



Validación del método analítico, en cultivo celular, para el aislamiento y prueba confirmatoria del virus de la estomatitis vesicular en ganado bovino

Mancheno Hidalgo, Pablo Sebastián

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

MVZ M. Sc. Chávez Larrea, María Augusta

17 de marzo de 2021

Urkund Analysis Result

Document Information

Analyzed document	Avances.docx (D97883346)
Submitted	3/10/2021 6:56:00 PM
Submitted by	
Submitter email	psmancheno@espe.edu.ec
Similarity	7%
Analysis address	machavez.espe@analysis.orkund.com

.....
María Augusta Chávez Larrea MVZ M. Sc.

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Validación del método analítico, en cultivo celular, para el aislamiento y prueba confirmatoria del virus de la estomatitis vesicular en ganado bovino**” fue realizado por el señor **Mancheno Hidalgo, Pablo Sebastián**, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 17 de marzo de 2021

.....
María Augusta Chávez Larrea MVZ M. Sc.

C. C. 0201274842



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Mancheno Hidalgo, Pablo Sebastián** con cédula de ciudadanía nº 1805092333 declaro que el contenido, idea y criterios del trabajo de titulación "**Validación del método analítico, en cultivo celular, para el aislamiento y prueba confirmatoria del virus de la estomatitis vesicular en ganado bovino**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales y referenciado las citas bibliográficas.

Sangolquí, 17 de marzo de 2021

Firma

Mancheno Hidalgo, Pablo Sebastián
C.C.:1805092333



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Mancheno Hidalgo, Pablo Sebastián** con cédula de ciudadanía n° 1805092333 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Validación del método analítico, en cultivo celular, para el aislamiento y prueba confirmatoria del virus de la estomatitis vesicular en ganado bovino”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 17 de marzo de 2021

Firma

Mancheno Hidalgo, Pablo Sebastián

C.C.: 1805092333

Dedicatoria

A Dios, por brindarme bienestar físico y espiritual, y la posibilidad de cursar estudios universitarios.

Este trabajo de investigación está dedicado a mis padres y hermana, sin quienes nada hubiera sido posible. Su amor, y su guía me condujeron por el camino de la superación.

Agradecimiento

A mis padres, por su apoyo absoluto e incondicional amor, me motivaron a ser cada día mejor en esta etapa de aprendizaje.

A mi hermana María José, por su continuo aliento y sabios consejos

A Alex, María Teresa, Euclides, Jorge, Nathy y todo el personal de la Dirección de Diagnóstico Animal de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, por su amabilidad y brindarme sus conocimientos, así como en darme la apertura necesaria para la realización de este proyecto.

A mis tíos Alfonsito y Magdalena por su generosidad y afecto

A mis amigos Alex, Eduardo, José Gabriel, Joss, quienes contribuyeron con ideas valiosas para la ejecución de este proyecto.

A María Augusta Chávez Larrea MVZ M. Sc. y Ligia Ayala PhD, por la guía académica

Índice de contenidos

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO, EN CULTIVO CELULAR, PARA EL AISLAMIENTO Y PRUEBA CONFIRMATORIA DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR EN GANADO BOVINO	1
Urkund Analysis Result	2
CERTIFICACIÓN	3
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA	4
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de contenidos	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
Introducción	16
Formulación del problema	16
Justificación del problema	16
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
Hipótesis	17

Marco teórico	18
Generalidades	18
Estructura	19
Genoma	20
Epidemiología.....	21
Diagnóstico	23
Cultivo Celular	24
Línea Celular BHK- 21.....	26
Efecto Citopático	27
Conteo Celular	28
Criopreservación.	28
Curva de crecimiento.....	28
Titulación Viral.....	30
Validación de una prueba diagnóstica	30
Metodología	32
Localización del ensayo	32
Toma y recolección de muestras.....	32
Línea Celular BHK-21.....	32
Mantenimiento de la Línea celular BHK-21.....	32
Descongelamiento de la línea celular BHK-21.....	32
Subcultivo.....	33

	10
Conteo Celular	34
Determinación del número de células para el ensayo de daño citopático	34
Procesamiento epitelios	35
Inoculación del virus	35
Reproducibilidad.....	36
Recuperación del virus	36
Titulación Viral.....	36
Sensibilidad analítica.....	37
Especificidad analítica	37
Análisis Estadístico.....	37
Análisis Molecular	38
Resultados	39
Crecimiento Línea Celular BHK-21	39
Curva de crecimiento.....	40
Efecto citopático	43
Sensibilidad Analítica	44
Repetibilidad.....	45
Especificidad Analítica.....	46
Análisis molecular	47
Discusión	49
Crecimiento Línea Celular BHK-21	49

	11
Curva de crecimiento.....	49
Efecto Citopático	51
Repetibilidad.....	52
Análisis Molecular	53
Conclusiones	54
Recomendaciones	55
Bibliografía	56
Anexos	62

Índice de Tablas

Tabla1 Prueba de Shapiro-Wilks	41
Tabla2 Prueba ANOVA de doble vía	42
Tabla3 Prueba de Tukey	42
Tabla4 Cálculo de la media infectiva en cultivo celular	45
Tabla5 Repetibilidad	45
Tabla6 Repetibilidad	46

Índice de Figuras

Figura1 Signos clínicos de estomatitis vesicular en ganado bovino.....	18
Figura2 Estructura del virus de estomatitis vesicular	20
Figura3 Estructura y Organización del genoma del virus de estomatitis vesicular	21
Figura4 Intervalos de tiempo brotes	22
Figura5 Efecto Citopático causado por VEV en células BHK-21	27
Figura6 Patrón de crecimiento de células en cultivo celular	30
Figura7 Línea celular BHK-21 observada al microscopio invertido	39
Figura8 Gráfico tiempo vs absorbancia	40
Figura9 Efecto Citopático causado por VEV en Células BHK-21	44
Figura10 Células BHK-21 infectadas con virus de rabia.....	46
Figura11 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%	47

RESUMEN

En este estudio se busca estandarizar la técnica para aislar el virus de estomatitis vesicular (VEV) de muestras de epitelios de vacas infectadas, proporcionadas por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitaria-Agrocalidad. La estomatitis vesicular (EV) es una enfermedad que afecta principalmente al ganado bovino y al ser clínicamente indistinguible de la Fiebre Aftosa (FA), surge la necesidad de contar con pruebas confirmatorias. El aislamiento viral es una técnica sensible, en el que se utilizan cultivos celulares, los cuales son inoculados con el virus viable presente en la muestra y una vez que ocurre replicación viral efectiva, se observan cambios morfológicos de las células hospederas o efectos citopáticos (ECP).

Se realizó el crecimiento de línea celular baby hamster kidney (BHK-21) en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado y enriquecido, de donde se pudo determinar a través de una curva de crecimiento que la mejor concentración para inocular el virus es 3000 células/ml., después de 72 horas de incubación.

Se procesaron 30 epitelios que fueron definidos como positivos para VEV a través de ELISA-sándwich, con el protocolo de aislamiento viral en cultivo celular de PANAFTOSA, y con los cuales se efectuó la repetibilidad. Con ayuda de un microscopio óptico invertido se determinó la presencia de 3 muestras con ECP superior a 80% que fueron recogidas, congeladas y sometidas a análisis molecular para identificación viral. El análisis molecular reveló la presencia de VEV en las muestras provenientes de aislamiento viral.

PALABRAS CLAVE:

- AISLAMIENTO VIRAL
- EFECTO CITOPÁTICO
- ESTOMATITIS VESICULAR

ABSTRACT

This study aims to standardize the technique to isolate vesicular stomatitis virus (VSV) from samples of infected cow epithelia, provided by the Agency for the Regulation and Control of Phytosanitary and Animal Health-Agrocalidad. Vesicular stomatitis (VE) is a disease that mainly affects cattle and, being clinically indistinguishable from Foot-and-Mouth Disease (FMD), creating the need for confirmatory tests. Viral isolation is a sensitive technique, in which cell cultures are used to inoculate the viable virus present in the sample, and once effective viral replication occurs, morphological changes of the host cells or cytopathic effects (CPE) are observed.

The baby hamster kidney cell line (BHK-21) was grown in supplemented and enriched DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), from which it was possible to determine through a growth curve that the best concentration to inoculate the virus is 3000 cells / ml., after 72 hours of incubation.

30 epithelia defined as positive for VSV through ELISA-sandwich were processed with the protocol of viral isolation in cell culture of PANAFTOSA, these samples were used to perform the repeatability assay. Using an inverted optical microscope, 3 samples with greater CPE than 80% were determined, collected, frozen and subjected to molecular analysis for viral identification. Molecular analysis revealed VSV presence.

KEY WORDS:

- VIRAL ISOLATION**
- CYTOPATHIC EFFECT**
- VESICULAR STOMATITIS**

Introducción

Formulación del problema

El Laboratorio de Virología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario cuenta con una técnica para el diagnóstico directo del virus de Estomatitis Vesicular, el ensayo denominado ELISA sándwich-indirecto, que es una prueba con alta sensibilidad y especificidad (Ferris & Donaldson, 1988), que permite detectar la presencia del virus. Generalmente, los falsos negativos a ELISA SI se deben a la poca cantidad viral presente en la muestra, llamados positivos débiles, por lo tanto son difícilmente detectables por las técnicas de rutina (Zaaijer et al., 1993). En caso de obtener resultados dudosos, el virus puede ser recuperado por medio de células.

El cultivo celular aparece como alternativa principal para la confirmación de casos clínicos para el virus de Estomatitis Vesicular.

Justificación del problema

La estomatitis vesicular y la fiebre aftosa son enfermedades clínicamente indistinguibles, y según reporta la Organización Mundial de Sanidad Animal OIE (OIE, 2018), la fiebre aftosa es una enfermedad inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres, y es de declaración obligatoria. Es la primera enfermedad para la cual la OIE ha establecido una lista oficial de países y zonas reconocidos libres con o sin vacunación.

En el 2015 la República del Ecuador alcanzó el estatus sanitario de “Ecuador continental libre de aftosa con vacunación y Galápagos libre de aftosa sin vacunación”. Ante lo cual se vuelve primordial reportar acertadamente cualquier caso clínico sospechoso, que permita tomar decisiones para la prevención y control de un posible brote de fiebre aftosa.

Las ventajas de la implementación de la técnica incluyen no solamente una técnica de acompañamiento diagnóstico sino también una herramienta que influye en el ahorro económico

a la institución tomando en cuenta que ya existe un laboratorio de cultivo celular, un banco de células, materiales, equipamiento y personal.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Optimizar un método analítico de aislamiento viral en cultivo celular como prueba confirmatoria del virus de estomatitis vesicular en el ganado bovino.

Objetivos Específicos

- Hacer la curva de crecimiento de la línea celular BHK-21, para el aislamiento del virus.
- Describir los efectos citopáticos, causados por el virus de la estomatitis vesicular en las líneas celulares BHK-21 mediante la visualización de cambios morfológicos en la célula.
- Confirmar el aislamiento del virus de estomatitis vesicular en la línea celular BHK-21 mediante la técnica de RT-PCR.

Hipótesis

La técnica de aislamiento viral es más sensible que el ELISA sándwich-indirecto, utilizada para el diagnóstico del virus de estomatitis vesicular en la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonitario-Agrocalidad

Marco teórico

Generalidades

La estomatitis vesicular (EV) es una enfermedad del ganado causada por algunos miembros del género *Vesiculovirus*, pertenecientes a la familia *Rhabdoviridae*. Los serotipos más comunes son New Jersey (VEV-NJ) e Indiana (VEVI-1). Los principales síntomas del virus de la estomatitis vesicular (VSV) son ampollas, llagas y desprendimiento de piel en el hocico, la lengua, las orejas, y por encima de los cascos (figura 1). La cojera y la pérdida de peso también pueden ocurrir. (Letchworth et al., 1999).

Histológicamente la infección por VSV resulta en la lisis de células epiteliales, edema intersticial severo, que aparece con la infiltración de células inflamatorias, y todo en conjunto resulta en la aparición de vesículas. (Scherer et al., 2007)

Figura 1.

Signos clínicos de estomatitis vesicular en ganado bovino



Nota: Se muestran vesículas causadas por el virus de estomatitis vesicular en ganado bovino, A en encías, B en la lengua. tomado de (Wood, 2015)

El virus de estomatitis vesicular infecta principalmente a caballos, burros, cerdos y vacas, sin embargo se ha observado evidencia serológica de infecciones en camélidos sudamericanos y

otras especies silvestres como venados, zarigüeyas, zorros y osos. Además roedores y pollos han sido infectados experimentalmente. (Spickler, 2010)

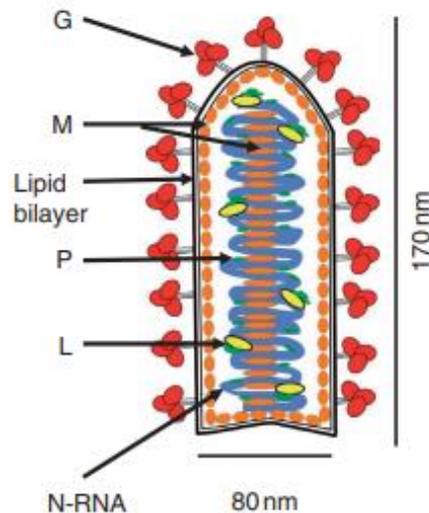
Estructura

EL VEV presenta forma de bala y tiene aproximadamente 180 nm. de longitud y 70 nm. de diámetro. La proteína matriz M, sirve de soporte para la envoltura lipídica externa, que se deriva de la célula hospedera, y se encuentra cubierta con picos que sirven de anclaje para la glicoproteína G. La proteína G transmembrana, media en el reconocimiento celular y la fusión, permitiendo el ingreso del virus a la célula. (Whelan, 2008). En el interior de la partícula encontramos el complejo de la proteína N que está formada por la asociación de ribonucleoproteínas (RNP) con la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRP). La función del complejo de la proteína N es proteger el ARN genómico viral y formar el núcleo helicoidal en el virión (Green et al., 2006). La asociación de las ribonucleoproteínas con la proteína M, condensa el ARN genómico viral en una estructura sólida que se encapsula en el virus maduro (Green et al., 2006).

es la proteína más conservada entre los serotipos. Las proteínas P y L se combinan para catalizar la RdRp a partir de ARN genómico, y promueven la traducción de los ARNm en el orden secuencial de N-P-M G-L, ya que la proteína L posee actividad ARNm metiltransferasa (Liang et al., 2015)

Figura 2

Estructura del virus de estomatitis vesicular



Nota: Se muestra una representación del virus de estomatitis vesicular con sus componentes estructurales las proteínas G,M,P,L,N. tomado de (Whelan, 2008)

Genoma

El VSV presenta un genoma lineal de ARN monocatenario con sentido negativo no segmentado, de aproximadamente 11 kb. El genoma comprende como se muestra en la figura 3: una secuencia líder (Le) de 47 nucleótidos en el terminal 3', 5 genes que codifican para 5 proteínas: proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G), y polimerasa L, y una secuencia tráiler de 59 nucleótidos en el terminal 5', que pertenece a la región no traducida (Whelan, 2008).

Durante la transcripción primaria, la RdRp reconoce las señales específicas para transcribir seis ARN discretos: un ARN líder de 47 nucleótidos, que no está protegido ni poliadenilado, y 5 ARNm metilados en el Extremo 5' y poliadenilados en el extremo 3'. Estos ARNm maduros son luego traducidos por los ribosomas del hospedador para producir proteínas

virales funcionales que son necesarias para la replicación del genoma viral. Durante la replicación, la RdRP se inicia en el extremo 3' del genoma y sintetiza un anti genoma complementario de longitud completa, que posteriormente sirve como molde para la síntesis de genomas de progenie de longitud completa. Finalmente, las proteínas virales y el ARN genómico se ensamblan en partículas virales completas y el virus sale de la célula por gemaciones a través de la membrana plasmática (Li & Zhang, 2012)

Figura 3

Estructura y Organización del genoma del virus de estomatitis vesicular



Nota: tomado de (Whelan, 2008)

Epidemiología

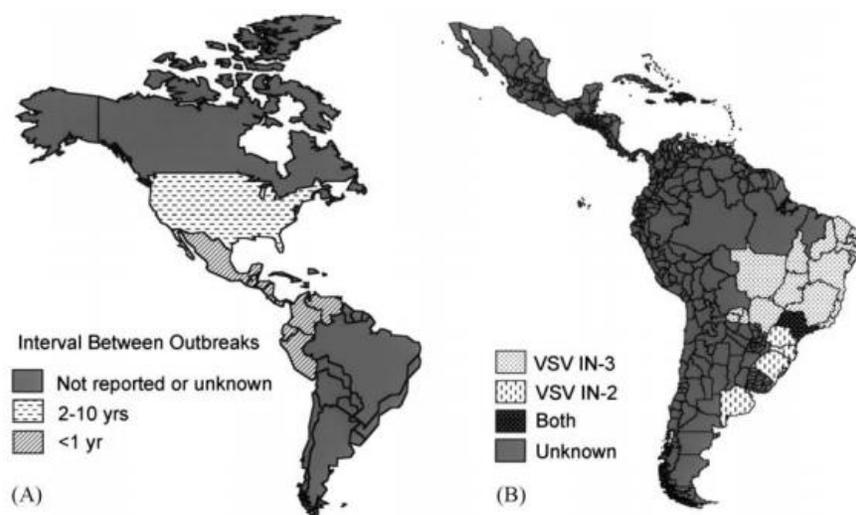
La EV es una enfermedad que se presenta únicamente en el continente americano. El VSV es endémico desde el sur de México hasta el norte de Sudamérica, área en donde ocurren brotes con signos clínicos estacionalmente todos los años. En esta región, el serotipo NJ totaliza el 80% de los casos clínicos reportados, mientras que IN-1 los restantes (Rodríguez, 2002)

En Brasil y Argentina se reportan casos esporádicamente, sin embargo los agentes causantes de la enfermedad han sido identificados como VSV-IN2 y VSV-IN3.

En el sur de Estados Unidos, los brotes son producidos por VSV-NJ y VSV-IN1, con intervalos de aproximadamente 10 años. A nivel del continente americano la mortalidad producida es despreciable, y la morbilidad puede llegar hasta el 96% (Reis Júnior et al., 2009)

Figura 4

Intervalos de tiempo brotes



Nota: tomado de (Rodríguez, 2002)

La transmisión se produce a través de contacto directo, aerosoles y fómites. Sin embargo debido a la gran cantidad de especies que bajo condiciones naturales pueden transportar virus, la posibilidad de que ocurra transmisión mecánica y biológica es alta.

La transmisión biológica, en la cual los vectores se infectan y replican el virus, está dada principalmente por insectos que se nutren de sangre, llamados hematófagos, moscas de la arena (*Lutzomyia sp.*) y moscas negras familia *Simuliidae* (Reis Júnior et al., 2009)

En la transmisión mecánica, los vectores no se infectan, ni tienen la capacidad de replicar el virus, por lo cual únicamente se limitan a transportar el virus físicamente en sus patas o piezas bucales, después de haber estado en contacto con fómites o con la piel de los animales que presentan signos clínicos. Durante los brotes estacionarios, el VSV ha sido aislado de las piezas

bucales en moscas comunes (*Muscidae Sp.*) y algunas especies de dípteros (Rozo-Lopez et al., 2018).

Asimismo debemos considerar a los saltamontes (*Caelifera sp.*) que tienen la capacidad de infectarse y replicar a VSV, después de consumir pastos contaminados. Esta ha sido propuesta como una de las posibles causas para la propagación del virus a larga distancia (Rozo-Lopez et al., 2018).

Los reservorios u hospederos diseminadores son desconocidos. (Schmitt, 2002).

Diagnóstico

De acuerdo con el Manual Terrestre de la OIE (2018), la estomatitis vesicular no se puede diferenciar completamente de otras enfermedades vesiculares, y frente a cualquier caso sospechoso, una valoración de laboratorio es urgente en las primeras etapas de la afección. La rápida y precisa confirmación de los virus es de vital importancia para el efectivo control y prevención de las enfermedades virales.

Identificación del Agente.

A) Identificación Directa.

Cultivo Celular: En condiciones in vitro controladas, el VSV puede ser inoculado en una línea celular adecuada para que ocurra replicación viral y podamos diferenciarlo de otras enfermedades vesiculares a través de observar daño citopático (Sandin, 2008).

Observación Directa: La microscopía electrónica nos permite diferenciar a la familia *Rhabdovirus* por sus características morfológicas específicas (OIE, 2018).

Pruebas *in-vivo*: El VSV puede ser inoculado en embriones de pollo de 8-10 días, y luego de su replicación, puede ser aislado del saco alantoideo (OIE, 2018).

Prueba de fijación del complemento: un conjunto de proteínas séricas que reaccionan con los complejos antígeno-anticuerpo, ocasiona la formación de poros trans-membrana y por lo tanto, la destrucción de la célula (Sandin, 2008).

Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas: Los antígenos del virus pueden detectarse por medio de métodos inmunológicos con anticuerpos fluorescentes o con métodos de inmunoanálisis. Los métodos de inmunoanálisis se caracterizan por utilizar enzimas como marcadores que permiten evaluar y cuantificar las uniones antígeno-anticuerpo (Cejudo & Fiñana, n.d.), Los métodos de inmunoanálisis son los más difundidos en los laboratorios de diagnóstico, por su bajo costo y relativamente buena sensibilidad y especificidad.

Detección de material genético. Se puede utilizar la reacción en cadena de la (PCR) para amplificar pequeños segmentos del ARN de VSV presentes en muestras de tejidos y líquidos vesiculares (Lambert & Leedom Larson, 2016)

B) Identificación Serológica.

Los anticuerpos específicos pueden ser identificados y cuantificados utilizando pruebas ELISA y fijación del complemento. Presenta la gran desventaja que los anticuerpos aparecen únicamente 8 días después de la infección, y no se ha demostrado todavía su tiempo de persistencia después de la infección (Sandin, 2008)

Cultivo Celular

Al conjunto de técnicas que permiten la manutención y reproducción de células, en un ambiente artificial con condiciones controladas, se conoce como cultivo celular.

Estos sistemas constituyen una importante herramienta de investigación porque permiten examinar las condiciones en las que se encuentran las células, y verificar los procesos normales celulares.

El paso más importante y crucial en cultivo celular es seleccionar el medio de crecimiento apropiado para el cultivo in vitro. Un medio de crecimiento o medio de cultivo es un líquido o gel diseñado para apoyar el crecimiento de microorganismos, células o pequeñas plantas. Un medio de cultivo típico se compone de un complemento de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero como fuente de factores de crecimiento, hormonas y unión (Tapia, 2015).

En el entorno en el cual crecen las células es necesario controlar ciertos factores llamados físico químicos, como temperatura, pH, cantidad de CO₂.

Entre las ventajas de esta técnica, tenemos que al amplificarse únicamente el virus, aumenta la sensibilidad sin disminuir la especificidad. Sin embargo es un proceso es lento y toma días o semanas y puede estar no disponible a tiempo para la atención del caso. (Sandin, 2008)

Cultivo primario

Un cultivo celular se obtiene de explantes de órganos o de embriones animales, estas células obtenidas bajo condiciones de esterilidad, se disgregan aplicando digestión mecánica, enzimática, o química que deshace las uniones intercelulares. La suspensión conseguida se vierte en la superficie plana de un recipiente de plástico, en donde las células se adhieren y dividen, formando una delgada capa celular conocida como monocapa celular. La monocapa crece en un medio de cultivo específico que contiene albumina, sales, vitaminas.

Cultivo Secundario

Las células en proliferación hacen que las sustancias necesarias se consuman en poco tiempo y el rápido aumento de los metabolitos y la disminución de sus áreas de proliferación. En esta situación, si las células obtenidas de un cultivo primario se transfieren a un nuevo medio de cultivo, en que pueden continúan proliferando, se conoce como cultivo secundario.

Factores físico-químicos a controlar en el cultivo celular

-Temperatura: se intenta simular una temperatura cercana a la corporal del organismo del cual las células fueron tomadas, para muchas células de mamíferos la temperatura adecuada es de 36-37 °C.

-pH: la mayoría de células de mamífero toleran un rango de pH. entre 7.2-7.4. Entre los factores que provocan variaciones en el pH del entorno de cultivo están los desechos del metabolismo celular, por lo cual se debe cambiar regularmente el medio de crecimiento.

-CO₂: El sistema tampón de bicarbonato que involucra el equilibrio entre CO₂ y bicarbonato (HCO₃⁻) permite controlar el pH a través de regular la concentración de CO₂ del entorno. La mayoría de entornos utilizan entre 4-10% de CO₂. En aire.

Otros factores a tener en cuenta: los fabricantes de los medios específicos de crecimiento, además tienen en cuenta para la composición final de su producto la presión osmótica, humedad, tensión superficial, viscosidad, parámetros sin los cuales las células no podrían crecer adecuadamente.

Línea Celular BHK- 21

La línea celular de fibroblastos BHK-21 (BHK cepa 21) se derivó de los riñones de crías de cinco hámster no sexuados de un día de edad en marzo de 1961, por IA Macpherson y MGP Stoker. Los hámsteres utilizados para generar células BHK 21 eran de la especie *Mesocricetus auratus*, comúnmente conocido como hámster dorado sirio.

La línea más utilizada es un subclón (clon 13) de BHK21, generalmente llamado BHK 21 (C13), que ha estado involucrado en la fabricación comercial de vacunas contra la fiebre aftosa durante un período de veinte años. Las células BHK-21 son susceptibles a múltiples virus, incluido el adenovirus D humano, el reovirus 3, el virus de la estomatitis vesicular. Hasta la fecha, las células BHK-21 se han utilizado con éxito para el aislamiento, el cultivo y el ensayo de criopreservación

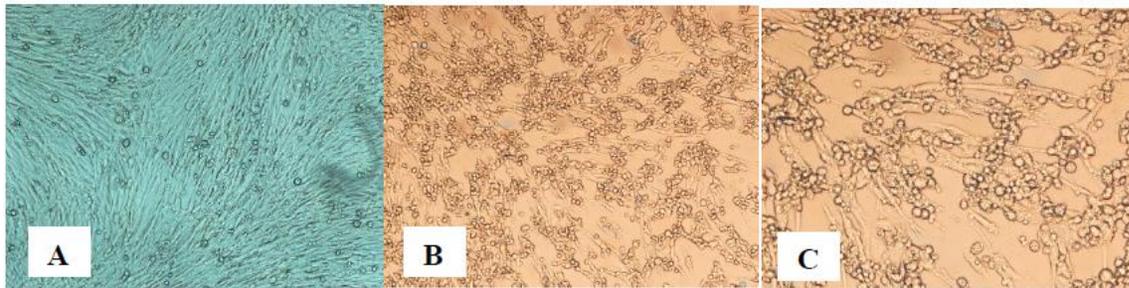
indirecta del virus de Schmallenberg (SBV) que infecta predominantemente al ganado, como el ganado vacuno, ovino y caprino.

Efecto Citopático

Ante una infección vírica, una de las formas de respuesta que tienen las células es el efecto citopático (ECP), que consiste en alteraciones morfológicas, moleculares y bioquímicas asociadas a la replicación del virus en la célula huésped. En el caso específico de VSV inoculado en una capa preformada de la línea celular BHK-21, se observa que las células adquieren forma individual redonda, y a nivel grupal se asemejan a un racimo de uvas. A medida que progresa el EC, la lisis celular aparece provocando que la viabilidad celular disminuya (Whelan, 2008).

Figura 5

Efecto Citopático causado por VEV en células BHK-21



Nota: el gráfico muestra el efecto citopático producido por el virus de estomatitis vesicular en la línea celular BHK-21 en (A) 24 horas, (B) 48 horas, (72) horas después de la inoculación del virus. tomado de (PANAFTOSA, 2020)

Conteo Celular

Este procedimiento se realiza a fin de determinar la población celular por cultivo, y con el objetivo de poder utilizar un número determinado de células en ensayos sucesivos a realizar, que puede ser criopreservación o nuevo subpase. De esta manera el conteo se realiza con ayuda de la cámara de Neubauer y el colorante azul de Tripán que permite determinar células muertas al teñirlas de color azul. Así, las células fueron visualizadas con ayuda de un microscopio invertido (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

Criopreservación.

A medida que se realizan subpases, se observan más cambios genéticos y fenotípicos en sucesivas generaciones de células. Por razones económicas y de investigación estas células podrían ser requeridas nuevamente en el futuro, motivos por los cuales surge la necesidad de congelar y almacenar las células por un tiempo definido.

El punto más importante del proceso de congelación es evitar la cristalización, proceso en que el agua intracelular en expansión, rompe la membrana causando que la célula explote. Con la utilización de un crioprotector hidrófilo como el dimetilsulfóxido (DMSO), reducimos el estrés osmótico, evitando que se acumulen electrolitos al interior de la célula, minimizando la entrada de agua a la célula en el momento mismo de la congelación (Fernández Núñez et al., 2016)

A continuación las células deben ser llevadas primero a -80°C por una hora, y finalmente a -196°C de nitrógeno líquido para evitar la desnaturalización de proteínas e inactivarlas metabólicamente. (Uysal et al., 2018)

Curva de crecimiento.

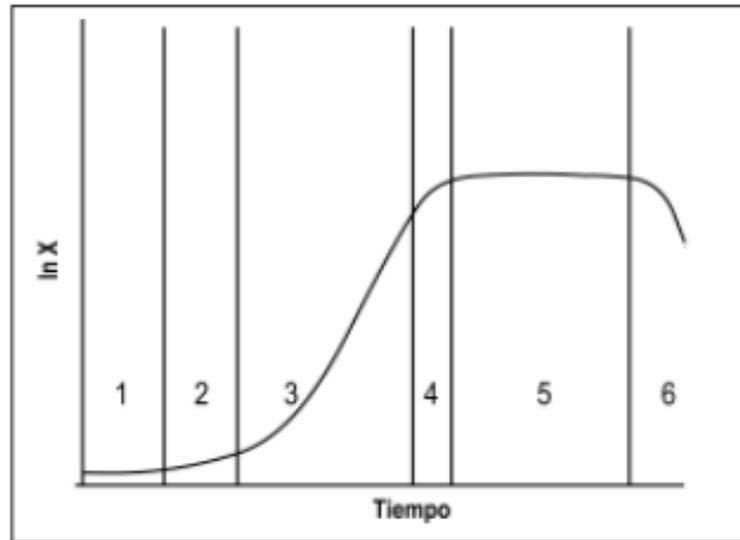
En cultivo celular a medida que las células crecen, estas se dividen en monocapa o en suspensión y siguen un patrón de crecimiento característico compuesto por seis fases: lag,

aceleramiento, exponencial, desaceleración, estacionaria, fase de muerte (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007)

1. **Fase lag** o de adaptación, las células intentan ajustarse metabólicamente a las condiciones de pH, luz, temperatura, humedad y nutrientes a que están expuestas en el nuevo inóculo.
2. **Fase de aceleramiento** los componentes estructurales celulares se incrementan como proteínas, preparando a las células para entrar en fase de división celular.
3. **Fase exponencial** se alcanza la mayor tasa de división celular, únicamente limitado por la disponibilidad de nutrientes
4. **Fase desaceleración** la tasa de división celular disminuye a causa de nutrientes limitantes, y la acumulación de desechos celulares. La concentración celular alcanza su máximo valor.
5. **Fase estacionaria** la natalidad celular es igual a la mortalidad, no hay disminución de biomasa, pero las condiciones del cultivo se vuelven cada vez menos aptas para las células.
6. **Fase de muerte** la ausencia de nutrientes lleva a la muerte celular, la concentración celular disminuye y si no se reemplaza el medio de crecimiento, la viabilidad celular cae significativamente.

Figura 6

Patrón de crecimiento de células en cultivo celular



Nota: Se muestra las fases de la curva de crecimiento celular. Tomado de (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007)

Titulación Viral

Al proceso de evaluar la capacidad infectante de un virus presente en una serie de diluciones, capaz de ocasionar lisis celular o ECP al 50% de una población celular se conoce como titulación viral. El parámetro empleado en la titulación viral es la dosis infectiva tejido celular 50% (DITC50%).

Existen varios métodos para encontrar la DITC50%, en este estudio se utilizó la técnica de titulación por punto final de dilución, que consiste en producir diluciones seriadas en base 10 de la suspensión viral, las cuales son inoculadas en un número de 3 réplicas por dilución en una capa preformada de células adecuadas, con la finalidad de observar efecto citopático. Los datos son recopilados, y posterior a su tabulación, determinamos en que dilución se produjo el 50% de

Validación de una prueba diagnóstica

La validación es un proceso que determina la idoneidad de una prueba que se ha desarrollado, estandarizado y optimizado para un fin determinado. Sigue las siguientes etapas.

Determinación de características analíticas.

Se realiza un estudio que tiene por objeto documentar que los resultados de la prueba diagnóstica son distintos en sujetos sin y con el proceso a diagnosticar, el diseño que se caso-control con muestra de conveniencia. En esta etapa también debe determinarse la sensibilidad analítica de la prueba, que hace referencia a la cantidad mínima de analito que la prueba necesita para funcionar.

Determinación de características diagnósticas.

Se establece el rendimiento de la prueba, a través de la sensibilidad diagnóstica, y la especificidad diagnóstica. Lo ideal es que las muestras con las que se trabajen deriven del análisis de un conjunto de muestras procedentes de referencia, cuyos antecedentes y estado en cuanto a la enfermedad/infección en cuestión se conozcan y sean relevantes para el país o región.

Reproducibilidad.

Este estudio se lleva a cabo con muestras todavía sin diagnosticar en los que se plantea el diagnóstico en cuestión, permite, evaluar adecuadamente la capacidad predictiva diagnóstica de la prueba. En esta etapa se evaluará la repetibilidad intralaboratorio, así como la reproducibilidad de la prueba. La reproducibilidad es una importante medida de la precisión de una prueba cuando se utiliza en varios laboratorios situados en regiones o países distintos utilizando exactamente la misma prueba (protocolo, reactivos y controles). Cada uno de al menos tres laboratorios analiza el mismo conjunto de un mínimo de 20 muestras, con idénticas alícuotas para cada laboratorio.

Metodología

Localización del ensayo

La fase de laboratorio se desarrolló en los Laboratorios de Virología y Cultivo Celular de la dirección de Diagnóstico Animal de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitaria (Agrocalidad), ubicado en la Granja Experimental Tumbaco del Ministerio de Agricultura con dirección: avenida Interoceánica km. 14 ½, sector La Granja, cantón Quito, provincia de Pichincha.

Toma y recolección de muestras.

Los epitelios de vaca infectados con VEV fueron proporcionados por el laboratorio de Virología de la Dirección de Diagnóstico Animal de Agrocalidad,

Línea Celular BHK-21

La línea celular BHK-21 fue proporcionada por el laboratorio de Cultivo Celular de la dirección de Diagnostico Animal de Agrocalidad. Las células fueron subcultivadas, a fin que estas se dividan y conseguir una población mayor. Posterior a cada ensayo, las células fueron congeladas con el objetivo de mantener la reserva de la línea celular.

Mantenimiento de la Línea celular BHK-21

Las células BHK-21 se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco-DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino activado y 10% de caldo triptosa fosfato, y enriquecido con gentamicina 50µg/ml, penicilina 10 U/ml, y anfotericina 50µg/ml

Descongelamiento de la línea celular BHK-21

Previo al descongelamiento celular se tuvo listo un tubo Falcon con 10 mL de medio de crecimiento suplementado a temperatura ambiente, y un frasco de cultivo (flask de 75 cm²), con 10 mL de medio de crecimiento suplementado a una temperatura de 37°C.

El descongelamiento inició al tomar un criotubo del tanque de nitrógeno líquido, que contenía la suspensión celular y se lo llevó a 37°C en baño María, teniendo precaución de que la suspensión no se descongele por completo. A continuación, se transfirió la suspensión al tubo 10 mL de medio de crecimiento suplementado, se homogenizó la solución usando una micropipeta y la suspensión fue llevada a centrifugación a 1000 rpm, durante 10 minutos a una temperatura de 20°C.

Posteriormente, se retiró el sobrenadante sin alterar el pellet (masa celular) ubicada en el fondo del tubo Falcon y se resuspendió las células en 1 mL de medio de crecimiento suplementado precalentado a 37°C. A continuación se sembró la suspensión celular en frascos de cultivo (flask de 75 cm²), a los cuales previamente se había añadido 10 ml de medio de cultivo suplementado. Los frascos de cultivo fueron colocados en una cámara de incubación humidificada bajo condiciones controladas de 5% CO₂ y a una temperatura de 37°C.

Subcultivo

El seguimiento a las células BHK-21 en cultivo se realizó con un microscopio invertido, utilizando un objetivo de 40X. De esta forma cuando se observó que las células ocuparon un 85-90% de la superficie disponible del plato de cultivo, fueron transferidas a nuevos platos de cultivo con medio de crecimiento suplementado fresco.

Para realizar el subcultivo, se tomó el flask y con la ayuda de una pipeta serológica, se eliminó el medio de cultivo contenido en el recipiente. A continuación se realizaron tres lavados utilizando 2 mL de PBS, precalentado a 37 °C en baño María. Posteriormente se procedió a despegar las células de la superficie de cultivo al colocar 2 mL de tripsina al 0.05% e incubando a 37 °C durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se observaron las células bajo el microscopio a fin de comprobar que las células se hayan despegado por completo. Para asegurar que todas

las células se despeguen por completo del plato, se dio un ligero golpe del plato contra la superficie de la cámara de flujo laminar.

Para detener la reacción de la tripsina se añadió 1.5 mL de medio de crecimiento suplementado, y la suspensión fue llevada a centrifugación por 10 minutos a 1000 revoluciones por minuto. Por último, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de crecimiento suplementado para su posterior conteo.

Conteo Celular

Para el conteo celular se mezcló 10 µL de azul de Tripán con 10 µL de la suspensión celular, y se cargó la cámara de Neubauer con un total de 10 µL de la solución preparada. A continuación se determinó la población celular, contando el número de células vivas contenidas dentro de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer anexo 1. Para la determinación del número de células se empleó la siguiente fórmula:

$$NC = \frac{\text{Numero de células contadas} \times \text{factor de la cámara}}{\text{número de cuadrantes}} \times \text{dilución}$$

Donde,

- NC = Número final de células en la muestra por mL de suspensión.
- Factor de la Cámara = 10000
- Número de Cuadrantes = 4
- Dilución = 2, corresponde al factor de dilución entre la muestra y el colorante

Determinación del número de células para el ensayo de daño citopático

Con las células BHK-21 obtenidas en subcultivo, se realizó una curva de crecimiento, se sembró 5 diferentes densidades celulares, con 8 repeticiones para cada densidad de células en placas de 96 pocillos (1000, 3000, 5000, 7000 y 9000 células / ml), y se midió la absorbancia a

450 nm a 24, 48, 72 y 96, 120, 144, 168, 192 horas usando el lector de microplacas Multiskan FC (Fisher Scientific).

Procesamiento epitelios

Los epitelios de vaca infectados con VEV fueron procesados de acuerdo con el protocolo de la OIE, primero se los retiró de refrigeración de -20°C y se los dejó a temperatura ambiente por media hora. Posteriormente en un pocillo se colocó aproximadamente un gramo de tejido, con 3 gramos de arena y 3 ml. de medio MEM. Con un pistilo se procedió a macerar, hasta obtener un líquido homogéneo. A continuación este líquido homogéneo se recuperó en un tubo de falcón de 15 ml. y se congeló en nitrógeno líquido, inmediatamente se procedió a descongelar, sumergiendo el tubo en agua a temperatura ambiente. Para lograr la separación de los elementos se centrifugó por 20 minutos a 2500 revoluciones. Finalmente se filtró con una membrana de $0.22\ \mu\text{m}$. para eliminar impurezas, obteniéndose el inóculo, y se almacenó en criotubos con capacidad de 2ml. a -20°C .

Inoculación del virus

A los criotubos que contienen el inóculo, almacenados a -20°C . se los colocó en baño maría a 37°C . En las placas de 96 pocillos, con una capa de células BHK-21 previamente formada, se extrajo el medio de crecimiento de cada pocillo. Inmediatamente se añadió 100 ml. de medio DMEM. Y 30 μl . de inóculo, se incubó en estufa a 37°C y 5% de CO_2 por una hora para que ocurra la adsorción viral. Mientras duraba la incubación, cada 15 minutos se agitó la placa ligeramente para asegurar que toda la capa preformada de células BHK-21 esté bañada por el inóculo. Una vez efectuada la adsorción viral, se retiró el inóculo con una pipeta y se añadió a cada pocillo 20 μl . de PBS, para realizar un lavado y eliminar posibles residuos de inóculo. Se retiró el PBS, y se colocó 200 μl . de medio de manutención. Las placas de 96 pocillos se

incubaron en estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 72 horas, realizando observaciones diarias al microscopio invertido, para determinar efecto citopático.

Reproducibilidad

A partir de veinticuatro muestras de epitelios clasificada como positiva para VEV, y de 6 muestras de epitelios clasificadas como negativas para VEV, y tratadas de acuerdo con el protocolo de procesamiento de epitelios de la OIE, se obtuvo 5ml de inóculo viral por cada muestra tratada. Cada una de las muestras fue tratada por separado 3 veces, obteniéndose de cada muestra 3 inóculos virales que fueron sembrados en una capa preformada de células BHK-21.

Recuperación del virus

En las muestras provenientes del ensayo de repetibilidad que presentaron efecto citopático en más del 80% de células, se les sometió a un procedimiento de recolección para su posterior almacenamiento. Primero se agregó 50 µl de tripsina por pocillo y se esperó por 5 minutos, a continuación se agregó 100 µl de medio de manutención para detener la reacción. Y esto se almacenó en crioviales de 2 ml a -20 °C.

Titulación Viral

A partir de una única muestra de epitelio clasificada como positiva para VEV y tratada de acuerdo con el protocolo de procesamiento de epitelios de la OIE, se obtuvo 5ml de inóculo viral. Previamente se tuvo preparado 7 tubos de ensayo con 1000 µl de medio DMEM suplementado en cada tubo. Se realizaron diluciones seriadas a partir de una concentración de inóculo viral de 100 µl, que fue colocado en el primer tubo, y después de homogenizar se extrajo con la pipeta 100 µl de contenido de este tubo, que fueron transferidos al siguiente tubo, y así sucesivamente. Se sembró en una placa de 96 pocillos como se muestra en el anexo 2.

Posteriormente para encontrar el valor de DICT50, se siguió el método de Reed y Muench de titulación viral por punto final de dilución.

Sensibilidad analítica

Siguiendo el método de Reed y Muench, fue determinada como la menor dilución, para la cual hubo un resultado positivo de ECP.

Especificidad analítica

En un placa p96 con una capa preformada de células BHK-21, se inoculó muestras procesadas de virus de la rabia, proporcionadas por el laboratorio de Virología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario-Agrocalidad. Se muestra en el anexo 2 la distribución de la placa de 96 pocillos.

Repetibilidad

A partir de veinticuatro muestras de epitelios clasificada como positiva para VEV, y de 6 muestras de epitelios clasificadas como negativas para VEV, y tratadas de acuerdo con el protocolo de procesamiento de epitelios de la OIE, se obtuvo 5ml de inóculo viral por cada muestra tratada. Cada una de las muestras fue tratada por separado 3 veces, obteniéndose de cada muestra 3 inóculos virales que fueron sembrados en una capa preformada de células BHK-21.

Análisis Estadístico

Los datos de absorbancia obtenidos de la curva de crecimiento celular, se analizaron en el software estadístico GraphPad Prism, para representarlos en una gráfica tiempo vs absorbancia, mostrando barras de error de la varianza.

Los datos de absorbancias obtenidos de la curva de crecimiento celular, se analizaron en el software estadístico InfoStat, para evaluar si las distribuciones de las absorbancias de los

diferente densidades celulares (1000, 3000, 5000, 7000 y 9000 células / ml), se ajustan o no a una distribución normal, mediante la prueba de Shapiro-Wilks

A continuación los datos de las absorbancias obtenidos de la curva de crecimiento celular, se analizaron en el software estadístico GraphPad Prism, para evaluar si las medias de las absorbancias de los diferentes grupos celulares (1000, 3000, 5000, 7000 y 9000 células / ml), varían significativamente entre ellas, mediante una prueba ANOVA de doble vía.

Finalmente, los datos de las absorbancias obtenidas en la curva de crecimiento celular, se analizaron en el estadístico GraphPad Prism, para evaluar qué tratamientos de las diferentes densidades celulares (1000, 3000, 5000, 7000 y 9000 células / ml), son iguales o y cuáles no, mediante una comparación múltiple de Tukey.

Análisis Molecular

3 muestras con ECP superior al 80% se enviaron al laboratorio de Biología Molecular de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario-Agrocalidad, donde técnicos del área mencionada realizaron una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa RT-PCR, para corroborar la presencia del VEV.

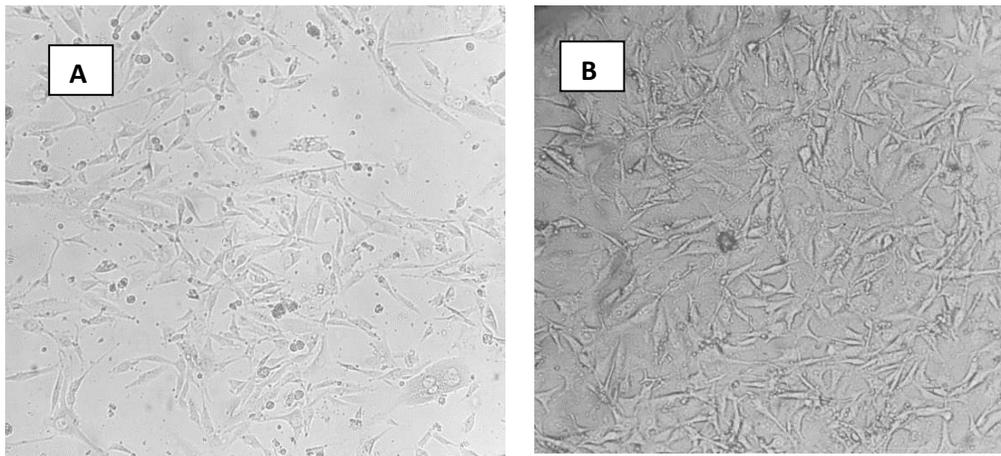
Resultados

Crecimiento Línea Celular BHK-21

La línea celular Baby Hamster kidney (BHK-21) fue cultivada bajo condiciones óptimas de laboratorio asegurando así cultivos libres de agentes contaminantes. En la figura 7 se muestra un cultivo de la línea celular observada con el objetivo (10X), del microscopio óptico invertido, se observa que las células presentan morfología epitelial después de 48 horas en cultivo, y después de 72 horas en cultivo, observamos un aumento en su densidad.

Figura 7

Línea celular BHK-21 observada al microscopio invertido



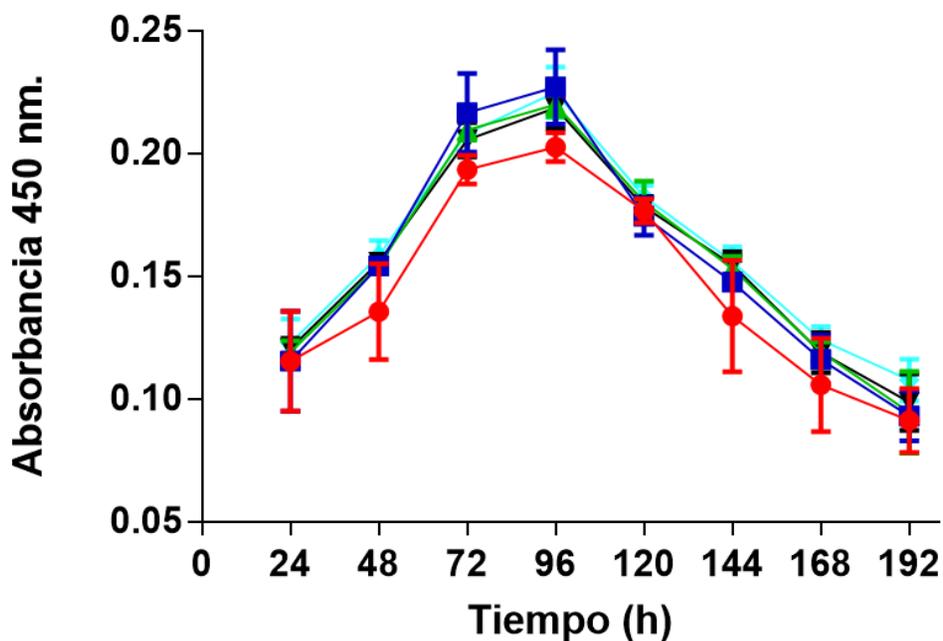
Nota: Observación realizada con el objetivo 10x. (A) después de 48 horas en cultivo. (B) después de 72 horas en cultivo.

Curva de crecimiento

Con los datos de las lecturas de absorbancia, obtenidas del espectrofotómetro a 450 nm., en 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas a partir de la siembra de diferentes densidades celulares en placas de cultivo P96, se elaboró las curvas tiempo vs absorbancia. En la figura 8 se muestra el gráfico de las curvas resultantes, acompañadas de barras que simbolizan las varianzas de las absorbancias medidas, para cada diferente densidad celular, correspondiente a los intervalos de tiempo de 24 horas.

Figura 8

Gráfico tiempo vs absorbancia



Nota. En rojo 1000 células/ml, en azul 3000 células/ml, en verde 5000 células/ml, en negro 7000 células/ml, en celeste 9000 células/ml. Se muestra también la varianza de la absorbancia medida para cada intervalo de tiempo de 24 horas. Tomado de GrahPad-Prism.

Con los datos de media y varianza muestral obtenidos en la figura 8, se aplicó la prueba estadística Shapiro-Wilks, con la cual se probó que la curva de las células se ajusta a una distribución normal. Como se observa en la tabla 1, el valor de probabilidad obtenido (p) es muy inferior a nuestro nivel de significancia elegido (0,05), por lo que aceptamos la hipótesis nula (las curvas celulares se ajustan a una distribución normal)

Tabla 1

Prueba de Shapiro-Wilks

células/ml	variable	n	Media	D.E.	W*	p(unilateral D)
1000	absorbancia	56	0,11	0,05	0,9	<0,0001
3000	absorbancia	56	0,13	0,05	0,88	<0,0001
5000	absorbancia	56	0,13	0,05	0,86	<0,0001
7000	absorbancia	56	0,13	0,05	0,89	<0,0001
9000	absorbancia	56	0,14	0,05	0,88	<0,0001

Nota: tomado de Infostat

Con los datos de distribución normal obtenidos en la figura 9, se procedió a elegir una prueba paramétrica. Se aplicó la prueba ANOVA de doble vía, con la cual demostramos que al menos uno de los tratamientos planteados, varía significativamente con respecto a los demás. En la tabla 2, podemos observar que los valores de probabilidad (p) obtenidos, son mucho menores a nuestro nivel de significancia elegido (0.05), por lo cual aceptamos la hipótesis H_0 nula (al menos uno de los tratamientos varía significativamente con respecto a los demás)

Tabla 2*Prueba ANOVA de doble vía*

Alpha 0,05				
Fuente de Variación	% de variación total	Valor de P	Valor de P Resumido	¿Significante?
Interacción	0,7816	0,0333	*	SI
Tiempo	92,22	<0,0001	****	SI
Número de células	1,63	<0,0001	****	SI
Coincidencia Factores	1,084	0,0069	**	SI

A continuación se aplicó la comparación múltiple de Tukey, con la cual se encontró que únicamente el tratamiento de 1000 células/ml, varía significativamente con respecto a los demás tratamientos, como se puede ver en la tabla 3. Basado en esto, se tomó la decisión de sembrar 3000 células/ml, debido a que es la densidad celular más pequeña que no varía significativamente con respecto a los demás grupos.

Tabla 3*Prueba de Tukey*

Alpha 0.05					
Prueba de comparación múltiple de Tukey	Varianza	Intervalo Confianza 95%	¿Significante?	Resumen	Valor P ajustado
1000 vs. 3000	-0,01127	-0,0181 to -0,004433	Si	***	0,0003
1000 vs. 5000	-0,01196	-0,0188 to -0,005131	Si	***	0,0001

Prueba de comparación múltiple de Tukey	Varianza	Intervalo Confianza 95%	¿Significante?	Resumen	Valor P ajustado
1000 vs. 7000	-0,01209	-0,01892 to -0,005256	Si	***	0,0001
1000 vs. 9000	-0,01627	-0,0231 to -0,009433	Si	****	<0,0001
3000 vs. 5000	-0,000698	-0,007531 to 0,006134	No	ns	0,9983
3000 vs. 7000	-0,0008234	-0,007656 to 0,006009	No	ns	0,9968
3000 vs. 9000	-0,005	-0,01183 to 0,001833	No	ns	0,2412
5000 vs. 7000	-0,000125	-0,006958 to 0,006708	No	ns	>0,9999
5000 vs. 9000	-0,004302	-0,01113 to 0,002531	No	ns	0,3842
7000 vs. 9000	-0,004177	-0,01101 to 0,002656	No	ns	0,4137

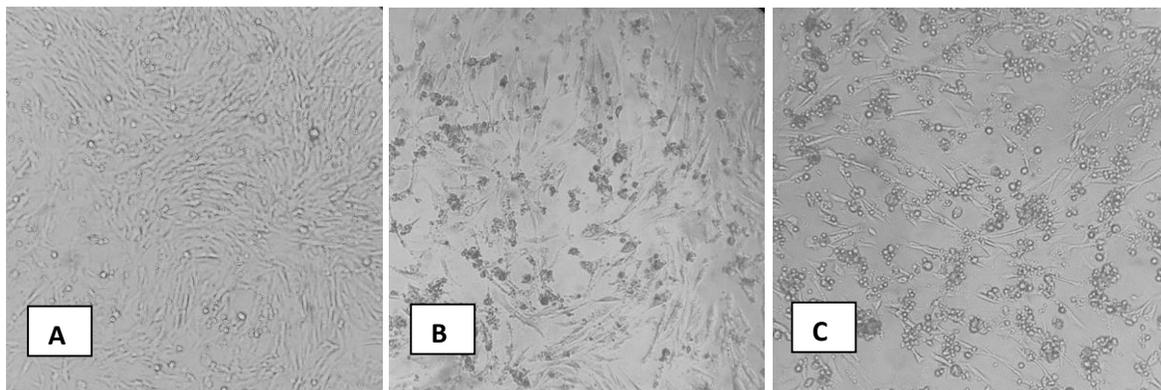
Efecto citopático

Al cabo de 24 horas de haberse realizado la inoculación de VEV en la capa preformada de células BHK-21, se realizó la primera observación utilizando el objetivo de 40x del microscopio óptico invertido, donde se constató, que las células no presentaban cambios morfológicos, y no se encontraban agrupadas, su densidad era igual. La siguiente observación fue realizada al cabo de 48 horas después de la inoculación y en esta ocasión se observó que aproximadamente la mitad de las células habían sufrido cambios morfológico, presentaban forma redonda, y su densidad había disminuido ligeramente, lo cual indicaba que ocurrió lisis celular. Finalmente al cabo de 72 horas de realizada la inoculación, se realizó una tercera observación donde se constató que la mayoría de las células presentaban forma redonda y se habían agrupado forma

de “racimo de uva”. De igual manera su densidad había disminuido, y prácticamente no quedaban células con morfología epitelial.

Figura 9

Efecto Citopático causado por VEV en Células BHK-21



Nota. Observación realizada con objetivo 40x del microscopio óptico invertido transcurridas (A) 24 horas, (B) 48 horas, (C) 72 horas después de la inoculación de VEV en la capa preformada de BHK-21

Como se muestra en la tabla 3, con el factor de dilución 10^{-3} , calculamos la Dosis Infecciosa para el 50% de los Cultivos Celulares DICT50, que cuantifica la cantidad de VEV que produce ECP en el 50% en la línea BHK-21, se encontró que DICT50/ml = $10^{4.17}$ o lo que es lo mismo, una DICT50/ml estará presente en una dilución 1:14791

Sensibilidad Analítica

El límite de detección (LOD) fue determinado por evaluación visual de la tabla 4, como la mayor dilución después de la cual una identificación de respuesta positiva no fue confiable. Fue fijada en 10^{-5} .

Tabla 4*Cálculo de la media infectiva en cultivo celular*

Dilución	Pocillos inoculados	Número de pocillos con EP	Número de pocillos sin EP	Infectado (A)	Acumulado		Porcentaje Infectados $\frac{A}{A+B} \times 100$
					No infectado (B)	Total	
10^{-1}	7	7	0	20	0	20	100%
10^{-2}	7	5	2	13	2	15	86.6%
10^{-3}	7	4	3	8	5	13	61.5%
10^{-4}	7	3	4	4	9	13	30.7%
10^{-5}	7	1	6	1	15	16	6.25%
10^{-6}	7	0	7	0	22	22	0%

Repetibilidad

Con los datos de ECP presentados en las tablas 5 y 6, se obtuvo una concordancia del 93.33%, ya que de 30 tratamientos, en 28 de ellos se obtuvieron los mismos resultados en las 3 réplicas realizadas.

Tabla 5*Repetibilidad*

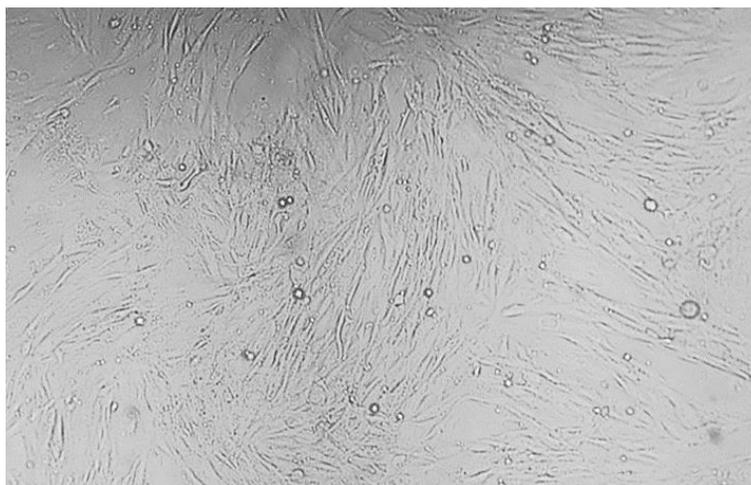
	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15
experimento 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
experimento 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
experimento 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

Tabla 6*Repetibilidad*

	M 16	M 17	M 18	M 19	M 20	M 21	M 22	M 23	M 24	M 25	M 26	M 27	M 28	M 29	M 30
experimento 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
experimento 2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
experimento 3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Especificidad Analítica

Como se muestra en la figura 10, el virus de la rabia no produjo daño citopático en las células BHK-21, después de 72 horas de haber inoculado el virus de la rabia en la capa preformada de células BHK, no se observó células con forma redonda, agrupamiento de células o lisis celular.

Figura 10*Células BHK-21 infectadas con virus de rabia*

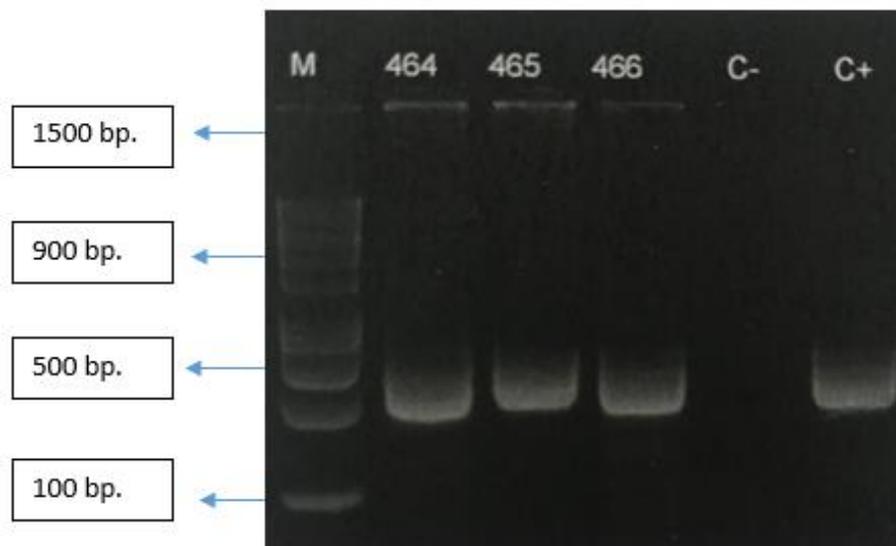
Nota. Observación realizada 72 horas después de inoculado el virus de rabia. No se observa ECP

Análisis molecular

Los resultados entregados por el laboratorio de Biología Molecular de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario-Agrocalidad, confirmaron que las muestras 15, 20, y 25 tenían presente el virus de la estomatitis vesicular. En el gel de agarosa mostrado en la figura 11, se puede apreciar que existe la presencia de bandas en el peso indicado de 400 pares de bases. Se tomó además en cuenta la intensidad de la banda, y el barrido.

Figura 11

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%



Nota. Gel de agarosa observado en transiluminador, se aprecia la presencia de bandas en el peso indicado de 400 pares de bases.

Discusión

Crecimiento Línea Celular BHK-21

La línea celular BHK-21 fue cultivada siguiendo protocolos estandarizados y establecidos en el laboratorio, utilizando equipos de laboratorio calibrados y en buen estado, teniendo en cuenta todos los criterios para el crecimiento normal de las células, con operadores capacitados para el correcto manejo de los equipos y cultivo de la línea celular.

De esta manera, se obtuvieron cultivos de la línea celular BHK-21 presentando morfología epitelial, al ser observadas bajo el microscopio (figura 7). Según el Manual de cultivo celular de la empresa (ATCC, 2020), las células BHK-21 son células epiteliales que presentan forma estriada y alargada. Esto confirma la morfología de los cultivos de la línea celular BHK-21 mantenidos en el laboratorio para la presente investigación.

En muchos protocolos de cultivo celular de células BHK-21, únicamente se suplementa al medio DMEM con suero fetal bovino al 10%. Sin embargo en este estudio el DMEM fue suplementado con 10% de suero fetal bovino y 10% de caldo triptosa fosfato, como lo indica la casa comercial (Cell Culture High TEch, 2014), en su catálogo de productos, recomienda suplementar el medio DMEM tanto con suero fetal bovino al 10%, como con caldo triptosa fosfato 5-10%. El caldo triptosa fosfato tiene la capacidad de fomentar el crecimiento de la línea celular BHK-21, además contribuye a un mejor anclaje celular y potencia acción amortiguadora del medio.

Curva de crecimiento

En la presente investigación, con la finalidad de evaluar el crecimiento, determinar el número de células para realizar los ensayos y establecer el momento adecuado para inocular el VEV en la capa preformada de células BHK-21, se procedió a realizar curvas de crecimiento

partiendo de diferentes densidades celulares. De esta manera la generación de la curva de crecimiento permitió conocer parámetros iniciales sobre la línea celular BHK-21 para poder continuar con los ensayos de efecto citopático.

Se realizó una curva de crecimiento con diferentes concentraciones de células. Para la inoculación del ensayo se eligió la concentración de 3000 células/ml, debido a que con observaciones en el laboratorio, se determinó que con esta concentración, a las 72 horas de haber realizado la siembra, se forma una monocapa de células BHK-21 con una confluencia aproximada del 85%, generando las condiciones ideales para inocular el VEV. Tal como sucedió en el estudio realizado por (Fernández Núñez et al., 2016), se reporta que la concentración máxima de células BHK-21 fue encontrada después de 72 horas de la inoculación. En este estudio se utilizó una concentración de 2500 células/ml, y el método utilizado para llevar a cabo el conteo celular fue con cámara de Neubauer.

En el presente estudio se utilizó la densidad óptica para medir el crecimiento celular, obteniendo curvas de crecimiento que se ajustan a los modelos teóricos, sin embargo de acuerdo con (Acebo-González & Hernández-García, 2016) la desventaja de usar la densidad óptica para la estimación rápida del crecimiento celular, radica en que tanto las células viables como las no viables absorben a una longitud de onda específica y como resultado, el valor de la densidad óptica no puede tomarse como una medida directa de la viabilidad celular. Esto puede originar que los datos de crecimiento celular obtenidos de la densidad óptica sean fiables únicamente hasta que la curva alcance la fase de desaceleración, (S Rahman et al., 2007) utilizó como método de cuantificación del crecimiento celular, tinción con Tripan Blue 0.4% y conteo en la cámara de Neubauer,

La longitud de onda elegida para realizar la lectura de las absorbancias de la curva de crecimiento fue de 450 nm. En un estudio previo realizado por (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007) se menciona que utilizar una longitud de onda por encima del espectro de 600 nm potencializa la

detección de células que contienen clorofila, mientras que utilizar una longitud de onda por debajo de 450 nm., potencializa la detección de productos de consumo celular como la glucosa.

Efecto Citopático

En el presente estudio se observó ECP en las células BHK-21 inoculadas con VEV, que se expresó como agrupamiento de las células, lisis celular, y cambios en su morfología figura 9. Se pensaba que todos cambios producidos en las células se debían a que las proteínas del virus alteraban la permeabilidad de la membrana celular. Sin embargo, en un estudio realizado por (Redondo et al., 2015) se demostró que el ECP es producido por la interferencia de las proteínas M1, M2, M3 de VEV con el transporte de ARNm, en la célula huésped desde el núcleo hacia el citoplasma. Lo cual podría explicar el cambio morfológico en la célula BHK-21, al detenerse la expresión génica, escasean proteínas estructurales que dan soporte y forma a la célula. En la misma investigación, se probó que la proteína M1 altera la redistribución de las ribonucleoproteínas que controlan el empalme del ARN en la célula huésped.

Se observó también en el presente estudio que hubo una significativa reducción de la densidad celular transcurridas 72 horas de la inoculación de VSV en la precapa formada de BHK-21. (Lian et al., 2010) menciona que el VSV produce apoptosis en las células BHK-21 a través de inducir cambios en el potencial de la membrana mitocondrial y de activar las vías de señalización de las caspasas 9 y 3, alterando de esta forma la muerte celular programada. Además indica que en promedio, 1 de cada 4 células se ven afectadas con apoptosis y el resto con cambios morfológicos. Estos resultados coinciden con los encontrados en el presente estudio.

De acuerdo con (Lock et al., 2019) el método de dilución por punto final, a pesar de su antigüedad es bastante fiable, especialmente cuando queremos cuantificar virus que no forman

placas fácilmente, y el ECP es nuestro indicador. La dilución por punto final puede ser potenciada combinándola con el poder de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), se puede lograr un aumento en la sensibilidad de al menos 10 veces, que podría resultar enormemente útil si se quiere trabajar con varias sepas de un mismo virus. El factor a tener en cuenta, es que la utilización de una qPCR, incrementaría significativamente el costo del proyecto. El virus de la rabia fue elegido para realizar el ensayo de especificidad analítica porque pertenece al género *Rhabdoviridae*, al igual que el virus de estomatitis vesicular.

Repetibilidad

La repetibilidad se realizó con la finalidad de conocer la concordancia procesando 30 epitelios, tomando alícuotas y depositándolas en un recipiente individual como tres réplicas idénticas de la muestra original que contienen las concentraciones originales de analito, tal como lo recomienda la (OIE, 2019) en su capítulo principios y métodos de validación de pruebas diagnósticas de enfermedades infecciosas.

En el presente estudio obtuvo una concordancia del 93.33%, y únicamente en 2 tratamientos no se obtuvo los resultados esperados. En la tabla 5 la muestra 15, clasificada previamente como negativa mediante ELISA-SI, dio como resultado en una de las réplicas efecto citopático. Este resultado contradictorio pudo deberse a una contaminación cruzada al momento de cargar las muestras en la placa de 96 pocillos, o a su vez por una degradación del virus, o presencia de este en pocas cantidades. Mientras tanto en la tabla 6, la muestra 17 que fue previamente clasificada como positiva mediante ELISA-SI, en una de las réplicas dio como resultado negativo. Esto puede deberse a varios factores como un error en los lavados con PBS, en el presente estudio se comprobó que hacerles los lavados con PBS sin los cuidados adecuados, puede despegar la capa preformada de células.

Análisis Molecular

(Tapia, 2015) nos menciona que todo aislamiento viral debe ser confirmado mediante pruebas de inmunodiagnóstico o moleculares, debido a que ningún efecto citopático es específico de un virus en particular. En el presente estudio, el aislado viral fue sometido a una RT-PCR con la cual confirmamos que se trata de VEV.

Una de las mayores ventajas del aislamiento viral es la posibilidad de obtener altas concentraciones de virus completo, para posteriores estudios de caracterización genómica y antigénica, de sensibilidad antiviral y para conservación en repositorios biológicos.

De acuerdo (Lambert & Leedom Larson, 2016), la rt-PCR es más sensible que el cultivo celular, pero tiene el riesgo que deja pasar cepas que no se conocen, así por ejemplo el virus de estomatitis vesicular tiene 2 cepas principales, pero se han reportado variantes regionales de aparición no cíclica que difícilmente pueden ser identificadas en lugares ajenos al de su aparición mediante rt-PCR.

Conclusiones

El protocolo establecido en el laboratorio permitió obtener cultivos óptimos de la línea celular BHK-21 con un buen crecimiento y proliferación.

A partir de diferentes densidades celulares se obtuvieron curvas de crecimiento que permitieron determinar la fase exponencial para la inoculación del virus de estomatitis vesicular.

La densidad celular elegida para los ensayos fue de 3000 células/pocillo, además se determinó que el virus de estomatitis vesicular debe inocularse a los cultivos celulares a las 72 horas.

Los efectos citopáticos identificados mediante el microscopio óptico invertido en la línea celular BNK-21 fueron: redondeamiento celular, disminución de la densidad y agrupamiento en racimos.

Mediante la técnica de diluciones seriadas, y el método de Reed y Muench se determinó la dosis infectiva media en cultivo celular del virus de estomatitis vesicular en $10^{-4.17}$.

Mediante la técnica de diluciones seriadas se determinó la sensibilidad analítica de la prueba en 10^{-5} .

El análisis de rt-PCR de las 3 muestras provenientes del ensayo de repetibilidad, evidenció que la prueba de aislamiento viral es más sensible que ELISA sándwich indirecto.

Recomendaciones

Para los ensayos a realizar es aconsejable trabajar con los pases iniciales de la línea celular BHK-21, mientras mayor sea el número de pases de la línea celular, aumenta la susceptibilidad de las células.

Antes de empezar con los ensayos de inoculación, es necesario disponer primero de un stock congelado de la línea celular lo suficientemente amplio, que nos permita ejecutar más ensayos de los proyectado.

En el protocolo para inocular el virus de estomatitis vesicular en la capa preformada de células BHK-21, los lavados con PBS se deben de realizar con mucha precaución, un exceso de fuerza al momento de depositar el PBS en los pocillos de la placa, puede despegar la capa preformada de células BHK-21.

En próximos estudios se recomienda completar el análisis molecular de las 30 muestras empleadas en el ensayo de repetibilidad.

Bibliografía

Acebo-González, Dayana, & Hernández-García, A. T. (2016). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 4(1), 64–75.

<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226886003.pdf>

Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal, Ja*

[https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_REC
uento_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO](https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECuento_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO)

ATCC. (2020). BHK-21 [C-13] ATCC® CCL-10™ *Mesocricetus auratus*. *Product Catalog*.

<https://www.atcc.org/products/all/CCL-10.aspx#culturemethod>

Cejudo, A. G., & Fiñana, I. T. (2017). 8. *Inmunoanálisis*.

<https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/18%20INMUNOANALISIS.pdf>

Cell Culture High TEch. (2016). *Tryptose Phosphate Broth*. 6.

<http://himedialabs.com/TD/M1710.pdf>

Combe, M. (2015). *Variability and host-dependency of RNA virus mutation rates* [Universitat de Valencia].

<https://roderic.uv.es/handle/10550/46762>

Dongyou, L. (2016). *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*. In *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*.

<https://doi.org/10.1201/b19719>

Duarte, P. C., Morley, P. S., Traub-Dargatz, J. L., & Creekmore, L. H. (2008). *Factors associated with vesicular stomatitis in animals in the western United States*. *Journal of the American Veterinary*

<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/850>

Fernández Núñez, E. G., Leme, J., de Almeida Parizotto, L., de Rezende, A. G., da Costa, B. L. V., Boldorini, V. L. L., Jorge, S. A. C., Astray, R. M., Pereira, C. A., Caricati, C. P., & Tonso, A. (2016). *Approach toward an efficient inoculum preparation stage for suspension BHK-21 cell culture*. *Cytotechnology*, 68(1), 95–104.

<https://doi.org/10.1007/s10616-014-9756-6>

Ferris, N. P., & Donaldson, A. I. (1988). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. *Veterinary Microbiology*, 18(3–4), 243–258.

[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90091-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90091-0)

Green, T. J., Zhang, X., Wartz, G. W., & Luo, M. (2006). Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science*, 313(5785), 357–360.

<https://doi.org/10.1126/science.1126953>

Lambert, T., & Leedom Larson, K. (2016). *Vesicular Stomatitis Virus*. *College of Veterinary Medicine*, 6.

<https://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2016/03/Vesicular-stomatitis-virus-VSV.pdf>

Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., & Barrera, J. D. C. (1999). *Vesicular stomatitis*. In *Veterinary Journal* (Vol. 157, Issue 3, pp. 239–260). Bailliere Tindall Ltd.

<https://doi.org/10.1053/tvj.1>

Li, J., & Zhang, Y. (2012). *Messenger RNA Cap Methylation in Vesicular Stomatitis Virus, a Prototype of Non-Segmented Negative-Sense RNA Virus* | IntechOpen.

<https://www.intechopen.com/books/methylation-from-dna-rna-and-histones-to-diseases-and-treatment/messenger-rna-cap-methylation-in-vesicular-stomatitis-virus-a-prototype-of-non-segmented-negative-se>

Lian, H., Liu, W., Liu, Q., Jin, H., Sun, Y., Li, J., Xia, Z., & Gao, H. (2010). *A laboratory-attenuated vesicular stomatitis virus induces apoptosis and alters the cellular microRNA expression profile i*

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-010-0749-2>

Liang, B., Li, Z., Jenni, S., Rahmeh, A. A., Morin, B. M., Grant, T., Grigorieff, N., Harrison, S. C., & Whelan, S. P. J. (2015). Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy. *Cell*, 162(2), 314–327.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.018>

Lock, M., Korn, M., Wilson, J., Sena-Esteves, M., & Gao, G. (2019). *Measuring the infectious titer of recombinant adenovirus using tissue culture infection dose 50% (TCID50) end-point dilution and quanti*

<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2019/8/pdb.prot095562.full>

OIE. (2019). *Principios y Métodos de Validación de Pruebas de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas.*

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.6.0_INTRODUCTION.pdf<http://www.oie>

OIE. (2018). *Estomatitis Vesicular. Manual Terrestre.*

https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.23_VESICULAR_STOMATITIS.pdf

PANAFTOSA, L. de R. (2020). *Método de Ensaio – MET Código: MET/LREF/034 - V.1*
Fase:

- Reis Júnior, J. L., Mead, D., Rodriguez, L. L., & Brown, C. C. (2009). *Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis viruses*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093355758>
- Redondo, N., Madan, V., Alvarez, E., & Carrasco, L. (2015). *Impact of vesicular stomatitis virus M proteins on different cellular functions*. *PLoS ONE*, 10(6), e0131137.
<https://doi.org/10.13>
- Rodríguez, L. L. (2002). *Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States*. *Virus Research*, 85(2), 211–219.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00026-6)
- Rozo-Lopez, P., Drolet, B., & Londoño-Rentería, B. (2018). *Vesicular Stomatitis Virus Transmission: A Comparison of Incriminated Vectors*. *Insects*, 9(4), 190.
<https://doi.org/10.3390/insects>
- S Rahman et al. (2007). *Studies on In Vitro Culture Characteristics of Adherent Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21) Cell Line*. *Int. J. Agri. Biol.*, 9(6), 821–826.
<https://www.researchgate.net/pub>
- Sandin, D. (2008). *Métodos de estudio y diagnóstico viral*.
<http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 8.pdf>
- Scherer, C. F. C., O'Donnell, V., Golde, W. T., Gregg, D., Mark Estes, D., & Rodriguez, L. L. (2007). *Vesicular stomatitis New Jersey virus (VSNJV) infects keratinocytes and is restricted to lesion sites*
<https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2007/03/v07031/v07031.html>
- Schmitt, B. (2002). *Vesicular stomatitis*. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 18, Issue 3, pp. 453–459).
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00031-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00031-2)

Sena-Esteves, M., & Gao, G. (2020). *Introducing genes into mammalian cells: Viral vectors. In Cold Spring Harbor Protocols (Vol. 2020, Issue 8, pp. 297–329). Cold Spring Harbor Laboratory Press. H*

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32457039/>

Spickler, A. R. (2010). *Estomatitis Vesicular.*

http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/estomatitis_vesicular.pdf

Su, Q., Sena-Esteves, M., & Gao, G. (2020). *Titration of recombinant adeno-associated virus (RAAV) genome copy number using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Cold Spring Harbor*

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32358049/>

Tapia, L. (2015). *Laboratorio de virología en la práctica clínica. Revista Médica Clínica Las Condes, 26(6), 744–752.*

<https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.003>

Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., & Sariboyaci, A. E. (2018). *Cell and tissue culture: The base of biotechnology. In Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of*

https://www.researchgate.net/publication/322186855_Cell_and_Tissue_Culture

Whelan, S. P. J. (2008). *Vesicular Stomatitis Virus. In Encyclopedia of Virology (pp. 291–299). Elsevier Ltd.*

<https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00529-X>

Wood, J. (2015). *Vesicular stomatitis found in SD cattle | TSLN.com. Livestock News.*
<https://www.tsln.com/news/vesicular-stomatitis-found-in-sd-cattle/>

Zaaijer, H. L., Cuypers, H. T. M., Reesink, H. W., Winkel, I. N., Lelie, P. N., & Gerken, G. (1993). Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *The Lancet, 341(8847), 722–724.*

[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90488-3](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90488-3)

Zuluagal, D. F. N., & Yuill, T. M. (1979). *Estudios ecológicos de los virus de estomatitis vesicular en Antioqia, Colombia.*

<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/17326/v87n5p389.pdf?sequence=1>

&isAllowed=y

Anexos