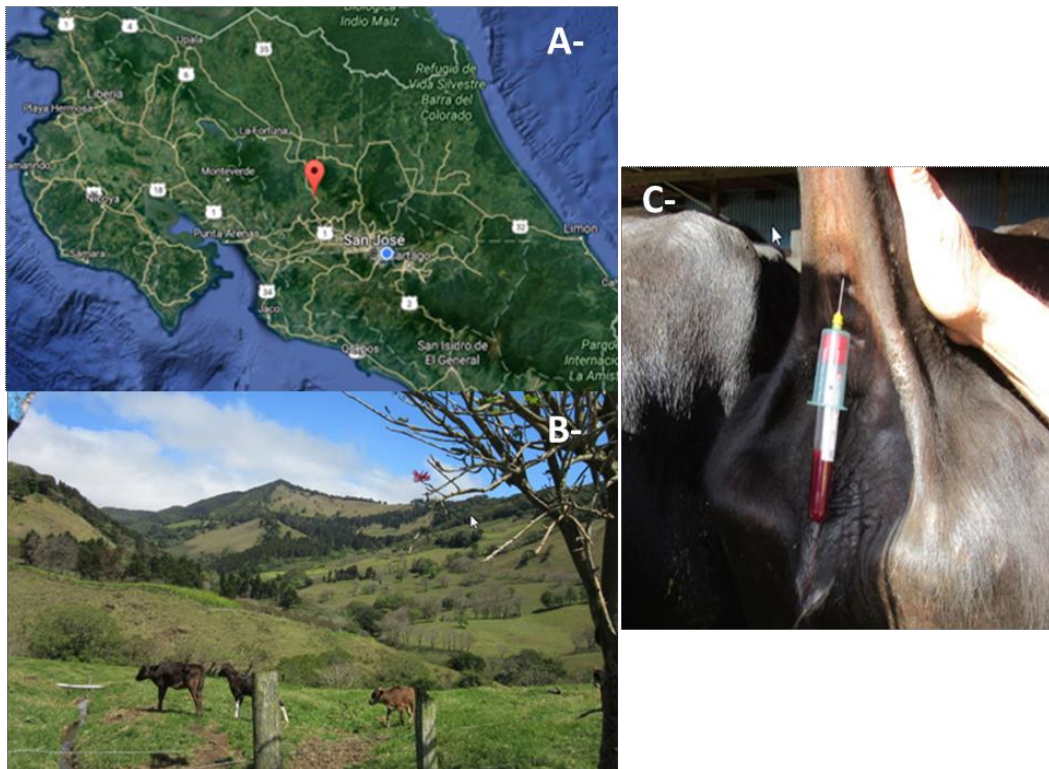


Figura N° 2: A- Mapa de Costa Rica, zona de Zarcero. (Google maps). B- Geografía de la zona de Zarcero, Costa Rica. C-Toma de muestra de la vena coccígea con Vacutainers®



Después de la retracción del coagulo se colocaron a 4–7°C y se trasladaron al laboratorio. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos, se separó el suero y se identificaron en tubos tipo Eppendorf®. Se conservaron a -20 °C hasta su análisis en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, UNLP.

### **C.2 Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)**

Se realizó el análisis serológico de todas las muestras por la prueba de IDGA. Se utilizó el kit comercial producido en el Laboratorio de Virología FCV-UNLP (aprobado por SENASA, expediente número: 41285/8, certificado número: 88.494). Se utilizó como soporte de la prueba la placa de agar también elaborada en la FCV-UNLP. Posteriormente, se perforaron 7 rosetas por placa de agar con el sacabocado. La siembra en cada roseta se realizó como indica la figura 3, el volumen de siembra fue de 35 µl para todos los reactivos acorde al instructivo.

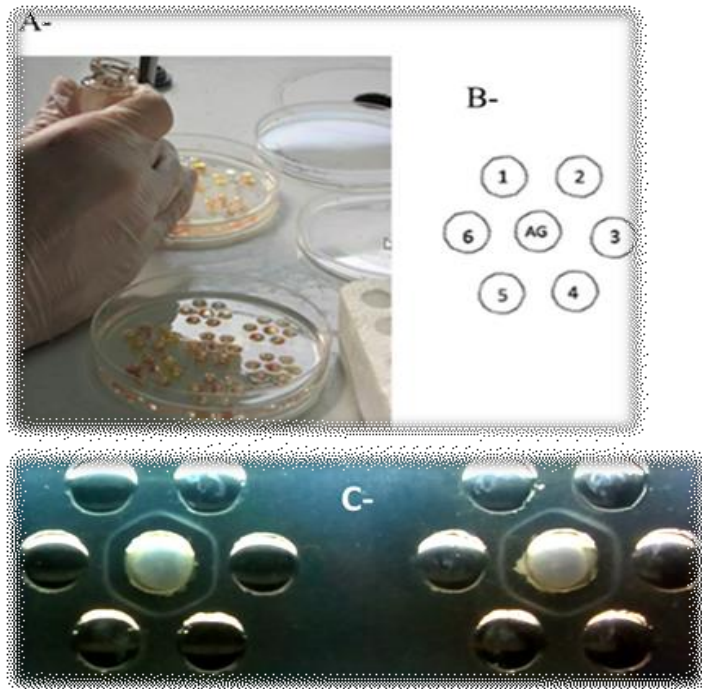


Figura 3: A- Placa de Petri con el total de las rosetas sembradas. B- Esquema de la roseta en placa de Petri para la siembra de los sueros. Pocillos 1, 2, 4 y 5 sueros problemas. Pocillos 3 y 6, sueros controles positivos, Pocillo central: antígeno VLB. Figura N° 5. Kit de IDGA para la detección de anticuerpos ant-VLB, producido en el Laboratorio de Virología FCV-UNLP.

### **C.3 Western Blot (WB)**

#### **C.3.1 Obtención de la proteína p24 recombinante (p24r) en sistema bacteriano**

Los procedimientos para la producción de la p24r ya han sido estandarizados y se llevaron a acorde a la tesis doctoral de la Dra. Alejandra Larsen denominada: “*Producción de proteínas recombinantes de valor inmunogénico del virus de la leucosis bovina y su aplicación al diagnóstico de la enfermedad* “. La p24r expresada en sistema bacteriano utilizada en este trabajo se obtuvo a partir de *Escherichia coli* M15 transformadas con la construcción pQE30-p24r. Para la expresión de la proteína se utilizó como referencia el protocolo del manual The QIA expressionist™. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad utilizando resina Ni-NTA (Quiagen®) por diferencia de pH.

#### **C.3.2 Cultivo bacteriano para la expresión de la p24r del VLB**

Para este trabajo se utilizó el stock celular que contiene el gen que codifica para la proteína p24, conservadas a -80 °C. Se realizó un repique de la colonia mencionada en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). El cultivo se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche. Para corroborar la presencia del gen que codifica a la proteína en cuestión y su expresión, se tomó 2,5 ml del cultivo fue incubado a 37°C en agitación a 190 rpm durante 2 hs en un Erlenmeyer de 125 cm<sup>3</sup> conteniendo 20 ml de LB / ampicilina (100 µg/ml) / kanamicina (25 µg/ml). Cuando la Densidad Óptica (DO) alcanzó

aproximadamente un valor de 0,6 se procedió a la inducción con IPTG (Isopropyl  $\beta$  D-1-thiogalactopyranoside-SIGMA, USA) a una concentración final de 1 mM. El cultivo fue incubado a 37°C en agitación a 150 rpm durante 4 hs. Posteriormente, una alícuota de células obtenidas del cultivo fue resuspendidas en igual volumen de buffer de muestra en condiciones de reducción por la presencia de 2-Me. Se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, anexo 3. Brevemente, las proteínas fueron desnaturalizadas y reducidas por calor mediante el calentamiento de las muestras a 95 °C por 5 minutos. La preparación del gel de siembra y de resolución se realizó de acuerdo al anexo 3. Se sembraron 20  $\mu$ l de muestra y 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular preteñido (Page Ruler Fermentas SM 0671). Las muestras fueron sembradas por duplicado. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 1 hora. Finalizada la electroforesis una porción del gel se dispuso para su tinción con azul brillante de Coomassie, mientras que con la otra porción del gel se realizó una electrotransferencia para realizar la técnica de WB, que nos permita observar la antigenicidad de la p24r.

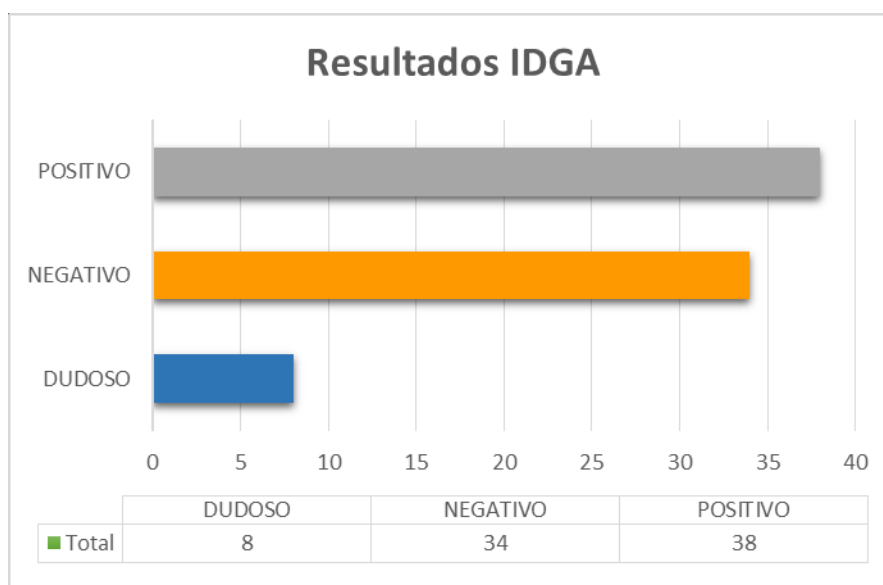
Para la electrotransferencia se utilizó una membrana de PVDF de 22  $\mu$ m previamente tratada con metanol. Se realizó a 15 V durante 30 minutos en un TransBlot-SD Semi-Dry transfer cell (Bio-Rad. USA). Una vez realizada la electrotransferencia, la membrana fue bloqueada toda una noche a 4°C en solución de bloqueo. Posteriormente fue lavada por 5 minutos 3 veces en solución de lavado. Como suero primario positivo y negativo se utilizaron sueros controles que forman parte del kit de IDGA-LEB, aprobado por el SENASA. La membrana se incubó con los sueros primarios diluidos 1/100 en solución de bloqueo por 1 hora a 37°C en suave agitación. Una vez finalizada la incubación la membrana se lavó por 5 minutos 3 veces en solución de lavado en agitación suave. Luego se incubó 1 hora a 37°C con un suero conjugado anti-IgG de bovino hecho en cabra marcado con peroxidasa (SIGMA, USA) diluido 1/5000 en solución de bloqueo. Posteriormente se procedió al lavado y se reveló con 20  $\mu$ l de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato y con 30 mg de cromógeno diaminobencidina (DAB, WAKOPURE Chemical Industries, Japón) en 100 ml de PBS.

### **C.3.3 Purificación de la p24r por diferencia de pH.**

El pellet celular fue resuspendido en 6 ml buffer PO4 pH7 (anexo4, 4.1) y se agregó lisozima a una concentración final del 1 mg/ml. La mezcla fue incubada 30 minutos a 37°C y posteriormente sonicada (6 series a 200-300 V de una duración de 10 segundos cada una, con intervalos entre ellas de 30 segundos). El lisado obtenido se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 20 minutos.

### **C.4 RESULTADOS OBTENIDOS**

Del total de LAS muestras obtenidas, 38 animales fueron positivos a VLB, mientras que 34 animales resultaron negativos y 8 animales resultaron dudosas a VLB por la prueba de IDGA. Estos resultados se presentan en el siguiente gráfico:



Con estos resultados obtenidos, se determinó la prevalencia de LEB en la región estudiada, siendo la misma del 58%. Esta prevalencia surge de la sumatoria de los francos y débiles positivos, estos últimos considerados positivos también por esta prueba.



Una vez obtenida la prevalencia de LEB en la zona analizada, se procedió a la realización de la prueba de WB de los 34 sueros negativos y de los 8 sueros dudosos a VLB por la técnica de IDGA.

Previamente fue llevada a cabo la expresión y purificación de la p24r como se mencionó anteriormente. La producción y antigenicidad de esta proteína se demuestran con un SDS-PAGE y un con un WB, figuras 4.

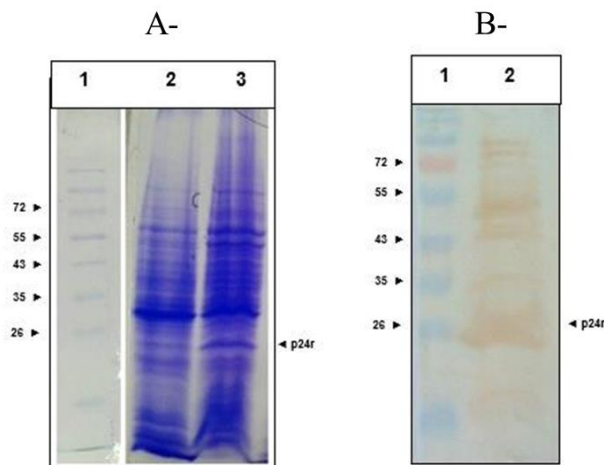


Figura 4: **A-** Electroforesis en SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida, del de *E. coli* M15] transformada con p24r. Tinción con Azul brillante de Coomassie. **1:** Marcador de peso molecular. **2:** Muestra de cultivo no inducido. **3:** Muestra de pellet de cultivo inducido con IPTG. **B-** WB de cultivo de la colonia de *E. coli* M15 transformada con p24r, inducido con IPTG. **1:** Marcador de peso molecular. **2:** Muestra de pellet de cultivo inducido con IPTG incubado con suero control positivo.

El resultado obtenido de la prueba de WB determinó que del total de los sueros negativos a IDGA tres sueros fueron positivo a VLB (figura 5).

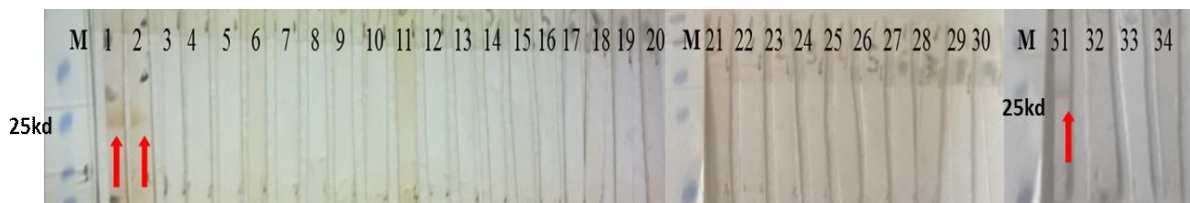


Figura 5: WB realizada con la p24r. Las flechas indican los animales positivos a VLB.

Además, se observó que los 8 sueros dudosos por IDGA fueron positivos a VLB por la técnica de WB, figura 6.



Figura 6: WB de muestras negativas por IDGA. La flecha indican los animales positivos a la p24r

Con estos resultados se logró confirmar la presencia de anticuerpos anti-vlb en los 8 animales dudosos, y además, se detectaron 3 animales que por la prueba de IDGA dieron resultado negativo. Finalmente podemos tuvimos 31 animales negativos y 49 animales positivos a VLB por WB.

## D- Conclusiones

Debido a las diferencias de sensibilidad y especificidad analítica y epidemiológica respectivamente de las pruebas utilizadas en este trabajo para la detección de LEB, es sumamente importante determinar prevalencias de la enfermedad para la elección de una prueba tamiz que nos permitan realizar un “*screening*” en los rodeos. Acorde a la bibliografía, rodeos con altas prevalencias podrían ser analizados con un IDGA como prueba tamiz, donde los animales detectados como negativos se analizaran con una prueba confirmatoria, como puede ser un WB. Sin embargo, y debido a las características operativas que presenta la prueba de IDGA, ya mencionadas anteriormente, esta prueba en combinación con el WB como prueba confirmatoria resultan una herramienta importante a aplicar en el saneamientos de los establecimientos con alta prevalencia de LEB, que pretendan comenzar con programas sanitarios que permitan la eliminación de LEB definitivamente en sus roderos. Varios trabajos determinan la baja sensibilidad de la técnica de IDGA considerada tamiz para el diagnóstico de LEB (Trono y col., 2001; Seong In Lim y col., 2009; Martin y col., 2001). Al ser una prueba de elección para el diagnóstico de rutina y que todavía se prescribe para el comercio internacional de animales según la OIE (OIE, 2004), es importante contar con una prueba confirmatoria en caso de ser necesario para la detección de animales con LEB para exportación, que nos permita detectar aquellos animales falsos negativos.

La seropositividad de este trabajo coincide con los resultados mencionados por Beita, 2008, en su tesis doctoral ya que la provincia de Alajuela es una de las que presentó mayor seropositividad a LEB. Algunas de estas fincas, la mayoría de ellas pequeñas de tamaño, por lo que aumentaba la probabilidad de contacto directo entre una vaca positiva y una negativa a LEB.



En algunos animales infectados la proteína p24r puede ser detectada en las etapas tempranas de la infección (Kittelberger y col., 1996), característica primordial para el diagnóstico de la enfermedad en estados tempranos. La producción de esta proteína en forma recombinante en un sistema bacteriano y las ventajas que ello conlleva, utilizarla como antígeno diagnóstico en técnicas como WB proporciona una herramienta fundamental para entender la epidemiología de la enfermedad (Bicka y col., 2001; Juliarena y col., 2007; Gutierrez y col., 2009; Larsen y col. 2013).

Es importante realizar pruebas confirmatorias a los animales cuyo estado sanitario fuera clasificado como dudoso por la técnica de IDGA. El WB con la proteína p24r como antígeno diagnóstico fue capaz de reconocer anticuerpos específicos contra la enfermedad. Por su comprobada sensibilidad, el ensayo de WB es una técnica adecuada para continuar explorando como prueba diagnóstica confirmatoria de sueros dudosos y negativos a la prueba de IDGA que por su sensibilidad analítica no son capaces de detectar por esta última .

Por último, cabe destacar que es importante que los productores tomen conciencia de las pérdidas económicas que conlleva tener los rebaños positivos a VLB. Según la tesis de A.L. Gonzalez, 2014 en Costa Rica, el total de pérdidas en dólares (USA) por el efecto del VLB en producción y reproducción por lactancia podría ser de \$172 a \$232 para cada animal seropositivo y entre \$264 a \$333 para cada animal seroconvertido.

Por lo tanto, la realización de más y mejores investigaciones científicas, su divulgación para su entendimiento por parte de los productores, sumado al mejor manejo de la epidemiología de la enfermedad y presentando, fundamentalmente, políticas públicas que permitan afrontar las grandes pérdidas que afrontan los establecimientos con altas prevalencias de LEB, podrían comenzar hacia un programa

exitoso para el control y erradicación definitiva de la enfermedad utilizando ambas pruebas (IDGA y WB).

### *E- Bibliografía*

1. Beita G. Epidemiología de la leucosis enzoótica bovina en hatos lecheros especializados. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 2008
2. Bicka L, Kuźmak J, Kozaczyńska B, Plucienniczak A, Skorupska A. Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay. *Acta Biochim Pol.* 2001;48(1):227-232.
3. Bruck C, Portetelle D, Mammerickx, Mathot M, Burny A. Epitopes of BLV glycoprotein gp51 recognized by sera of infected cattle and sheep. *Leukemia Res.* 1984; 8:315.
4. Burny A, Bruck C, Cleuter Y, Couez D, Deschamps J, Gregoire D, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix GM, Portetelle D. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leucosis. *Onder. J. Vet. Res.* 1985; 52: 133-144.
5. Burrige MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr M.F, Van Der Maaten MJ. Fall in Antibody Titer to Bovine Leukemia Virus in the Periparturient Period. *Can. J. Comp. Med.* 1982; 46: 270-271
6. Coffin JM. *Retroviruses*, Woodbury, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1997.
7. Chamizo Pestana EG. Julio 2005. Leucosis Bovina Enzoótica: Revision. *Revista Electronica de Veterinaria REDVET.* VI, Nº7. [on line]: [www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070705/070516.pdf](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070705/070516.pdf)
8. Choi KY, Liu RB, Buehring GC. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J Virol Methods.* 2002; 104(1):33-39.

9. Doltz G, Moreno E. Comparison of Agar gel Immunodiffusion Test, Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay and Western blotting for the detection of BLV Antibodies. *J. Vet. Med.* 1999; 46: 551-558.
10. Felmer E, Zuñiga J, Recabal M, Chavez R. Diagnóstico y tipificación del virus de la leucosis bovina mediante una prueba de PCR-RFLP a partir de ADN extraído desde células somáticas de la leche. *Arch. Med. Vet.* 2006; 38, (3) 253-257.
11. Ferrer JF, Bhatt DM, Abt DA, Marshak RR, Baliga VL. Serological diagnosis of infection with the putative bovine leukemia virus. *Cornell Vet.* 1975; 65(4):527-542.
12. Florins A, Gillet N, Asquith B, Boxus M, Burteau C, Twizere JC, Urbain P, Vandermeers F, Debaq C, Sanchez-Alcaraz MT, Schwartz-Cornil I, Kerkhofs P, Jean G, Théwis A, Hay J, Mortreux F, Wattel E, Reichert M, Burny A, Kettmann R, Bangham C, Willems L. Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front. Biosci.* 2007;12,1520-1531.
13. Florins A, Boxus M, Vandermeers F, Verlaeten O, Bouzar AB, Defoiche J, Hubaux R, Burny A, Kettmann R, Willems L. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease. *VetImmunol Immunopathol.* 2008;125(1-2): 1-7.
14. Gillet, N., A. Florins, M. Boxus, C. Burteau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, A. Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann & L. Willems. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology.* 2007; 4:18
15. Gomez-Lucia E., Blanco M., Doménech A. *Manual De Inmunología Veterinaria.* Ed: Pearson-Prentice-Hall. 2007
16. González ET, Oliva GA, Ando Y, Etcheverrigaray ME. Bovine leukemia Virus. Antigen production and serologic detection. 2nd International Conference on the Impact of viral diseases on the development of Latin American Countries and the Caribbean region, Mar del Plata 1988.

17. Gonzalez ET, Oliva GA, Valera AR, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray ME. Leucosis enzootica bovina: evaluacion de tecnicas diagnosticas (ID, ELISA-1, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Vet.* 2001; 21, 12-20.
18. González AL. Efectos de la infección con el virus de la leucosis bovina enzoótica sobre parámetros productivos y reproductivos en vacas lecheras de Costa Rica. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de Costa Rica, 2014.
19. González E. Linfoma: Descubren enfermedad mortal en el ganado. *Agroindustria.* 1977; 6: 15-18.
20. González ET, Oliva GA, Norimine J, Cid De La Paz V, Echeverria MG, Etcheverrigaray ME. Enzootic Bovine Leukosis (EBL): Evaluation of Western Blot Technique applied to the diagnosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia.* 1999; 51: 299- 305.
21. González, J. Situación actual y perspectivas del sector lácteo costarricense. Congreso Nacional Lechero. Nov. 21-22. Cámara Nacional de Productores de Leche (Proleche), Costa Rica. 2012.
22. Gumprecht F. Leukozytenzerfall im Blute bei Leukämie und bei schweren Anämien. *Deutsch Arch. Klini. Med.* 1896; 57. 523–548
23. Gutiérrez SE, Dolcini GL, Arroyo GH, Rodríguez Dubra C, Ferrer JF, Esteban EN. Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am J Vet Res.* 2001; 62(10):1571-1577.
24. Heeney JL, Valli VE, Montesanti J. Alterations in Humoral Immune Response to Bovine Leukaemia Virus Antigens in Cattle with Lymphoma. *J. gen. Virol.* 1988; 69, 659-666.

25. Jiménez C, Bonilla J, Dolz G, Rodríguez L, Herrero L, Bolaños E, Cortez R, and Moreno E. Bovine Leukemia-Virus Infection in Costa Rica. *Journal of Veterinary Medicine*, 1995; 42, 385-390.
26. Johnson R, Kaneene J. Bovine Leukemia virus and Enzootic Bovine Leucosis. *Vet Bulletin*. 1992; 62:287-312.
27. Juliarena M, Gutierrez S, Ceriani C. Chicken antibodies: a useful tool for antigen capture ELISA to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies. *Vet Res Commun*. 2007; 31(1):43-51.
28. Juliarena MA, Gutierrez SE, Ceriani C. Determination of proviral load in bovine leucemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am. J. Vet. Res*. 2007; 68, 1220–1225.
29. Kohara J, Konnai S, Onuma M. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Jpn J Vet Res*, 2006. 54(1): 25-30
30. Klintevall K, Naslund G, Svedlund G, HajduL K, Linde N, Klingeborn B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J Virol Methods*. 1991; 33:319-333.
31. Kittelberger R, Laybourn BJ, Diack DS, Penrose ME, Reichel MP, Motha J, Molloy JB, Merza M. Evaluation of electrophoretic immunoblotting for the detection of antibodies against the bovineleukosis virus in cattle. *Methods*. 1996; 61(1-2):7-22.
32. Kuckleburg CJ, Chase CC, Nelson EA, Marras SA, Dammen MA, Christopher-Hennings J. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet. Diagn. Invest*. 2003;15(1):72-6.

33. Larsen A, Gonzalez ET, Serena MS, Echeverría MG, Mortola E. Expression of p24 gag protein of bovine leukemia virus in insect cells and its use in immunodetection of the disease. *Mol Biotechnol.* 2013; 54(2):475-83.
34. Larsen, A. Producción de proteínas recombinantes de valor inmunogénico del virus de la leucosis bovina y su aplicación al diagnóstico de la enfermedad. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, 2014.
35. Lim SI, Jeong W, Tark DS, Yang DK, Kweon CH. Agar gel immunodiffusion analysis using baculovirus-expressed recombinant bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51/gp30T-) *J. Vet. Sci.* (2009), 10(4), 331:336.
36. Mammerickx M, Portetelle D, De Clercq K, Burny A., Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk Res*, 1987. 11(4): p. 353-8.
37. Martin D, Arjona A, Soto I, Barquero N, Viana M, Gómez-Lucía E. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2001;48(2):97-106.
38. Meertens L, Mahieux R, Mauclère P, Lewis J, Gessain A. Complete sequence of a novel highly divergent simian T-cell lymphotropic virus from wild-caught red-capped mangabeys (*Cercocebus torquatus*) from Cameroon: a new primate T-lymphotropic virus type 3 subtype. *J. Virol.* 2002; 76(1): 259-68.
39. Miller JM, Van Der Maaten MJ. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur J Cancer* . 1977;13, 1369-1375.
40. Monke DR, Rohde RF, Hueston WD, Milburn RJ. Estimation of the sensibility and specificity of the agar gel immunodifusion test for bovine leukemia virus: 1296 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1992; 200:2001-2004.

41. Monti G. Epidemiology, infection dynamics and effective control of bovine leukemia virus within dairy herds of Argentina: A quantitative approach. Tesis de Ph.D. WageningenUniversity, Germany. 2005
42. OIE. (2004). Manual de la OIE sobre animales terrestres Disponible en el URL: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.3.04\\_Leucosis\\_bovina.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.04_Leucosis_bovina.pdf)
43. Panei CJ, Estudios moleculares en segmentos provirales del virus de la leucosis bovina relacionados a procesos de tumorigénesis y en regiones asociadas a resistencia/susceptibilidad en el MHC de clase II bovino. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, 2011.
44. Panei CJ, Takeshima SN, Omori T, Nunoya T, Davis WC, Ishizaki H, Matoba K, Aida Y. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. BMC Vet Res. 2013 4;9:95
45. Panei CJ, Larsen AE, Fuentealba NA, Metz GE, Echeverría MG, Galosi CM, Valera AR Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus Carlos Javier. Open Vet. Jour. 2019; 9 (1), 33-37
46. Pennimpe de EFF, Gomez CM, Stanchi NO. Introducción a la inmunobiología. Editorial de la Universidad de La Plata. 2004
47. Pomier C, Sanchez Alcaraz MT, Debaq C, Lancon A, Kerkhofs P, Willems L, Wattel E, Mortreux F. Early and transient reverse transcription during primary deltaretroviral infection of sheep. Retrovirology. 2008, 5:16.
48. Portetelle D, Bruck C, Mammerickx M, Burny A. Use of monoclonal antibody in an ELISA test for detection of antibodies to bovine leukemia virus. J. Virol. Methods. 1983; 6:19-29.



49. Rama G, Pritsch O, Adrien ML, Moratorio G, Meikle A. Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria (Montevideo)*. 2012; 48, (185):11-17.
50. Romero JJ, Dávila J, Beita, Dolz G. Relación entre el estado serológico a leucosis bovina enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 2015. 39(2): 7-18.
51. Simard C, Richardson S, Dixon P, Belanger C, Maxwell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can J Vet Res*. 2000; 64 2 101-106
52. Tajima S, Aida Y. Mutant tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos. *J Virol*, 2002. 76(5): 2557-2562.
53. Tizard I. R. Inmunidad en el feto y en el recién nacido. En Tizard IR *Introducción a la inmunología Veterinaria*. 8Va Edición. Barcelona España. Ed. Elsevier, 2009; 223-238.
54. Trono K, Pérez, DM, Duffy S, Borca M, Carrillo C. Seroprevalence of Bovine Leukemia Virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol*. 2001; 83:235-248.
55. Weiss RA. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 2006; 3;3:67.

# ANEXOS

## Anexo 1

### **Preparación de placas para Inmunodifusión**

- a) Hidroximetil – 1,3 propanediol (TRIS) 0,05M y ClNa al 8,5% (P/V) 1000 ml de agua ultrapura.
- b) Ajustar el pH a 8 con ClH.
- c) Disolver agar noble al 1% p/v en el buffer pH 8
- d) Calentar a baño maría en ebullición hasta la completa disolución, (Aproximadamente 30 min).
- e) Verter el agar suavemente (18ml) en placas de Petri, limpias y desengrasadas con gasa o algodón embebido en alcohol.
- f) Colocar las placas abiertas en una superficie plana hasta gelificar.
- g) Luego conservar las placas tapadas y en cámara húmeda a 4 °C.

Al momento de su uso se cortó el agar con un sacabocado de 7 bocas hasta el fondo de la placa, sacando el agar de cada una de las cavidades con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.

**Anexo 2****Soluciones Stock****1) Acrilamida- Bisacrilamida**

Acrilamida 30 gr

Bisacrilamida 0.8 gr

H<sub>2</sub>O csp 100 ml

Se prepara en vaso de precipitado o erlenmeyer graduado, se coloca un imán, se agita hasta disolución, se retira el imán y se completa el volumen. Se filtra con embudo en recipientes color caramelo. Se guarda a 4°C.

**2) Buffer Tris-HCl 1.5 M**

Tris-Base 18.15 gr

H<sub>2</sub>O csp 100 ml

HCl hasta llevar a pH 8.8

Se disuelve en Tris en la mitad del volumen final, se ajusta el pH con HCl puro, se completa el volumen de agua indicada previamente, se retira el imán, se enfrasca en vasos rotulados y se guarda a 4°C.

**3) Buffer Tris- HCl 0.5 M pH 6.8**

Tris-Base 6 g

HCl csp pH 6.8

H<sub>2</sub>O 50 ml (luego llevar a 100 ml)

Se disuelve en Tris en la mitad del volumen final, se ajusta el pH con HCl puro, se completa el volumen de agua indicada previamente, se retira el imán, se enfrasca en vasos rotulados y se guarda a 4°C.

4) **SDS al 10 %**

10 gr de SDS se disuelven en 50 ml de agua en un erlenmeyer en agitación y si es necesario en baño maría a 60°C aprox. Se completa el volumen se guarde en un frasco color caramelo, correctamente rotulado. Almacenar a temperatura ambiente.

5) **APS al 1 %**

Se prepara en el momento de trabajar, 100 mg de APS en 1 ml de agua. La droga pura se guarda en heladera.

6) **Buffer para reservorio de corrida concentración 10 X**

Tris-Base	30.2 gr
Glicina	144 gr
H <sub>2</sub> O	csp 1000 ml

### ANEXO 3

La polimerización de los geles se puede realizar en placas de vidrio grandes (19 x 17) o pequeñas (9 x 10). Las placas de vidrio deben estar perfectamente limpias y desengrasadas. Según el sistema a utilizar, será diferente el método para montar las placas de vidrio.

#### **Gel de corrida, de resolución o Resolving gel**

Se puede aplicar en distinta concentración según el tamaño de molécula que se desea separar.

	<b>7.5 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12.5 %</b>	<b>15 %</b>
Acril-Bis 30-8	7.5 ml	10 ml	12.5 ml	15 ml
Tris-HCl    pH 8.8	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
Agua	14.5 ml	12 ml	9.5 ml	7 ml
Temed	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
SDS 10%	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml
APS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml

La mezcla se prepara en un vaso de precipitado. Las cantidades de Temed y APS pueden variar si no se logra una polimerización adecuada en tiempo aproximado de 20 a 30 minutos.

Con pipeta de vidrio y propipeta se toma la mezcla y se introduce con mucho cuidado entre las placas, seguido se agrega suavemente agua destilada con jeringa entre las placas de vidrio para favorecer una correcta polimerización. Si es invierno o el ambiente está frío colocar las placas en estufa a 37°C hasta su polimerización (20-30 minutos)

#### **a)     Gel concentrador , apilamiento o Staking Gel**

Se puede usar al 4 o al 5 %.

	<b>Placa grande 4%</b>	<b>Placa chica 4%</b>	<b>Placa chica 5 %</b>
Acril-Bis	1.33 ml	0.66 ml	0.66 ml
Tris-HCl pH 6.8	2.5 ml	1.25 ml	1.25 ml
Agua	6 ml	3 ml	2.97 ml
Temed	10 µl	5 µl	5 µl
SDS 10 %	0.1 ml	0.05 ml	0.05 ml
APS	0.1 ml	0.05 ml	0.075 ml

Se descarta el agua de las placas y se agrega sobre el gel de resolución la mezcla del gel concentrador hasta llegar casi al borde de la placa.

Se coloca el peine con cuidado de no formar burbujas, se deja a temperatura ambiente y si es posible con luz directa para facilitar la polimerización.

**b)** Se retira el peine, se montan las placas de vidrio que contienen el gel en el soporte para electroforesis y el conjunto se introduce en la cuba. Completar los reservorios con el buffer de corrida y se enjuagan las cavidades con el buffer del reservorio.