



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ESTOMATITIS VESICULAR BOVINO Y FILOGENIA DEL AGENTE CAUSAL PRESENTE EN MUESTRAS COLECTADAS EN LAS REGIONES COSTA Y ORIENTE DEL ECUADOR

AUTOR: LÓPEZ ALAJO, CAROLINA VANESSA

DIRECTOR: Ing. FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER PhD

SANGOLQUÍ

2018



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ESTOMATITIS VESICULAR BOVINO Y FILOGENIA DEL AGENTE CAUSAL PRESENTE EN MUESTRAS COLECTADAS EN LAS REGIONES COSTA Y ORIENTE DEL ECUADOR”** fue realizado por la señorita **LÓPEZ ALAJO, CAROLINA VANESSA** 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 Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 17 de octubre de 2018

Firma:

Ing. Francisco Flores, PhD.

C. C. 1713443479.....



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **LÓPEZ ALAJO, CAROLINA VANESSA**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ESTOMATITIS VESICULAR BOVINO Y FILOGENIA DEL AGENTE CAUSAL PRESENTE EN MUESTRAS COLECTADAS EN LAS REGIONES COSTA Y ORIENTE DEL ECUADOR** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas. Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 17 de octubre de 2018

Firma:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carolina V. López Alajo', written over a dotted line.

Carolina Vanessa López Alajo

C.C: 1722253547



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **LÓPEZ ALAJO, CAROLINA** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ESTOMATITIS VESICULAR BOVINO Y FILOGENIA DEL AGENTE CAUSAL PRESENTE EN MUESTRAS COLECTADAS EN LAS REGIONES COSTA Y ORIENTE DEL ECUADOR** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 17 de octubre de 2018

Firma:

..........

Carolina Vanessa López Alajo

C.C: 1722253547

DEDICATORIA

A mis padres, quienes con su amor y apoyo incondicional fueron un pilar gracias al cual fui capaz de enfrentar cada reto y desafío impuesto en la vida.

A mis hermanos, quienes me han motivado e impulsado constantemente para ser una mejor versión de mí.

Carolina Vanessa López Alajo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre Carmen Alajo, quien siempre me supo comprender y alentar para que nunca pierda mi camino. A mi padre Jorge López, quien ha sido un soporte incondicional durante cada etapa de mi vida. A mis hermanos Santiago y Ricardo por motivarme siempre. A mi tío Luis, gracias por el amor que siempre me hizo sentir.

A mis amigos de la universidad Mayra Heredia, Pablo Paredes, y en especial a Valeria Martínez por todo el apoyo, las palabras de aliento y la confianza que depositaron en mí.

Al Ing. Francisco Flores, PhD por todo el apoyo, guía y compromiso para la realización de este proyecto, gracias por su tiempo y por recibirme siempre que tuve inquietudes, pero, sobre todo gracias por ser un excelente maestro.

Al Dr. Freddy Proaño, PhD por sus consejos y asesoría durante las etapas finales de este proyecto, gracias por su tiempo y apoyo para ultimar detalles.

Al Laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD, por abrirme las puertas, ayudarme a desarrollar mis capacidades y por facilitarme todas las herramientas, sin las cuales este proyecto no se hubiera realizado.

A MsC. Anita Garrido, responsable técnica del laboratorio, por su guía y apoyo durante la realización de este proyecto, por estar siempre dispuesta a responder mis dudas y aportar nuevas ideas cada vez que me sentía perdida.

A los técnicos analistas del laboratorio David Jarrín, Sol Vaca y Silvia Pachacama quienes siempre fueron generosos con su conocimiento y comprensivos con los errores.

Carolina Vanessa López Alajo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| CERTIFICACIÓN | I |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD | II |
| AUTORIZACIÓN..... | III |
| DEDICATORIA..... | IV |
| AGRADECIMIENTOS | V |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | VII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | X |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | XIII |
| RESUMEN..... | XIV |
| ABSTRACT | XV |
| | |
| CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 ANTECEDENTES | 1 |
| 1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER | 3 |
| 1.3 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN | 4 |
| 1.3.1 Objetivo general del proyecto..... | 4 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 5 |
| | |
| CAPÍTULO 2 : MARCO TEÓRICO | 6 |
| 2.1 ESTOMATITIS VESICULAR | 6 |
| 2.1.1 Generalidades..... | 6 |
| 2.1.2 Epidemiología..... | 8 |
| 2.1.3 Genoma..... | 9 |
| 2.1.4 Diagnóstico | 11 |
| 2.1.5 Tratamiento, prevención y control..... | 13 |
| 2.2 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)..... | 13 |
| 2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) | 15 |
| 2.3 SECUENCIACIÓN SANGER | 15 |
| 2.4 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS..... | 16 |
| 2.5 ÁRBOLES FILOGENÉTICOS | 17 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA..... | 18 |
| 3.1 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO..... | 18 |
| 3.2 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS..... | 18 |
| 3.3 EXTRACCIÓN DE ARN | 19 |
| 3.4 SELECCIÓN DE CEBADORES..... | 19 |
| 3.5 TRANSCRIPCIÓN REVERSA..... | 20 |
| 3.6 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PRC)..... | 20 |
| 3.6.1 Temperatura de hibridación de los cebadores..... | 22 |
| 3.6.2 Concentración de cloruro de magnesio..... | 22 |
| 3.6.3 Concentración de cebadores. | 23 |
| 3.7 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LA TÉCNICA Y DEL LÍMITE MÍNIMO DE DETECCIÓN | 23 |
| 3.8 DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD ANALÍTICA DE LA TÉCNICA..... | 23 |
| 3.9 DIAGNÓSTICO DE VIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR DE PCR EN MUESTRAS DE EPITELIO BOVINO. | 23 |
| 3.10 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA..... | 24 |
| 3.11 SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS | 24 |
| 3.12 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS | 24 |
| 3.13 HIPÓTESIS | 26 |
| CAPÍTULO 4 RESULTADOS | 27 |
| 4.1 EXTRACCIÓN DE ARN | 27 |
| 4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PRC)..... | 27 |
| 4.2.1 Ensayos de optimización para la detección de VEVI-1..... | 27 |
| 4.2.2 Ensayos de optimización para detección de VEVI-2..... | 30 |
| 4.2.3 Ensayos de optimización para la detección de VEVI-3..... | 33 |
| 4.2.4 Ensayos de optimización para la detección de VEVNJ..... | 36 |
| 4.3 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LA TÉCNICA Y DEL LÍMITE MÍNIMO DE DETECCIÓN DE VEVI-3..... | 39 |

| | | |
|----------------------------------|--|----|
| 4.4 | DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LA TÉCNICA Y DEL LÍMITE MÍNIMO DE DETECCIÓN DE VEVNJ | 42 |
| 4.5 | DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN DE VEVI-3..... | 44 |
| 4.6 | DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN DE VEVNJ..... | 44 |
| 4.7 | DIAGNÓSTICO DE VEVI-3 MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR DE PCR EN MUESTRAS DE EPITELIO BOVINO. | 45 |
| 4.8 | DIAGNÓSTICO DE VEVNJ MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR DE PCR EN MUESTRAS DE EPITELIO BOVINO. | 46 |
| 4.9 | SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS | 47 |
| 4.10 | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS | 48 |
| CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN | | 52 |
| CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES..... | | 59 |
| CAPÍTULO 7 RECOMENDACIONES | | 61 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Vesículas y úlceras presentes en (A) labios, encías y (B) lengua de bovinos. | 6 |
| Figura 2. Estructura del virus de estomatitis vesicular. | 7 |
| Figura 3. Organización del genoma del virus de estomatitis vesicular. | 10 |
| Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVI-1 (793-R y 179-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-7: M-1178, Carriles 8-14: M-1304, C+: control positivo VEVI-1 (con Ta=50°C), C-: control negativo. | 28 |
| Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVI-1 (793-R y 179-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-6: M-1304, Carriles 8-14: M-1492, C-: control negativo. | 29 |
| Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de cloruro de magnesio utilizando los cebadores de VEVI-1 (793-R y 179-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-3: M-1178, Carriles 4-6: M-1304, C-: control negativo. | 30 |
| Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVI-2 (711-R y 102-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-12: M-1299. C+: control positivo Ind-2 (a 50.1°C). C-: control negativo. | 31 |
| Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de cloruro de magnesio utilizando los cebadores de VEVI-2 (711-R y 66-F). M: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen) Carriles 1-3: M-1299. Carriles 5-6: Control positivo VEVI-2. C-: control negativo. | 32 |
| Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del ensayo de especificidad analítica utilizando los cebadores de VEVI-2 (711-R y 66-F). M: marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen), Carril 1: M-1299, Carril 2: M-1473, Carril 3: M-1284, Carril 4: Control positivo VEVI-2, Carril 5: Control positivo FA, C-: control negativo. | 33 |

- Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-5: M-1590, Carriles 6-10: M-1286, Carriles 11-15: control positivo VEVI-3, C-: control negativo.34
- Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de cloruro de magnesio utilizando los cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen). Carriles 1-3: M-1590, Carriles 4-6: M-1286, Carriles 7-9: control positivo de VEVI-3. C-: control negativo.35
- Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de concentración de cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen) Carriles 1-5: Muestra 1286. Carriles 6-10: muestra 1590, C-: controles negativos.36
- Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVNJ (744-R y 102-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1, 2, 3, 4, 5: muestra 1286, Carriles 7, 8, 9, 10, 11: control positivo, carriles 13, 14, 15,16, 17 muestra, Carriles 6 y 18: control negativo.37
- Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de cloruro de magnesio utilizando los cebadores de VEVNJ (744-R y 102-F). M: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen) Carriles 1-3: M-1525. Carriles 4-6: Control positivo de VEVNJ. C-: control negativo.....38
- Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de concentración de cebadores utilizando los cebadores de VEVNJ (744-R y 102-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen) Carriles 1-5: Control positivo de VEVNJ. Carriles 6-10: M-1525. C-: control negativo.....39
- Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del límite de detección al diluir el producto en agua utilizando los cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen). Carriles 1-7: Producto purificado en concentraciones decrecientes. C+: control positivo de VEVI-3. C-: control negativo.40

- Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del límite de detección al diluir el producto en ADNc utilizando los cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen). Carriles 1-7: Producto purificado en concentraciones decrecientes. C+: control positivo de VEVI-3. C-: control negativo.41
- Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del límite de detección al diluir el producto en agua utilizando los cebadores de VEVNJ (102-R y 744-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-7: Producto purificado en concentraciones decrecientes. C+: control positivo de VEVNJ. C-: control negativo.42
- Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del límite de detección al diluir el producto en ADNc utilizando los cebadores de VEVNJ (102-R y 744-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-7: Producto purificado en concentraciones decrecientes. C+: control positivo de VEVNJ. C-: control negativo.43
- Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del ensayo de especificidad analítica utilizando los cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: marcador molecular de 100 pb (Invitrogen), Carril 1: muestra, carril 2: Control FA, C-: control negativo, C+: control positivo Ind-3.44
- Figura 21.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del ensayo de especificidad analítica utilizando los cebadores de VEVNJ (744-R y 102-F). M: marcador molecular de 100 pb (Invitrogen), Carril 1: muestra, carril 2: control+ FA, carril 3: control positivo VEVNJ, carril 4: control negativo.45
- Figura 22.** Árbol filogenético del virus de estomatitis vesicular utilizando método de máxima verosimilitud de MEGA 751

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 <i>Descripción de las muestras utilizadas en el análisis</i> | 18 |
| Tabla 2 <i>Cebadores probados en la implementación de la RT_PCR para la detección del virus de estomatitis vesicular</i> | 20 |
| Tabla 3 <i>Concentraciones y volúmenes de los componentes de la PCR.</i> | 21 |
| Tabla 4 <i>Temperatura de fusión y temperatura de hibridación teóricas de los cebadores y rango de temperatura para el ensayo de gradiente de temperatura de hibridación.</i> | 22 |
| Tabla 5. <i>Secuencias de referencia obtenidas de la base de datos de NCBI</i> | 25 |
| Tabla 6 <i>Concentraciones iniciales y finales, y volumen final empleado para la preparación de una reacción de PCR para el diagnóstico de VEVI-3.</i> | 46 |
| Tabla 7 <i>Perfil térmico para la amplificación por PCR para el diagnóstico de VEVI-3.</i> | 46 |
| Tabla 8 <i>Concentraciones iniciales y finales, y volumen final empleado para la preparación de una reacción de PCR para el diagnóstico de VEVNJ</i> | 47 |
| Tabla 9 <i>Perfil térmico para la amplificación por PCR para el diagnóstico de VEVNJ.</i> | 47 |

RESUMEN

La estomatitis vesicular (EV) es una enfermedad causada por el virus de estomatitis vesicular (VEV) que se caracteriza por la presencia de vesículas y úlceras en la lengua, tejidos orales y patas; síntomas indistinguibles de la fiebre aftosa en bovinos, por lo que es importante obtener un diagnóstico rápido y concluyente. En este proyecto se busca obtener un método diagnóstico de estomatitis vesicular bovina e inferir la filogenia del agente causal a partir de muestras colectadas en las regiones Costa y Oriente del Ecuador. En este estudio se realizó la extracción de ARN de muestras de epitelio bovino, se realizó la retro transcripción y la PCR de punto final con cebadores para la fosfoproteína P de VEV; el análisis filogenético se realizó en base a secuencias obtenidas a partir de productos de PCR purificados de muestras de VEVI-1 y VEVNJ. Se logró la estandarización óptima de VEVNJ; la presencia del virus se determinó por la amplificación de un fragmento de 642 pb, observándose un límite de detección de 1 fg/ μ l de producto de PCR purificado. No se logró una estandarización óptima de VEVI-1 pues se observó la presencia de productos inespecíficos, sin embargo, el fragmento de interés de 650 pb sí corresponde al VEVI-1 y por lo tanto se usó para el análisis filogenético. No se logró la estandarización óptima para la detección de VEVI-2 y VEVI-3 en muestras de epitelio bovino. El análisis filogenético mostró que las secuencias obtenidas en este proyecto se agrupan únicamente en VEVI-1 o VEVNJ.

Palabras clave: RT-PCR, virus de estomatitis vesicular, árbol filogenético, Ecuador.

ABSTRACT

Vesicular stomatitis (VS) is a disease caused by vesicular stomatitis virus (VSV) which is characterized by the presence of vesicles and ulcers; Symptoms indistinguishable from foot-and-mouth disease in cattle, so it is important to obtain a rapid and conclusive diagnosis to contain outbreaks of vesicular stomatitis. Therefore, this project seeks to obtain a diagnostic method for bovine vesicular stomatitis and to infer the phylogeny of the causal agent from samples collected in the Coast and East regions of Ecuador to monitor the movement of viral genetic lineages in endemic areas to obtain data on possible outbreaks of EV in the future. In this study, RNA extraction was performed from bovine epithelial field samples, retro transcription and end-point PCR were performed with primers for the P-phosphoprotein of VSV. The phylogenetic analysis was performed based on sequences obtained from purified PCR products of samples diagnosed with VSVI-1 and VSVNJ. The optimal standardization of VSVNJ was achieved, where the presence of the virus was determined by the amplification of a 642 bp fragment, with a detection limit of 1 fg/ μ l of purified PCR product. An optimal standardization of VSVI-1 wasn't achieved, however, the fragment of interest of 650 bp correspond to VSVI-1 and therefore was used for phylogenetic analysis. Optimum standardization for the detection of VSVI-2 and VSVI-3 in bovine epithelial samples was not achieved, since the primers used in this assay prove to be non-specific. Phylogenetic analysis showed that the sequences obtained in this project are grouped only in VSVI-1 or VSVNJ.

Key words: RT-PCR, vesicular stomatitis virus, phylogenetic tree, Ecuador.

CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Los primeros reportes de estomatitis vesicular (EV) como enfermedad en equinos se dieron en Sudáfrica, donde los signos clínicos incluían temperatura elevada y pérdida de apetito, seguido de marcada salivación y la aparición de vesículas en encías, lengua y labios, las cuales al romperse dejaban ulceraciones rojizas; dando paso a un periodo de curación y recuperación de los animales. En Sudáfrica, también se reportaron varios brotes de estomatitis en el ganado bovino entre los años 1897 y 1943, sin embargo, no se identificó el agente o agentes causales de la enfermedad y no existe evidencia que el virus de estomatitis vesicular (VEV) haya sido el causante (Hanson, 1952).

Hanson (1992) reporta que el primer brote de estomatitis vesicular de importancia en América se dio en 1916 en Denver (EEUU), sin embargo, existen reportes anecdóticos que plantean la posibilidad de la existencia de la enfermedad muchos años antes. La enfermedad luego se extendió al resto de Estados Unidos por medio de brotes esporádicos, afectando tanto a equinos como a bovinos. La enfermedad se registró a intervalos a lo largo de todo el territorio sin llegar a ser motivo de alarma, hasta que en 1925 la fiebre aftosa invadió Texas y surgió la necesidad de desarrollar un diagnóstico diferencial para ambas enfermedades en bovinos.

En 1925, se aisló y preservó el agente causal de la estomatitis vesicular en bovinos y equinos enfermos de la zona de Richmond, Indiana; esta cepa actualmente se conoce como virus de estomatitis vesicular Indiana clásico (VEVI-1). Un año más tarde se originó un brote de estomatitis vesicular en New Jersey, donde se observaron casos con lesiones en pezuñas y ubres de las vacas, esta nueva cepa se identificó como virus de estomatitis vesicular New Jersey (VEV-NJ), que

constituye un tipo antigénico distinto al de VEVI-1. Los resultados permitieron determinar la existencia de dos serotipos inmunológicos de VEV. La estomatitis vesicular en América del Sur, fue reportada por primera vez en Argentina, en 1939, más tarde se encontraron casos en Venezuela y México (Hanson, 1952).

Actualmente la enfermedad está limitada al continente americano y los serotipos Indiana clásica y Nueva Jersey son consideradas endémicas en México, América Central, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (World Organisation for Animal Health (OIE), 2015).

Más tarde se encontró que, según las relaciones serológicas, existen tres subtipos del serotipo Indiana,: Indiana-1 o virus de indiana clásico (VEVI-1), Indiana-2 (VEVI-2) también conocido como virus Cocal (COCV) e Indiana-3 (VEVI-3) llamado también virus Alagoas (VSAV) (Pauszek, Allende, & Rodriguez, 2008).

El primer aislado de VEVI-2 asociado con la enfermedad clínica se obtuvo a partir de caballos en Argentina en 1963 y el brote más grande en ganado bovino se dio en 1998 en el sur de Brasil (Pauszek et al., 2008). El VEVI-3 ha causado brotes esporádicos en el ganado únicamente al norte de Brasil (Alonso, Martins, Gomes, Allende, & Söndahl, 1991)

En Ecuador, en febrero de 2003, se registraron dos focos esporádicos de VEVI-1 en las provincias de Napo y Morona Santiago. En el año 2004 se desató una epidemia de EV en las zonas tropicales y subtropicales del país, con 53 focos infecciosos, de los cuales 50 se ocasionaron por VEV-NJ y tres por VEVI-1 (World Organisation for Animal Health (OIE), 2004).

En el año 2009, El Centro Panamericano de la Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) dio apoyo a la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD en Ecuador,

para el aislamiento viral y la caracterización antigénica y molecular de 7 muestras de epitelio vesicular, aquel año se registró solo un caso positivo para VEV-NJ (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa – OPS/OMS, 2009).

Varios casos esporádicos se han reportado en 2014 en las provincias de Zamora Chinchipe, Santo Domingo y Guayas, aunque el número exacto y el serotipo causante se desconocen (El Productor, 2014)

1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER

Los signos clínicos de la enfermedad de estomatitis vesicular en bovinos incluyen lesiones vesiculares y ulceraciones en lengua, epitelio oral y bandas coronarias, los cuales son idénticos a los de la fiebre aftosa. La fiebre aftosa es una enfermedad que requiere diferentes estrategias de control y representa una enorme cantidad de pérdidas económicas. Por otro lado, aunque la estomatitis vesicular también puede ocasionar pérdidas económicas significativas al disminuir la producción y restringir el transporte de los animales, es auto limitada y causa pocas lesiones permanentes. Ambas enfermedades solo pueden diferenciarse por medio de pruebas de laboratorio. La estomatitis vesicular puede también propagarse a humanos, causando una enfermedad transitoria y débil similar a una gripe. Todo lo mencionado anteriormente destaca la importancia de obtener un diagnóstico rápido y concluyente de la estomatitis vesicular en los programas de sanidad animal que permita contener los brotes de estomatitis vesicular y también prevenir una propagación desapercibida de la fiebre aftosa (Sepúlveda, Malirat, Bergmann, Mantilla, & Nascimento, 2007; Wilson et al., 2009).

Para el diagnóstico de la estomatitis vesicular se cuenta con herramientas como la identificación por fijación del complemento (CF), ensayo por inmunoadsorción ligado a

enzimas (ELISA) indirecto, tipo sándwich, y pruebas de neutralización de virus. Estas pruebas requieren de mucho trabajo y tiempo para obtener un resultado; por lo que un diagnóstico rápido y certero se logra únicamente con métodos moleculares tales como la PCR (Sepúlveda et al., 2007).

Estudios previos han descrito la filogenia del virus de estomatitis vesicular en Estados Unidos mostrando la existencia de linajes genéticos específicos en las distintas áreas geográficas estudiadas (Rodríguez, 2002). Adicionalmente, estudios sugieren que la evolución del VEV está influenciada por los factores ecológicos de la zona geográfica (Rodríguez, Fitch, & Nichol, 1996). Todos los estudios previos limitan el VEVI-1 y VEVNJ al hemisferio norte del continente americano y a Ecuador; mientras que los subtipos Indiana 2 e Indiana 3 se han limitado a Brasil y Argentina (World Organisation for Animal Health-OIE, 2015). Sin embargo, recientes análisis realizados por La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD, en muestras de epitelio bovino obtenidas en Ecuador, indican la presencia de los subtipos Indiana 2 e Indiana 3. Por ello se ha hecho necesario un análisis filogenético de las muestras positivas de los subtipos del virus de estomatitis vesicular, para determinar así la diversidad genética del virus y la relación filogenética entre ellos.

1.3 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo general del proyecto

- Diagnosticar estomatitis vesicular bovina e inferir la filogenia del agente causal a partir de muestras colectadas en las regiones costa y oriente del Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo para el diagnóstico del virus de estomatitis vesicular en bovinos mediante PCR.
- Determinar la especificidad y sensibilidad analítica del ensayo.
- Construir la filogenia de los virus de estomatitis vesicular bovino utilizando secuencias del gen codificante para la fosfoproteína P.

CAPÍTULO 2 : MARCO TEÓRICO

2.1 ESTOMATITIS VESICULAR

2.1.1 Generalidades

La estomatitis vesicular (EV) es una enfermedad que afecta a caballos, ganado y cerdos, causada por el virus de estomatitis vesicular (VEV) el cual pertenece al género *Vesiculovirus*, de la Familia *Rhabdoviridae*, siendo el virus prototipo de estudio de la familia. La enfermedad se caracteriza por la presencia de vesículas y úlceras en la lengua, tejidos orales, patas y ubres (figura 1); cuando se da en bovinos es indistinguible de la fiebre aftosa. A diferencia de la fiebre aftosa, la estomatitis vesicular es auto limitada (Letchworth, Rodriguez, & Del Cbarrera, 1999).



Figura 1. Vesículas y úlceras presentes en (A) labios, encías y (B) lengua de bovinos.

Fuente: <http://vetbook.org>, (2009)

La estomatitis vesicular aparece esporádicamente en el continente americano, desde el norte de Suramérica (Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela) hasta el sur de México, particularmente durante la transición de la estación lluviosa a la seca (Rodríguez, 2002).

Existen dos clases inmunológicas del VEV reconocidas: Indiana (VEVI-1) y New Jersey (VEV-NJ). Dentro del serotipo Indiana se han encontrado tres subgrupos basados en las relaciones

serológicas: Indiana 1 (VEVI-1), Indiana 2 (VEVI-2) también conocido como virus Cocal e Indiana 3 (VEVI-3) también llamado virus Alagoas (Pauszek, Barrera, Goldberg, Allende, & Rodriguez, 2011).

Los virus de estomatitis tienen forma de bala con una longitud de 65-185 nm y 75 nm de ancho. Son virus de cadena simple de ARN negativo no segmentado encapsulado por una cápside de ribonucleoproteínas, además posee una envoltura fosfolipoprotéica derivada de la célula huésped (figura 2). Los diferentes subtipos del VEV son similares en tamaño y morfología, con la única variación que generan distintos tipos de anticuerpos neutralizantes en el huésped (Reis Jr, Mead, Rodriguez, & Brown, 2009).

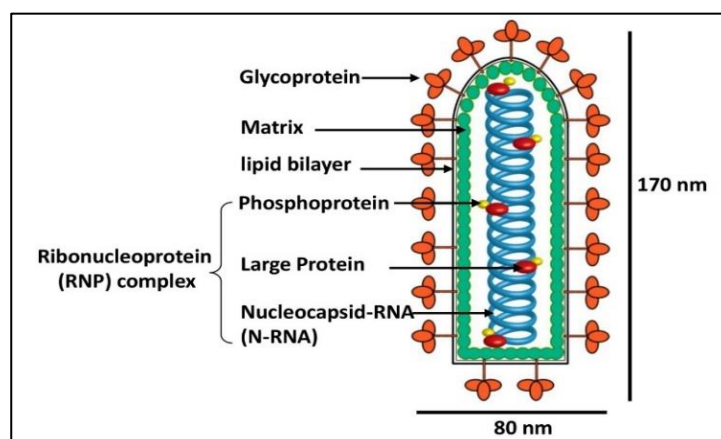


Figura 2. Estructura del virus de estomatitis vesicular.

Fuente: Li & Zhang, (2012).

La estomatitis vesicular afecta principalmente a equinos, bovinos y porcinos. También se han observado signos clínicos en ovejas y cabras, aunque esto es poco común. En Sudamérica se han visto afectados también algunos camélidos. Los seres humanos pueden contraer el virus por contacto directo, causando una enfermedad debilitante temporal con síntomas similares a la gripe,

tales como fiebre, escalofríos, malestar y dolor muscular sin presencia de vesículas (Reis Jr et al., 2009).

El virus puede transmitirse por el contacto directo con abrasiones en la piel, contacto directo con animales domésticos infectados, inhalando aerosoles por vía nasofaríngea y también se ha demostrado la transmisión experimental del VEV-NJ desde moscas negras (*Simulium vittatum*) hacia el ganado y cerdos domésticos. El virus tiene un amplio periodo de incubación que va desde 30 horas hasta 6 días (Reis Jr et al., 2009). Se ha propuesto que los saltamontes migratorios (*Melanopu sanguinipes*) tienen un rol de diseminadores de la enfermedad, en experimentos de laboratorio se ha observado que los saltamontes infectados actúan como un reservorio del virus, y al ser ingeridos por los bovinos, estos últimos desarrollan signos clínicos (Nunamaker et al., 2003).

Se ha observado que los VEV pueden inactivarse al ser expuestos a una temperatura de 58°C por 30 minutos. Estos virus son estables a pHs entre 4.0 y 10.0 y son sensibles a desinfectantes iodados, formaldehído, hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70%, hidróxido de sodio al 4%, éter y otros compuestos orgánicos. Así mismo se ha observado que se inactivan con la luz solar y son capaces de sobrevivir por largos periodos de tiempo a bajas temperaturas para luego reactivarse (World Organisation for Animal Health (OIE), 2015).

2.1.2 Epidemiología

La EV es una enfermedad limitada al continente americano y los serotipos VEVI-1 y VEVNJ son considerados endémicos en áreas del norte de Sudamérica, Centroamérica y México, con brotes periódicos que involucran cientos o miles de granjas. Brotes causados por VEVI-2 ocurren de

forma esporádica en Argentina sur de Brasil y VEVI-3 se ha observado en algunas regiones de Brasil (Rodríguez, 2002).

El virus de estomatitis vesicular se ha estudiado extensivamente de forma molecular, sin embargo, la epidemiología permanece desconocida. Las tasas de infección entre los distintos brotes son variables, la morbilidad puede llegar hasta el 96%, en la gran mayoría de casos de infección de caballos y ganado la mortalidad es despreciable (Reis Jr *et al.*, 2009).

El serotipo New Jersey es el responsable del 80% de los brotes en Estados Unidos, mientras que a Indiana 1 se le atribuye el resto. El serotipo VEVNJ es muy importante en Latinoamérica, en 2007 la enfermedad se reportó en 497 rebaños a lo largo de la región (Reis Jr *et al.*, 2009).

Cerca del 90% de los animales dentro de rebaños endémicos pueden ser seropositivos para VEV, de los cuales, usualmente entre el 10 al 15% de los animales muestran signos clínicos. Se presenta particularmente en animales adultos, puesto que se ha observado que bovinos menores a un año son raramente afectados. La gran mayoría de animales enfermos se recuperan en dos semanas, pero la enfermedad causa complicaciones de importancia económica como la ocurrencia de mastitis y la pérdida de producción en la industria de la leche (Reis Jr *et al.*, 2009).

2.1.3 Genoma

El genoma viral del VEV es lineal y está formado por una sola cadena de ARN negativo no segmentado de, aproximadamente, 11kb (11 161 nucleótidos). El genoma posee 5 genes que codifican 5 proteínas (figura 3): proteína de nucleocápside N, fosfoproteína P (llamada anteriormente proteína NS), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) y polimerasa L. Posee una secuencia líder (Le) traducida de 47 nucleótidos en el terminal 3' y una secuencia tráiler de 59

nucleótidos en el terminal 5' que pertenece a la región no traducida. La transcripción de los genes virales se da en forma secuencial a partir de un único promotor en el terminal 3' del genoma, en el orden de los genes en el genoma: 3'Le-N-P-M-G-L-(tráiler)5', donde la transcriptasa viral es la encargada de transcribir cada uno de los ARN mensajero (ARNm) monocistrónicos individuales (Banerjee & Barik, 1992).

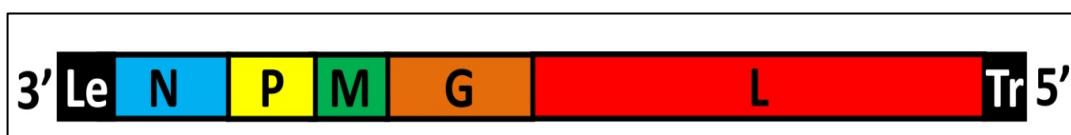


Figura 3. Organización del genoma del virus de estomatitis vesicular.
Fuente: Li & Zhang (2012).

La **proteína de nucleocápside (N)** es la más abundante en células infectadas, ya que, al igual que P y L, es indispensable para la transcripción. Se observa que es la proteína más conservada entre los serotipos. La **fosfoproteína (P)** posee tres dominios sobresalientes, los cuales son esenciales para la transcripción y replicación viral: el dominio I es responsable de la asociación de P con L, el dominio II es el que se une a L para regular la transcripción y el dominio III está cargado positivamente y se encuentra en el C terminal. La proteína P es la menos conservada de las cinco proteínas estructurales. La **proteína de matriz (M)** es importante para la estructura del virus, la morfología, ensamblaje y gemación viral y está muy conservada entre todos los serotipos virales. La **glicoproteína (G)** se fusiona con la membrana celular durante la entrada del virus y durante la salida de los virus por gemación, después de P, la proteína G es la menos conservada de las proteínas virales. La **polimerasa (L)**, al asociarse con P y N, cumple funciones de ATPasa, metilasa, guanilil transferasa, adicción de caperuza y de la cola de poly (A) al ARN mensajero; esta

proteína está altamente conservada entre los cuatro virus (Pauszek, Schumann, Bunch, & Rodriguez, 2002).

2.1.4 Diagnóstico

La estomatitis vesicular no puede ser diferenciada clínicamente de otras enfermedades vesiculares, puesto que los síntomas son idénticos, por ello el diagnóstico pronto y certero en los casos sospechosos de EV se realiza en laboratorio, por medio de la identificación del agente o por pruebas serológicas. Las mejores muestras para el diagnóstico de la enfermedad es el fluido vesicular, epitelio que recubre a las vesículas intactas o las aletas epiteliales de vesículas inmediatamente luego de su rotura e hisopados de los fluidos vesiculares. Las muestras se recolectan de lesiones en la boca o patas del animal. En caso de no disponer de tejido epitelial, se pueden tomar muestras de fluido esofágico-faríngeo. En algunos casos no es posible recolectar muestras para la identificación del agente, entonces se pueden tomar muestras de suero para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos (World Organisation for Animal Health (OIE), 2015).

a. Identificación del agente

- **Visualización directa:** Las características morfológicas únicas de la familia *Rhabdovirus*, permiten diferenciarlo de otras familias por medio de microscopía electrónica.

- **Cultivo *in vitro*:** La inoculación del virus en cultivos celulares apropiados permite la diferenciación de las enfermedades vesiculares por medio del efecto citopático del virus en las líneas celulares.

- **Pruebas *in vivo***: Los replicados virales pueden aislarse en embriones de gallina de 8 a días de edad por medio de inoculación en el saco alantoideo.

- **Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA sándwich indirecto)**: Es el método de preferencia actual utilizado para el diagnóstico de la EV y la identificación de los serotipos virales, así como de otras enfermedades vesiculares. El procedimiento se prepara con un juego de antisuero polivalente de conejo o cobayo contra los viriones de los tres serotipos Indiana y un juego de antisuero monovalente de conejo o cobayo contra los viriones de NJ. Requiere confirmación de las muestras negativas por medio de cultivo *in vitro*.

- **Prueba de fijación del complemento**: Es menos sensible que el ELISA, y puede verse afectado por factores pro- o anti-complementarios. Al igual que el ELISA, las muestras de campo negativas requieren confirmación por medio de cultivo celular.

- **Métodos de reconocimiento del ácido nucleicos**: Se utiliza la RT-PCR para la amplificación de regiones genómicas específicas y detectar así la presencia de ARN viral en el tejido; las técnicas de PCR no se utilizan como pruebas de screening de rutina para el diagnóstico.

(World Organisation for Animal Health (OIE), 2015)

b. Pruebas serológicas

Para la identificación y cuantificación de anticuerpos específicos en suero, se prefiere las pruebas de **ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de bloqueo en fase líquida (LP- ELISA) o ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA competitivo)** y la **neutralización del virus**, mientras que la **prueba de fijación del complemento** se utiliza

únicamente para la cuantificación de anticuerpos tempranos, es decir para periodos cortos post infección (World Organisation for Animal Health (OIE), 2015).

2.1.5 Tratamiento, prevención y control

El tratamiento de la EV es sintomático, se pueden limpiar las lesiones utilizando una solución antiséptica y el uso de antibióticos para evitar una infección secundaria de los tejidos lesionados (Spickler, 2016).

Para el control de la enfermedad, todos los animales con sospecha de padecer EV, deben seguir el lineamiento nacional o local para el reporte de la enfermedad a las entidades competentes. Se debe prevenir la diseminación del virus a otros animales por contacto directo, para ello se restringe el movimiento de los animales enfermos y se aplican cuarentenas por, hasta 21 días posteriores a la curación de las lesiones de los animales. La buena desinfección y saneamiento de los establecimientos y fómites evita la diseminación de los virus. El control de insectos en establos y criaderos deben eliminarse por medio del uso de insecticidas para prevenir la diseminación (Spickler, 2016; World Organisation for Animal Health (OIE), 2015).

Actualmente no se dispone de vacunas comercialmente, aunque se han probado experimentalmente vacunas de virus inactivado y de virus atenuado (World Organisation for Animal Health (OIE), 2015)

2.2 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica *in vitro* basada en la amplificación exponencial de un fragmento de ADN por medio de la enzima termoestable *Thermus aquaticus* (*Taq*) polimerasa. El método utiliza un par de cebadores sintéticos

que se hibridan con una de las dos cadenas del ADN diana, siendo la región flanqueada por los cebadores, la que se amplificará. Los cebadores hibridados actúan como un sustrato para la *Taq* ADN polimerasa, la cual añade deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs por sus siglas en inglés) secuencialmente creando una cadena de ADN complementaria (Patrinos, Ansonge, & Danielson, 2017).

Experimentalmente, el proceso de amplificación consta de 3 etapas:

1. Desnaturalización: Consiste en la separación de ambas cadenas del ADN diana para tener cadenas simples, para ello se utilizan temperaturas de 94 o 95°C.
2. Hibridación: Los cebadores específicos se hibridan con las cadenas de ADN simples cuando la temperatura de la mezcla alcanza la temperatura de hibridación (T_h por sus siglas en inglés) la cual puede estar en un rango de 40 a 70°C. La temperatura de hibridación depende de varios factores y de la secuencia específica de los cebadores utilizados.
3. Extensión: Se da gracias a la acción de la *Taq* polimerasa, la cual incorpora deoxinucleótidos trifosfato en el extremo 3' del cebador para formar una nueva cadena complementaria a la cadena molde, esta etapa se lleva a cabo a 72°C.

Al repetir dichas etapas por un número de veces, generalmente de 30 a 40 ciclos, la secuencia diana de ADN se amplifica resultando en billones de copias del fragmento de interés, llamado “amplicón” (Patrinos et al., 2017)

La técnica de PCR requiere un ADN diana o molde que se desea amplificar, un par de cebadores que delimitan el fragmento de interés, deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), la *Taq* polimerasa con su cofactor Mg^{2+} provisto en una solución de cloruro de magnesio y el buffer de PCR, que provee

un ambiente estable y óptimo para la acción de la enzima. La especificidad y sensibilidad de la PCR dependerán de la concentración final de todos los componentes en la mezcla de reacción o master mix (Kennedy, 2011)

2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Es una variación de la PCR estándar que permite la amplificación de transcritos de ARN mensajero (ARNm) específicos; para ello, la reacción se calienta a 37°C permitiendo que la enzima transcriptasa reversa produzca una copia de ADN complementario (ADNc) a las cadenas simples de ARNm. Luego las copias de ADNc se amplificarán exponencialmente de la misma manera que la PCR estándar. Existen protocolos de un solo paso que combina en un solo tubo, tanto la reacción de transcripción reversa como la PCR, o protocolos de dos pasos donde la reacción de transcripción reversa se realiza de forma separada de la PCR (Walker & Royal Society of Chemistry (Great Britain), 2009).

2.3 SECUENCIACIÓN SANGER

La secuenciación método de Sanger, fue nombrada en honor a su inventor Frederick Sanger. Se conoce también como método de secuenciación dideoxi, puesto que utiliza dideoxinucleótidos como terminadores de la elongación de la cadena de ADN durante su síntesis. Los dideoxinucleótidos carecen del grupo hidroxilo (OH) en el terminal 3', el cual es indispensable para la adición del siguiente nucleótido durante la síntesis de la cadena complementaria. Cuando uno de los dideoxinucleótidos es incorporado a la cadena de ADN por la enzima ADN polimerasa durante la elongación, ésta se detiene inmediatamente. Tradicionalmente, se preparan cuatro tubos de reacción, cada uno con el ADN molde, ADN polimerasa, el cebador y con los cuatro deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). A cada tubo se le añade una pequeña proporción de un

dideoxinucleótido trifosfato diferente (ddNTPs). Como resultado se obtienen varios fragmentos de ADN de diferentes longitudes, cada uno con un dideoxinucleótido diferente conocido en el terminal 3'; los productos se someten a electroforesis en gel de agarosa para obtener un patrón de bandas en orden, del cual es posible deducir la secuencia de nucleótidos del ADN diana (Hartl & Jones, 2009).

En la práctica, actualmente, se emplea la electroforesis capilar que tiene el mismo principio, pero permite su automatización. Para secuenciar una cadena de ADN, se lleva a cabo una reacción de síntesis de ADN en un solo tubo de reacción, al que se adicionan los cuatro dNTPs y una pequeña cantidad de cada uno de los ddNTPs marcados con un fluoróforo diferente. Cada fragmento resultante acabado en un ddNTP está marcado con una molécula fluorescente, los fragmentos se separan de acuerdo su peso por electroforesis capilar, la detección automatizada de marcadores fluorescentes proporcionan la secuencia ordenada de los nucleótidos en cromatogramas de forma inmediata (Hartl & Jones, 2009).

2.4 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS

El alineamiento de secuencias es un proceso que compara dos o más secuencias biológicas, ya sea ARN, ADN o proteínas, para inferir las posiciones donde las secuencias son homologas, es decir, si comparten una historia evolutiva común. El alineamiento es necesario para la identificación y cuantificación de las regiones conservadas o de los motivos funcionales y para el análisis filogenético. El alineamiento de las secuencias se logra por medio de programas y algoritmos automatizados (Rosenberg, 2009).

2.5 ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Los árboles filogenéticos son diagramas que contienen nodos conectados entre sí por medio de ramas. Cada rama representa la persistencia de un linaje genético a través del tiempo y cada nodo representa un ancestro en común, en este contexto, el árbol describe las relaciones evolutivas entre el ancestro común más antiguo y las poblaciones presentes de los organismos. Recientemente, la filogenia molecular se ha vuelto indispensable para la comparación de genomas, para describir relaciones entre parálogos en una familia de genes, para describir las dinámicas evolutivas y epidemiológicas de patógenos y para identificar genes (Yang & Rannala, 2012)

CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA

3.1 Localización geográfica del proyecto.

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD, que se encuentra ubicado en la Av. Interoceánica Km. 141/2 y González Suárez en el sector La Granja, Tumbaco.

3.2 Descripción de las muestras.

Se receptaron 20 muestras de tejido epitelial pertenecientes bovinos con sintomatología clínica de una enfermedad vesicular, provenientes de provincias de la región Costa y Oriente del Ecuador, tal como se detalla en la Tabla 1. Los tejidos se transportaron refrigerados a 4°C en buffer glicerol (pH 7.8). Al llegar al laboratorio se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

Tabla 1

Descripción de las muestras utilizadas en el análisis

| N° | Código | Provincia | Año |
|----|--------|--------------------------------|------|
| 1 | M-0041 | Napo | 2017 |
| 2 | M-0072 | Zamora Chinchipe | 2017 |
| 3 | M-1129 | Zamora Chinchipe | 2016 |
| 4 | M-1178 | Santo Domingo de los Tsáchilas | 2016 |
| 5 | M-1240 | El Oro | 2016 |
| 6 | M-1257 | Esmeraldas | 2016 |
| 7 | M-1259 | Esmeraldas | 2016 |
| 8 | M-1286 | Santo Domingo de los Tsáchilas | 2016 |
| 9 | M-1288 | Santo Domingo de los Tsáchilas | 2016 |
| 10 | M-1299 | Santo Domingo de los Tsáchilas | 2016 |
| 11 | M-1304 | Santo Domingo de los Tsáchilas | 2016 |
| 12 | M-1372 | Zamora Chinchipe | 2016 |
| 13 | M-1373 | Zamora Chinchipe | 2016 |
| 14 | M-1473 | Pastaza | 2016 |
| 15 | M-1492 | Pastaza | 2016 |
| 16 | M-1508 | Zamora Chinchipe | 2016 |

CONTINÚA

| | | | |
|----|--------|------------------|------|
| 17 | M-1525 | Pastaza | 2016 |
| 18 | M-1590 | Zamora Chinchipe | 2016 |
| 19 | M-1700 | Morona Santiago | 2016 |
| 20 | M-1818 | Morona Santiago | 2016 |

Se utilizaron controles positivos de referencia provenientes de PANAFTOSA, los cuales consisten en un serotipo viral de EV inoculado en cultivo de células BHK-2, e inactivados en Trizol.

3.3 Extracción de ARN

Los procedimientos de extracción de ARN se llevaron a cabo en un ambiente libre de RNAsas. La extracción de ARN total de las muestras de epitelio bovino se realizó empleando el agente caotrópico TRIzol® Reagent (Invitrogen), siguiendo un protocolo adaptado de las instrucciones del fabricante. El ARN se resuspendió en 50 µl de agua estéril tratada con DEPC. La calidad y cantidad del ARN se determinó por medio de la técnica de espectrofotometría utilizando el NanoDrop 8000 de Thermo Scientific.

La extracción de los controles positivos de referencia se realizó por medio del kit de extracción High Pure Viral Nucleic Acid de Roche, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

3.4 Selección de cebadores

Se usaron cuatro pares de cebadores que amplifican específicamente fragmentos pertenecientes al gen codificante para la fosfoproteína de virus de estomatitis vesicular (proteína P).

Tabla 2

Cebadores probados en la implementación de la RT_PCR para la detección del virus de estomatitis vesicular

| Cebador | Dirección | Secuencia | Tamaño |
|----------------|------------------|-------------------------------|---------------|
| P-NJ 102 | Directo | 5' GAGAGGATAAATATCTCC 3' | 642 pb |
| P-NJ 744 | Reverso | 5' GGCATACTGAAGAATA 3' | |
| P-Ind 179 | Directo | 5' GCAGATGATTCTGACAC 3' | 614 pb |
| P-Ind 793 | Reverso | 5' GAC TCT YGC CTG RTT GTA 3' | |
| P-Ind2 66 | Directo | 5' AATTGGATGACGCMGTCCA 3' | 645 pb |
| P-711 | Reverso | 5 'CCTCCDACHGARATG 3' | |
| P-Ind3 JX | Directo | 5' TATGAAAAAAAAITAACAGIATC 3' | 650 pb |
| P-711 | Reverso | 5 'CCTCCDACHGARATG 3' | |

Se comprobó la especificidad de los cebadores *in silico* mediante un análisis con el algoritmo en línea Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

3.5 Transcripción reversa

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN extraído de muestras o controles, se realizó una transcripción reversa por medio de la enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) de Invitrogen, utilizando rándom hexámeros, siguiendo un protocolo basado en la descripción del fabricante.

3.6 Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

El ADNc obtenido se utilizó para la PCR con los cebadores específicos para cada serotipo. Para ello se utilizó el kit de Invitrogen GoTaq® G2 Hot Start Polymerase siguiendo un protocolo adaptado de lo sugerido por el fabricante. Para lograr la optimización de las condiciones de la PCR se realizaron ensayos de amplificación modificando los componentes de reacción y el perfil térmico, tales como temperatura de hibridación de los cebadores, concentración de cloruro de magnesio y concentración de los cebadores. La concentración de los otros parámetros, como es la

concentración de otros componentes (dNTPs, Buffer, Taq Polimersa) y temperatura de desnaturalización y elongación, ya se encuentran optimizados de fábrica y la variación de los mismos no representan un cambio significativo en la optimización.

Las concentraciones y volúmenes de los componentes de la PCR, empleado en el estudio adaptado de (Sepúlveda et al., 2007) se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3

Concentraciones y volúmenes de los componentes de la PCR.

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen 1 Rx(μl) |
|-------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| H ₂ O | | | 28.75 |
| Buffer PCR | 5X | 1X | 10 |
| MgCl ₂ | 25mM | 1.5 mM | 3 |
| dNTP | 10 nM | 0.2 mM | 1 |
| Primer | 25 μM | 0.5 μM | 1 |
| Forward | | | |
| Primer | 25 μM | 0.5 μM | 1 |
| Reverse | | | |
| Enzima Go | 5 U/μl | 1.25 U/50 μl | 0.25 |
| Taq Hot Start | | | |
| Volumen final | | | 45 |

Adaptado de Sepúlveda (2007)

El perfil térmico para la amplificación de PCR, adaptado del estudio de Sepúlveda et al. (2007) consistió en una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, la hibridación de los cebadores a la temperatura de hibridación (T_a) respectiva para cada par de cebadores durante 1 minuto y la extensión a 72°C por un minuto, concluyendo con la extensión final a 72°C por 5 minutos.

3.6.1 Temperatura de hibridación de los cebadores

Se realizó un ensayo de gradiente de temperatura de hibridación, para determinar la mejor temperatura. Para ello, primero se calculó la temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés) de cada par de cebadores, utilizando el software informático OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Posteriormente se calculó la temperatura de hibridación (T_a) utilizando la siguiente fórmula:

$$T_a = T_m - 5$$

La gradiente de temperatura de hibridación se realizó en un rango de temperatura tal como se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4

Temperatura de fusión y temperatura de hibridación teóricas de los cebadores y rango de temperatura para el ensayo de gradiente de temperatura de hibridación.

| Cebador | T_m calculado | T_m promedio | T_a teórico | Rango de temperatura |
|-----------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------------|
| P-NJ 102 | 50.5 °C | | | |
| P-NJ 744 | 52.9 °C | 51.7 °C | 46.7 °C | 46°C – 53°C |
| P-Ind 179 | 54.8 °C | 58 °C | 53°C | 50°C – 59°C |
| P-Ind 793 | 61.2 °C | | | |
| P-Ind2 66 | 62.4 °C | 55.2 °C | 50.2 °C | 49°C – 56°C |
| P 711 | 49.3 °C | | | |
| P-Ind3 JX | 58 °C | 53.65 °C | 48.65 °C | 48°C – 53°C |
| P 711 | 49.3 °C | | | |

3.6.2 Concentración de cloruro de magnesio.

Se modificó la concentración de cloruro de magnesio final en el mix preparado. Para ello se realizó la gradiente de concentración de este compuesto desde 1mM hasta 2 mM con incrementos de 0.5mM.

3.6.3 Concentración de cebadores.

Se analizó la concentración de cebadores óptima para el ensayo, utilizando una gradiente desde 0.1 μ M hasta 0.5 μ M con incrementos de 0.1 μ M.

3.7 Determinación de la sensibilidad analítica de la técnica y del límite mínimo de detección

Para determinar la sensibilidad analítica (o límite mínimo de detección) se utilizaron diluciones seriadas del producto de PCR amplificado de muestras positivas, tanto en agua como en ADNc de células epiteliales de lengua bovina, hasta que el ensayo ya no pueda detectar la diana en tres replicas. El producto de PCR diluido se cuantificó en gel de agarosa al 1.5% (p/v) usando como referencia el marcador molecular Low DNA Mass Ladder de Invitrogen.

3.8 Determinación de la especificidad analítica de la técnica.

Para determinar la especificidad analítica se probaron los cebadores de EV utilizados con ADNc de controles positivos de referencia de fiebre aftosa, la enfermedad contra la cual se quiere lograr un diagnóstico diferencial.

3.9 Diagnóstico de virus de estomatitis vesicular mediante la técnica molecular de PCR en muestras de epitelio bovino.

Para el análisis de los resultados de la prueba diagnóstica molecular, se utilizaron datos cualitativos: presencia o ausencia de la banda en el peso indicado al visualizarse en el gel de agarosa. Se tomó en cuenta la intensidad de la banda, la presencia de bandas inespecíficas y el barrido de la banda.

Positivo: Cuando se visualice banda de amplificación

Negativo: Cuando no se visualice banda de amplificación

3.10 Electroforesis en gel de agarosa

Todos los productos amplificados de la PCR, se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v), a 100 voltios por 30 minutos. Para la visualización de las bandas se utilizó el SYBR™ Safe DNA Gel Stain de Invitrogen. Las imágenes se capturaron con una cámara profesional Nikon.

3.11 Secuenciación automatizada de los productos amplificados

Se determinó el serotipo de VEV presente en cada una de las muestras recolectadas. Los productos amplificados se purificaron usando el kit PureLink® Quick Gel Extraction de Invitrogen. Los productos se enviaron a la empresa Macrogen, para la secuenciación estándar por método Sanger.

3.12 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

La limpieza, eliminación de ambigüedades y obtención de las secuencias consenso se realizó en el software Geneious® 10.2.2. El alineamiento de las secuencias consenso y la construcción del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA 7.

El árbol filogenético se construyó utilizando las 19 secuencias obtenidas en este ensayo, en conjunto con otras secuencias de referencia del virus de estomatitis vesicular obtenidas de la base de datos de NCBI que poseían mayor homología con las secuencias de este estudio, además se incluyeron secuencias representativas de los cuatro serotipos virales las cuales se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5.*Secuencias de referencia obtenidas de la base datos de NCBI*

| <i>N°</i> | <i>Código de Acceso</i> | <i>País de origen</i> | <i>Serotipo Viral</i> | <i>Huésped</i> | <i>Año recolección</i> |
|-----------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|------------------------|
| 1 | EF028139.1 | Costa Rica | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 2 | EF028134.1 | Costa Rica | Indiana 1 | Bovino | 2004 |
| 3 | EF028143.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 4 | EF028151.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 5 | EF028149.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 6 | EF028146.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 7 | EF028150.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 8 | EF028147.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 9 | EF028145.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 10 | EF028142.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 11 | EF028144.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 12 | EF028148.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 13 | EF028141.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 14 | EF028140.1 | Ecuador | New Jersey | Bovino | 2004 |
| 15 | KF772606.1 | México | New Jersey | Bovino | 2010 |
| 16 | KF772604.1 | México | New Jersey | Bovino | 2010 |
| 17 | KF772602.1 | México | New Jersey | Bovino | 2008 |
| 18 | KF772601.1 | México | New Jersey | Bovino | 2008 |
| 19 | KF772578.1 | México | New Jersey | Bovino | 2005 |
| 20 | KF772577.1 | México | New Jersey | Bovino | 2005 |
| 21 | FJ595505.1 | USA | New Jersey | Bovino | 2006 |
| 22 | FJ595504.1 | USA | New Jersey | Bovino | 2006 |
| 23 | EF028135.1 | El Salvador | Indiana 1 | Bovino | 2004 |
| 24 | EF028137.1 | Costa Rica | Indiana 1 | Bovino | 2004 |
| 25 | EF028138.1 | Ecuador | Indiana 1 | Bovino | 2004 |
| 26 | KU296059.1 | Colombia | Indiana 1 | Bovino | 2001 |
| 27 | AF473864.1 | USA | Indiana 1 | Bovino | 1998 |
| 28 | AF252223.1 | USA | Indiana 1 | Bovino | 1997 |
| 29 | EU373657.1 | Trinidad y Tobago | Indiana 2 | Equino | 1961 |
| 30 | EU373658.1 | Brasil | Indiana 3 | Equino | 1964 |
| 31 | NC_028255.1 | Trinidad y Tobago | Indiana 2 | Equino | 1961 |

CONTINÚA

| | | | | | |
|----|-------------|-----------|-----------|--------|------|
| 32 | NC_025353.1 | Brasil | Indiana 3 | Equino | 1964 |
| 33 | JF795529.1 | Brasil | Indiana 3 | Bovino | 1986 |
| 34 | JF795528.1 | Brasil | Indiana 3 | Bovino | 1977 |
| 35 | JF795530.1 | Brasil | Indiana 3 | Bovino | 1995 |
| 36 | JF795524.1 | Argentina | Indiana 2 | Equino | 1986 |
| 37 | JF795525.1 | Brasil | Indiana 2 | Equino | 1998 |
| 38 | JF795521.1 | Argentina | Indiana 2 | Equino | 1963 |
| 39 | JF795523.1 | Brasil | Indiana 2 | Equino | 1979 |
| 40 | JF795526.1 | Brasil | Indiana 2 | Bovino | 1998 |
| 41 | JF795527.1 | Brasil | Indiana 2 | Bovino | 1998 |

Todas las secuencias se alinearon utilizando el algoritmo MUSCLE en forma de aminoácidos, en total se analizaron 60 secuencias, 19 secuencias obtenidas en este trabajo y 41 secuencias de referencia.

3.13 Hipótesis

Los subtipos del virus de estomatitis vesicular presentes en muestras de epitelio bovino originarios de las regiones Costa y Oriente del Ecuador pertenecen a linajes genéticos diferentes, y poseen una región variable en el gen de la proteína P que permite diferenciarlos molecularmente.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS

4.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN a partir de muestras de tejido epitelial utilizando el agente caotrópico TRIzol dio como resultado concentraciones totales de 500 ng/ μ l a 1000 ng/ μ l. Todas las muestras se diluyeron a una concentración final de 300 ng/ μ l. La calidad y pureza del ARN obtenido fue bueno, obteniéndose radios A260/A280 de 1.80 a 2.10 y radios A230/260 de 1.68 a 2.25.

En cuanto a la extracción de ARN a partir de controles de referencia, las concentraciones totales fueron aproximadamente de 150 ng/ μ l, con radios A260/280 de 1.80 a 2.0 y radios A230/260 de 2.0 a 2.15 indicando una alta calidad de ARN obtenido.

4.2 Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

4.2.1 Ensayos de optimización para la detección de VEVI-1

Se utilizó la master mix de la Tabla 3 y se usó el perfil térmico descrito por Sepúlveda et al. (2007) variado la temperatura de hibridación en un rango comprendido entre 50 y 59°C, para esto se utilizó muestras de epitelio bovino (M1178 y M1304). El control no se sometió a la gradiente de temperatura puesto que en ensayos previos en el laboratorio ya se determinó que la temperatura óptima es 50°C. Los resultados son inconclusos, puesto que hay presencia de bandas inespecíficas en todas las temperaturas de hibridación (figura 4), se observa una disminución de las bandas inespecíficas en la muestra M1178 a 56.7°C, por lo que se decidió repetir este ensayo utilizando un rango más corto de temperaturas (56 a 58°C) y otra muestra de epitelio bovino.

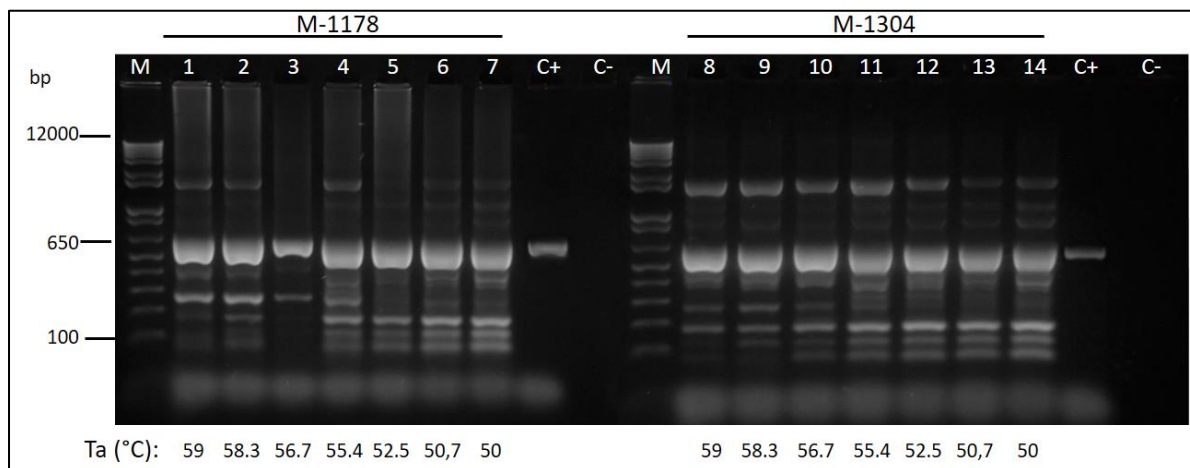


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVI-1 (793-R y 179-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-7: M-1178, Carriles 8-14: M-1304, C+: control positivo VEVI-1 (con $T_a=50^\circ\text{C}$), C-: control negativo.

En la repetición del ensayo se utilizaron las muestras M1304 y M1492, los resultados muestran que bandas inespecíficas en una temperatura de 56.7°C en ambas muestras (figura 5), lo que significa que dicha temperatura no puede utilizarse en general para todos los ensayos. Esto permite determinar que, en este caso, la temperatura no es un factor de gran influencia para la optimización de la técnica, por lo que, para futuros ensayos, se utilizó una temperatura de hibridación de 50°C , la cual es óptima para el control.

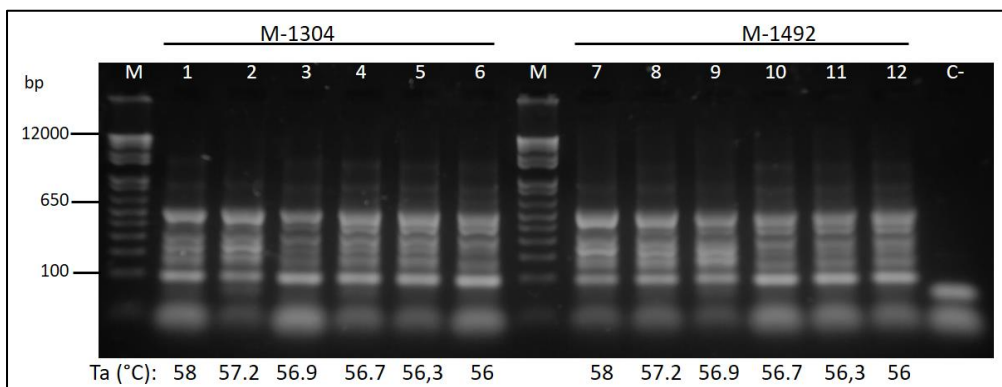


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVI-1 (793-R y 179-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-6: M-1304, Carriles 8-14: M-1492, C-: control negativo.

Se probaron tres concentraciones de cloruro de magnesio utilizando las muestras de epitelio bovino (M1178 y M1304), la reacción para el control positivo de referencia se realizó con una concentración de 1.5 mM. Los resultados muestran la presencia de bandas no específicas en todas las concentraciones probadas (figura 6), lo que indica que la variación de este parámetro no contribuye a la optimización de técnica.

Finalmente, no se logró realizar la optimización de la técnica al utilizar como diana muestras de epitelio, lo que indica problemas de especificidad de los cebadores cuando la muestra proviene de campo. Para confirmar si la banda de interés (650 pb) corresponde al VEVI-1, esta se purificó y se envió a Macrogen para su secuenciación.

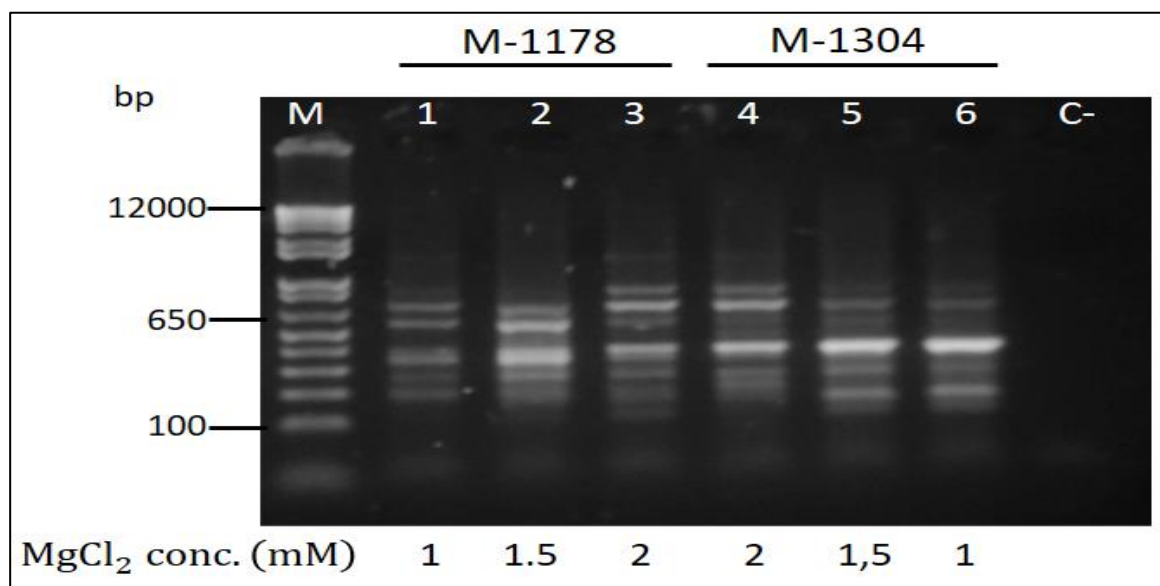


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de cloruro de magnesio utilizando los cebadores de VEVI-1 (793-R y 179-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-3: M-1178, Carriles 4-6: M-1304, C-: control negativo.

4.2.2 Ensayos de optimización para detección de VEVI-2

El ensayo de gradiente de temperatura de hibridación de cebadores utilizó la master mix de la Tabla 3 y el ADNc de una muestra de epitelio bovino. Se probó un rango de temperatura entre 49 y 53°C (ver Tabla 4). Los resultados muestran la presencia de bandas inespecíficas, la banda de interés (645pb) se encuentra con mayor intensidad a 49°C (figura 7). El perfil térmico del control positivo se realizó con una Ta de 50°C, como lo indica Sepúlveda (2009) y este no muestra la presencia de bandas inespecíficas.

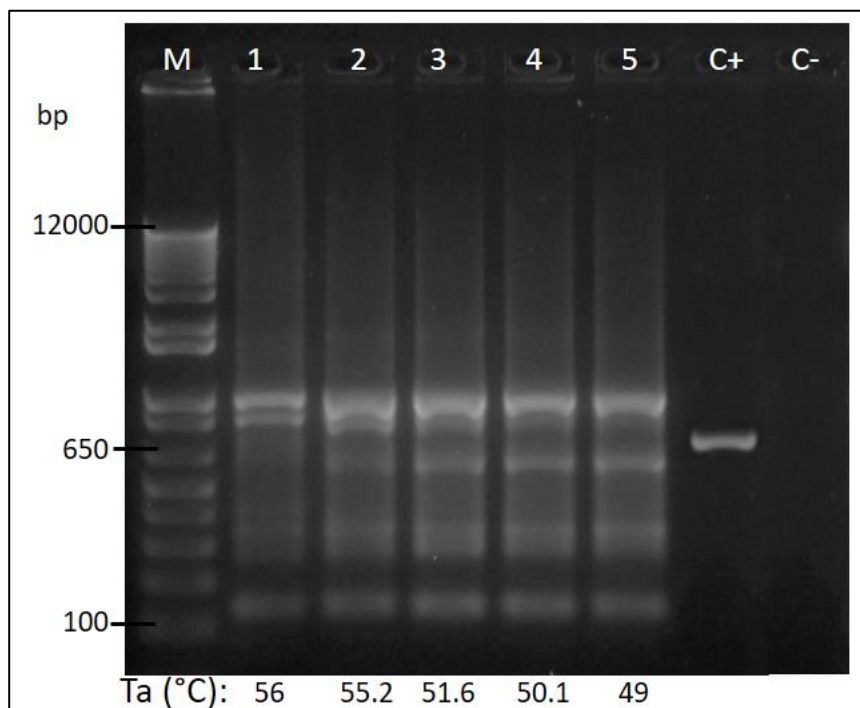


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVI-2 (711-R y 102-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-12:M-1299. C+: control positivo Ind-2 (a 50.1°C). C-: control negativo.

Para mejorar la especificidad del ensayo, se realizó un gradiente de la concentración de cloruro de magnesio, en donde se probaron concentraciones de 1, 1.5 y 2 mM, usando la muestra M-1299 y el control positivo de referencia de VEVI-2. En el control positivo no se observa la presencia de bandas inespecíficas pudiendo determinarse una concentración óptima de 1 mM de cloruro de magnesio (figura 8); sin embargo, la presencia de bandas inespecíficas en la muestra de campo hace difícil establecer esta concentración como la óptima.

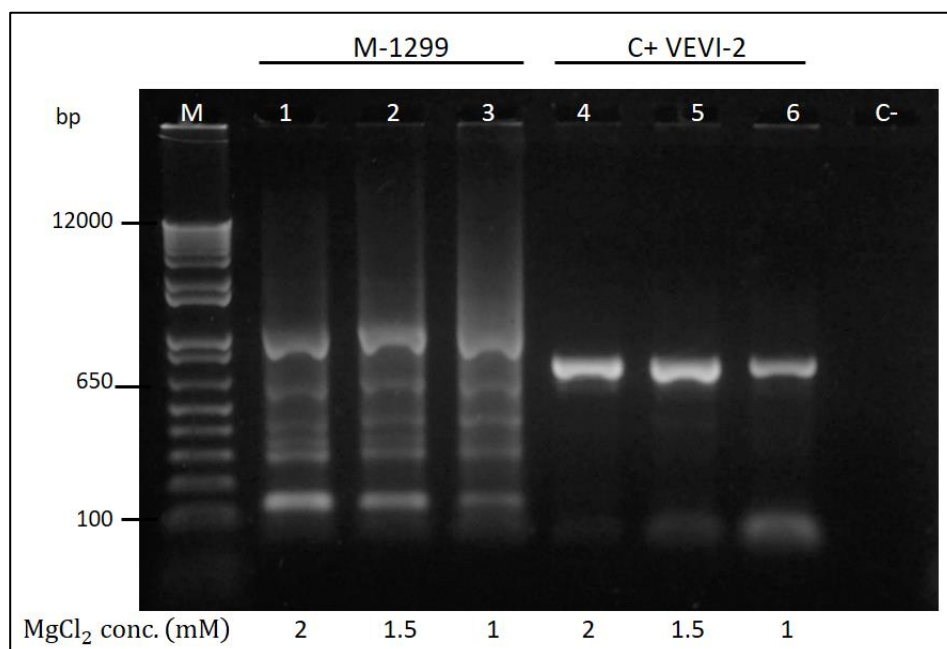


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de cloruro de magnesio utilizando los cebadores de VEVI-2 (711-R y 66-F). M: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen) Carriles 1-3: M-1299. Carriles 5-6: Control positivo VEVI-2. C-: control negativo.

Dada la presencia de varias bandas inespecíficas, se realizó un análisis de especificidad para determinar cuál es la banda de interés (figura 9); para ello se analizaron tres muestras de epitelio bovino, el control positivo de VEVI-2 y un control positivo de FA. Se observa la presencia de la banda de interés (642 pb) en las muestras M-1299 y M-1473, mientras que no se observa en la M-1824. La banda de interés se purificó y envió para su secuenciación, también se enviaron las bandas de 1000 pb (figura 9, flecha roja)

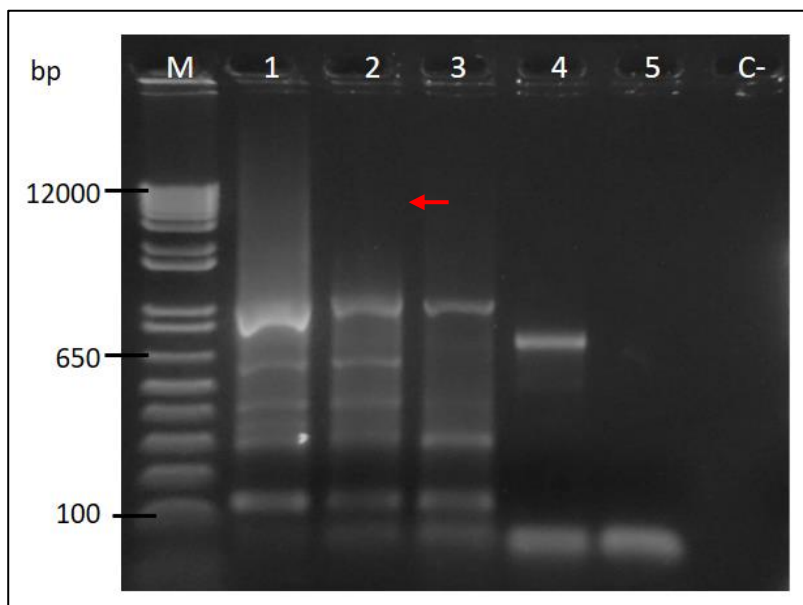


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del ensayo de especificidad analítica utilizando los cebadores de Vevi-2 (711-R y 66-F). M: marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen), Carril 1: M-1299, Carril 2: M-1473, Carril 3: M-1284, Carril 4: Control positivo Vevi-2, Carril 5: Control positivo FA, C-: control negativo.

4.2.3 Ensayos de optimización para la detección de Vevi-3

La optimización de la PCR para la detección de Vevi-3 inició con un ensayo para evaluar la temperatura de hibridación de los cebadores 711-R y JX-F, se trabajó con la master mix de la Tabla 3 y se utilizó como diana el ADNc de muestras de epitelio bovino (M-1590 y M-1286) y del control de referencia positivo. El termociclador se programó para modificar la temperatura de hibridación en un rango comprendido entre 48°C y 54°C (ver Tabla 4). Ambas muestras de epitelio generaron una banda intensa y definida a 51.6°C, sin embargo, el control es muy tenue y poco visible a esta temperatura de hibridación, por lo que se ha seleccionado la temperatura de 49.9°C como la óptima (Figura 10).

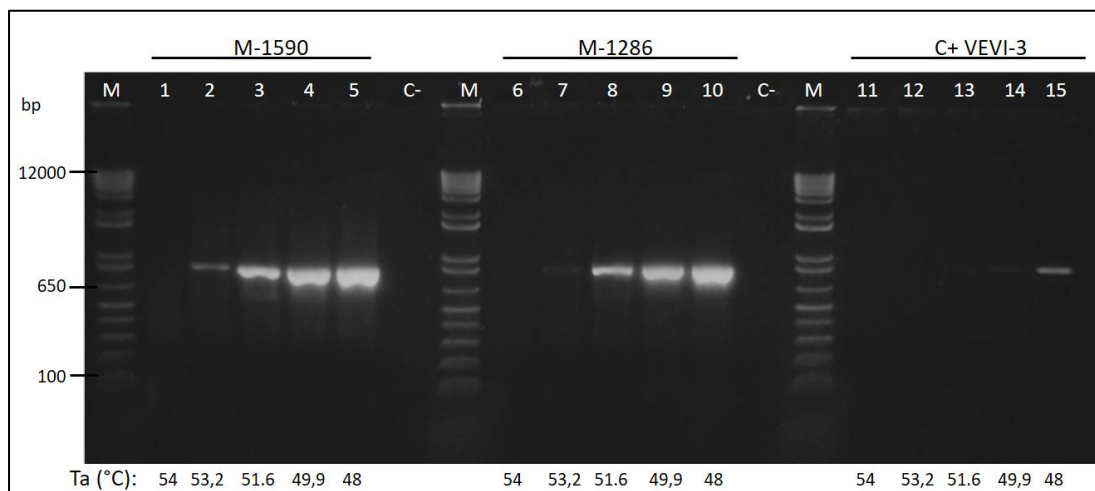


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-5: M-1590, Carriles 6-10: M-1286, Carriles 11-15: control positivo VEVI-3, C-: control negativo.

Para incrementar la sensibilidad de la técnica, se realizó también un gradiente de concentración de cloruro de magnesio, se ensayaron tres concentraciones usando dos muestras de epitelio y un control positivo de referencia de VEVI-3. En los resultados se observa la ausencia de banda usando una concentración de 1mM, por otro lado, existen bandas inespecíficas al usar 2mM; por ello la banda más óptima se observa a 1.5mM, sin embargo, dado que el control con esta concentración es muy tenue, se ha decidido utilizar la concentración de 2mM e incrementar la especificidad variando la concentración de los cebadores utilizados (figura 11).

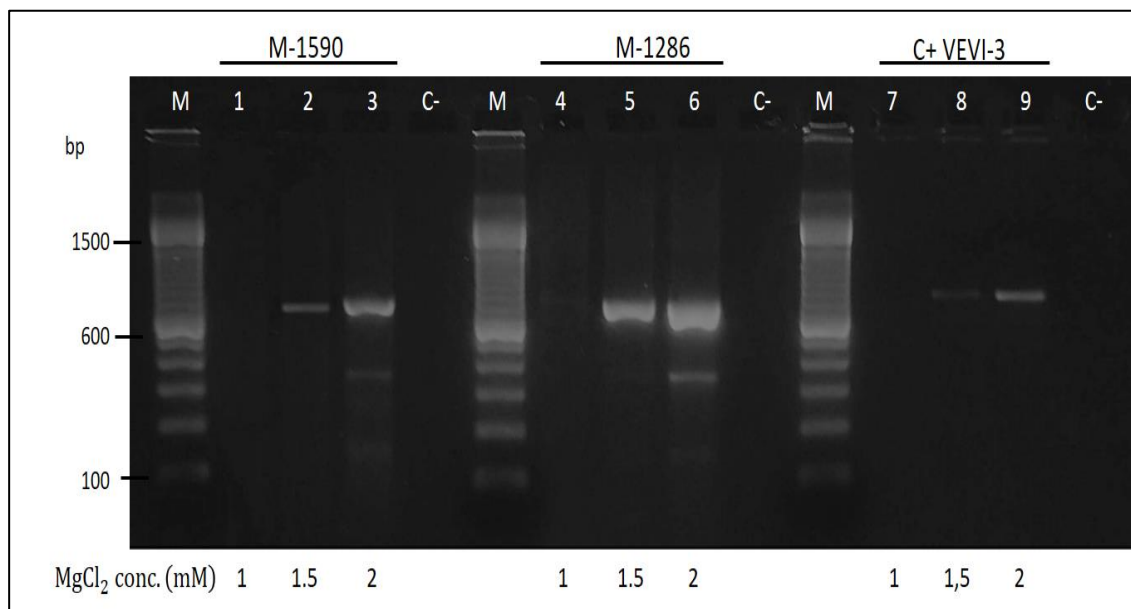


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de cloruro de magnesio utilizando los cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen). Carriles 1-3: M-1590, Carriles 4-6: M-1286, Carriles 7-9: control positivo de VEVI-3. C-: control negativo.

Finalmente se ensayaron concentraciones de cebadores desde 0.1 a 0.5 μM usando dos muestras de VEVI-3. Se observa la presencia de bandas inespecíficas tanto a la concentración de 0.5 y 0.4 μM , las cuales desaparecen a 0.3 μM , por lo que se seleccionó esta concentración como la óptima para el ensayo (figura 12).

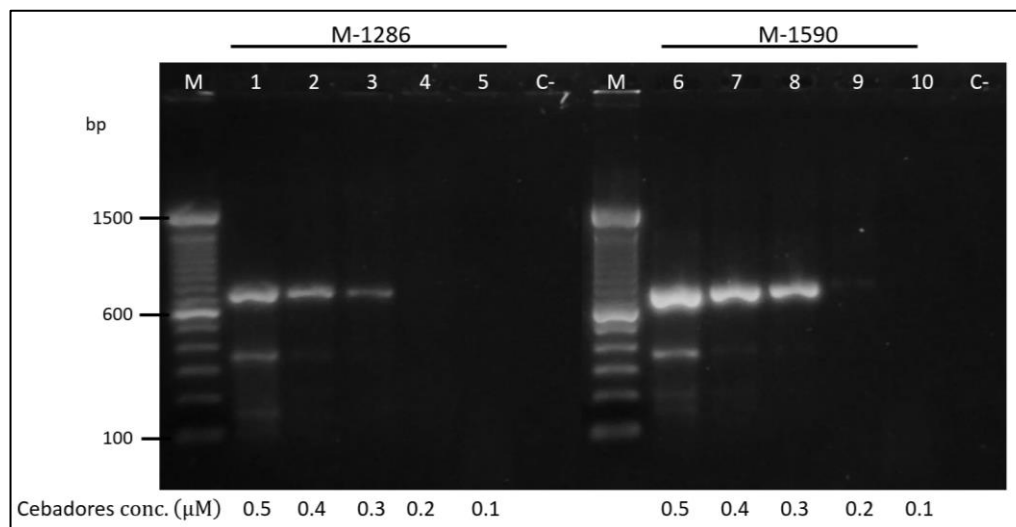


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de concentración de cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen) Carriles 1-5: Muestra 1286. Carriles 6-10: muestra 1590, C-: controles negativos.

4.2.4 Ensayos de optimización para la detección de VEVNJ

La detección de VEVNJ se planteó en base a la misma master mix de la Tabla 3 y el perfil térmico establecido por Sepúlveda (2007). La prueba inicial fue probar los cebadores utilizando un gradiente de temperatura de hibridación entre 46°C y 53°C (ver Tabla 4). Se ensayaron dos muestras de epitelio bovino y un control positivo de referencia de VEVNJ. Los mejores resultados se observaron a una temperatura de hibridación de 50.1°C, en el caso del control este es muy intenso (figura 13); en el caso de las muestras se observa un barrido y bandas inespecíficas tenues, las cuales se eliminarán optimizando otros componentes de la PCR.

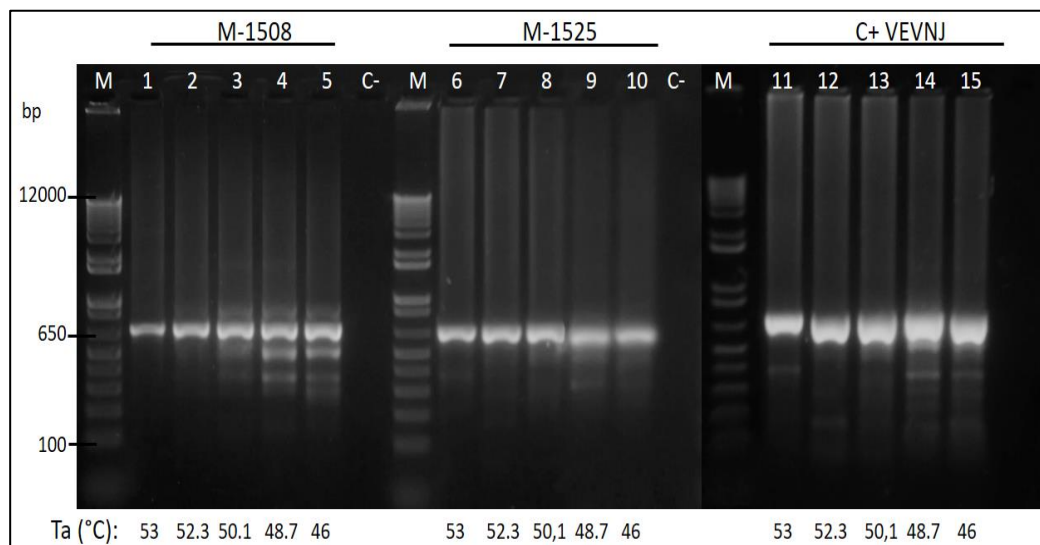


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de temperatura de hibridación para los cebadores de VEVNJ (744-R y 102-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1, 2, 3, 4, 5: muestra 1286, Carriles 7, 8, 9, 10, 11: control positivo, carriles 13, 14, 15, 16, 17 muestra, Carriles 6 y 18: control negativo.

Para disminuir el barrido y grosor de la banda se ensayaron tres concentraciones de cloruro de magnesio: 1, 1.5 y 2 mM con un ADNc de muestra de bovino y un control positivo de referencia de VEVNJ. La banda más delgada e intensa, que no muestra además bandas inespecíficas (figura 14), se observó usando una concentración de 1mM, la cual se tomó como ideal para continuar con la optimización.

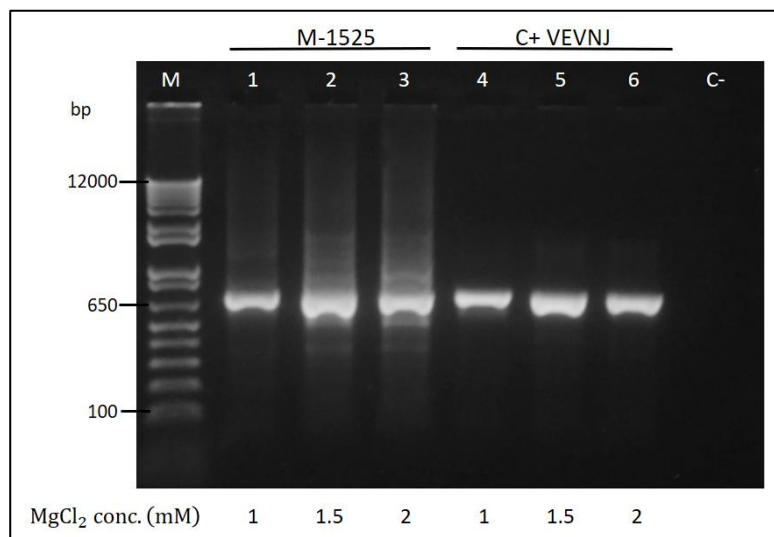


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de cloruro de magnesio utilizando los cebadores de VEVNJ (744-R y 102-F). M: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen) Carriles 1-3: M-1525. Carriles 4-6: Control positivo de VEVNJ. C-: control negativo.

Finalmente se evaluó la concentración óptima de cebadores usando una muestra de epitelio bovino y un control positivo de VEVNJ. No se observa diferencia entre las concentraciones de 0.5 y 0.4 μ M, ya que en ambos casos la banda intensa y bien definida, además la banda de 0.3 μ M está muy clara y definida, aunque posee menor intensidad, por lo tanto, se ha decidido usar esta como la óptima para el ensayo (figura 15).

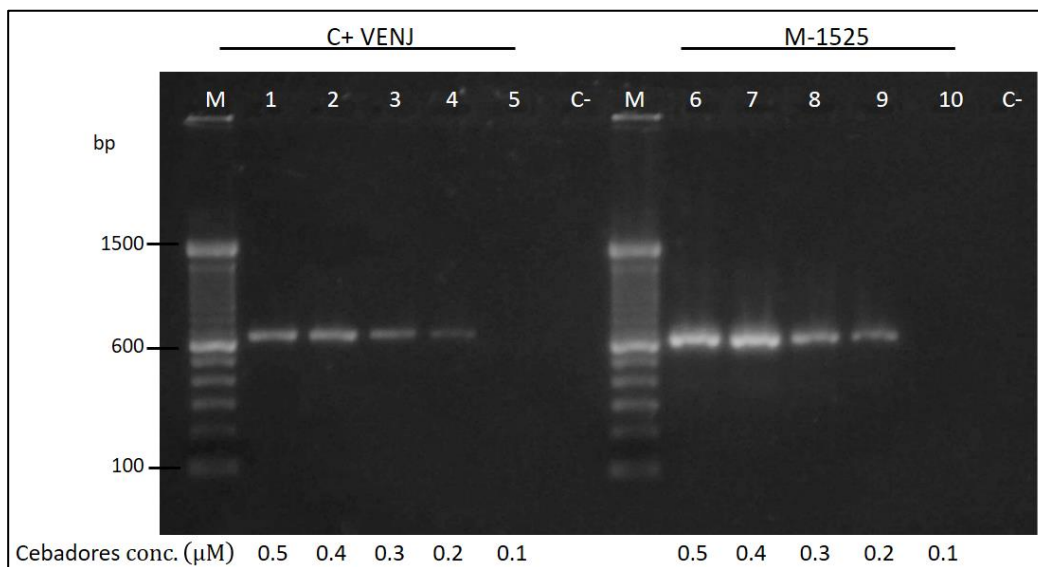


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del gradiente de concentración de cebadores utilizando los cebadores de VEVNJ (744-R y 102-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen) Carriles 1-5: Control positivo de VEVNJ. Carriles 6-10: M-1525. C-: control negativo.

4.3 Determinación de la sensibilidad analítica de la técnica y del límite mínimo de detección de VEVI-3

La sensibilidad analítica se determinó a partir de un producto de PCR amplificado y purificado en gel; para ello se partió de un producto purificado con una concentración de 100 ng/μl. La concentración mínima detectable en agua fue de 1×10^{-5} ng/μl, con una banda tenue, el ensayo se realizó por triplicado obteniendo el mismo resultado en todos los casos (figura 16).

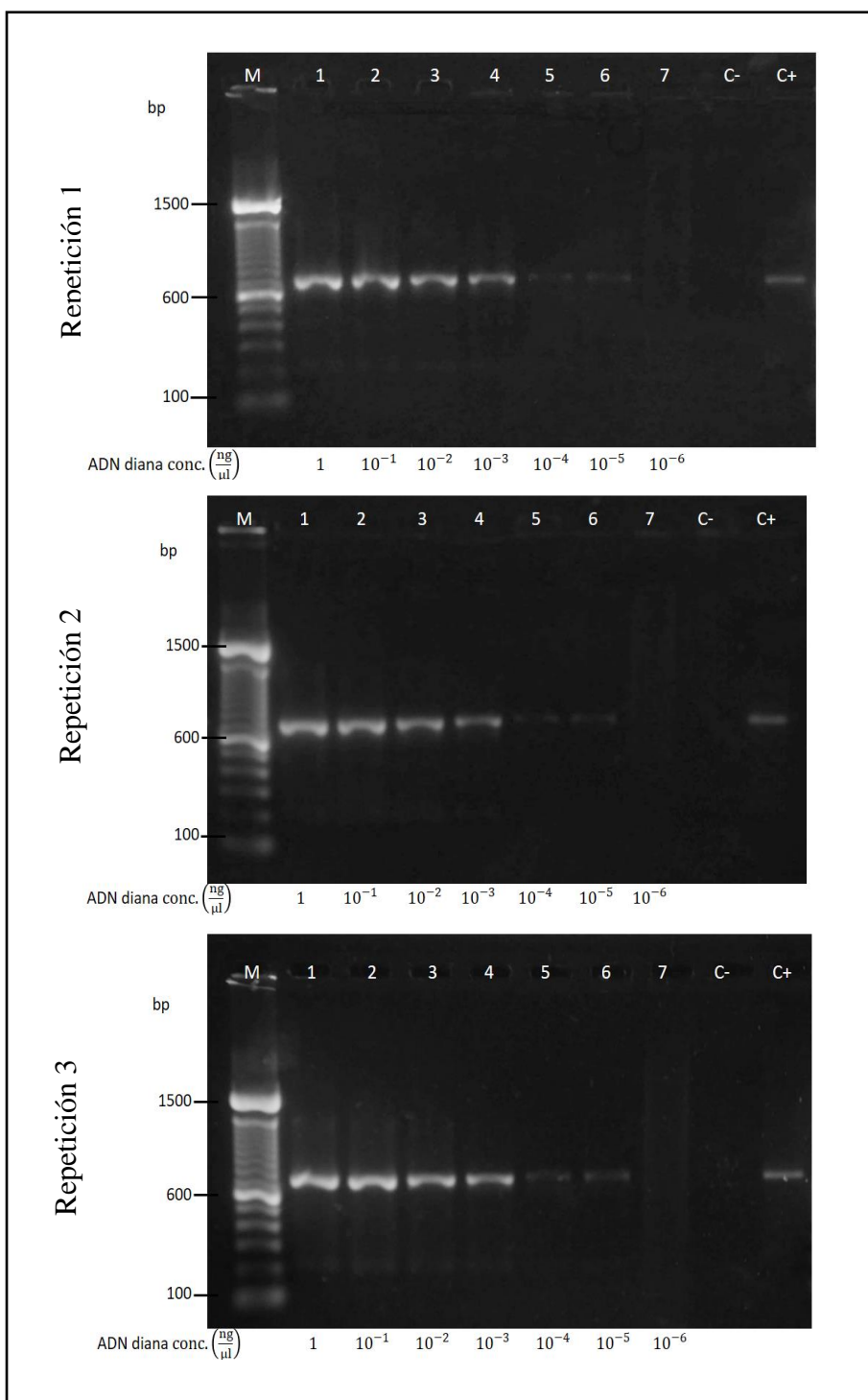


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del límite de detección al diluir el producto en agua utilizando los cebadores de VIVI-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen). Carriles 1-7: Producto purificado en concentraciones decrecientes. C+: control positivo de VIVI-3. C-: control negativo.

La concentración mínima detectable en ADNc de células epiteliales bovinos fue de 1×10^{-5} ng/ μ l, sin embargo, en este caso la banda es ligeramente más intensa y se observa un barrido que acompaña a las bandas, el ensayo se realizó por triplicado obteniendo el mismo resultado en todos los casos (figura 17).

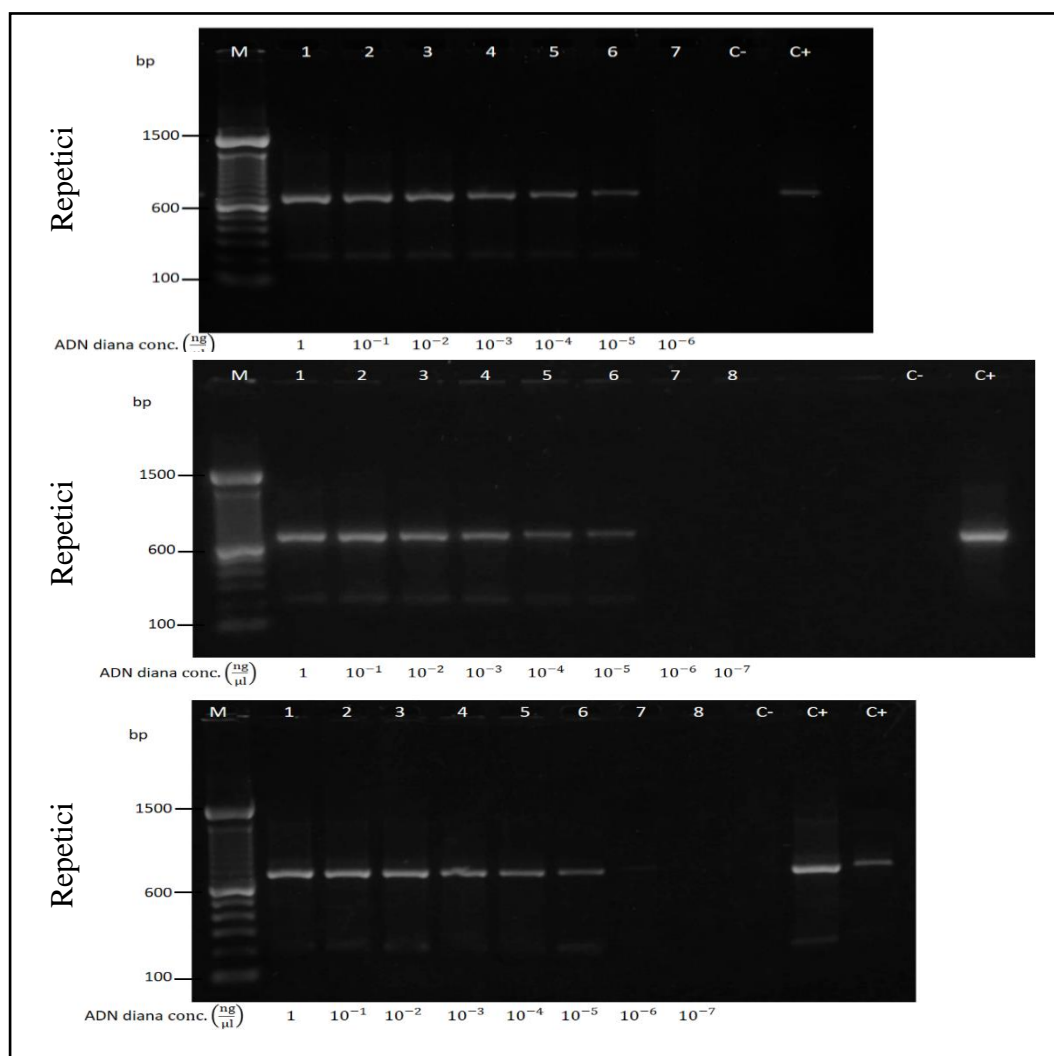


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del límite de detección al diluir el producto en ADNc utilizando los cebadores de VEV1-3 (711-R y JX-F). M: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen). Carriles 1-7: Producto purificado en concentraciones decrecientes. C+: control positivo de VEV1-3. C-: control negativo.

4.4 Determinación de la sensibilidad analítica de la técnica y del límite mínimo de detección de VEVNJ

Para determinar la sensibilidad analítica y el límite mínimo de detección se utilizó producto de PCR amplificado y purificado con una concentración inicial de 100 ng/μl. La concentración mínima detectable en agua fue de 1×10^{-6} ng/μl, en donde se observa una banda poco intensa. El ensayo se realizó por triplicado obteniendo el mismo resultado en todos los casos (figura 18).

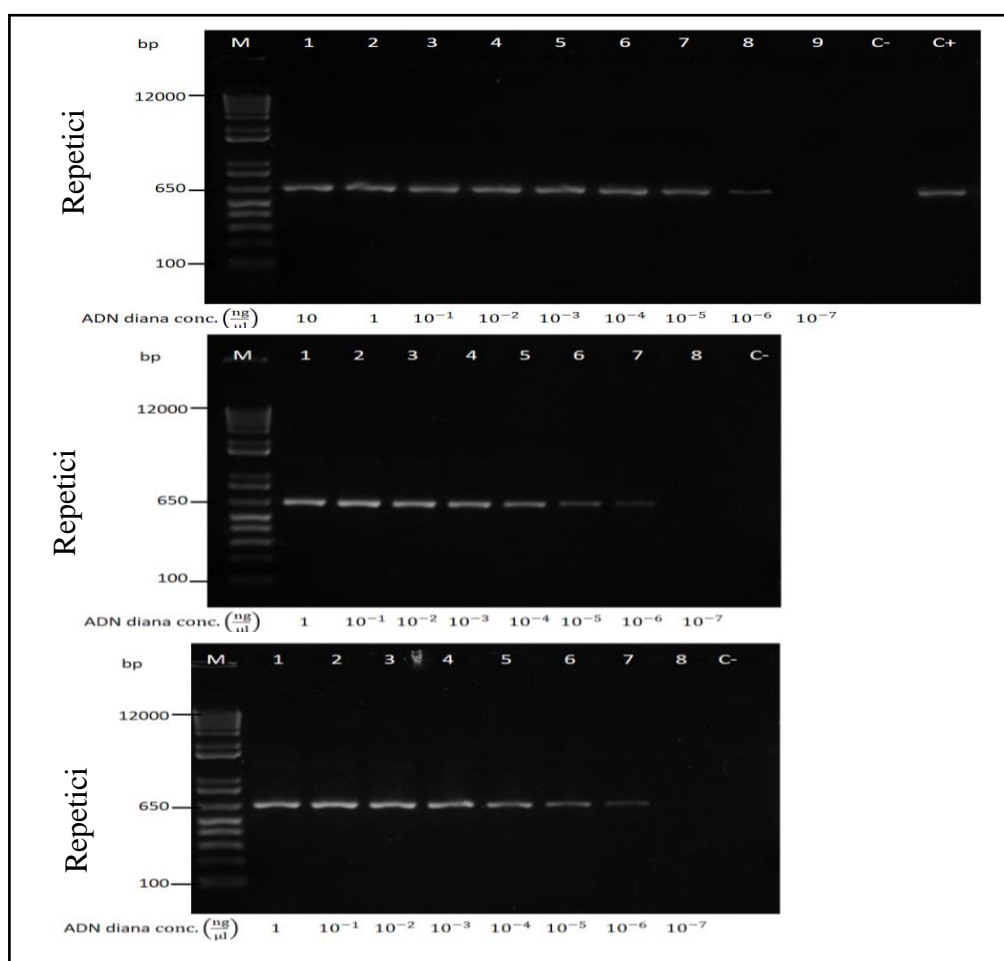


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del límite de detección al diluir el producto en agua utilizando los cebadores de VEVNJ (102-R y 744-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-7: Producto purificado en concentraciones decrecientes. C+: control positivo de VEVNJ. C-: control negativo.

La concentración mínima detectable en ADNc de células epiteliales bovinas fue también de 1×10^{-6} ng/ μ l, en donde se observan bandas más intensas que en el anterior ensayo. El ensayo se realizó por triplicado obteniendo el mismo resultado en todos los casos (figura 19).

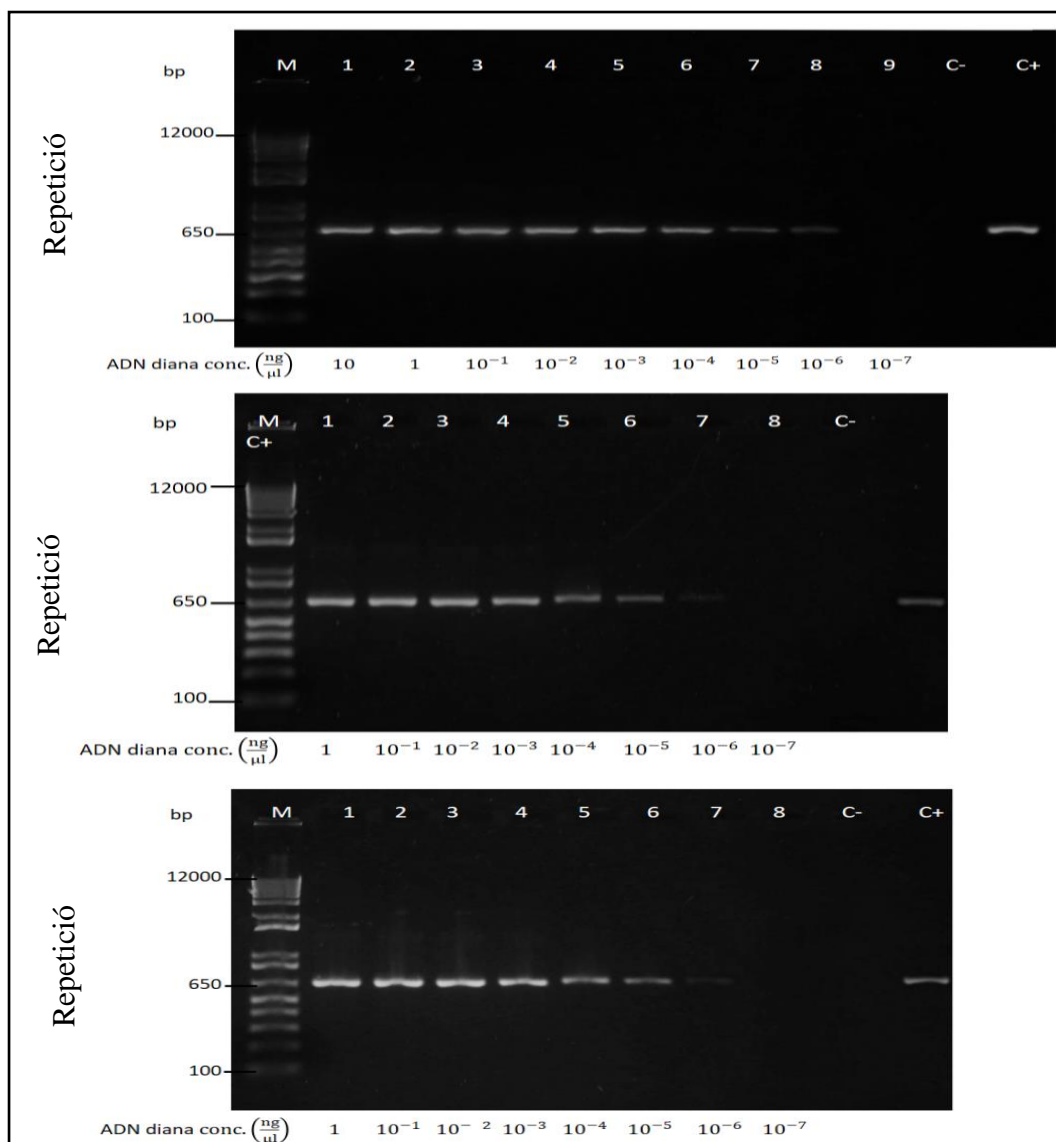


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del límite de detección al diluir el producto en ADNc utilizando los cebadores de VEVNJ (102-R y 744-F). M: Marcador molecular 1Kb (Invitrogen). Carriles 1-7: Producto purificado en concentraciones decrecientes. C+: control positivo de VEVNJ. C-: control negativo.

4.5 Determinación de la especificidad analítica para la detección de VEVI-3.

Para determinar la especificidad analítica del diagnóstico, se realizó una PCR con los parámetros ya optimizados de una muestra de epitelio bovino, el control positivo de referencia de fiebre aftosa y el control positivo de referencia de VEVI-3 (figura 20). Como resultado se observa una banda intensa en la muestra de epitelio bovino, y una banda menos intensa en el control positivo de VEVI-3; y es negativo cuando se ha utilizado como diana el control de FA.

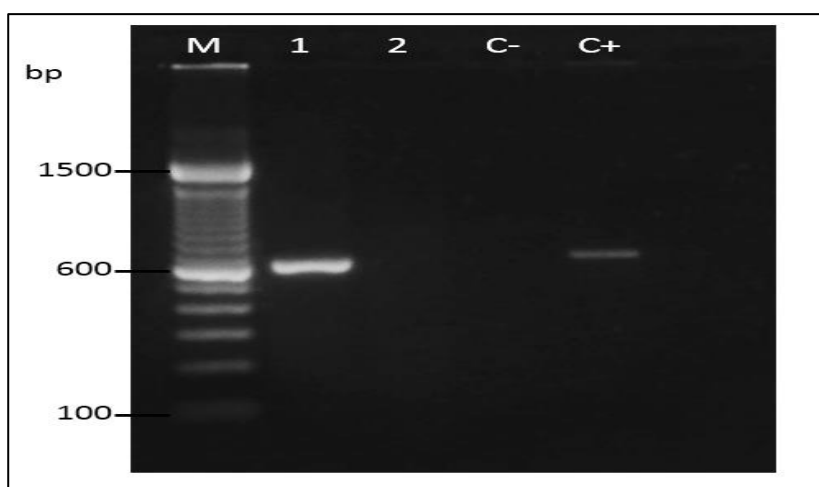


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del ensayo de especificidad analítica utilizando los cebadores de VEVI-3 (711-R y JX-F). M: marcador molecular de 100 pb (Invitrogen), Carril 1: muestra, carril 2: Control FA, C-: control negativo, C+: control positivo Ind-3.

4.6 Determinación de la especificidad analítica para la detección de VEVNJ.

Para determinar la especificidad analítica, al igual que en el caso de VEVI-3, se realizó una PCR con los parámetros optimizados de una muestra de epitelio bovino, el control positivo de referencia de fiebre aftosa y el control positivo de referencia de VEVNJ (figura 21). Se observa que el diagnóstico es positivo tanto para la muestra de epitelio bovino como para control positivo de referencia de VEVNJ y es negativo para el control de FA.

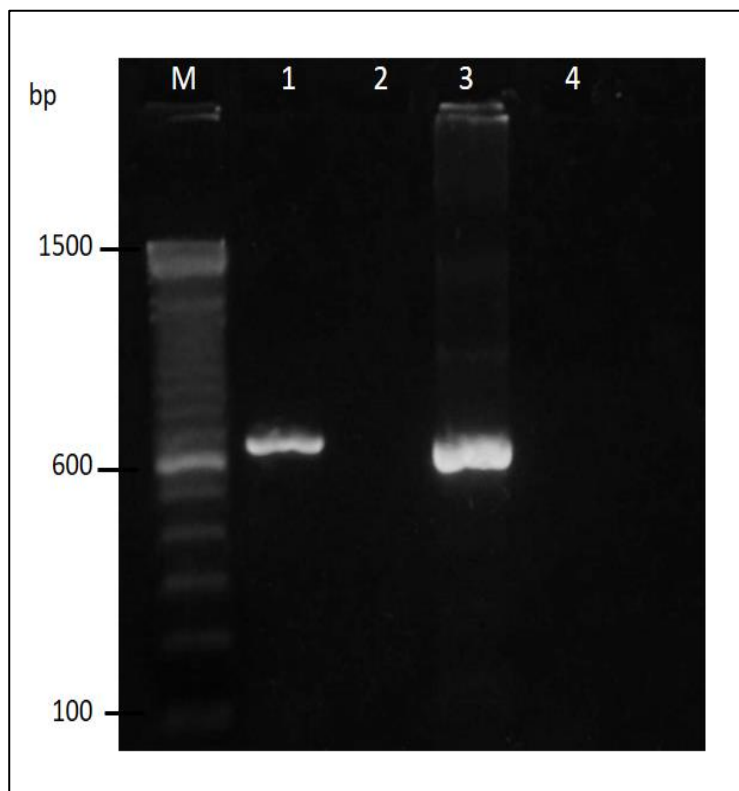


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en donde se visualizan los resultados del ensayo de especificidad analítica utilizando los cebadores de VEVNJ (744-R y 102-F). M: marcador molecular de 100 pb (Invitrogen), Carril 1: muestra, carril 2: control+ FA, carril 3: control positivo VEVNJ, carril 4: control negativo.

4.7 Diagnóstico de VEVI-3 mediante la técnica molecular de PCR en muestras de epitelio bovino.

Las concentraciones y volúmenes empleados en la máster mix para la PCR estandarizada y optimizada para el diagnóstico de VEVI-3 se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6

Concentraciones iniciales y finales, y volumen final empleado para la preparación de una reacción de PCR para el diagnóstico de VEVI-3.

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen 1 Rx(μl) |
|-------------------------|-----------------------|---------------------|------------------|
| H ₂ O | | | 28.55 |
| Buffer PCR | 5X | 1X | 10 |
| MgCl ₂ | 25mM | 2.0mM | 4 |
| DNTPs | 10mM | 0.2mM | 1 |
| Primer P-NJ 102 F | 25μM | 0.3 μM | 0.6 |
| Primer P-NJ 744 R | 25μM | 0.3 μM | 0.6 |
| Enzima Go Taq Hot Start | 5U/ μl | 1.25U/50 μL | 0.25 |
| TOTAL | | | 45 |

Las temperaturas y tiempos de amplificación empleado en el perfil térmico de la PCR para el diagnóstico de VEVI-3 se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7

Perfil térmico para la amplificación por PCR para el diagnóstico de VEVI-3.

| N° DE CICLOS | TEMPERATURA °C | TIEMPO MIN: SEG |
|--------------|----------------|-----------------|
| 1 | 94 | 05:00 |
| | 94 | 01:00 |
| 40 veces | 49.9 | 01:00 |
| | 72 | 01:00 |
| 1 | 72 | 05:00 |
| 1 | 4 | ∞ |

4.8 Diagnóstico de VEVNJ mediante la técnica molecular de PCR en muestras de epitelio bovino.

Las concentraciones y volúmenes empleados para la PCR estandarizada y optimizada para el diagnóstico de VEVNJ se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8

Concentraciones iniciales y finales, y volumen final empleado para la preparación de una reacción de PCR para el diagnóstico de VEVNJ.

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen 1 Rx (µl) |
|-------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| H ₂ O | | | 30.55 |
| Buffer PCR | 5X | 1X | 10 |
| MgCl ₂ | 25mM | 1.0mM | 2 |
| DNTPs | 10mM | 0.2mM | 1 |
| Primer P-NJ 102 F | 25µM | 0.3 µM | 0.6 |
| Primer P-NJ 744 R | 25µM | 0.3 µM | 0.6 |
| Enzima Go Taq Hot Start | 5U/ µl | 1.25U/50 µL | 0.25 |
| TOTAL | | | 45 |

Las temperaturas y tiempos de amplificación empleado en el perfil térmico de la PCR para el diagnóstico de VEVNJ se detalla en la Tabla 9.

Tabla 9

Perfil térmico para la amplificación por PCR para el diagnóstico de VEVNJ.

| N° DE CICLOS | TEMPERATURA °C | TIEMPO MIN: SEG |
|---------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | 94 | 05:00 |
| | 94 | 01:00 |
| 40 veces | 50.1 | 01:00 |
| | 72 | 01:00 |
| 1 | 72 | 05:00 |
| 1 | 4 | ∞ |

4.9 Secuenciación automatizada de los productos amplificados

Los productos de PCR amplificados de las muestras de epitelio bovino fueron cuantificados en gel de agarosa al 1.5% (p/v), obteniéndose una concentración entre 100 y 150 ng/µl. Los productos fueron enviados a la empresa MacroGen para su secuenciación y los resultados fueron remitidos en formato AB1 y FASTA.

Se realizó el alineamiento de las secuencias sentido con las secuencias anti-sentido y se limpiaron utilizando el software Geneious® 10.2.2, se obtuvo una secuencia consenso para cada alineamiento, la cual se analizó en base a los cromatogramas, observando el porcentaje de las bases que poseían una alta calidad (HQ%, por sus siglas en inglés). Se descartaron todas las secuencias que poseían un valor inferior a 85%, debido a que la baja calidad de los bases puede generar resultados poco confiables en las relaciones observadas en el árbol filogenético. Se crearon secuencias consenso en formato FASTA.

Se realizó un análisis de similitud y homología de secuencias consenso utilizando el software BLAST, confirmándose que todas las secuencias obtenidas son homologas con el gen de la fosfoproteína P del virus de estomatitis vesicular, a excepción de dos secuencias: M1299 y M1473, las cuales muestran tener mayor identidad con secuencias de *Vos Taurus*, por lo que estas muestras fueron descartadas para futuros análisis. Se obtuvieron en total 19 secuencias de muestras provenientes a distintas zonas de la región Costa y Oriente del Ecuador.

Se analizaron también las secuencias obtenidas de la purificación de las bandas inespecíficas de VEVI-2 de 1000 pb (figura 9), las cuales mostraron un alto porcentaje de identidad con secuencias de *Bos Taurus*.

4.10 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

Las 19 secuencias de nucleótidos fueron traducidas a proteínas obteniéndose secuencias de aminoácidos.

El árbol filogenético se construyó utilizando el método de máxima verosimilitud utilizando el software MEGA 7 obteniéndose como resultado la figura 22. Se observa claramente los cuatro

grupos serológicos, de donde VEVI-1, VEVI-2 y VEVI-3 están estrechamente relacionados y forman un grupo monofilético, donde VEVI-2 es ancestral a VEVI-1 y VEVI-3.

Todas las muestras que en este estudio se habían determinado, previamente, como positivas a VEVI-3, se agrupan junto a dentro del clado de VEVI-1, indicando que estas muestras en realidad no pertenecen al serotipo VEVI-3.

Las muestras M1240, M1286, M1288, M1257 y M1259, que antes habían sido determinadas como VEVI-3 positivas, están agrupadas con las muestras M1178 y M1304, este grupo es ancestral al grupo de las muestras M1492 y M1129, las cuales se han agrupado con una muestra recolectada en Ecuador en el año 2001 (EF28138.1) y están estrechamente relacionadas con muestras provenientes de El Salvador, Costa Rica y Estados Unidos.

Ninguna secuencia obtenida en este estudio se ha agrupado en los clados de VEVI-2 o VEVI-3, por lo tanto, se descarta la posibilidad de la presencia de estos serotipos virales en Ecuador.

Todas las muestras que fueron determinadas como VEVNJ positivas se han agrupado en el clado de VEVNJ, por lo que este diagnóstico sí es certero. Las secuencias de VEVNJ obtenidas en este estudio están muy relacionadas con aquellas obtenidas en el 2004. También se observa que las secuencias se agrupan de acuerdo a la proximidad geográfica del lugar de origen, hay un grupo de Ecuador, otro de México y USA y una única secuencia de Costa Rica.

| | | | | |
|-----|------------|------------------|------|--|
| | EF028145.1 | Ecuador | 2004 | |
| | EF028142.1 | Ecuador | 2004 | |
| | EF028150.1 | Ecuador | 2004 | |
| | EF028147.1 | Ecuador | 2004 | |
| 76 | EF028149.1 | Ecuador | 2004 | |
| | EF028146.1 | Ecuador | 2004 | |
| 42 | EF028151.1 | Ecuador | 2004 | |
| | EF028144.1 | Ecuador | 2004 | |
| | EF028143.1 | Ecuador | 2004 | |
| | EF028140.1 | Ecuador | 2004 | |
| 91 | EF028148.1 | Ecuador | 2004 | |
| | EF028141.1 | Ecuador | 2004 | |
| | M1508 | Zamora Chinchipe | 2016 | |
| | M1372 | Zamora Chinchipe | 2017 | |
| | M1373 | Zamora Chinchipe | 2016 | |
| 76 | M1818 | Morona Santiago | 2016 | |
| 76 | M41 | Napo | 2017 | |
| | M1525 | Pastaza | 2016 | |
| 62 | M1700 | Morona Santiago | 2016 | |
| | M72 | Zamora Chinchipe | 2016 | |
| 100 | M204 | Zamora Chinchipe | 2017 | |
| | EF028139.1 | Costa Rica | 2004 | |
| | KF772602.1 | Mexico | 2008 | |
| 100 | KF772604.1 | Mexico | 2010 | |
| | KF772606.1 | Mexico | 2010 | |
| 50 | KF772577.1 | Mexico | 2005 | |
| 91 | KF772578.1 | Mexico | 2005 | |
| 50 | KF772601.1 | Mexico | 2001 | |
| 51 | FJ595505.1 | USA | 2006 | |
| 98 | FJ595504.1 | USA | 2006 | |

VEVNJ

CONTINÚA

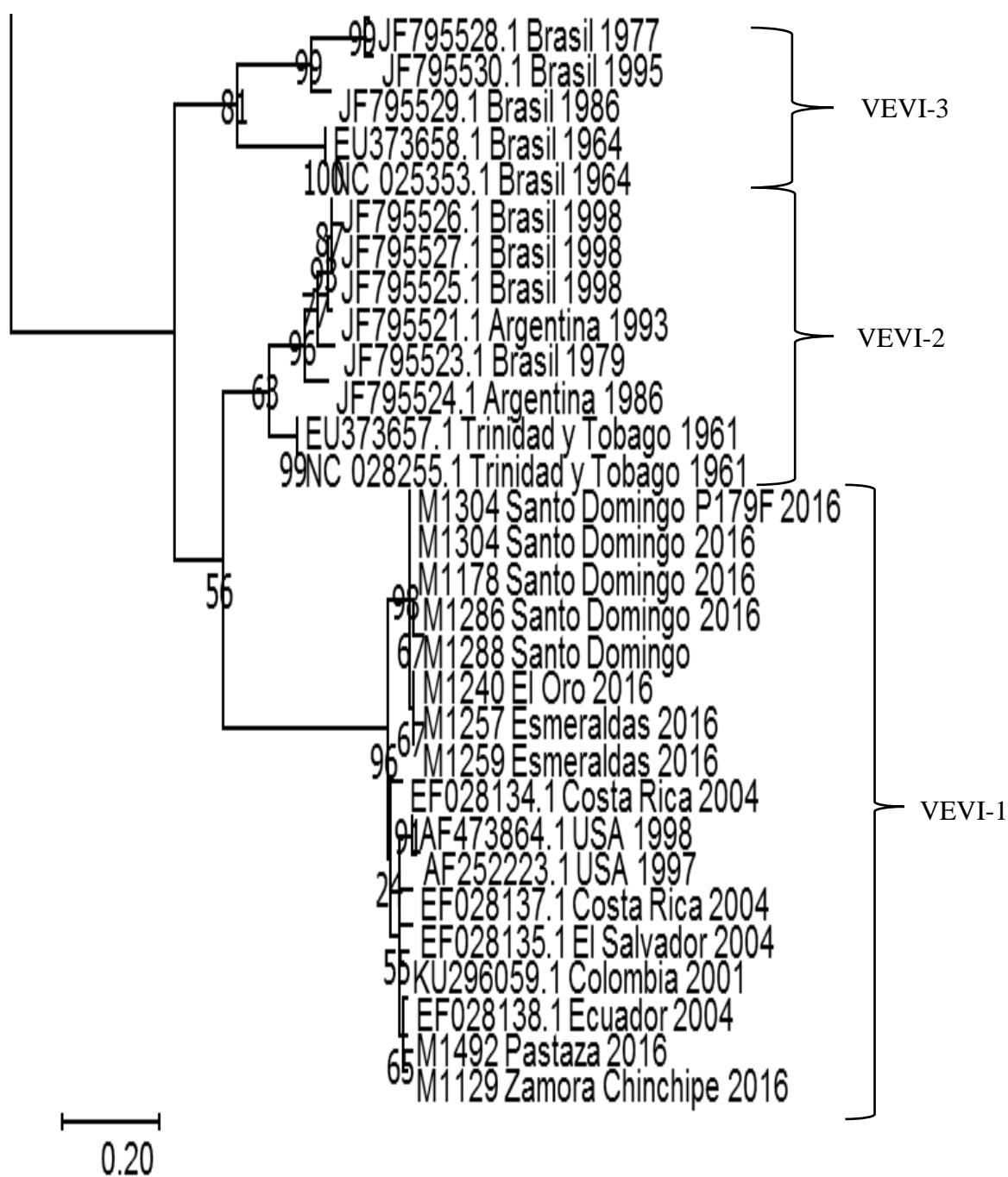


Figura 22. Árbol filogenético del virus de estomatitis vesicular utilizando método de máxima verosimilitud de MEGA 7

CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN

El diagnóstico de VEV actualmente se realiza por medio de la observación de los síntomas clínicos, cultivo celular y ELISA (Alonso et al., 1991), sin embargo en muchos casos la concentración de virus presente en muestras de campo no es suficiente para detectar los antígenos y es necesario realizar un cultivo celular primero (Sepúlveda et al., 2007), lo que retrasa el diagnóstico de la enfermedad. Al usar el método de diagnóstico por medio de RT-PCR se reduce el tiempo necesario para el diagnóstico a uno o dos días y permite discriminar entre los diferentes subtipos de VEV.

El método de extracción de ARN del VEV utilizando el reactivo TRIzol es un método de un solo paso para el aislamiento de ARN basado en extracción con isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (Simms, Cizdziel, & Chomczynski, 1993) y en este ensayo ha probado ser eficiente en cuanto al tiempo requerido para la obtención de ARN, sin sacrificar la calidad del mismo cuando se parte de muestras de epitelio, lo cual es de gran utilidad, ya que permite la detección del virus directamente de la matriz sin necesidad de pasar primero por un cultivo celular, ahorrando tiempo y recursos para el diagnóstico.

En este estudio se han probado los cebadores descritos por Sepúlveda et al. (2007) para el diagnóstico del VEVI-1 y VEVNJ, los cuales ya habían probado ser eficientes en muestras de campo recolectadas en Ecuador en el año 2004. En el laboratorio de AGROCALIDAD la técnica se estandarizó con controles de referencia en el año 2014, pero no es sino hasta el año 2016, con este proyecto, que se busca estandarizar y optimizar el protocolo para muestras de epitelio, sin embargo, solo se logró la estandarización y optimización de la técnica diagnóstica para el subtipo New Jersey, puesto que en el caso de VEVI-1 se observa la presencia de bandas inespecíficas al

utilizar muestras de epitelio recolectadas en campo, las cuales dificultan el diagnóstico de la enfermedad, no obstante, dichos productos inespecíficos no se observan en la amplificación del control positivo de referencia. La causa de los productos inespecíficos es desconocida, aunque se cree que se debe a la hibridación no específica de los cebadores con otras regiones del genoma viral. Finalmente, la banda de interés de 642 pb se purificó y secuenció, comprobándose que el fragmento amplificado corresponde a la secuencia parcial de la fosfoproteína P de VEV1-1.

Para el diagnóstico de VEVNJ, el protocolo se estandarizó en base al establecido por Sepúlveda et al. (2007), pero se realizaron ciertas modificaciones para lograr su optimización. El perfil se térmico se mantuvo intacto en cuanto a tiempo y temperatura de los ciclos con la única variación en la temperatura de hibridación a 49.9°C. Los componentes de la RT-PCR se utilizó el cloruro de magnesio a una concentración de 1mM y la concentración de los cebadores se estableció a 0.3 µM. Estas diferencias se deben a las diferentes condiciones en las que se realizó el ensayo, tales como la temperatura ambiental, localización geográfica, casa comercial de los equipos y reactivos utilizados. En todos los ensayos de estandarización, se contó con el control de referencia de VEVNJ y una muestra de epitelio, obteniéndose resultados similares para ambos casos.

La sensibilidad analítica se debe realizar en base a una muestra estándar bien definida (World Organisation for Animal Health (OIE) 2006), es este estudio la muestra estándar utilizada fue el producto amplificado de PCR purificado y cuantificado, ya que este consiste en varias copias del fragmento de interés. Se determinó que la técnica puede detectar hasta $10^{-6} \frac{ng}{\mu l}$ lo que equivale a $1 \frac{fg}{\mu l}$, esto es comparable al estudio de Sepúlveda et al. (2007), en donde se determinó la sensibilidad analítica en base a la dosis infectiva viral en cultivo celular y se encontró que la técnica podía

detectar hasta una dilución de 10^{-5} del título viral, la variación en ambos casos se debe a los cambios que se realizaron en la estandarización del protocolo y de las condiciones ambientales. No hubo una diferencia notable entre el producto diluido en agua y el diluido en ADNc de células epiteliales, por lo que se descarta la presencia de inhibidores de PCR en las células epiteliales bovinas.

La técnica probó ser específica para VEVNJ puesto que fallo al amplificar el virus de la fiebre aftosa, el cual es una enfermedad vesicular clínicamente similar a VEV.

En este estudio también se probaron los cebadores para VEVI-2 y VEVI-3, cuyas secuencias fueron facilitadas por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa – OPS/OMS, los cuales fueron diseñados en base a las secuencias publicadas.

Se demostró que los cebadores utilizados para VEVI-2: 66F y 711R, no pueden utilizarse para el diagnóstico de la enfermedad, puesto que al purificarse el producto obtenido y secuenciarlo, se encontró que este posee un alto porcentaje de identidad con secuencias del cromosoma Y de *Bos Taurus*, indicando la hibridación de los cebadores con el genoma del huésped dando como resultado un falso positivo.

La estandarización y optimización de la RT-PCR para la detección de VEVI-3, se basó en el protocolo establecido por Sepúlveda et al. (2007), puesto que se intentaron mantener las mismas condiciones para optimizar recursos. Se modificó la temperatura de hibridación a 50.1°C , manteniendo el resto de condiciones del perfil térmico. Para la estandarización se utilizó dos muestras de campo y un control de referencia, en algunos casos el control era tenue o las muestras de campo generaban productos no específicos, por lo que las modificaciones tuvieron que realizarse

de tal manera que incrementen la intensidad de la banda del control positivo sin generar productos inespecíficos en las muestras de epitelio, de tal manera, en la master mix, se utilizó una concentración de 2mM de cloruro de magnesio y la concentración de los cebadores se fijó a $0.3\mu\text{M}$.

El límite de detección de la técnica fue de $10^{-5} \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ lo que equivale a $0.1 \frac{\text{fg}}{\mu\text{l}}$, lo cual se confirmó al realizar tres repeticiones del ensayo, no hay evidencia de un análisis de sensibilidad analítica con los cebadores de VEVI-3 en otros estudios. En el ensayo del producto de PCR diluido en ADNc muestra una banda no específica de 200 pb, la cual se debe algún tipo de interacción inespecífica de los cebadores con el material genético de las células epiteliales bovinas o por la re-amplificación del producto de PCR tal como Höfner, Carpenter, & Donaldson (1993) describen, sin embargo, esta banda no interfiere con el diagnóstico de la enfermedad.

La técnica estandarizada fue específica para VEVI-3, ya que no amplificó el virus de la fiebre aftosa.

Sepúlveda et al. (2007) indica que los cebadores utilizados en este estudio reconocen al gen de la fosfoproteína P, por lo que es factible realizar un análisis filogenético de los subtipos de virus de estomatitis vesicular para comprender los mecanismos y factores involucrados en la epidemiología de la enfermedad en el Ecuador.

Los productos amplificados se enviaron para su secuenciación a la empresa MacroGen Inc. (2017), quienes especifican que la calidad de la secuencia obtenida depende de la pureza del ADN molde enviado, por ello los productos se purificaron en gel para eliminar cebadores o restos de dNTPs, también indican que la concentración influye en la calidad de la secuencia, por ello todos los productos enviados poseían una concentración superior a 100 ng/ul.

Se evaluó la homología de las secuencias obtenidas con las secuencias en la base de datos de NCBI, para esto se tomó en cuenta el porcentaje de cobertura, el porcentaje de identidad y el valor E. En todos los casos se obtuvo un porcentaje de cobertura superior al 100 %, según el portal NCBI (2010), esto corresponde al porcentaje de la secuencia en la base de datos que se superpone a la secuencia diana. En cuanto al porcentaje de identidad máximo, se obtuvieron valores superiores a 96%, esto se debe a que existen ciertas incompatibilidades entre la secuencia de la base de datos y la diana, finalmente este valor se corresponde con el valor E o valor esperado, el cual indica la probabilidad de que las coincidencias entre ambas secuencias ocurran por azar y no por homología, de tal manera que mientras más cercano a cero sea, más significativa sea la puntuación.

En este estudio se utilizó una porción del gen de la fosfoproteína P (~650 pb), esto debido a que, a diferencia de las otras proteínas estructurales del virus, esta secuencia del gen es más divergente a nivel de proteína entre los grupos VEVNJ y VEVI, gracias a su región hipervariable tal como lo describe Pauszek et al. (2008).

Al obtener información sobre la epidemiología de la infección con VEV, dicho conocimiento permitiría establecer diferencias entre el comportamiento esperado de una potencial epidemia de fiebre aftosa y de VEV, para desarrollar estrategias de control y prevención efectivas para ambas enfermedades. Varios estudios se han centrado en la caracterización molecular y epidemiología molecular del virus en diferentes regiones de América (Pauszek et al., 2008, 2011; Perez et al., 2010; Rainwater-Lovett, Pauszek, Kelley, & Rodriguez, 2007) sin embargo en ninguno se han utilizado muestras de virus aisladas recientemente en el Ecuador.

El análisis filogenético en este estudio se realizó con base en la secuencia de aminoácidos, puesto que las secuencias de nucleótidos obtenidas son altamente variables y no permiten un alineamiento aceptable de residuos homólogos. El árbol se construyó utilizando el método de la máxima verosimilitud, el cual ya había sido utilizado anteriormente para analizar este virus por Pauszek et al. (2011). El análisis filogenético muestra que VEVI-3 es ancestral a VEVI-2 y VEVI-1, lo cual es consistente con el análisis de clusters basado en serología realizado por Pauszek et al. (2011).

Las secuencias obtenidas con los cebadores de VEVNJ (102-F y 744-R) pertenecen al mismo grupo de las secuencias de referencia de VEVNJ, por lo que estos cebadores son específicos para el virus y pueden ser utilizados en futuros ensayos.

Todas las secuencias obtenidas en este proyecto pertenecientes al serotipo VEVNJ provienen de la región Oriente del Ecuador, y se encuentran estrechamente relacionadas con las secuencias obtenidas en el Ecuador en el año 2004 por Sepúlveda et al. (2007), esto indica el relativamente bajo nivel de variación entre los virus recolectados con 13 años de diferencia en Ecuador, lo cual es consistente con el observado en aislados de VEVNJ en América descrito por Rodríguez (2002), esto indica la existencia de limitaciones evolutivas, se ha determinado que el VEV permanece relativamente estable en las áreas endémicas.

Las secuencias obtenidas con los cebadores de VEVI-3, pertenecen en realidad al serotipo VEVI-1, esto confirma la ausencia del serotipo VEVI-3 en Ecuador confirmándose que este se limita a las regiones de Brasil y Argentina (Pauszek et al., 2008). Por lo tanto, la PCR para detectar

VEVI-3 con los cebadores indicados no es específica para el serotipo viral, causando un diagnóstico errado.

Las secuencias obtenidas de VEVI-1 en este proyecto se dividen notoriamente en dos grupos: uno perteneciente a la región Costa y otro perteneciente a la región Oriente; este último también se agrupa con las secuencia de una muestra recolectada en Ecuador en 2004 descrita por Sepúlveda et al. (2007) y con secuencias provenientes de Colombia, Centro América y estados Unidos, según Velazquez-Salinas et al. (2014) los factores geográficos o ecológicos son más determinantes para las relaciones evolutivas del VEV que los factores asociados a tiempo o al huésped.

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES

- No se logró la estandarización y optimización del VEVI-1 debido a la presencia de productos inespecíficos, pero al purificar la banda de interés, se comprobó que este sí corresponde al VEVI-1 y puede servir como método diagnóstico de la enfermedad.
- La estandarización y optimización de la técnica de PCR para la detección de VEVI-3 requirió una temperatura de hibridación de 50.1°C, concentración de cloruro de magnesio de 2mM y concentración de cebadores de 0.3uM, dando como resultado una banda de aproximadamente 650 pb.
- El método de detección de VEVI-3 mostro ser muy sensible para detección de fragmentos de ADN amplificados, detectando hasta 0.1 fg/ul de este; además también mostro ser especifico al no amplificar a otra enfermedad vesicular como lo es fiebre aftosa.
- Se logró la estandarización y optimización del protocolo de PCR para la detección de VEVNJ estableciendo la temperatura de hibridación a 49.9°C, la concentración de cloruro de magnesio a 1mM y concentración de cebadores a 0.3uM, dando como resultado una banda de aproximadamente 650 pb.
- El límite mínimo de detección de VEVNJ fue de 1 fg/ul de fragmentos de ADN amplificados, lo que indica una elevada sensibilidad; así mismo, la técnica demostró ser específica al obtenerse un resultado negativo en la amplificación del virus de fiebre aftosa.

- El análisis filogenético basado en el alineamiento múltiple de aminoácidos, mostró la existencia de cuatro grupos principales (VEVI-1, VEVI-2, VEVI-3 y VEVNJ) donde las secuencias obtenidas en este proyecto se agrupan únicamente en VEVI-1 o VEVNJ.
- El diagnóstico de VEVI-3 no es efectivo y específico, puesto que las secuencias obtenidas con los cebadores de VEVI-3 (JX-F y 711-R) no corresponden a secuencias pertenecientes al grupo VEVI-3 y por lo tanto no pueden usarse para este diagnóstico.
- Las secuencias obtenidas con los cebadores de VEVNJ (102-F y 744-R) si son específicas para este serotipo viral, puesto que, al ser analizadas filogenéticamente, estas pertenecen al grupo de VEVNJ.

CAPÍTULO 7 RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un nuevo diseño de cebadores para el diagnóstico de VEVI-1, VEVI-2 y VEVI-3 en base a las secuencias de la base de datos de NCBI y a las secuencias obtenidas en el presente estudio.
- Se recomienda realizar cultivo celular de las muestras recolectadas en este estudio, de tal manera que los aislados se puedan almacenar y enviar para una secuenciación de genoma completo obteniendo secuencias que faciliten el diseño de cebadores específicos.
- Una vez que se obtengan cebadores específicos, es recomendable realizar las pruebas nuevamente a las muestras, que en un inicio fueron catalogadas como VEVI-2 y VEVI-3, para confirmar los resultados de este estudio.
- Es recomendable continuar con la recolección de muestras de VEV, para profundizar en la información epidemiológica y geográfica del VEV en Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, A., Martins, M. A., Gomes, M. da P., Allende, R., & Söndahl, M. S. (1991). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing, and subtyping of vesicular stomatitis virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, 3(4), 287–292.
- Banerjee, A. K., & Barik, S. (1992). Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology*, 188(2), 417–428. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90495-B](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90495-B)
- Centro Panamericano de Fiebre Aftosa – OPS/OMS. (2009). *INFORME ANUAL 2009 LABORATORIO*. Recuperado a partir de http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=151
- El Productor. (2014). Noticias Agropecuarias y Agrícolas del Ecuador y el Mundo – Periodico El Productor – Elproductor.com. Recuperado a partir de <http://elproductor.com/2014/02/03/ecuador-estomatitis-vesicular-afecta-a-bovinos-en-la-provincia/>
- Hanson, R. P. (1952). The natural history of vesicular stomatitis. *Bacteriological Reviews*, 16(3), 179–204.
- Hartl, D. L., & Jones, E. W. (2009). *Genetics: analysis of genes and genomes* (7. ed). Sudbury, Mass: Jones and Bartlett.
- Höfner, M. C., Carpenter, W. C., & Donaldson, A. I. (1993). Detection of foot-and-mouth disease virus RNA in clinical samples and cell culture isolates by amplification of the capsid coding

- region. *Journal of Virological Methods*, 42(1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(93\)90176-R](https://doi.org/10.1016/0166-0934(93)90176-R)
- Kennedy, S. (Ed.). (2011). *PCR troubleshooting and optimization: the essential guide*. Norfolk: Caister Acad. Press.
- Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., & Del Cbarrera, J. (1999). Vesicular Stomatitis. *The Veterinary Journal*, 157(3), 239–260. <https://doi.org/10.1053/tvjl.1998.0303>
- Li, J., & Zhang, Y. (2012). Messenger RNA Cap Methylation in Vesicular Stomatitis Virus, a Prototype of Non-Segmented Negative-Sense RNA Virus. En A. Dricu (Ed.), *Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*. InTech. <https://doi.org/10.5772/54598>
- Nunamaker, R. A., Lockwood, J. A., Stith, C. E., Campbell, C. L., Schell, S. P., Drolet, B. S., ... Letchworth, G. J. (2003). Grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) Could Serve as Reservoirs and Vectors of Vesicular Stomatitis Virus. *Journal of Medical Entomology*, 40(6), 957–963. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.957>
- Patrinos, G. P., Ansoerge, W., & Danielson, P. B. (2017). *Molecular diagnostics*.
- Pauszek, S. J., Allende, R., & Rodriguez, L. L. (2008). Characterization of the full-length genomic sequences of vesicular stomatitis Cocal and Alagoas viruses. *Archives of Virology*, 153(7), 1353–1357. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0113-y>
- Pauszek, S. J., Barrera, J. del C., Goldberg, T., Allende, R., & Rodriguez, L. L. (2011). Genetic and antigenic relationships of vesicular stomatitis viruses from South America. *Archives of Virology*, 156(11), 1961–1968. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1081-1>
- Pauszek, S. J., Schumann, K. R., Bunch, T. A., & Rodriguez, L. L. (2002). Full-length genome analysis of natural isolates of vesicular stomatitis virus (Indiana 1 serotype) from North,

Central and South America. *Journal of General Virology*, 83(10), 2475–2483.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2475>

Perez, A. M., Pauszek, S. J., Jimenez, D., Kelley, W. N., Whedbee, Z., & Rodriguez, L. L. (2010). Spatial and phylogenetic analysis of vesicular stomatitis virus over-wintering in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 93(4), 258–264.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.003>

Rainwater-Lovett, K., Pauszek, S. J., Kelley, W. N., & Rodriguez, L. L. (2007). Molecular epidemiology of vesicular stomatitis New Jersey virus from the 2004–2005 US outbreak indicates a common origin with Mexican strains. *Journal of General Virology*, 88(7), 2042–2051. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82644-0>

Reis Jr, J. ., Mead, D., Rodriguez, L. L., & Brown, C. (2009). Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis viruses. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2(1), 49–57.

Rodríguez, L. L., Fitch, W. M., & Nichol, S. T. (1996). Ecological factors rather than temporal factors dominate the evolution of vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13030–13035.

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)

Rosenberg, M. S. (Ed.). (2009). *Sequence alignment: methods, models, concepts, and strategies*. Berkeley: University of California Press.

Sepúlveda, L. M., Malirat, V., Bergmann, I. E., Mantilla, A., & Nascimento, E. R. do. (2007). Rapid diagnosis of vesicular stomatitis virus in Ecuador by the use of polymerase chain reaction. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 500–506.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300022>

- Simms, D., Cizdziel, P. E., & Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA., *15*(4), 532–535.
- Spickler, A. R. (2016, enero). Vesicular Stomatitis. Recuperado a partir de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/vesicular_stomatitis.pdf
- Velazquez-Salinas, L., Pauszek, S. J., Zarate, S., Basurto-Alcantara, F. J., Verdugo-Rodriguez, A., Perez, A. M., & Rodriguez, L. L. (2014). Phylogeographic characteristics of vesicular stomatitis New Jersey viruses circulating in Mexico from 2005 to 2011 and their relationship to epidemics in the United States. *Virology*, *449*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.10.025>
- Walker, J. M., & Royal Society of Chemistry (Great Britain) (Eds.). (2009). *Molecular biology and biotechnology* (5. ed). Cambridge: RSC Publ. Recuperado a partir de <http://www.gbv.de/dms/bowker/toc/9780854041251.pdf>
- Wilson, W. C., Letchworth, G. J., Jimenez, C., Herrero, M. V., Navarro, R., Paz, P., ... Rodriguez, L. L. (2009). Field Evaluation of a Multiplex Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Vesicular Stomatitis Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *21*(2), 179–186. <https://doi.org/10.1177/104063870902100201>
- World Organisation for Animal Health (OIE). (2004). Animal Health Information: Ecuador. OIE, Paris. Recuperado a partir de ftp://ftp.oie.int/SAM/2004/EQU_E.pdf
- World Organisation for Animal Health (OIE). (2006). Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. OIE, Paris. Recuperado a partir de http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/1.1.3_Validacion_y_control_de_calidad.pdf

World Organisation for Animal Health (OIE). (2015). Vesicular Stomatitis. OIE, Paris. Recuperado

a partir de

[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.23_VESICULAR_S
TOMATITIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.23_VESICULAR_S
TOMATITIS.pdf)

Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews*

Genetics, 13(5), 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>