UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

"DETECCION SEROLOGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (VLB) EN EL NORESTE DE MEXICO"

POR

RAMIRO AVALOS RAMIREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

DICIEMBRE 1995

TM
SF967
.I4
R3
c.1

1080072494

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

POR

RAMIRO AVALOS RAMIREZ

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

" DETECCION SEROLOGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (VLB) EN EL NORESTE DE MEXICO "

Por

RAMIRO AVALOS RAMIREZ
Medico Veterinario Zootecnista
Universidad Autónoma de Nuevo León
Monterrey, Nuevo León
1 9 8 7

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología

Diciembre 1995

TM
SF967
.L4
R3

Biblioteca Central Magna
UANL
FONDO
TESIS

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

" DETECCION SEROLOGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (VLB) EN EL NORESTE DE MEXICO"

Comision de tesis :

Dra. Laura Trejo Avila (Director)

Dr. Reyes Tamez Guerra (Asesor)

Dr. José Antonio Salinas Meléndez (Asesor)

MC. Pablo Zapata Benavidez (Asesor)

DEDICATORIAS

Al creador del Universo quien empleó hasta el más mínimo detalle en el diseño y ejecución de su obra. Gracias por permitirme conocer "algo" de todo lo bello creado en este breve lapso de tiempo de mi vida.

A mis padres , Román Avalos Juárez y Julia Ramírez Gutierrez por su ejemplo, entusiasmo y fortaleza para cuidarme, enseñarme y comprenderme.

A mis hermanos, Concepción, Rosa, Rosario, Guillermo y Román, quienes me brindaron y soportaron algunos años de su vida.

A mi Esposa Trinidad y mi hija Julia Valeria y a la bebe que viene , porque su presencia y alegría me alienta a continuar (Disculpenme por no estar todo el tiempo que quisiera estar con ustedes).

Con mucho cariño ha ti (donde quiera que estes), que me has brindado cosas buenas de esta vida.

A todas las personas que me hicieron pasar ratos felices, amargos y de otra índole, dado que ello me permitio conocerlos

AGRADECIMIENTOS

Creo que no serian suficientes estas hojas para externar mis agradecimientos a todas las Personas e Instituciones que de una manera u otra han influido en el desarrollo personal y académico de un servidor.

A la Universidad Autonoma de Nuevo León que a pesar de lo que se diga de ella siempre alienta la flama de la verdad.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia cuya evolución a sido muy favorable para la formación de buenos profesionales.

A la Facultad de Ciencias Biológicas escuela que ha sabido proyectar el quehacer en las Ciencias Biológicas.

A mis asesores : Dra. Laura Trejo Avila, Dr. Reyes Tamez Guerra, Dr. José Antonio Salinas Melendez y MC. Pablo Zapata Benavides

Al personal de la FMVZ de la UANL quienes siempre me han brindado un apoyo y trato especial.

Dr. Rafael Ramírez, Dr. José A. Salinas, MVZ. MC. Javier Omar Sanchez Guerra, MVZ. MC. Telesforo Vera, MVZ. MC. Alfredo Wong, MVZ. M.C. Juan J. Zárate, MVZ. EPG Mario A. Guzmán, MVZ. EPG. Martha V. Garza, MVZ. Guillermo Dávalos Aranda, MVZ. MC. Fco. Javier Picón Rubio, MVZ. Marco A. Cantú, QCB. Lourdes Silva, QBP. A. Aguirre, Dr. Daniel K. Miller. Dr. Roque G. Ramírez, Dr. Jorge R. Kawas, Biol. Jaime Hernandez, MVZ. Alicia Nevarez Garza, MVZ. EBPc. Jorge

Martínez, MVZ. Sergio Ramiro Temblador, MVZ. EA. Francisco Santoyo Stephano y con afecto al Dr. Rubén Cervantes Vega.

A todas las secretarias en especial para la Srita. Maribel Robledo Cubillos, Sra. Maria de la Cruz Padilla Dávila y Sra. Irma González González.

A los Estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la UANL. Especialmente a quienes tuve la fortuna de impartirles clases y a los que han sido ayudantes del Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario.

Al personal del Laboratorio de Inmunología y Virología del departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, quienes siempre me dieron un trato cordial y amable.

Dr. Reyes Tamez, Dra. Cristina Rodriguez, MC. Juan M. Alcocer, Mati, Leonardo, José Luis Mendez, Bertha, Catarino, Aracelí, MC. Juan Fco. Contreras, QBP Arturo Chavez R. Especialmente para la QBP. M. Antonieta Lara Rodriguez y MVZ.MC. Pablo Zapata Benavides, quien a este último le corresponde grán parte de este trabajo.

A los propietarios de todos los hatos en los cuales se nos permitió obtener y analizar muestras (Especialmente al personal de la Unidad de Producción el "Canada" perteneciente a la Facultad de Agronomía de la UANL y al Dr. Juan Villarreal, al Director de esa Institución) y todas aquellas personas que me auxiliaron en esta tarea.

INDICE GENERAL

Página

INDICE DE CUADROS IX

INDICE DE FIGURAS XI

ABREVIATURAS. XIII

1. RESUMEN 1

2. INTRODUCCION 4

2.1. Objetivos 5

2.2. Hipótesis 6

3. ANTECEDENTES 7

3.1.Historia del Linfosarcoma / VLB en bovinos 7

3.2.Genética, Morfología y Análisis Fisicoquímico 9

3.3. Manifestaciones clínicas en bovinos positivos a VLB 14

3.4. Epizootiología. 16

3.5. Diagnóstico Serológico de la Infección por VLB 19

3.6. Detección del provirus del VLB 21

3.7. Importancia económica 23

4. MATERIAL Y METODOS 26

4.1.Ubicación de las zonas muestreadas. 26

4.2.Toma de muestras, separación de suero y mononucleares sanguíneos periféricos (MSP) 26

4.3.Cultivo de células y obtención de antígenos. 27

4.3.1. Cultivo de Mononucleares sanguíneos periféricos (MSP) y obtención de antígenos en sobrenadante celular (ASC) 27

4.3.2. Cultivo de células de riñón de cordero persistentemente infectadas con VLB (FLK-VLB) y producción de antígenos solubles. 28

4.3.2.1. Purificación de la Glicoproteína 51 (Gp 51) del VLB 28

4.4. Detección de anticuerpos contra el Virus de la Leucosis Bovina. 29

4.4.1. Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG). 29

4.4.2. Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima (ELISA) 30

4.4.2.1 Curva de referencia y establecimiento del punto de corte en ELISA 32

4.4.3.Inmunoelectrotransferencia (WB) 33

4.5. Detección de antigenos del Virus de la Leucosis Bovina. 34

4.5.1. Fijación de Complemento 34

4.5.2. Inmunoelectrotransferencia (WB). 35

4.6. Detección del provirus del VLB. 37

4.6.1. Amplificación y purificación del plásmido pGEM3-Tax-Rex-X-VLB. . . . 37

4.6.2. Extracción de DNA de MSP cultivados. 39

4.6.3. Dot Blot 40

4.7. Microscopía electrónica de linfocitos cultivados de vacas seropositivas al VLB. 42

4.8. Obtención de datos y análisis estadístico 43

4.9. Diagrama de flujo 44

5. RESULTADOS 45

5.1. Total de muestras, tipo de producción y procedencia. 45

5.1.1. Edad y razas de los animales 45

5.2. Seropositividad y prevalencia. 45

5.3. Comparación entre ELISA, WB e IDAG para detectar anticuerpos contra VLB en hatos con diferente seroprevalencia. 49

5.4. Detección de antígenos del VLB en cultivos de MSP 50

5.5. Comparación entre Westernblot y FC para la detección de antígenos del VLB en cultivos de MSP 51

5.6. Detección del provirus del VLB en DNA de MSP cultivados y comparación con las pruebas serológicas para detectar al VLB. 52
5.7. Detección de viriones del VLB. 54

6. DISCUSION 55
7. CONCLUSIONES 64
8. LITERATURA CITADA 65
9. APENDICE 79

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
I	Localización, tipo de producción y seropositividad de los hatos muestreados en el Noreste de México para detectar el Virus de la Leucosis Bovina	46
II	Seropositividad contra el Virus de la Leucosis Bovina en bovinos del Noreste de México, de acuerdo a la función zootécnica	47
III	Seropositividad contra el VLB en bovinos de diferentes edades de algunos hatos lecheros del noreste de México.	47
IV	Distribución de bovinos seropositivos al Virus de la Leucosis Bovina de acuerdo a la raza y función zootécnica	48
V	Comparación entre ELISA, WB e IDAG para detectar anticuerpos séricos contra VLB en tres hatos de bovinos con diferentes seroprevalencias.	49
VI	Densidad óptica obtenida en la prueba de fijación de complemento para la detección de antígenos del VLB en cultivo de MSP de vacas positivas a IDAG	50
VII	Comparación entre WB y Fijación de complemento para la detección de antígenos del VLB en linfocitos de vacas positivas ó negativas a IDAG	52

VIII Comparación entre ELISA, Dot blot é IDAG para detectar al VLB en un hato lechero con elevada seroprevalencia. 54

INDICE DE FIGURAS

Figura **Página**

1. Distribución relativa de las zonas muestreadas en el noreste de México para detectar anticuerpos contra el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en suero de bovinos. 26

2. Patrón utilizado en la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel . . . 30

3. Esquema de distribución de los sueros sospechosos y controles negativos y/o positivos al virus de la Leucosis Bovina en la microplaca de ELISA. 31

4. Curva de referencia y punto de corte obtenida con los sueros controles en la prueba de ELISA. 32

5. Reactividad obtenida en la Inmunoelectrotransferencia con el suero de vacas seropositivas y seronegativas (IDAG) contra las proteínas estructurales Gp51 y P24 del VLB 34

6. Serorreactividad obtenida contra Gp51, P24 y otras proteínas del sobrenadante de cultivo de linfocitos de vacas seropositivas o negativas a VLB 36

7. Mapa genético del plásmido pGEM3-Tax-Rex-X-VLB, empleado para detectar el genoma proviral del VLB en linfocitos cultivados de bovinos. 37

8. Corrimiento electroforético del plásmido pGEM3-Tax-Rex-X-BLV. 39

9. Corrimiento electroforético del DNA de mononucleares bovinos . . . 40

10. Absorbancia obtenida con el sobrenadante de cultivo de linfocitos en la prueba de fijación de complemento. 51

11. Reactividad obtenida en la membrana de nitrocelulosa con el DNA de MSP cultivados para detectar al provirus del VLB en vacas seropositivas o seronegativas a IDAG. 53

12. Partículas virales tipo "C" observadas en mononucleares sanguíneos periféricos estimulados con Concanavalina A, obtenidos a partir de vacas seropositivas al VLB. 54

P24	Proteína de 24 Kd del Virus de la Leucosis Bovina
PSA	Portador Sano Asintomático
pX_{BL}	Gen pX del Virus de la Leucosis Bovina
RNA	Acido Ribonucleico
SSC	Solución Salina de Citratos
VLB	Virus de la Leucosis Bovina
WB	Inmunoelectrotransferencia

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ASC	Antígenos en Sobrenadante Celular
BpL	Bovinos destinados a la producción de leche
BpC	Bovinos destinados a la producción de carne
°C	grados Celsius
DNA	Acido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima
EUA	Estados Unidos de América
FC	Fijación de Complemento
Gp51	Glicoproteína de 51Kd del Virus de la Leucosis Bovina
h	horas
IDAG	InmunoDifusión en Agar Gel
lbs	libras de presión
LEB	Linfosarcoma Enzoótico Bovino
LP	Linfocitosis Persistente
LTR	Terminaciones Largamente Repetidas
µl	microlitros
µg	microgramos
ml	mililitros
MSP	Mononucleares Sanguíneos Periféricos
m	minutos
ORF	Marco de Lectura Abierta
PBS	Buffer de Fosfatos Salino
PM	Peso Molecular