

**Estandarización de una prueba de diagnóstico del virus de estomatitis vesicular en ganado  
bovino mediante la detección de anticuerpos neutralizantes**

Panchana Torres, Carolina Jacqueline

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Torres Arias, Marbel, PhD

Ing. Maldonado Orbe, Rubén Alexander

9 de septiembre del 2021

## Resultados del análisis de Urkund

### Document Information

Analyzed document Tesis\_Carolina Panchana.pdf (D112585991)  
 Submitted 9/14/2021 8:30:00 PM  
 Submitted by  
 Submitter email biblioteca@espe.edu.ec  
 Similarity 9%  
 Analysis address ilbbiblioteca.GDC@analysis.orkund.com



### Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8427/tesis399.pdf%3Bsequence%3D1">https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8427/tesis399.pdf%3Bsequence%3D1</a> D1 Fetched: 1/19/2021 3:53:02 AM	 7
<b>W</b>	URL: <a href="http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.23_VESICULAR_STOMATITIS.pdf">http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.23_VESICULAR_STOMATITIS.pdf</a> TIS.pdf Fetched: 4/7/2021 1:12:28 AM	 2
<b>SA</b>	<b>Avances.docx</b> Document Avances.docx (D97883346)	 6
<b>W</b>	URL: <a href="https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/1453/html">https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/1453/html</a> Fetched: 7/27/2020 4:45:53 PM	 1
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1603/033.046.0643">https://doi.org/10.1603/033.046.0643</a> Fetched: 9/14/2021 8:32:00 PM	 5
<b>SA</b>	<b>CLopez tesis.txt</b> Document CLopez tesis.txt (D29753088)	 4
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1099/VIR.0.82039-0">https://doi.org/10.1099/VIR.0.82039-0</a> Fetched: 9/14/2021 8:32:00 PM	 4
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/estomatitis-vesicular-enfermedad-confundible-t32342.htm">https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/estomatitis-vesicular-enfermedad-confundible-t32342.htm</a> Fetched: 9/14/2021 8:32:00 PM	 1
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247">https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247</a> Fetched: 9/14/2021 8:32:00 PM	 1
<b>W</b>	URL: <a href="https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/2786/1/La%20entrada%20de%20virus%20dengue%20a%20la%20infecci%C3%B3n%20primaria%20en%20ausencia%20de%20anticuerpos.pdf">https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/2786/1/La%20entrada%20de%20virus%20dengue%20a%20la%20infecci%C3%B3n%20primaria%20en%20ausencia%20de%20anticuerpos.pdf</a> Fetched: 8/1/2021 4:45:36 AM	 1



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Estandarización de una prueba de diagnóstico del virus de estomatitis vesicular en ganado bovino mediante la detección de anticuerpos neutralizantes**”, fue realizado por la señorita **Panchana Torres, Carolina Jacqueline** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, agosto 2020

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
**MARBEL  
TORRES**

**Torres Arias Marbel, PhD.**  
C. C 1802949154



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Carolina Jacqueline, Panchana Torres**, con cédula de ciudadanía n° 1726177544, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Estandarización de una prueba de diagnóstico del virus de estomatitis vesicular en ganado bovino mediante la detección de anticuerpos neutralizantes”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 9 septiembre de 2021**

Firma

**Panchana Torres, Carolina Jacqueline**

C.C: 1726177544



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo **Panchana Torres, Carolina Jacqueline**, con cédula de ciudadanía n° 1726177544 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Estandarización de una prueba de diagnóstico del virus de estomatitis vesicular en ganado bovino mediante la detección de anticuerpos neutralizantes”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 9 de septiembre de 2021**

Firma

**Panchana Torres, Carolina Jacqueline**

C.C: 1726177544

**Dedicatoria**

A mis padres, Luis y Ligia

A mis hermanos, Paola y Bryan

A mi sobrino Mathías

A la memoria de mi abuelita Salomé

*Carolina Jacqueline Panchana Torres*

## Agradecimientos

Gracias a mis padres Luis y Ligia por brindarme su amor infinito, por ser mis guías, por ser incondicionales, por cada abrazo por cada beso y por siempre recibir su apoyo a lo largo de la carrera. A mis hermanos Paola y Bryan por ser los primeros en alentarme a seguir adelante. A mi sobrino Mathías por ser la luz que vino a darnos muchísimo amor. A mis abuelitos por su preocupación, por cada consejo lleno de sabiduría y por cada cartoncito de comida que me han mandado.

A mi hermano de vida, Darío por siempre brindarme su apoyo, y por cuidarme en todo este camino desde el primer día que lo conocí. A mi amigo Negrito por ser incondicional en todos los momentos difíciles, y por siempre animarme con buenas películas. A mi Andrés por inspirarme a crecer cada día más, por estar siempre conmigo en los momentos más angustiantes y por todo su cariño.

A la Doc. Marbel por brindarme la oportunidad de estar en su laboratorio, por su paciencia y comprensión en cada momento. A todo el equipo del laboratorio de inmunología y virología; André, Lucho, Alex, Fer, Carlitos muchísimas gracias por todos los momentos divertidos y sobre todo por enseñarme tanto.

Al Doc. Jorge Espinoza que sin haberme conocido lo suficiente no dudo en brindarme la oportunidad de ingresar al laboratorio de Agrocalidad. Al Ing. Alex que fue mi guía en este trabajo de investigación, y me brindo todo el apoyo para poder realizarlo. Al director Euclides por el apoyo y confianza en mi trabajo

A todo el equipo iGEM- Ecuador que se convirtió en mi familia y han sido en estos dos años parte esencial de mi formación.

¡Este es el sueño! Es conflicto, es compromiso, es pura emoción

*La La Land*

## Tabla de Contenido

<b>Resultados del análisis de Urkund .....</b>	<b>2</b>
<b>Certificación .....</b>	<b>3</b>
<b>Responsabilidad de Autoría.....</b>	<b>4</b>
<b>Autorización de Publicación .....</b>	<b>4</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>6</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>13</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>13</b>
<b>Listado de Abreviaturas.....</b>	<b>15</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>17</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo I: Introducción.....</b>	<b>19</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>19</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos Generales y Específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>23</b>
<b>Capítulo II: Revisión Bibliográfica.....</b>	<b>24</b>

<b>Generalidades.....</b>	<b>24</b>
<i>Sinonimia.....</i>	<i>24</i>
<i>Acción de agentes físicos y químicos en la inactivación del VEV .....</i>	<i>25</i>
<b>Etiología.....</b>	<b>25</b>
<i>Taxonomía .....</i>	<i>25</i>
<i>Serotipos .....</i>	<i>25</i>
<i>Estructura Viral .....</i>	<i>27</i>
<i>Genoma Viral .....</i>	<i>29</i>
<i>Ciclo de Replicación Viral .....</i>	<i>29</i>
<b>Epidemiología .....</b>	<b>31</b>
<b>Transmisión .....</b>	<b>32</b>
<b>Signos Clínicos.....</b>	<b>35</b>
<b>Prevención y control.....</b>	<b>36</b>
<b>Respuesta Inmune al VEV .....</b>	<b>37</b>
<i>Vías de señalización dependientes de los receptores tipo Toll (TLR) activados por VEV .</i>	<i>37</i>
<i>Actividad de Interferón (IFN).....</i>	<i>38</i>
<i>Secreción de Óxido Nítrico (NO).....</i>	<i>40</i>
<i>Anticuerpos Neutralizantes.....</i>	<i>41</i>
<b>Técnicas de Diagnóstico.....</b>	<b>43</b>
<b>Neutralización del Virus.....</b>	<b>47</b>

	10
<b>Mecanismos de Neutralización Viral por Anticuerpos .....</b>	<b>47</b>
<b>Titulación Viral .....</b>	<b>49</b>
<i>Ensayo de formación de placas PFU .....</i>	<i>49</i>
<i>Ensayo de dilución de punto final .....</i>	<i>50</i>
<b>Técnicas para la cuantificación de anticuerpos .....</b>	<b>51</b>
<i>Método de Spearman –Karber.....</i>	<i>51</i>
<b>Cultivo Celular.....</b>	<b>52</b>
<i>Líneas Celulares.....</i>	<i>52</i>
<i>Línea celular BHK-21 .....</i>	<i>52</i>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>52</b>
<b>Capítulo III: Materiales y Métodos.....</b>	<b>53</b>
<b>Localización Geográfica .....</b>	<b>53</b>
<b>Origen de las muestras .....</b>	<b>53</b>
<b>Tamaño muestral .....</b>	<b>53</b>
<b>Medidas de bioseguridad .....</b>	<b>53</b>
<b>Manejo de células BHK-21 .....</b>	<b>54</b>
<i>Células BHK-21 .....</i>	<i>54</i>
<i>Condiciones de cultivo para BHK-21 .....</i>	<i>54</i>
<i>Subcultivos BHK-21 en monocapas.....</i>	<i>54</i>
<i>Conteo y viabilidad celular.....</i>	<i>55</i>

<i>Curva de Crecimiento de células BHK-21</i> .....	56
<b>Ensayo de Neutralización Viral (VN)</b> .....	<b>56</b>
<b>Manejo del VEV-NJ</b> .....	<b>57</b>
<i>Descongelación y evaluación del ECP inducido por el VEV-NJ  </i> .....	57
<i>Replicación y congelación del VEV-NJ</i> .....	58
<i>Titulación viral VEV-NJ</i> .....	59
<i>Cálculo del título viral por el método de Reed &amp; Muench</i> .....	60
<i>Cálculo de la solución de trabajo del virus</i> .....	60
<i>Sueros problema</i> .....	61
<i>Placa de NV con sueros problemas</i> .....	61
<i>Tinción de la placa de NV con cristal violeta</i> .....	63
<i>Calculo del Título Neutralizantes por Spearman- Karber</i> .....	63
<i>Control de Dosis Viral</i> .....	64
<i>Criterios de aceptación para el ensayo de VN</i> .....	65
<b>Sensibilidad Analítica</b> .....	<b>65</b>
<b>Especificidad Analítica</b> .....	<b>66</b>
<b>Repetibilidad analítica</b> .....	<b>66</b>
<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>66</b>
<b>Capítulo IV: Resultados</b> .....	<b>68</b>
<b>Replicación y diferenciación de la línea celular <i>Baby Hamster Kidney</i> (BHK-21)</b> .....	<b>68</b>

<b>Evaluación de la curva de crecimiento de la línea celular BHK-21 .....</b>	<b>69</b>
<i>Prueba de normalidad para la variable de incremento celular .....</i>	<i>69</i>
<i>Representación gráfica de las curvas de crecimiento .....</i>	<i>71</i>
<b>Replicación del VEV-NJ en la línea celular BHK-21.....</b>	<b>73</b>
<b>Ensayo de Titulación Viral por el método de <i>Reed &amp; Muench</i>.....</b>	<b>74</b>
<b>Prueba de <i>Screening</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>Ensayo de Neutralización Viral (VN) .....</b>	<b>78</b>
<i>Tinción cristal violeta 1% de las placas de VN.....</i>	<i>78</i>
<i>Cuantificación del Título de Neutralización mediante el método de Spearman-Karber..</i>	<i>79</i>
<b>Ensayo de Control de Dosis Viral .....</b>	<b>81</b>
<b>Ensayo de Sensibilidad Analítica (ASe) .....</b>	<b>82</b>
<b>Ensayo de Especificidad Analítica (ASp).....</b>	<b>83</b>
<b>Ensayo de Repetibilidad .....</b>	<b>84</b>
<b>Capítulo VI: Discusión .....</b>	<b>85</b>
<b>Capítulo VI: Conclusiones .....</b>	<b>93</b>
<b>Capítulo VII. Recomendaciones .....</b>	<b>94</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>95</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>121</b>

### Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> <i>Diferencias entre los serotipos New Jersey e Indiana del virus de Estomatitis Vesicular</i> .....	26
<b>Tabla 2.</b> <i>Mecanismos de transmisión del VEV por vectores mecánicos y biológicos.</i> .....	33
<b>Tabla 3.</b> <i>Métodos analíticos para el diagnóstico de EV mediante detección del agente viral y respuesta inmune</i> .....	43
<b>Tabla 4.</b> <i>Métodos analíticos recomendados para diferentes propósitos</i> .....	46
<b>Tabla 5.</b> <i>Estadístico y valor p de la prueba Shapiro-Wilks para el supuesto de normalidad</i> ...	70
<b>Tabla 6.</b> <i>Titulación (DICT<sub>50</sub>/mL) de las ocho diluciones del VEV-NJ</i> .....	76
<b>Tabla 7.</b> <i>Resultados de la prueba de Screening por provincia</i> .....	77
<b>Tabla 8.</b> <i>Resultados del control de dosis viral del VEV-NJ</i> .....	82
<b>Tabla 9.</b> <i>Evaluación de la repetibilidad del ensayo VN</i> .....	84

### Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Distribución geográfica de casos de EV en Sudamérica</i> .....	21
<b>Figura 2.</b> <i>Lesiones clínicas provocadas por el VEV en ganado bovino</i> .....	24
<b>Figura 3.</b> <i>Estructura y dimensiones de la partícula del VEV</i> .....	28
<b>Figura 4.</b> <i>Esquema del genoma del VEV</i> .....	29
<b>Figura 5.</b> <i>Ciclo de replicación del VEV</i> .....	31
<b>Figura 6.</b> <i>Redes de transmisión del VEV</i> .....	35
<b>Figura 7.</b> <i>Vías de señalización dependientes de los receptores tipo Toll</i> .....	39
<b>Figura 8.</b> <i>Activación de las vías de señalización JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) mediadas por el INF- tipo I y tipo III</i> .....	40
<b>Figura 9.</b> <i>Mecanismo de acción antiviral del NO mediante la señalización TLR4</i> .....	41

<b>Figura 10.</b> <i>Inducción de la respuesta inmune humoral por virus citopático</i> .....	42
<b>Figura 11.</b> <i>Mecanismos de neutralización viral mediado por anticuerpos neutralizantes</i> .....	48
<b>Figura 12.</b> <i>Proceso metodológicos para el ensayo de placa</i> .....	50
<b>Figura 13.</b> <i>Proceso metodológico para el ensayo de dilución de punto final</i> .....	51
<b>Figura 14.</b> <i>Células BHK-21 clon 13</i> .....	55
<b>Figura 15.</b> <i>Conteo celular usando un hemocitómetro</i> .....	55
<b>Figura 16.</b> <i>Esquema metodológico de la NV</i> .....	57
<b>Figura 17.</b> <i>Efecto citopático provocado en la línea celular BHK-21</i> .....	58
<b>Figura 18.</b> <i>Esquema de dilución del virus en base 10</i> .....	59
<b>Figura 19.</b> <i>Plan de placa para el ensayo de neutralización de virus</i> .....	62
<b>Figura 20.</b> <i>Esquema de dilución para el ensayo de control de dosis viral</i> .....	64
<b>Figura 21.</b> <i>Observación microscópica de células BHK-21</i> .....	68
<b>Figura 22.</b> <i>Gráficas Q-Q normal para los cinco inóculos celulares</i> .....	70
<b>Figura 23.</b> <i>Análisis de la curva de crecimiento de la línea celular BHK-21</i> .....	72
<b>Figura 24.</b> <i>Análisis de la curva normalizada del crecimiento de la línea celular BHK-21</i> .....	73
<b>Figura 25.</b> <i>Efecto Citopático del VEV-NJ en la línea celular BHK-21</i> .....	74
<b>Figura 26.</b> <i>Análisis del título promedio del VEV-NJ</i> .....	75
<b>Figura 27.</b> <i>Análisis del resultado de Screening</i> .....	77
<b>Figura 28.</b> <i>Resultado visual del ensayo de neutralización viral a las 48 horas</i> .....	78
<b>Figura 29.</b> <i>Análisis de los títulos medios de NAc de los sueros agrupados por provincia</i> .....	80
<b>Figura 30.</b> <i>Análisis del título medio de anticuerpos para sueros positivos</i> .....	81
<b>Figura 31.</b> <i>Análisis de la sensibilidad del ensayo de VN</i> .....	82
<b>Figura 32.</b> <i>Análisis de la Especificidad Analítica</i> .....	83

**Listado de Abreviaturas**

Ac: Anticuerpos

Ag: Antígenos

ARN: Ácido Ribonucleico

DVB: Diarrea viral bovina

DICT<sub>50</sub>: Dosis infectivas en el 50% del cultivo celular

DMEM: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco

DP: Distancia proporcional

CF: Fijación del complemento

CTP: Caldo triptosa fosfato

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

ECP: Efecto Citopático

ELISA-SI: Ensayo inmunoenzimático indirecto tipo sándwich

EV: Estomatitis Vesicular

FA: Fiebre Aftosa

Fab: Fragmento de unión al antígeno

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (siglas en inglés)

Fc: Fragmento cristizable

G: Glicoproteína de unión

Ig: Inmunoglobulina

IBR: Rinotraqueítis infecciosa bovina

LP-ELISA: Ensayo inmuno enzimático de bloqueo en fase líquida.

M: Proteína de matriz

mL: mililitros

NAc: Anticuerpos Neutralizantes

NJ: New Jersey

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal (siglas en inglés)

P: Fosfoproteína

PANAFTOSA: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y Salud Pública Veterinaria.

PBS: Buffer Fosfato Salino

PFU: Unidades formadora de placa

IND: Indiana

uL: micro litros

VEV: Virus de estomatitis vesicular

VN: Neutralización viral.

VPP: Peste Porcina Clásica

SFB: Suero fetal bovino

SD: Desviación estándar

## Resumen

La estomatitis vesicular (EV) es una enfermedad, provocada por el virus de estomatitis vesicular (VEV), clínicamente se caracteriza por la aparición de lesiones vesiculares en la boca, lengua, paladar, patas y en las ubres; en bovinos, equinos y suinos. En el Ecuador esta enfermedad es endémica y provoca pérdidas económicas en el sector ganadero debido a la pérdida de peso del animal. Actualmente en el país no existe un método de diagnóstico que detecte la respuesta inmunitaria contra el VEV. Por este motivo el objetivo de este estudio es estandarizar la técnica de neutralización viral para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VEV en línea celular BHK-21.

La titulación viral para el VEV del serotipo New Jersey (VEV-NJ) mediante la evaluación del efecto citopático fue de  $7,59 \pm 0,35 \log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{mL}$ . De los 44 sueros evaluados mediante el método *Spearman Karber* se obtuvo 24 (54,4%) sueros positivos y 20 (45,5%) negativos, presentando el mayor título neutralizante ( $>2,7$ ) para las provincias de Loja, Cotopaxi y Cañar ( $p_{\text{valor}}=0,0052$ ). La sensibilidad analítica del ensayo detectó la presencia de anticuerpos hasta la dilución 1:8192, y la especificidad analítica frente a enfermedades clínicamente indistinguibles presentaron títulos bajos ( $<1,5$ ) para sueros de diarrea viral bovina (DVB), rinotracheítis infecciosa bovina (IBR), peste porcina clásica (VPP) y un suero de humano con una protección por debajo del 40%.

### Palabras clave:

- NEUTRALIZACIÓN VIRAL
- ESTOMATITIS VESICULAR
- CULTIVO CELULAR BHK-21

### **Abstract**

Vesicular stomatitis (VS) is a disease caused by the vesicular stomatitis virus (VSV), clinically characterized by the appearance of vesicular lesions in the mouth, tongue, palate, legs and udders in cattle, horses and swine. In Ecuador, this disease is endemic and causes economic losses in the livestock sector due to the loss of animal weight. Currently, there is no diagnostic method in the country that detects the immune response against VEV. For this reason, the objective of this study is to standardize the viral neutralization technique for the detection of neutralizing antibodies against VEV in BHK-21 cell line.

Viral titer for VEV New Jersey serotype (VEV-NJ) by evaluation of the cytopathic effect was  $7.59 \pm 0.35 \log_{10}$  DICT50/mL. Of the 44 sera evaluated by the Spearman Karber method, 24 (54.4%) were positive and 20 (45.5%) negative, with the highest neutralizing titer ( $>2.7$ ) for the provinces of Loja, Cotopaxi and Cañar ( $p\_value=0.0052$ ). The analytical sensitivity of the assay detected the presence of antibodies up to dilution 1:8192, and the analytical specificity against clinically indistinguishable diseases presented low titers ( $<1.5$ ) for bovine viral diarrhea (BVD), infectious bovine rhinotracheitis (IBR), classical swine fever (CSF) sera and human serum.

#### **Keywords:**

- **VIRAL NEUTRALIZATION**
- **VESICULAR STOMATITIS**
- **BHK -21 CELL CULTURE**

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

La estomatitis vesicular (EV) es conocida desde hace más de un siglo como una enfermedad que se caracteriza por la aparición de vesículas en la lengua, patas y ubres del ganado (Basak & Chattopadhyay, 2008). El primer informe donde se describe una enfermedad con lesiones vesiculares fue en equinos procedentes de Sudáfrica en 1876, más tarde en Estados Unidos en 1916, se reportó por primera vez la enfermedad vesicular en bovinos y caballos a raíz de una epidemia, sin embargo, informes de 1862 reflejaron la descripción de síntomas característicos de EV en caballos del ejército, durante la Guerra Civil (Basak & Chattopadhyay, 2008; G. J. Letchworth et al., 1999; Whelan, 2008).

En 1926, Cotton estableció al virus de estomatitis vesicular (VEV) como el agente causal de la enfermedad de EV, al año siguiente identificó dos serotipos principales del virus; New Jersey (NJ) e Indiana (IND) (Cotton, 1927). Más tarde, según las relaciones serológicas se determinaron tres subtipos del serotipo Indiana: IND-1 o virus de Indiana clásico (VSIV), encontrado en áreas enzooticas; IND-2 o virus cocal (COCV) aislado esporádicamente en Trinidad, Brasil y Argentina; e IND-3 o virus Alagoas (VSAV) reportado en Brasil y Colombia (Brandly & Hanson, 1957; Federer et al., 1967; Olitsky, 1927).

En América del Sur la EV está confinada endémicamente en Argentina, Venezuela, Colombia, Perú y Ecuador (Trujillo, 2009). El primer país latino en reportar EV fue Argentina en 1939 en caballos, dos años después en 1941 apareció en ganado en Barinas – Venezuela, infectando a 716 animales (Hanson & Karstad, 1959).

Ecuador informó por primera vez la presencia del VEV en ganado, en las provincias de Guayas, Loja, Pichincha, Los Ríos, Chimborazo y Cañar durante el período de 1973-1984. Los casos fueron registrados cada cuatro años, en donde los dos primeros cuatrienios (1973-

1976; 1977-1980) presentaron una incidencia alta de casos positivos para el serotipo de NJ con un 85%, mientras que para el serotipo de IND fue solo del 15 %, de un total de 248 cabezas de ganado (Astudillo et al., 1986). El último cuatrienio (1981-1984) tuvo una disminución del 66% de la frecuencia de afección de EV, correspondiente a 19 y 23 casos positivos para los serotipos de NJ e IND respectivamente (Astudillo et al., 1986).

En el 2004, en Ecuador, hubo un brote epizootico de EV en rebaños bovinos, reportando 53 focos infecciosos de los cuales 51 fueron diagnosticados con el tipo NJ y 3 casos para IND (Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2005). En el 2010, en Zamora Chinchipe se informó la presencia de 21 casos para el VEV-NJ y un caso para el VEV-IND (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS), 2010). En el 2018, 67 fincas ganaderas distribuidas en Santo Domingo, Guayas, Manabí y Esmeraldas se vieron afectadas por los casos de EV provocando grandes pérdidas económicas (El Comercio, 2018).

El diagnóstico para enfermedades vesiculares; EV y fiebre aftosa (FA) dentro de América Latina, se realiza con el apoyo de los Laboratorios de Referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)/ y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) por sus siglas en inglés respectivamente. Estas organizaciones brindan capacitación técnica, validación de las pruebas de diagnóstico, monitoreo y vigilancia a la Red de Laboratorios Nacionales de Referencia de la región, siendo AGROCALIDAD la entidad representante del Ecuador (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y Salud Pública Veterinaria (PANAFTOSA) et al., 2019). De acuerdo, con las técnicas reportadas por AGROCALIDAD el tipo de análisis que se usa para la detección del agente vírico de EV mediante muestras epiteliales, es el ensayo inmunoenzimático indirecto tipo sándwich (ELISA-SI) (Agrocalidad, 2020b). Sin embargo, el Manual Terrestre de la OIE también recomienda el uso del aislamiento viral como método confirmatorio y técnicas

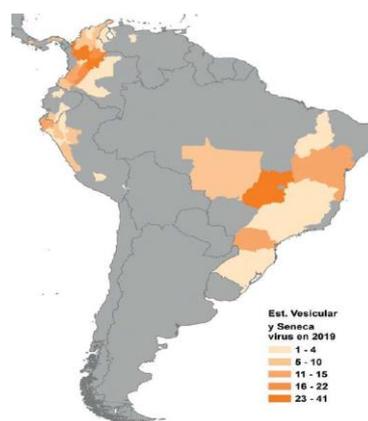
serológicas que detecten la respuesta inmune humoral producida por el agente infeccioso (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, 2018). Entre las técnicas de detección frente a la respuesta inmunitaria está la seroneutralización (SN), técnica que ha sido probada experimentalmente desde la década de 1930, y considerada la prueba estándar de oro para la evaluación de anticuerpos protectores contra diversos virus (Klasse, 2014; Peaper & Landry, 2014; Wellehan, 2006).

### Justificación

La EV se encuentra dentro del grupo de enfermedades vesiculares incluyendo la FA, ambas presentan signos clínicos similares como la formación de vesículas, úlceras en el epitelio oral, lengua y paladar. Debido a la semejanza sintomatológica la EV es considerada como una enfermedad indistinguible de la FA, siendo de interés para programas de sanidad animal que tratan de erradicar estas enfermedades (Gibbons, 1963; G. J. Letchworth et al., 1999; PANAFTOSA, 2018). En el último informe publicado por el organismo internacional PANAFTOSA – OPS/OMS en el 2019, el mayor número de casos de EV se concentra en los países de Brasil, Colombia, Ecuador y Perú (Figura 1).

### Figura 1

*Distribución geográfica de casos de EV en Sudamérica*



**Nota.** Tomado de Centro Panamericano de Fiebre Aftosa et al. ( 2019).

La infección por el VEV en el ganado no provoca mortalidad, y las lesiones vesiculares de la boca se curan de forma rápida, sin embargo, esta infección viral induce pérdida de peso, baja producción de leche y en algunos casos aparición de mastitis (Hanson, 1952).

Estas afecciones generan un alto impacto económico para los ganaderos causando pérdidas en los productos derivados como carne y leche, además de las restricciones de movilidad para controlar la propagación del virus (Rodríguez, 2002). En Estados Unidos las pérdidas económicas han sido de 100 \$ a 200 \$ por cabeza de ganado (Lord & Tabachnick, 2002). En Colombia donde la EV es endémica, se reportó en el período de 1980-1985 pérdidas por más de siete millones de dólares (Trujillo, 2009).

Por lo expuesto anteriormente es de gran importancia para el sector ganadero un diagnóstico rápido que garantice resultados concluyentes para EV, además de proporcionar una detección diferencial de enfermedades confundibles como la FA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOSA- OPS/OMS, 2017).

Actualmente el diagnóstico de EV, es realizado por Agrocalidad usando la técnica de identificación del agente viral, el cual está presente de 2 a 7 días en las lesiones vesiculares. Transcurrido este tiempo se requiere pruebas serológicas que midan la seroconversión de anticuerpos en suero (Agrocalidad, 2020b; MacLachlan & Dubovi, 2017). Por ello, es de suma importancia para Agrocalidad implementar una prueba que detecte la presencia de anticuerpos neutralizantes usando directamente suero.

De acuerdo con los métodos analíticos para la detección de la respuesta inmune de EV expuestos en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE, se recomienda la neutralización del virus (VN), el ensayo inmuno

enzimático de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA) y fijación del complemento (CF) (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, 2018).

En esta investigación se escogió la prueba de VN, por ser la "*Gold standar*" para la detección de anticuerpos neutralizantes (NAC) contra diferentes virus (Bordignon & Roberto Zanetti, 2014). Además es una prueba altamente sensible y específica, capaz de diferenciar el virus a nivel de serotipo (Bourgeois & Oaks, 2014). La VN también permite medir el título de anticuerpos neutralizantes después de eventos a exposición, vacunación o transferencia pasiva de anticuerpos derivados de la madre (Gauger & Vincent, 2020).

## **Objetivos Generales y Específicos**

### **Objetivo General**

Estandarizar una prueba de diagnóstico para el virus de estomatitis vesicular en ganado bovino mediante la detección de anticuerpos neutralizantes.

### **Objetivos Específicos**

- Cultivar el virus de estomatitis vesicular en la línea celular de Riñón de Hámster Neonato (BHK-21).
- Estandarizar el protocolo de seroneutralización para la cepa de New Jersey (NJ) e Indiana (IND-1) con el uso de sueros de ganado bovino.
- Cuantificar la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos en el suero mediante el método de Spearman- Karber.
- Determinar la especificidad y sensibilidad analítica del ensayo de neutralización viral.

## Capítulo II: Revisión Bibliográfica

### Generalidades

La EV es una enfermedad causada por el VEV que afecta principalmente a bovinos, equinos y porcinos. Sin embargo, también se ha encontrado evidencia serológica en otros animales, incluidos murciélagos, mapaches, venado, antílope, primates no humanos, roedores, zarigüeyas, pavos y patos. Clínicamente se caracteriza por la producción de máculas, erosiones y vesículas en los epitelios bucales o sobre la piel de las ubres y patas (Figura 2). La EV es endémica en México, América Central, este de Brasil, norte de América del Sur, y sureste de Estados Unidos (Figuoa et al., 1983; The Center for Food Security & Public Health (CFSPH), 2008).

### Figura 2

*Lesiones clínicas provocadas por el VEV en ganado bovino*



*Nota.* (\*) Vesículas y úlceras presentes en: A) pezones, B) rodete coronario de las patas, C) paladar. Tomado de Delgado et al (2015).

### *Sinonimia*

En el campo la EV es conocida con diversos nombres. En México se la conoce como “Mal de Hierba”, en centro América como “Meado de araña o Sapillo”, y en zonas endémicas

de Guatemala y el Salvador se las identifica como; Chaya, Piquete de abejón y Chilaste (Figueroa et al., 1983).

### ***Acción de agentes físicos y químicos en la inactivación del VEV***

El VEV es inactivado por los siguientes factores físicos: temperaturas de 50°C a 60°C por 30 minutos, luz solar, luz UV. Mientras, que los factores químicos que afectan al VEV son: disolventes de lípidos, desinfectantes de hipoclorito de sodio, fenol y formalina (1%). El VEV se puede conservar a -70°C o por liofilización (Biberstein & Vergés, 1994; Power et al., 2007). Un ciclo normal de liofilización empieza por una etapa de congelación a bajas temperaturas que permite inhibir la formación de cristales, si estos llegan a ser grandes pueden romper las membranas biológicas del virus cuando entran en la etapa de secado (Pieters et al., 2002; Wolkers et al., 2002).

### **Etiología**

#### ***Taxonomía***

El VEV tiene un genoma de ARN no segmentado de sentido negativo correspondiente al orden *Mononegavirales*. Dentro de este orden se le asigna la familia *Rhabdoviridae* debido a la forma de “bala”, y el género asignado para esta familia es *Vesiculovirus* (Whelan, 2008).

#### ***Serotipos***

El VEV presenta dos serotipos New Jersey (NJ) e Indiana (IND) que se distinguen por neutralizar los anticuerpos contra la proteína G (Cartwright & Brown, 1972). El serotipo NJ ha causado brotes más patogénicos y frecuentes, que los provocados por las cepas INDs (Bridges et al., 1997; Rodríguez, 2002). En la tabla 1 se describen sus principales diferencias.

**Tabla 1***Diferencias entre los serotipos New Jersey e Indiana del virus de Estomatitis Vesicular*

<b>Serotipos</b>	<b>Subtipos</b>	<b>Signos clínicos</b>	<b>Origen de Aislamiento</b>	<b>Distribución Geográfica</b>
<b>New Jersey (NJ)</b>	N/A	- Lesiones principalmente en podales (Jenney & Brown, 1972).	Artrópodos y Vertebrados (Hanson, 1968; Paul F. Smith et al., 2012).	- Zonas templadas de Norteamérica (Hanson, 1968)
		- Pérdida del epitelio de la lengua - Pérdida de peso - Deshidratación - Salivación excesiva (Hanson, 1968).		- México - Centro y Sur América (Letchworth et al., 1996).
<b>Indiana (IND)</b>	IND-1	- Lesiones principalmente en mamas (Jenney & Brown, 1972).	Artrópodos y vertebrados (Hanson, 1968).	- Norte, Centro y Sur América (Hanson et al., 1968a; Geoffrey J. Letchworth et al., 1996).

Serotipos	Subtipos	Signos clínicos	Origen de Aislamiento	Distribución Geográfica
<b>Indiana (IND)</b>	IND-2 ó virus Cocal	- Lesiones principalmente en mamas (Jenney & Brown, 1972).	Pulgas recogidas de ratas de arrozales (Jonkers et al., 1964).	- Sureste de Brasil y Argentina (Hanson et al., 1968a).
	IND-3 ó virus Aloagas		Mulas y caballos (Chow & McNutt, 1953).	- Norteamérica (Hanson, 1968) - Noreste y centro de Brasil (Chow & McNutt, 1953).

### **Estructura Viral**

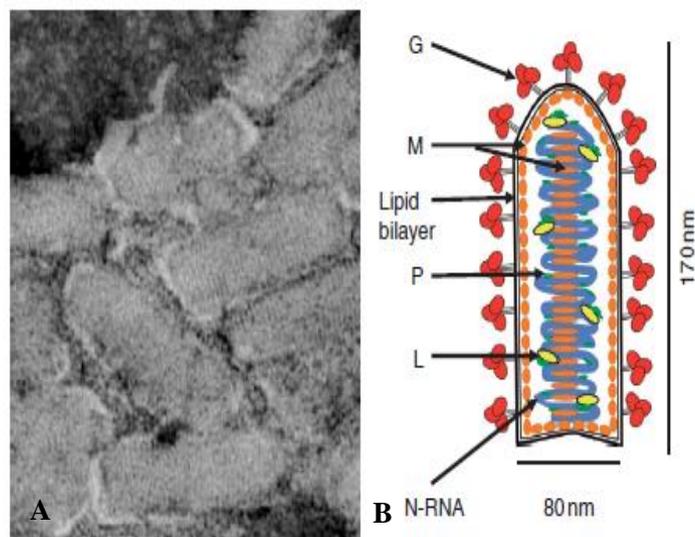
Las partículas víricas tienen forma de bala y miden aproximadamente 65-180 nm de largo y 60-75 nm de diámetro (Figura 3). Cada partícula comprende 74% proteína, 20% lípidos, 3% ARN y 3% carbohidratos. El virus posee una envoltura lipídica con proyecciones de picos triméricos denominada glicoproteína de unión (G) de 67 kDa, está encargada del reconocimiento y fusión celular para la entrada y salida del virus de la célula (Martinez et al., 2003; Pal et al., 1987; Reis et al., 2009; Whelan, 2008). El interior de la partícula contiene un

núcleo de ribonucleoproteína (RNP) del ARN genómico que está enrollado fuertemente alrededor de la proteína N viral, formando un entorno resistente a la ARNasa (Figura 3) (Brouillette et al., 1982; Whelan, 2008).

El complejo de N-ARN está asociado con la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), cuyos componentes virales son una proteína grande (L) de 241 kDa y un tetrámero de una fosfoproteína accesoria (P) de 29 kDa. Otro componente estructural importantes es la proteína de matriz (M) de 26 kDa participa en el ensamblaje viral y la gemación de las partícula (Thomas & Roth, 1994).

### Figura 3

*Estructura y dimensiones de la partícula del VEV*



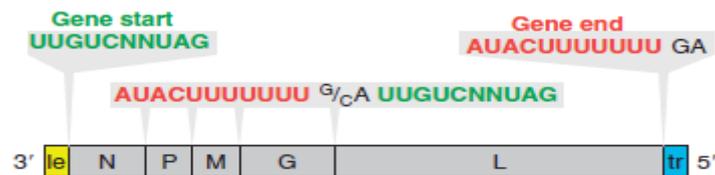
*Nota.* (A) Micrografía electrónica de partículas de VEV. (B) Esquema y dimensiones de la estructura del virión: P, fosfoproteína; M, proteína de matriz; G, glicoproteína de unión; L, subunidad de polimerasa grande; N-ARN, ARN recubierto de la nucleocápside. Adaptado de Whelan (2008).

### Genoma Viral

El genoma de ARN no segmentado de sentido negativo del VEV es de 11.161 nt, comprende una región líder (le) de 30 a 50 nt, cinco genes que codifica en orden a las proteínas N, P, M, G y L; y una región tráiler (tr) de 50 a 59 nt (Figura 4). Una característica fundamental de todos los *Mononegavirus* radica en que el ARN genómico no se encuentra desnudo dentro de las células infectadas, se presenta como un complejo de RNP, en el que está completamente cubierto por la proteína de la nucleocápside viral (Whelan, 2008)

#### Figura 4

Esquema del genoma del VEV



*Nota.* La ilustración destaca los elementos reguladores de la polimerasa. Colores: amarillo, región líder 3'; azul: región tráiler 5'; verde: residuos conservados de la secuencia de inicio; rojo: residuos conservados del extremo; negro: residuos no transcritos. Adaptado de Whelan (2008).

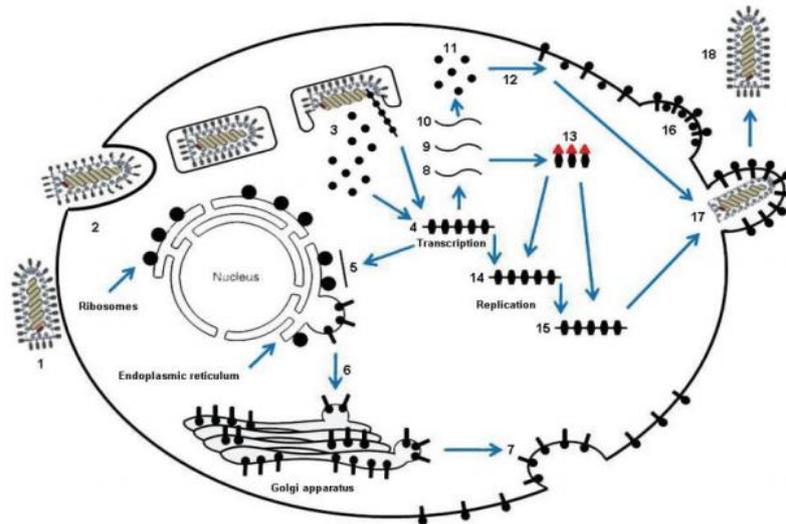
### Ciclo de Replicación Viral

La replicación consiste en tres etapas: fijación, entrada replicación, ensamblaje y liberación (Figura 5). La fijación del VEV está mediado por la glicoproteína que se une a la superficie de las células. Después de la unión el virus se internaliza mediante endocitosis dependiente de clatrina, y se administra a un endosoma temprano. El umbral de pH necesario para promover la fusión de las membranas virales y celulares es de aproximadamente 6,2, este pH se alcanza en el endosoma temprano permitiendo liberar el núcleo de RNP, competente para la transcripción en el citoplasma. Finalmente la liberación

de la proteína M migra al núcleo donde desempeña un papel en la inhibición de la expresión del gen huésped (Whelan, 2008).

El ciclo de replicación de VEV es completamente citoplasmático, ocurre de manera eficiente en células enucleadas. Durante la síntesis de ARN, la polimerasa utiliza el ARN encapsulado como molde en dos reacciones distintas: (1) transcripción de cinco ARNm que codifica a las proteínas N, P, M, G y L; y (2) replicación para producir hebras de ARN antígenómico y luego genómico. Se ha comprobado que la polimerasa genera muchos errores durante la replicación, provocando mutaciones en el genoma de la progenie, por lo tanto esta progenie es una mezcla heterogénea llamada "quasiespecie" (Sur et al., 2003; Whelan, 2008).

La expresión génica empieza en respuesta de un promotor específico dentro de la región le 3' (3'-UUGUCNNUAG-5'), la cual es reconocida por la RdRP e inicia la síntesis para la secuencia N generando un ARNm protegido, etilado y poliadenilado. La terminación final del gen N se logra mediante el reconocimiento de la polimerasa con la secuencia altamente conservada denominada 3'-AUACUUUUUUUG / C-5'. La terminación al final del gen N es esencial para que la polimerasa pueda transcribir al gen P, un evento poco entendido, debido a que la síntesis es 30% menos del ARNm-N para el ARNm-P. Esta síntesis secuencial continúa a través de todo el genoma viral y proporciona una gradiente de síntesis de ARNm tal que N> P> M> G> L (Figura 4) (Roche et al., 2006; Whelan, 2008).

**Figura 5***Ciclo de replicación del VEV*

*Nota.* Se muestra los pasos de la replicación viral siendo estos: 1- Unión a la superficie celular; 2- Endocitosis; 3- Fusión y desenmascaramiento; 4- Transcripción (-) del RNA genómico; 5- G RNAm; 6- Síntesis y glicosilación de la proteína G; 7- Entrega de la proteína G a la membrana plasmática; 8- N ARNm; 9- P ARNm; 10- M ARNm; 11-M proteína; 12- Migración de la proteína M al interior de la membrana plasmática; 13- Complejo N:P; 14- Replicación; 15- Genoma de la progenie; 16- Ensamble; 17- Gemación; 18- Desprendimiento. Adaptado de Rose & Whitt (2001)

### **Epidemiología**

La EV es enzoótico en regiones tropicales y subtropicales de América; sin embargo, se ha registrado brotes de EV en zonas templadas en los EE. UU y Canadá durante los meses de verano, que generalmente terminan después de la primera helada (Acree et al., 1964; Luis L. Rodriguez et al., 2000). En América Central y del Sur los brotes de EV son variables, y a menudo están asociados con las transiciones entre las estaciones lluviosas y secas (Hanson et al., 1968b).

La EV puede ser endémica en zonas cálidas, donde reaparece anualmente y gran parte de la población animal susceptible posee anticuerpos. La enfermedad es epidémica en zonas frías donde aparece irregularmente y los animales susceptibles están libres de anticuerpos (Mason, 1978).

El serotipo NJ es el más importante en el sureste de México, Panamá, noreste de América del Sur tales como Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. En el 2007 la enfermedad fue reportada en 497 rebaños de ganado en estos países. Colombia reportó 391 brotes donde 364 se debían a NJ y 27 al serotipo IND-1 (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa-OPS/OMS, 2007; Tesh et al., 1969). En Brasil y Argentina los brotes por EV han sido causados por los subtipos IND-2 e IND-3, por lo tanto no se han reportado casos asociados clínicamente a los serotipos NJ e IND-1, pero se presume la existencia de un *Vesiculovirus* no descrito que está estrechamente relacionado con el tipo NJ (Reis et al., 2009).

La incidencia de brotes por EV en hatos afectados puede variar ampliamente, se ha visto que entre el 10% al 15% presentan signos clínicos, donde predominan lesiones bucales mientras que en otros hatos solo presentan lesiones mamarias (Ellis & Kendall, 1964). Estos signos clínicos se observan principalmente en animales adultos, siendo poco común en bovinos y equinos menores de un año (Brandly et al., 1951).

Comprender la distribución temporal-espacial y las tasas de transmisión es clave para entender la epidemiología del VEV. En mucho de los países los factores responsables de epidemias cíclicas por el VEV siguen sin estar claras y no existe suficiente información actualizada sobre todo en la región de América Latina (Rozo-Lopez et al., 2018).

### **Transmisión**

El conocimiento sobre el ciclo natural y la patogenia del VEV sigue sin comprenderse con claridad (Reis et al., 2009). No obstante, los estudios han atribuido posibles métodos de

transmisión mediante fómites o contacto directo. Los animales infectados secretan saliva y exudados vesiculares cargados de virus que contaminan fácilmente las instalaciones y el medio ambiente, permitiendo una transmisión eficiente de animal a animal o de fómite a animal (Lord & Tabachnick, 2002; Stallknecht et al., 2001).

La investigación también ha demostrado que los insectos desempeñan un papel importante en la diseminación del VEV, como vectores mecánicos o como vectores biológicos (Figura 6) (Paul F. Smith et al., 2009; Urie et al., 2018). Los mecanismos de transmisión propuestos y conocidos se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2**

*Mecanismos de transmisión del VEV por vectores mecánicos y biológicos.*

<b>Vectores</b>	<b>Especies</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>Mecánicos</b>	- Moscas de Arena	Estas moscas al alimentarse de lesiones vesiculares o de saliva pueden amplificar el
	- Moscas Negras	VEV en los ganados a través de los bebederos
	- Mosquitos	de agua (Redelman et al., 1989; Reis et al.,
	- Culicoides	2009; Reis et al., 2011)
	- Saltamontes	Capacidad de infectar y replicar el VEV después de ingerir pasto contaminado, esto es una posible explicación para la propagación a larga distancia y los brotes en rebaños lejos de las fuentes de agua (Drolet et al., 2009; Nunamaker et al., 2003).

Vectores	Especies	Mecanismo
<b>Mecánicos</b>	- Tábanos ( <i>Tabanus</i> )	
	- Mosca de los ciervos ( <i>Chrysops</i> )	Son capaces de transmitir el VEV a huevos embrionados y depositarlos en vacas
	- Mosquitos ( <i>Aedes y Culex</i> )	expuestas a las picaduras de moscas (Ferris et al., 1955).
	- Moscas de establos ( <i>Stomoxys</i> )	
<b>Biológicos</b>	- Flebótomos	Este tipo de insectos hematófagos usan la transmisión transovárica, la cual consiste en la transferencia del virus de generación a generación (Drolet et al., 2009) Los experimentos han mostrado que la replicación del VEV sucede durante el desarrollo del flebótomo, y al llegar las hembras a la etapa adulta transmiten el virus mordiendo a roedores susceptibles (Mead et al., 1999; Tesh et al., 1972).
	- Mosca negra	Las poblaciones silvestres del género <i>Simulium</i> que han sido alimentadas con aislamientos de VSV-NJ, mostraron replicación viral durante 10 días, pero no diseminación a las glándulas salivales (Mead et al., 1997).

Vectores	Especies	Mecanismo
	- Mosca negra	Además, las moscas negras infectadas son capaces de transmitir a otras moscas cuando se alimentan cerca del mismo hospedador (Mead et al., 2000; P F Smith et al., 2011).
Biológicos	<i>Culicoides sonorensis</i>	Este mosquito hematófago se alimenta de una amplia variedad de huéspedes desde animales silvestres, domésticos y humanos (McGregor et al., 2019). <i>C. sonorensis</i> demostró ser susceptible por VEV-NJ mediante vía oral, detectado hasta 13 días después en los tejidos del mosquito, glándulas salivales y los huevos (Drolet et al., 2005; Nunamaker et al., 2000).

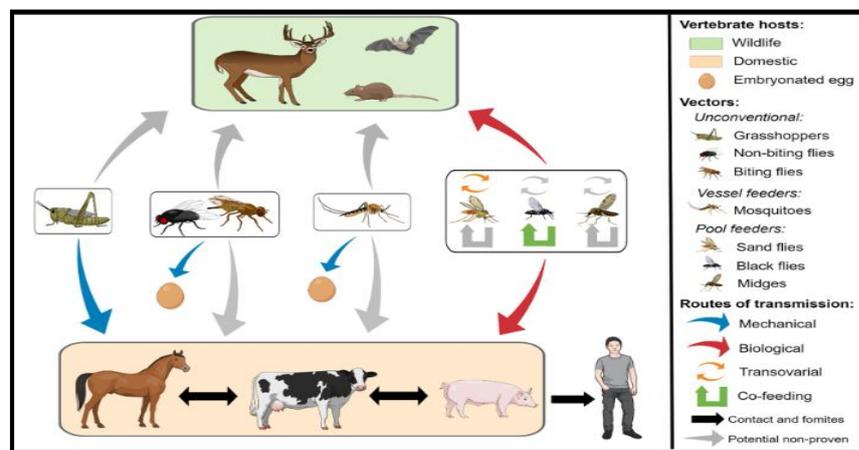
### Signos Clínicos

La infección por el VEV se distingue de un período febril corto y una recuperación completa. El período de incubación es corto en bovinos, cerdos y caballos dura entre 24 a 48 horas, en este tiempo, los animales pueden mostrar cojera, signos de depresión, fiebre de hasta 41,5°C y salivación excesiva (Whelan, 2008). Posteriormente aparecen pápulas de color rosa a blanco en la boca, labios, encías nariz, pezones y patas. El epitelio se separa de la capa basal formando vesículas que se llena de líquido amarillento claro conteniendo títulos muy altos de virus. Las lesiones orales hacen que los animales rechacen el alimento y pierdan un peso considerable (Schmidtman et al., 1999; Whelan, 2008).

Los animales infectados desarrollan anticuerpos neutralizantes que pueden persistir de 8 a 10 años, sin embargo, la reinfección por VEV puede ocurrir incluso en presencia de títulos altos de anticuerpos. En ausencia de infecciones secundarias, las lesiones suelen curarse en una a dos semanas y los animales empiezan a recuperar su peso (Whelan, 2008).

**Figura 6**

*Redes de transmisión del VEV*



*Nota.* Las flechas representan el flujo entre vectores y huéspedes. Ciclos conocidos (coloreados) y propuestos (grises). Tomado de Rozo-Lopez et al. (2018).

### Prevención y control

En la actualidad no existe un tratamiento para la EV, sin embargo, existen las buenas prácticas de saneamiento y cuarentena para contener la infección por EV (United States Department of Agriculture (USDA), 2019). Entre las principales recomendaciones se debe: aislar a los animales con lesiones vesiculares de los no afectados hasta que los signos clínicos de la EV hayan desaparecido; implementar controles de insectos que incluyan eliminación o reducción de crías de insectos y uso de insecticidas; las fuentes de agua y comida deben ser destruidas; y usar medidas de protección al manipular animales infectados para evitar el contagio a humanos (USDA, 2019; Webb et al., 1987).

Con respecto a la recuperación del animal, este debe tener acceso a una fuente de alimentación de alto contenido energético como melaza o pellets de alfalfa, y en el caso de presentar infecciones bacterianas secundarias en las lesiones de la piel o boca, se debe utilizar antibióticos y desinfectantes tópicos (Webb et al., 1987). Las úlceras orales se pueden limpiar con solución de yodo lugol al 1% (Gagnon, 2019). En las úlceras de los podales se rocía solución saturada de sulfato de cobre dos veces al día y se aplica antibióticos tópicos como valnemulina y lincomicina (Gagnon, 2019; Laven & Hunt, 2001). Las úlceras de las ubres se deben tratar con antibióticos de tipo oxitetraciclina y antiinflamatorios no esteroides como la indometacina (Gagnon, 2019; Holzhauser et al., 2017; Mukherjee & Simpson, 1987).

### **Respuesta Inmune al VEV**

La respuesta inmunitaria provocada por VEV se ha caracterizada principalmente en roedores y células epiteliales (G. J. Letchworth et al., 1999; Whelan, 2008).

### ***Vías de señalización dependientes de los receptores tipo Toll (TLR) activados por VEV***

La activación de los mecanismos inmunes empieza por el reconocimiento de la glicoproteína (proteína G) del VEV mediante los receptores tipo Toll 4 (TLR4) situado en la membrana celular, y de los TLR7-TLR8 que se encuentran intracelularmente en los endosomas (Figura 7) (Akira, 2001; Kawai & Akira, 2010; Medzhitov & Janeway, 2000). La proteína G permite la entrada en la células huésped al unirse al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), mediante los dominios ricos en cisteína conservados en estas proteínas (Finkelshtein et al., 2013; Nikolic et al., 2018). Las LDLR se expresan de forma ubicua por células de mamíferos esto permite que el VEV infecte prácticamente cualquier célula (Simovic et al., 2015).

La homodimerización o heterodimerización del receptor TLR4 inicia la señalización aguas abajo a través de dos proteínas adaptadoras MyD88 (adaptador de transducción de la respuesta primaria diferencial mieloide) y TRIF (adaptador con dominio del receptor citoplasmático Toll (TIR) que induce IFN- $\beta$ ) (Uematsu et al., 2005).

La activación de los TLR da como resultado la formación del miosoma IRAK4 (quinasa 4 asociada al receptor de IL-1) que activa a IRAK1 y a su vez activa a TRAF6 (factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)). Luego TRAF6 promueve la poliubiquitinación (Ub) ligada a la lisina-63 (K63) y de TAK1 (proteína quinasa 7 activada por mitógenos). TAK1 forma un complejo con las subunidades TAB1, TAB2, TAB3 (proteínas de unión de quinasa activada), que interactúan con las cadenas de poliubiquitina generadas por TRAF6 para mediar la activación de TAK1 (Kawai & Akira, 2010). Este complejo fosforila a IKK (complejo de quinasa) que consta de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y de las subunidades reguladoras NEMO (también llamados IKK  $\gamma$ ), lo que conduce a la translocación de NF- $\kappa$ B (p65/p56) (factor nuclear kappa B) al núcleo y la posterior transcripción de citocinas proinflamatorias (Figura 7) (Kawai & Akira, 2010; Kawasaki & Kawai, 2014).

Los TLR7 y TLR8 comparten la misma vía dependiente de MyD88 y pueden conducir a la producción de interferón tipo I (IFN-1). Sin embargo este requiere el reclutamiento de TRAF3 (factor 3 asociado al receptor TNF) e IKK $\alpha$  al complejo MYD88-IRAK-TRAF6 seguida de la fosforilación del IRF7 (factor regulador 7 de IFN) (Figura 7) (Lester & Li, 2014).

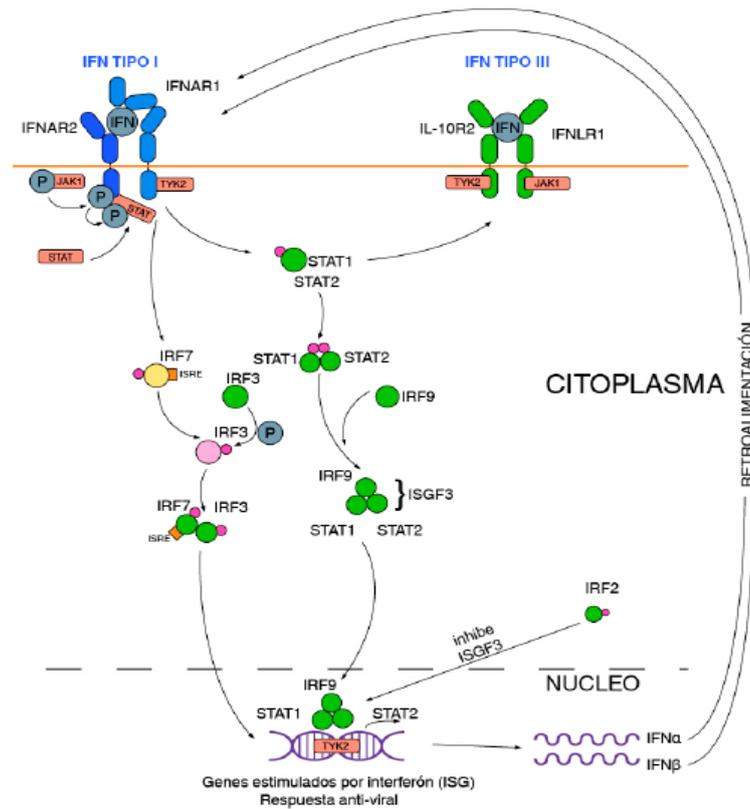
### ***Actividad de Interferón (IFN)***

Los IFNs tipo I se consideran como una respuesta antiviral frente al VEV, existe secreción de citocinas que inhiben la infección del virus activando la vía de transducción mediante las señales de quinasas Janus y activadores de la transcripción (JAK/ STAT) por sus siglas en inglés respectivamente (Figura 8) (Basu et al., 2006).



**Figura 8**

*Activación de las vías de señalización JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) mediadas por el INF- tipo I y tipo III.*



*Nota.* Tomado por O. M. Sánchez et al. (2019) y Schneider et al. (2014).

### **Secreción de Óxido Nítrico (NO)**

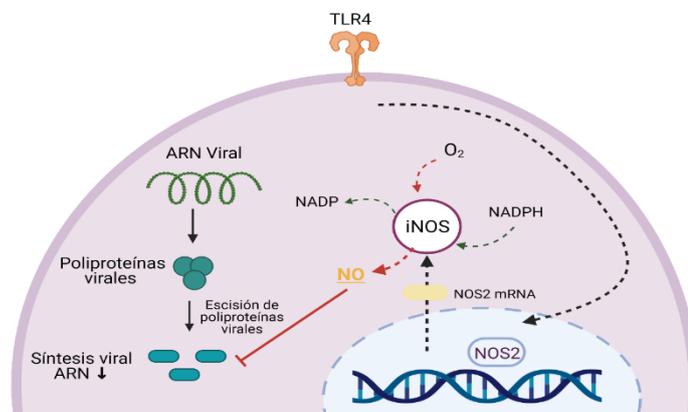
Los estímulos extracelulares como virus, toxinas bacterianas y fúngicas reconocidos por los TLR activan NF- $\kappa$ B, los cuales ingresan al núcleo y regulan positivamente la transcripción de genes para sintetizar el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que inhiben la replicación de patógenos liberando moléculas efectoras, incluyendo el NO (Abdul-Cader et al., 2016; Ibiza & Serrador, 2008). En los virus el NO actúa inhibiendo la replicación y

activación de proteasas implicadas en la entrada del agente viral (Figura 9)(Saura et al., 1999).

El NO es considerada importante en la defensa frente al VEV (Letchworth *et al.*,1999). Bi & Reiss (1995) reportaron *in-vitro* una fuerte inhibición del VEV provocado por el NO, encontrando iNOS en las neuronas del bulbo olfativo durante la infección por VEV.

### Figura 9

*Mecanismo de acción antiviral del NO mediante la señalización TLR4*



*Nota.* Adaptado de Al-Hatamleh *et al.* (2020). Creado en Biorender.com.

### **Anticuerpos Neutralizantes**

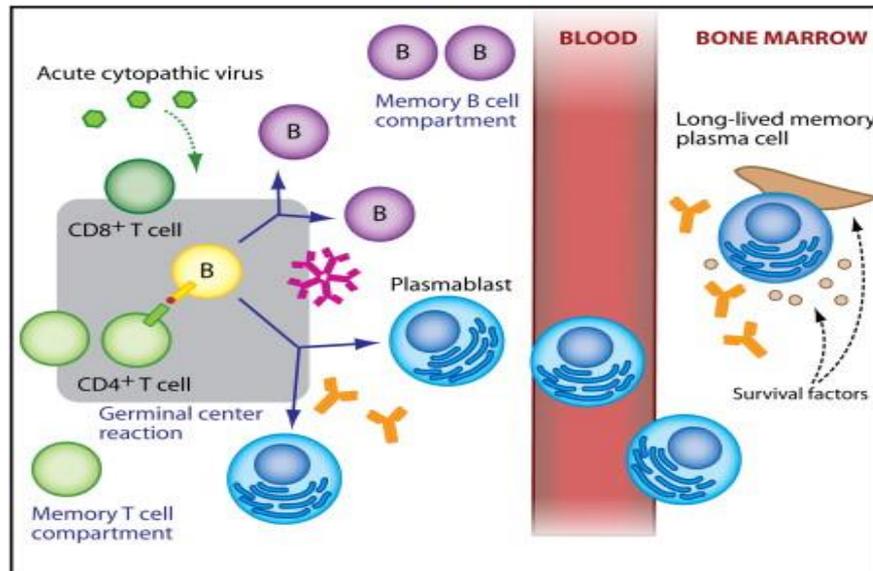
Los anticuerpos neutralizantes (NAC) se producen en los linfocitos B en respuesta a antígenos extraños y se encuentran en las secreciones sanguíneas, linfáticas y mucosas. Su función es inactivar un antígeno extraño ya sea marcándolo para su eliminación por células fagocítica o por el sistema del complemento (Payne, 2017).

El sistema inmunológico humoral en vertebrados contra virus citopáticos presenta un compartimento de células B y células plasmáticas de larga vida. Las células B tienen el potencial de reaccionar rápidamente contra la reinfección mediante anticuerpos y las células plasmáticas secretan anticuerpos de alta especificidad. La inducción de estas dos tipos de

células aparentemente depende de CD4<sup>+</sup> células T y señalización del receptor de las células B (Figura10) (Dörner & Radbruch, 2007).

**Figura 10**

*Inducción de la respuesta inmune humoral por virus citopático*



*Nota.* Tomado por Dörner & Radbruch (2007).

Con respecto a la respuesta inmunitaria frente a VEV, Bründler et al. (1996) reportó la protección de Ac contra el VEV en ratones deficientes de células B, pero no en presencia de protección pasiva. También se ha evidenciado en ratones que el VEV genera una respuesta de Ac 8 días después de la infección, en donde más del 50% de células productoras de IgG2a son específicas para la proteína G del VEV, la mayoría de estas células dejan aproximadamente 10.000 Ac formando un alto nivel de IgG protectoras (Bachmann et al., 1994). Los Ac contra la proteína G protegen los ratones neutralizando el virus y activando otras funciones inmunitarias como el complemento, macrófagos y dirigiendo las células T a células infectas por virus (Lefrancois, 1984). En el ganado vacuno los NAc persisten hasta por 8 años, pero fluctúan hasta 100 veces en un mes (L. L. Rodriguez et al., 1990)

### Técnicas de Diagnóstico

De acuerdo al Manual Terrestre de la OIE (2018), los métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de EV se basan en la identificación del agente viral o en la detección de la respuesta inmunitaria (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Métodos analíticos para el diagnóstico de EV mediante detección del agente viral y respuesta inmune*

Detección	Método Analítico	Principio
Agente Viral	Visualización directa	Microscopía electrónica para identificar las características morfológicas de los <i>Rhabdovirus</i> (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE , 2018).
	Cultivo <i>in-vitro</i>	Identificación del efecto citopático provocado por el VEV en líneas celulares como riñón de mono verde africano (Vero), riñón de hámster neonato (BHK-21) o (IBRS-2) (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE , 2018).
	Pruebas <i>in-vivo</i>	Inoculación del virus en el saco alantoideo de embriones de pollo de 8-10 días permite la multiplicación e aislamiento del VEV (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE , 2018).

<b>Detección</b>	<b>Método Analítico</b>	<b>Principio</b>
<b>Agente Viral</b>	Elisa indirecto en sándwich (IS-ELISA)	Identifica los viriones de las cepas NJ e IND con un conjunto de antisueros polivalentes provenientes de conejo o cobayo (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE , 2018).
	Prueba de fijación del complemento (CF)	Detección del complejo antígeno (Ag)- anticuerpo (Ac). Se usa antisuero monovalente anti-subtipo NJ y antisuero polivalente anti-subtipo IND (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE , 2018).
	Reconocimiento de ácido nucleico	Amplificación de áreas genómicas del VEV mediante PCR. Sin embargo, esta técnica no permite diferenciar si el virus es infeccioso (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE , 2018).
<b>Respuesta Inmune</b>	Elisa de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA)	Detección y cuantificación de Ac contra el serogrupo de EV. Es preferible trabajar con glucoproteínas víricas como Ag, porque no son infecciosas y generan menos falsos positivos (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE , 2018)

<b>Detección</b>	<b>Método Analítico</b>	<b>Principio</b>
	Elisa de competición (C-ELISA)	Los Ags recombinantes NJ e IND-1 de EV compiten con el Ag de muestra por unirse al Ac primario (Afshar et al., 1993).
		Detección de la presencia y la magnitud de Ac neutralizantes. Se basa en la reacción de Ac presentes en el suero, con la dosis infectiva (1000 DICT <sub>50</sub> ) de las cepas NJ e IND. Al reaccionar este complejo Ag-Ac se añaden un
<b>Respuesta Inmune</b>	Neutralización de virus (NV)	sistema susceptible como líneas celulares Vero o IB-RS-2 para observar la inefectividad residual del virus (Alonso F. & Sondahl, 1985; Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, 2018).
		Cuantificación de anticuerpos tempranos
	Fijación del Complemento (CF)	como IgM. Esta prueba tienen una sensibilidad baja y se ve afectada por factores inespecíficos ( Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE , 2018).

Las muestras usadas para la identificación del agente viral como diagnóstico de EV son; el epitelio de las vesículas no reventadas, líquido vesicular, o hisopos de vesículas reventadas. En el caso del ganado bovino cuando no haya tejido epitelial, se puede tomar muestras de líquido esofágico-faríngeo. Mientras que para la detección de la respuesta

inmunitaria y cuantificación de anticuerpos específicos se pueden utilizar muestras de sueros (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, 2018).

Conforme al propósito que se tenga en la investigación se elige al método analítico, esto se indica en la Tabla 4

**Tabla 4**

*Métodos analíticos recomendados para diferentes propósitos.*

Método	Propósito				
	Indicar ausencia de EV en la población	Determinar ausencia de EV en animales antes de los desplazamientos	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la EV	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Detección de la Respuesta Inmunológica</b>					
<b>LP-ELISA</b>	+++	+++	+++	+++	++
<b>C-ELISA</b>	+++	+++	-	+++	++
<b>VN</b>	++	+++	+++	+++	+++
<b>CF</b>	-	+	+++	+	-

*Nota.* (+++): método recomendado; (++): método idóneo; (+): método usado en casos determinados, pero con limitantes en costos y fiabilidad; (-): no recomendado. Tomado de la Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE (2018).

## **Neutralización del Virus**

La neutralización de virus (VN) o seroneutralización, es la reducción de la infectividad viral mediante la unión de los Ac a la superficie de los viriones, bloqueando así el ciclo de replicación viral que precede a la transcripción o codificación de los genes del virus (Klasse & Sattentau, 2002). Inicialmente el término de VN se aplicaba sólo a anticuerpos y a sus fragmentos Fab y F(ab'), pero más adelante la definición se extendió a fragmentos recombinantes de unión a antígenos de dominio único y *nanobodies* (Finlay & Almagro, 2012; Muyldermans, 2013).

La NV es un tipo de inmunoensayo especializado porque no detecta todas las reacciones de unión Ag-Ac, solo detecta anticuerpos que bloquean la replicación del virus. Esto es de vital importancia porque diferentes virus pueden compartir antígenos comunes, pero solo una pequeña fracción de estos antígenos son objetivos de anticuerpos neutralizantes (NAC) (Payne, 2017).

El ensayo de NV en suero es altamente sensible y específica, y se realiza en cuatro pasos: 1) diluciones seriadas dobles de suero, 2) incubación del virus a una concentración conocida, 3) inoculación de la línea celular, 4) detección del efecto citopático (Detmer et al., 2012). Los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero bloquean la infección viral evitando el daño en la línea celular, por el contrario si los anticuerpos no están presentes el virus causa efecto citopático (ECP) en el cultivo celular inoculado (Detmer et al., 2012).

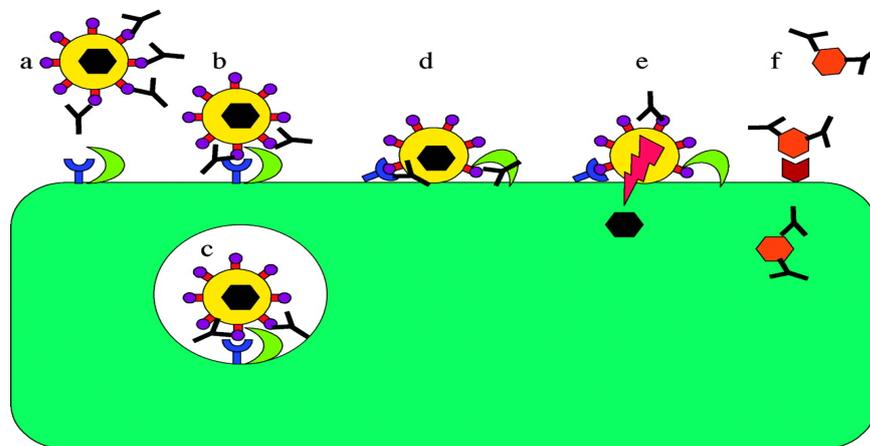
## **Mecanismos de Neutralización Viral por Anticuerpos**

La neutralización viral por anticuerpos tiene diferentes aspectos mecanicistas que no se han definido con claridad entre ellos: cómo se unen los NAC, si estos inducen cambios conformacionales, si inactivan irreversiblemente las proteínas virales que median la entrada, y si son más eficaces contra los viriones en suspensión o después de la unión del virión a las

células (Cheedarla & Hanna, 2018). Sin embargo, se han planteado seis mecanismos de acuerdo al evento en el ciclo de replicación del virus que bloquean los anticuerpos (Figura 12)(Mcdougal et al., 1996; Dulbecco et al., 1956).

**Figura 11**

*Mecanismos de neutralización viral mediado por anticuerpos neutralizantes*



*Nota.* Tomado de (Klasse & Sattentau, 2002).

En el primer mecanismo la unión del NAc a los picos de proteína del virión puede bloquear la unión del virus con los receptores de la superficie celular (Figura 12a). En el segundo mecanismo los NAc inhiben las interacciones entre la proteína de la envoltura viral y los receptores de la superficie celular después de que el virión se ha unido a la célula diana, evitando que este punto de unión desencadené cambios conformacionales que median eventos posteriores como la fusión de membranas (Figura 12b).

En la Figura 12c se observa como el virus se internaliza por endocitosis con los NAc que no han bloqueado la entrada del virión, estos NAc impiden la penetración del núcleo viral en el citoplasma de la célula provocando que el virión finalmente se destruya mediante degradación lisosómica (Klasse & Sattentau, 2002).

En la Figura 12d indica la intercalación del NAc en la interfaz de fusión entre la envoltura del virión y la membrana celular provocando el efecto de bloqueo (Klasse & Sattentau, 2002). En la Figura 12e plantea que incluso la baja ocupación de NAc puede causar cambios internos al transmitir señales a la envoltura viral induciendo que el núcleo viral se liberé comprometiendo que a otros pasos de replicación. Figura 12f muestra la neutralización viral en virus desnudos el cual difiere potencialmente de los virus envueltos, aunque se ha evidenciado que se podría parecer al primer mecanismo. También se muestra la posibilidad de que el complejo Ac-virión entre al citoplasma y el NAc bloquee pasos del ciclo replicativo (Klasse & Sattentau, 2002).

### **Titulación Viral**

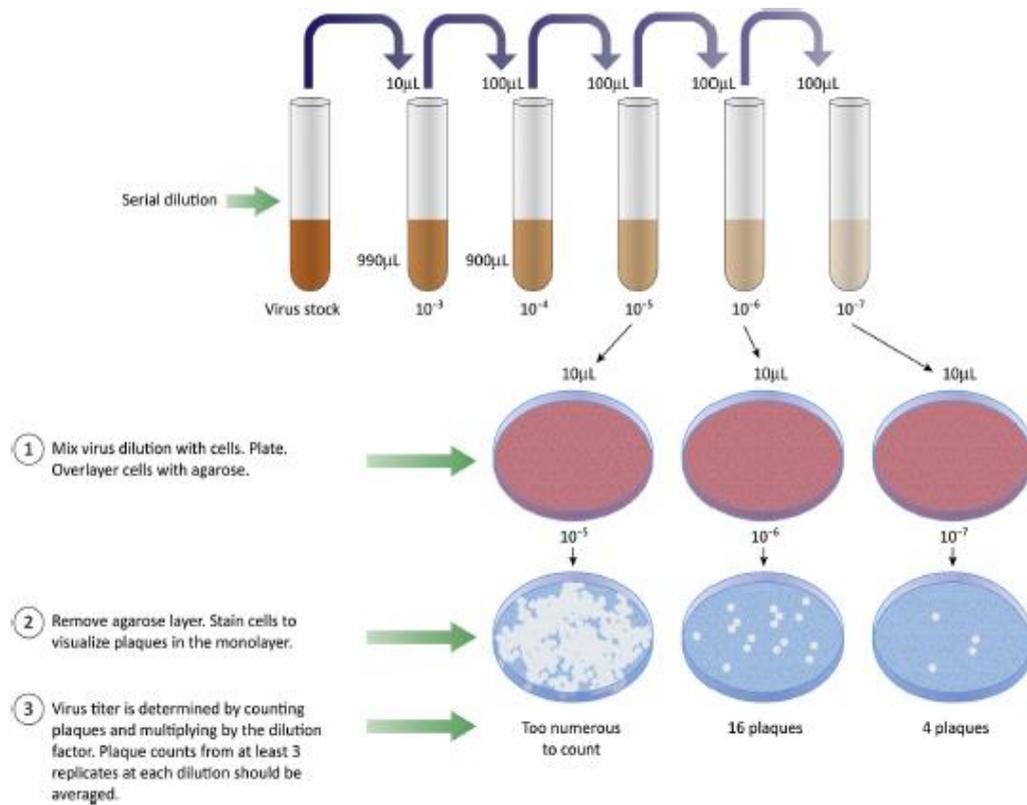
Los ensayos de titulación viral son ensayos biológicos que se basan en métodos de dilución (LaBarre & Lowy, 2001). Los principales métodos usados para la cuantificación de virus son: el ensayo de formación de placas (PFU), y la dilución de punto final usando el principio de dosis infectiva del 50% en cultivo de células (DICT<sub>50</sub>), ambos se realizan mediante la observación del efecto citopático (ECP); este último es usado para la validación de procesos que impliquen productos biológicos (Aleman et al., 2007).

#### ***Ensayo de formación de placas PFU***

Este ensayo mide la infectividad a través del conteo de centros infecciosos que se forman en la placa. Las muestras que contiene virus se diluyen en serie y se añaden a una capa de células cultivadas que posteriormente es recubierta por una capa de agarosa (Figura 13). El virus producido a partir de una célula infectada, destruye células cercanas desarrollando una región libre de células denominada placa. Los resultados de los ensayos de placa se reportan como unidades formadora de placa (PFU/mL) (Payne, 2017).

Figura 12

Proceso metodológicos para el ensayo de placa



Nota: Tomado de Payne (2017).

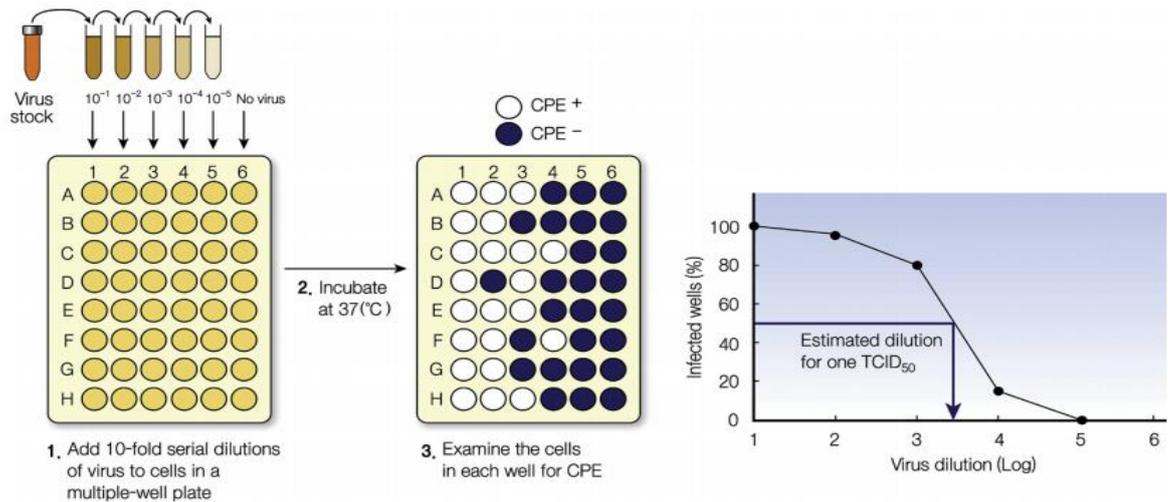
### Ensayo de dilución de punto final

Este ensayo se realiza en cultivos celulares donde  $DICT_{50}$  es la cantidad de muestra que infectará el 50% de las unidades de prueba. Las diluciones seriadas de virus son sembradas en monocapas de células hasta observar el efecto citopático, los resultados es la suma de todos los datos para derivar un título (Payne, 2017).

Los ensayos de dilución punto final se pueden realizar con animales e informarse como dosis infecciosa 50% ( $ID_{50}$ ) o dosis letal al 50% ( $LD_{50}$ ) si la muerte es el punto final (Payne, 2017).

Figura 13

Proceso metodológico para el ensayo de dilución de punto final



Nota. Tomado de Ryu (2017).

### Técnicas para la cuantificación de anticuerpos

#### Método de Spearman –Karber

Para estimar la concentración de anticuerpos se utilizan titulaciones de punto final que se expresan en términos de dilución del suero, los cuales previenen un efecto en el 50% de las monocapas de cultivo celular a una concentración estándar de virus (Thrusfield, 2007). Entre los métodos disponibles está el de Spearman – Karber el cual permite estimar la dilución de la muestra de suero que previene el ECP en el 50% de los pocillos replicados en la placa de microtitulación (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación de España, 2020). Este método no paramétrico expresado en unidades logarítmicas, se destaca por ser bastante robusto de acuerdo con Finney (1971) y Govindarajulu (2001). La estimación propuesta por (Kärber, 1931) se expresa en la siguiente fórmula.

$$\log ID_{50} = \log(\text{dilución más alto donde el ECP sea 100\%}) + 0,5 - \frac{\text{Unidades de prueba que muestran ECP}}{\text{Número de unidades de pruebas por dilución}}$$

## **Cultivo Celular**

### ***Líneas Celulares***

Las líneas celulares se componen de poblaciones de células transformadas con la capacidad de dividirse indefinidamente, esto se debe a la inmortalización en el laboratorio o porque se deriva de una fuente tumorigénica de un paciente o animal (Atala & Yoo, 2015). Estas células se dividen rápidamente entre 12 y 14 horas y tienen el potencial de ser subcultivadas indefinidamente (Verma & Singh, 2013). Las líneas celulares son los métodos más convenientes para el cultivo de virus y en el caso que no estén disponibles se pueden usar las células primarias explantadas de un animal vivo o humano (W. S. Ryu, 2016).

### ***Línea celular BHK-21***

La línea celular *baby hámster kidney* (BHK 21) se derivó de los riñones de crías de cinco hámsteres de la especie *Mesocricetus auratus* no sexados de 1 día de edad en 1961. El subclon 13 de BHK 21 es el más utilizado para la fabricación de vacunas contra la fiebre aftosa. Estas células son susceptibles a múltiples virus incluidos adenovirus D humano, reovirus 3, VEV entre otros (Creative Biolabs, 2007). Actualmente se utiliza esta línea celular para la producción de algunas proteínas recombinantes como el factor VIIa (NovoSeven®) y el factor FVIII (Kogenate®) (Soukharev et al., 2002).

## **Hipótesis**

**H<sub>0</sub>**= La estandarización del ensayo de neutralización viral permite la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus de estomatitis vesicular

## Capítulo III: Materiales y Métodos

### Localización Geográfica

La fase experimental del proyecto se ejecutó en los laboratorios de Virología y Cultivo Celular de la Dirección de Diagnóstico Animal en la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario – Agrocalidad. Ubicada en la Granja Experimental Tumbaco – INIAP del Ministerio de Agricultura, en dirección a la avenida interoceánico km 14 y Gonzáles Suárez, cantón Quito, provincia Pichincha – Ecuador.

### Origen de las muestras

Las muestras séricas de bovinos fueron proporcionadas por el Laboratorio de Virología – Agrocalidad, procedentes de eventos de vigilancia pasiva, de las provincias de Manabí, Esmeraldas, Cañar, Orellana, Napo, Cotopaxi, y Loja recolectados entre los años 2020-2021.

### Tamaño muestral

Se seleccionó una población de 222 sueros usando como criterio de inclusión, sueros diagnosticados con resultado negativo a fiebre aftosa mediante ELISA-SI. Estos sueros fueron sometidos a pruebas de *screening* en placas de 96 pocillos a una dilución 1:8, usando el protocolo de NV expuesto por Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, (2018). Para determinar el tamaño de muestra se tomó el 20% de sueros por cada ronda de *Screening* (Virginia Department of Health (VDH), 2020).

### Medidas de bioseguridad

La cepa VEV - NJ proporcionada por el Laboratorio de Virología- Agrocalidad, se trabajó en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2. Al considerarse al VEV como una zoonosis, se manejó como un organismo potencialmente infeccioso para los humanos

(Garcia, 2020). Esto implica que, al ingresar al laboratorio, no se permitió el uso de joyas o accesorios, se usó ropa de protección de cobertura total, guantes, mascarilla, y protección para los ojos (Public Health Agency of Canada, 2004). Todas las actividades con material infeccioso se realizaron en una cabina de seguridad biológica II.

### **Manejo de células BHK-21**

#### ***Células BHK-21***

La línea celular BHK-21 [C-13] (ATCC® CCL-10) fue proporcionada por el Laboratorio de Cultivo Celular – Agrocalidad, usada como sistema celular para el ensayo de neutralización, y para la multiplicación, titulación e identificación del VEV-NJ.

#### ***Condiciones de cultivo para BHK-21***

Las células BHK-21 se sembraron en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB; Sigma-Aldrich), y 10% de caldo triptosa fosfato (CTP; Sigma-Aldrich), e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific). Para evitar la contaminación bacteriana y fúngica se usó 100 UI/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina y 50 ug/mL anfotericina (ATCC, 2021).

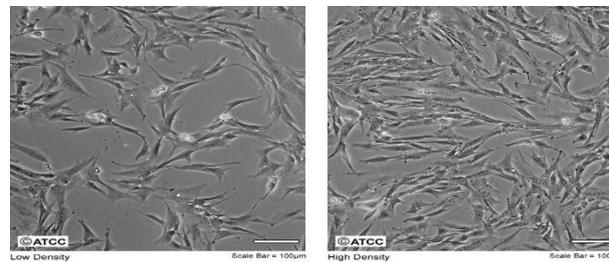
#### ***Subcultivos BHK-21 en monocapas***

Los volúmenes usados en subcultivos fueron para frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Al llegar a una confluencia entre el 80 y 90 % de células, éstas fueron transferidas a un nuevo frasco de cultivo celular. Primero se desechó el medio de cultivo del frasco, a continuación, se realizó dos lavados con 5 mL de buffer (PBS 1X; pH 7.4). Se agregó 2,5 mL de tripsina de páncreas porcino 1x (Sigma-Aldrich) por 8 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo se observó en el microscopio invertido (Olympus CKX41) el desprendimiento de células. Posteriormente, se detuvo la reacción de tripsina agregando 4 mL de DMEM suplementado, se centrifugó por

10 min a 1000 rpm (Hettich MIKRO 220R). Finalmente se desechó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en 1 mL de medio suplementado para posteriormente determinar la densidad celular con la que va ser inoculado el siguiente pase celular (Freshney, 2005).

#### Figura 14

*Células BHK-21 clon 13*



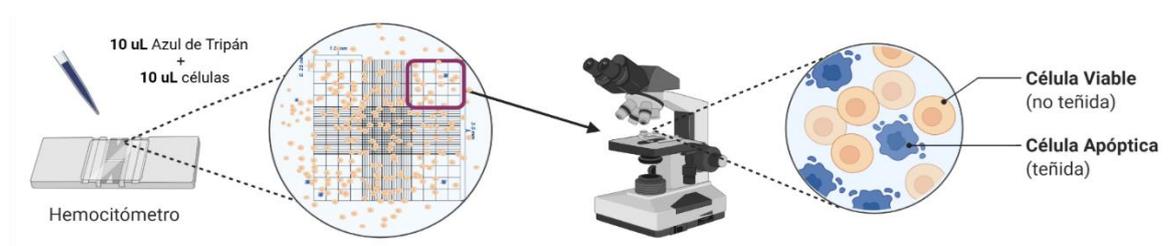
*Nota.* Tomado de ATCC (2021).

#### **Conteo y viabilidad celular**

El conteo celular se lo realizó en el hemocitómetro (cámara de Neubauer). Para determinar la viabilidad celular se realizó una dilución 1:1, el cual tiñó a las células no viables de color azul, y las células viables no se teñirán mostrando un color amarillo (Arbeláez et al., 1979).

#### Figura 15

*Conteo celular usando un hemocitómetro*



*Nota.* Creado en Biorender.com

Para determinar la concentración celular se empleó las siguientes fórmulas expuesta por Arredondo & Voltolina (2006).

$$C = \frac{N}{\text{Número de cuadrantes}} \times 10^4 \times F.D$$

$$F.D = \frac{\text{Volumen muestra} + \text{volumen del colorante}}{\text{volumen muestra}}$$

donde:

C: Concentración celular (células/mL)

N: Número de células contadas en los cuatro cuadrantes

F.D: Factor de dilución

#### **Curva de Crecimiento de células BHK-21**

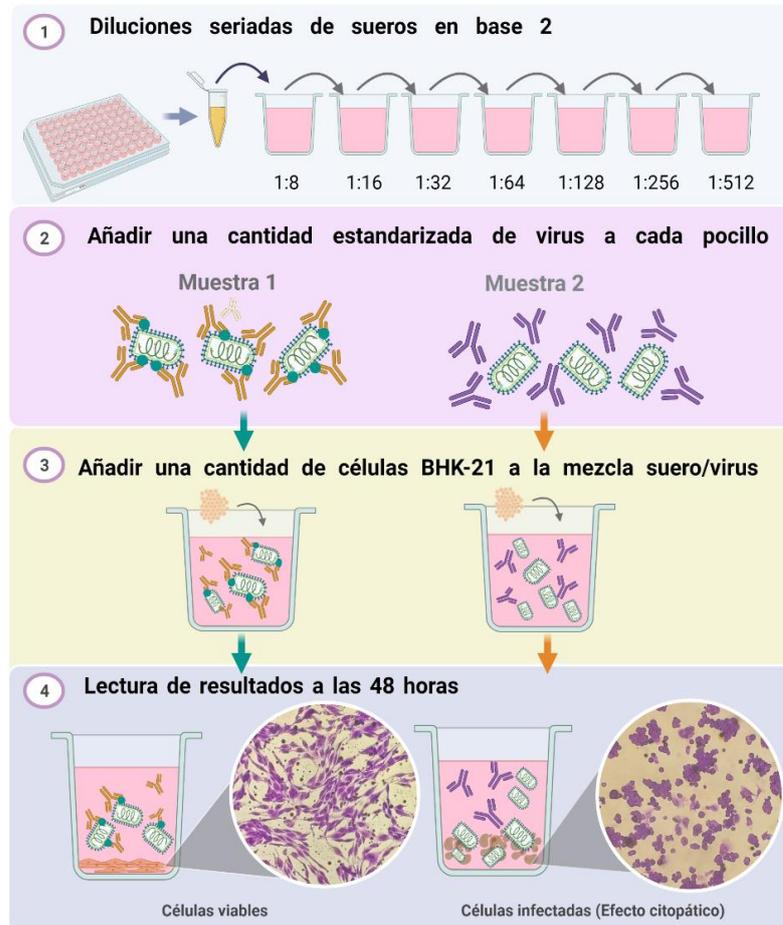
Se recolectó células BHK-21, para transferirlas a placas de 96 pocillos (Eppendorf), en donde se sembró 200 uL de medio suplementado con células a diferentes concentraciones (80.000, 100.000, 120.000, 140.000 y 160.000 células /mL), realizando ocho repeticiones para cada concentración e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. El plan de placa se observa en el Anexo 1.

Al cabo de 24, 48, 72 y 96 horas, se eliminó el medio de la placa, seguido de un lavado con 100 uL de PBS 1x. A continuación, se levantó las células con 100 uL de tripsina 1x por 3 minutos a 37°C. Finalmente se realizó el conteo celular como se indica en al anterior apartado.

#### **Ensayo de Neutralización Viral (VN)**

La metodología descrita se basó en las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE (2018) y fue sujeto a modificaciones.

**Figura 16. Esquema metodológico de la NV**



*Nota.* Creado en BioRender.com

### Manejo del VEV-NJ

#### ***Descongelación y evaluación del ECP inducido por el VEV-NJ |***

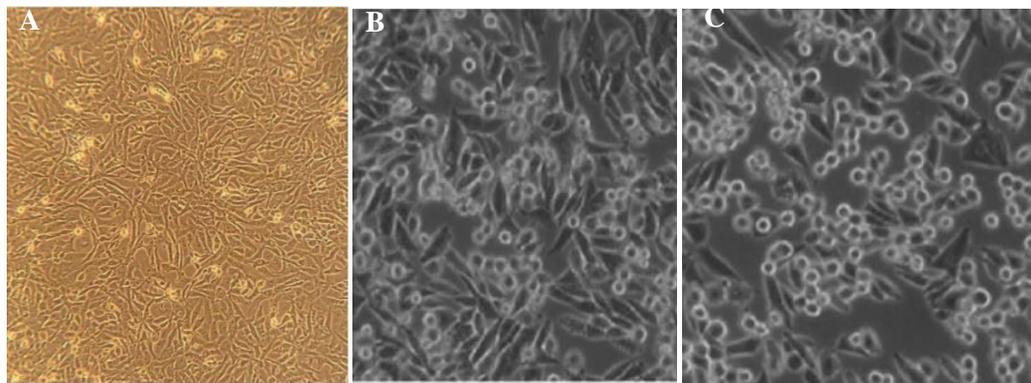
El criovial semilla de VEV-NJ se descongeló en baño maría (HumAqua 5) por 30 segundos a 37 °C, inmediatamente fue dispensado en un tubo cónico de 15 mL que contenía previamente 4 mL de medio DMEM -10% SFB. Se centrifugó el tubo a 10.000 rpm por 10 minutos (Centrifuge MPW-352). Posteriormente se resuspendió el *pellet* con 1 mL de medio suplementado, para ser inoculado en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, que previamente contenía una monocapa preformada de BHK-21 de al menos 48 h a una concentración de 300.000 células/mL. El frasco de cultivo celular permaneció en la incubadora (37°C; 5% CO<sub>2</sub>)

(Shell Lab) hasta observar entre el 70 y 80 % de ECP, para su posterior congelación o continua replicación (BioCision, 2012; Centro Pan-American de Febre Aftosa PANAFTOSA-OPS/OMS, 2020).

Para Cargnelutti et al. (2014), un ECP se caracteriza por la formación de focos redondos de lisis celular, formación de racimos de uvas, y desprendimiento celular como se muestra en la Figura 17.

### **Figura 17**

*Efecto citopático provocado en la línea celular BHK-21*



Nota. A) Control Celular: Capas confluentes de células BHK-21; B) Células BHK-21 infectadas con VEV a las 4 h; c) Células BHK-21 infectadas con VEV a las 6 h. Tomado de Almahboub et al. (2020) y Dunn et al. (2009).

### ***Replicación y congelación del VEV-NJ***

Una vez evaluado el ECP se procedió a la recolección del virus para su congelación, titulación o replicación. Primero se recuperó la suspensión viral del frasco de cultivo en un tubo cónico de 15 mL, el cual fue filtrado con una membrana de polietersulfona de 0.45  $\mu\text{m}$  (Hawach Scientific) para eliminar las células y desechos (Addgene, 2016). El filtrado viral fue fraccionado en alícuotas de aproximadamente 1,5 mL en crioviales de 2 mL para su congelación en un ultracongelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  (ESCO Lexicon® ULT Freezer). Para replicar se

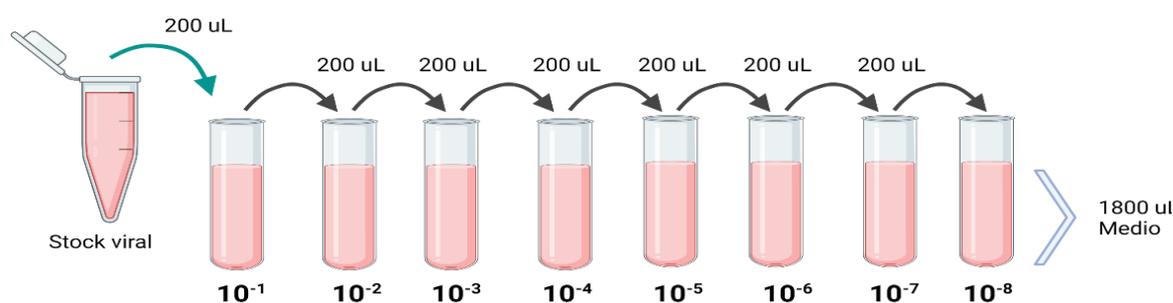
inoculó 300 uL de filtrado viral en un frasco de cultivo celular con una monocapa preformada de BHK-21, el cual fue incubado durante 48 a 72 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> (Centro Pan-Americano de Febre Aftosa PANAFTOSA- OPS/OMS, 2020).

### ***Titulación viral VEV-NJ***

Para la valoración del virus se consideró como *stock* una de las alícuotas fraccionadas del filtrado viral. Primero se dispensó en ocho crioviales 1,8 mL de medio suplementado con antibióticos. A continuación, se transfirió 200 uL del *stock* al primer criovial correspondiente a la dilución 10<sup>-1</sup>. Se homogenizó y se transfirió 200 uL al siguiente criovial (dilución 10<sup>-2</sup>), y así sucesivamente hasta la dilución 10<sup>-8</sup> como se muestra en la figura 18. Posteriormente se dispensó 100 uL de cada dilución a la placa de 96 pocillos que contenía una monocapa de células BHK-21 preformadas, empezando por la dilución más baja 10<sup>-8</sup> a las más alta 10<sup>-1</sup>, cada una con 8 repeticiones. Como control celular se añadió 100 uL de medio suplementado en las columnas 11 y 12 según el plan de placa Anexo 2 (Centro Pan-Americano de Febre Aftosa PANAFTOSA- OPS/OMS, 2020).

**Figura 18**

*Esquema de dilución del virus en base 10*



Nota. Creado en BioRender.com

### **Cálculo del título viral por el método de Reed & Muench**

Se calculó la Dosis infectiva del 50% en cultivo celular (DICT<sub>50</sub>) del virus empleando el método de Reed & Muench (1938). Primero se contó los pocillos positivos (presencia de ECP) y negativos (ausencia de ECP) de las ocho diluciones. Posteriormente, se determinó el porcentaje de ECP para cada dilución. Con los porcentajes calculados se determinó la DICT<sub>50</sub> usando las siguientes ecuaciones:

- Distancia proporcional (DP):

$$DP = \frac{\% ECP \text{ superior al } 50 \% - 50\%}{\% ECP \text{ superior al } 50 \% - \% ECP \text{ inferior al } 50 \%}$$

- Corrección de la DP

$$DP = DP \times \text{Factor Dilución } (\log_{10} = 1)$$

- Fórmula de la DICT<sub>50</sub>

$$\text{Log } (DICT_{50})^* / 0,1\text{mL} = [-\text{Log } (\text{Dilución mayor al } 50 \%) + DP]$$

- Despejando el logaritmo:

$$DICT_{50}/\text{mL} = 10^{[\text{Log } (DICT_{50})^* + FC]}$$

donde:  $FC = \frac{\text{Log } (DICT_{50})^* + \text{Volumen virus}}{100}$ ; factor de conversión de uL a mL

Finalmente se calculó la DICT<sub>50</sub>/mL a las 24 y 48 horas, obteniendo el valor de la media del título viral.

### **Cálculo de la solución de trabajo del virus**

La solución de trabajo del virus se diluyó a 2000 DICT<sub>50</sub>/mL (10<sup>3,3</sup>), concentración recomendada por la OIE (2018). Primero se calculó el volumen necesario por placa considerando que se usa 50 uL equivalente a 100 dosis de virus por pocillo. El siguiente paso

fue calcular el volumen a partir de la dilución obtenida de la titulación viral usando la siguiente fórmula:

*Volumen solución trabajo*

$$= \frac{\text{Dilución cercana a la dosis recomendada} \times \text{volumen desado}}{\text{Dilución de la dosis deseada}}$$

### ***Sueros problema***

Los sueros a testear fueron inactivados a  $56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos antes del ensayo de NV, y en el caso de presentar impurezas fueron centrifugados (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, 2018).

### ***Placa de NV con sueros problemas***

Para el ensayo de NV, se utilizó 5 muestras de sueros por duplicado diluidos en base 2, iniciando con la dilución 1:8, y distribuidas en placas de 96 pocillos. Como control positivo se usó sueros de animales convalecientes con títulos  $> 2.4$ , diagnosticados con EV mediante ELISA-SI en la fase de infección viral, y como control negativo se usó un suero hiperinmune del kit de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra proteínas de la cápside del virus de fiebre aftosa otorgada por la Organización Panamericano de Salud.

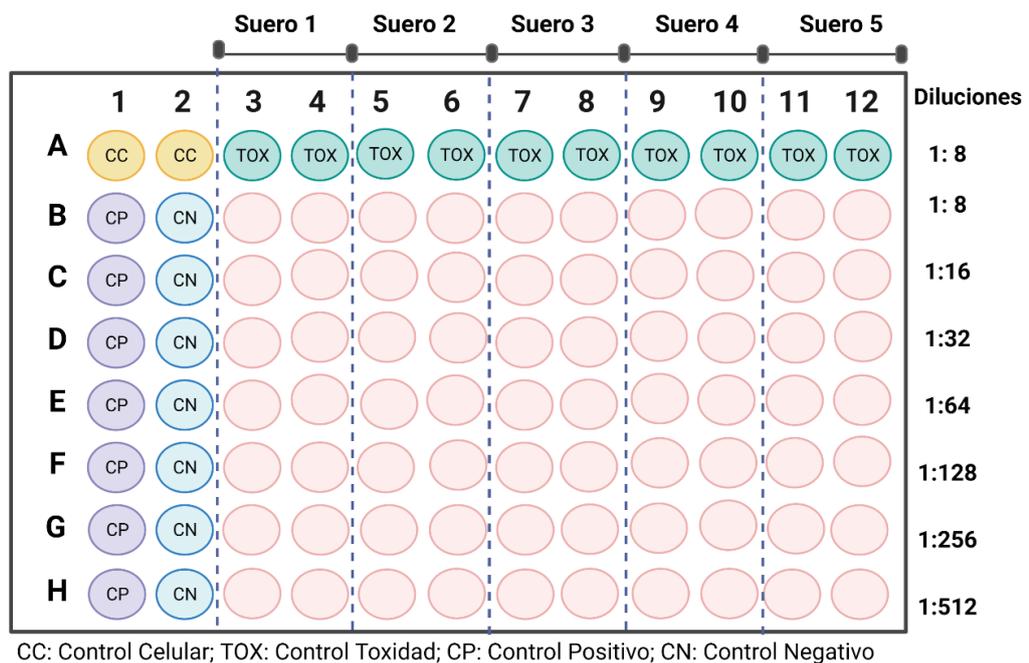
En la primera fila de la placa se realizó el control de toxicidad para los cinco sueros añadiendo 87,5 uL de medio suplementado más 12,5 uL del suero de prueba (dilución 1:8). En la segunda fila se inoculó 75 uL de medio suplementado más 25 uL de suero de prueba (dilución 1:4). A partir de la tercera hasta la séptima fila se añadió 50 uL de medio suplementado. A continuación, con un multicanal se homogenizó las muestras de la segunda fila y se tomó 50 uL para transferirlos a la tercera fila, y así sucesivamente hasta la última fila. El proceso de dilución fue el mismo para el control positivo, sin embargo, para el control

negativo se inició con dilución en base 10 empezando en (1:10). Posteriormente, se colocó 50 uL de la solución de trabajo viral, exceptuando la primera fila correspondiente al control de toxicidad y control celular. La placa fue incubada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante una hora para permitir la neutralización del virus.

A continuación, a la mezcla de suero/virus se inoculó 100 uL/pocillo de las suspensiones celulares de BHK-21 a una concentración de 160.000 células/ml. Finalmente, la placa fue incubada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 48 a 72 horas (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, 2018). El plan de placa se presenta en la Figura 19.

**Figura 19**

*Plan de placa para el ensayo de neutralización de virus*



*Nota.* Creado en BioRender.com

### ***Tinción de la placa de NV con cristal violeta***

Para tener una observación visual de las cavidades protegidas por Ab se realizó la tinción con cristal violeta 1%. Primero se descartó el medio de la placa, seguido de un lavado con 100 uL de PBS 1x/pocillo. Posteriormente se fijó las células con formol/salina al 10% por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se descartó la solución de fijación, y se añadió 75 uL de cristal violeta al 1% diluida en etanol al 5% y formol inhibido al 37%, durante 20 minutos. Finalmente se contaron las cavidades teñidas para evaluar el título neutralizante.

### ***Calculo del Título Neutralizantes por Spearman- Karber***

Para determinar el título de punto final de anticuerpos neutralizantes se aplicó el método acumulativo *Spearman Karber* (Arbeláez et al., 1979; Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, 2018). Expuesto en la siguiente fórmula:

$$\text{Título Ac} = (\text{Número de cavidades protegidas} \times \text{Número de cavidades por dilución} - \text{título 50\%}) \\ \times \log(\text{factor de dilución}) + \log(\text{dilución más baja del suero})$$

donde:

Número de cavidades por dilución:  $\frac{1}{2} = 0,5$

Título 50% = 0,5

Log (factor de dilución=2) = 0,3

Log (dilución más baja del suero= 8) = 0,9

Según la OIE (2018), el punto de corte de NAc contra VEV es 1,5 (expresado en log) y 32 (expresado aritméticamente). Por lo tanto, los sueros con títulos  $\geq 1,5$  (32) se consideran positivos, y los sueros con títulos  $< 1,5$  (32) se consideran negativos. La actividad neutralizante de los sueros se informó como el recíproco de la dilución más alta que da un 50% de inhibición del ECP.

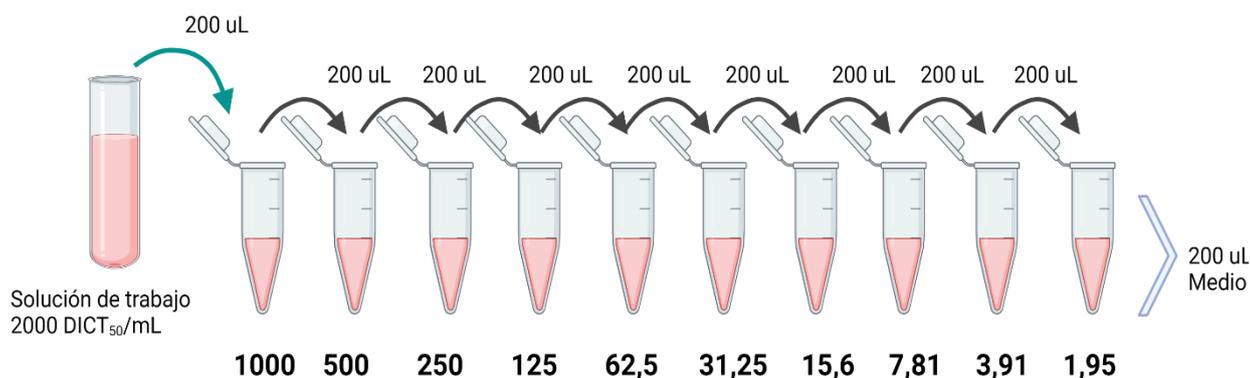
### **Control de Dosis Viral**

Se realizó una placa de control de dosis viral para comprobar si la dosis utilizada en la solución de trabajo cumplía con el rango de aceptación (30 a 300  $DICT_{50}/100\mu L$ ), debido a que las condiciones de congelación y descongelación causan pérdida viral.

La solución de trabajo viral fue diluida en base 2, con cuatro repeticiones. Primero en 10 tubos de 1.5 mL se dispensó 200  $\mu L$  de medio suplementado, a continuación, se transfirió 200  $\mu L$  de la solución de trabajo viral al primer tubo, siguiendo el esquema de dilución que indica la figura 20.

**Figura 20**

*Esquema de dilución para el ensayo de control de dosis viral*



*Nota.* Creado en BioRender.com

Posteriormente, en una placa de 96 pocillos se dispensó 100  $\mu L$  de DMEM suplementado en las columnas 11 y 12 correspondiente al control celular. A continuación, se dispensó los 100  $\mu L$  de las diluciones de virus empezando con la dilución más baja 1,95  $DICT_{50}/mL$  hasta la más alta 1000  $DICT_{50}/mL$ , el plan de placa se expone en el anexo 3. Consecutivamente, la placa se incubó durante una hora en una incubadora humidificada con 5% de  $CO_2$ , y 37°C. Transcurrido el período de incubación, se añadió 100  $\mu L$  de la suspensión celular a una concentración de 160.000 células/ $mL$ . A continuación, se incubó las placas a las

mismas condiciones mencionadas durante 48 a 72 horas. Finalmente se determinó la dosis viral mediante el método acumulativo de *Spearman Karber*.

### ***Criterios de aceptación para el ensayo de VN***

Los criterios de aceptación de la prueba de VN según la OIE (2018), deben cumplir con los siguientes parámetros:

- Los controles celulares no deben presentar cambios morfológicos
- El control de toxicidad de los sueros de prueba no debe presentar degeneración celular provocada por sustancias tóxicas.
- El control de dosis viral utilizada en la prueba debe estar entre 30 y 300 DICT<sub>50</sub>/100 uL
- El control positivo debe seguir siendo positivo durante todos los ensayos en los que se use
- El control negativo debe tener siempre un título inferior a 1,5.

### **Sensibilidad Analítica**

La sensibilidad analítica (ASe) se refiere a la capacidad del ensayo de neutralización viral para detectar cantidades de anticuerpos neutralizantes, y cuánto más sensible sea la prueba menor será la cantidad de anticuerpos que detectará (Stites et al, 1997). Para determinar la ASe se utilizó una dilución de punto final del suero hasta que el ensayo ya no pueda detectar el anticuerpo (Organización de Sanidad Animal (OIE), 2009). Se evaluarón n=8 sueros positivos con títulos > 2,8 por duplicado.

### **Especificidad Analítica**

La especificidad analítica (ASp) permite distinguir entre el analito detectado con otros componentes que pueden estar en la muestra (Organización de Sanidad Animal (OIE), 2009). La ASp se puede evaluar de tres formas distintas: selectividad, exclusividad e inclusividad. En este ensayo se usará el parámetro de exclusividad que de acuerdo al Manual de las Pruebas de Diagnóstico (OIE) 2009, se define como la capacidad de detectar un analito excluyendo todos los demás anticuerpos que pudieran generar una reacción cruzada.

Para este ensayo se seleccionó sueros de campo diagnosticados positivo mediante ELISA para Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR; n=3), Diarrea viral bovina (DVB; n=3), y Peste porcina clásica (VPP; N=3). Adicionalmente se usó un suero de humano para medir la exclusividad de especie. Cada suero fue evaluado por duplicado, en el anexo 4 se muestra el plan de placa de 96 pocillos.

### **Repetibilidad analítica**

La repetibilidad del ensayo se determinó enfrentando 9 sueros que contengan una actividad del analito que se sitúe en el intervalo de funcionamiento de la prueba. Los valores se evaluarán mediante el análisis de varianza (ANOVA), para encontrar el margen de titulación de anticuerpos (Arbeláez et al., 1979).

### **Análisis estadístico**

Los resultados de la curva de crecimiento celular se ajustaron a un criterio de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks, y representados con el gráfico de comparación de cuantiles (Q-Q Normal). Se realizó la transformación de la variable de respuesta a una misma escala mediante el método Mínimo-Máximo expresado en porcentaje para realizar comparaciones más robustas.

Los datos de título viral y título neutralizante fueron presentados con porcentajes, medias  $\pm$  SD (desviación estándar) y con al menos dos repeticiones por ensayo. La diferencia significativa con un nivel de significancia de 0.05 entre diferentes tratamientos fue evaluada por la prueba paramétrica ANOVA de una vía y contrastada mediante la prueba de medias Duncan y Tukey con un nivel de confianza del 95% ( $p\_valor < 0,05$ ). Los análisis estadísticos se realizarán con el software Graphpad Prism v 9.0 e Infostat.

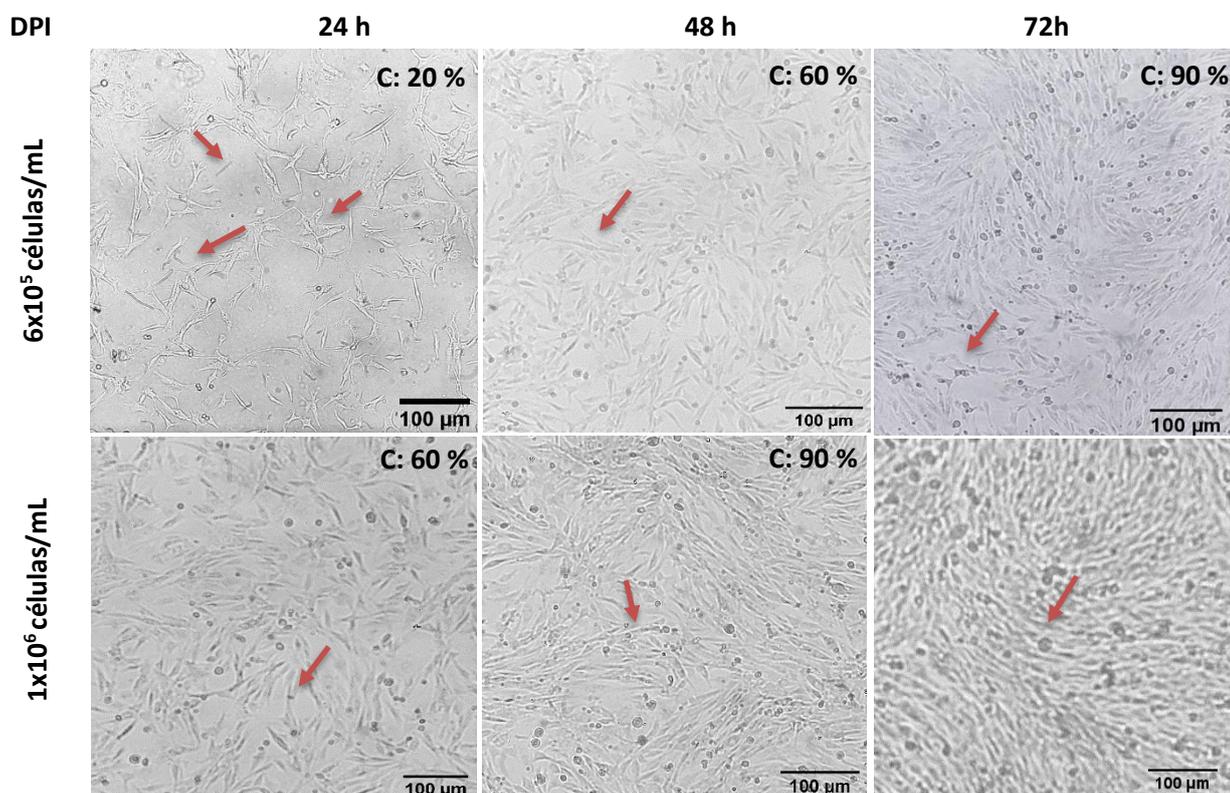
## Capítulo IV: Resultados

### Replicación y diferenciación de la línea celular *Baby Hamster Kidney* (BHK-21)

La línea celular BHK-21 fue cultivada bajo condiciones óptimas, reflejando una correcta morfología y diferenciación celular durante todo los subcultivos realizados. Para tener monocapas de células preformadas a las 48 y 72 horas se determinó la concentración de inóculo celular adecuada para frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. A una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL se obtuvo una confluencia del 90 % a las 24 h, incrementándose a una densidad promedio de  $2,44 \times 10^6 \pm 0,28 \times 10^6$  células/mL. Mientras que para tener una confluencia del 90% a las 72 h se usó un inóculo celular de  $6 \times 10^5$  células/mL con un incremento promedio de  $2,3 \times 10^6 \pm 0,45 \times 10^6$  células/mL.

#### Figura 21

Observación microscópica de células BHK-21



*Nota.* Micrografías a campo claro de dos inóculos de células BHK-21:  $6 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células/mL, a las 24, 48 y 72 horas. DPI: Días después de la inoculación. C: confluencia celular. Magnificación: 100X. Software: ImageJ. (↓) Diferenciación de células.

## **Evaluación de la curva de crecimiento de la línea celular BHK-21**

### ***Prueba de normalidad para la variable de incremento celular***

En el ensayo de la curva de crecimiento se obtuvo 32 datos para cada uno de los cinco inóculos celulares ( $8 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1.2 \times 10^5$ ,  $1.4 \times 10^5$ ,  $1.6 \times 10^5$  células/mL). Teniendo como variable de respuesta el incremento de la población celular a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Para validar que los datos obtenidos del ensayo de crecimiento celular no presentan valores atípicos se comprobó que estos sigan una distribución normal mediante; la prueba de Shapiro-Wilks con un nivel de confianza del 95% y con el gráfico de comparación de cuantiles (Q-Q Normal). En la tabla 5 se observa que el *p-valor* para cada uno de los cinco inóculos es mayor 0.05, aceptándose la hipótesis nula que confirma que la variable de incremento de la población celular presenta una distribución normal. Así mismo, en la figura 22 se observa que los datos aparecen agrupados alrededor de la línea recta con un factor de correlación ( $r$ )  $> 0,9$  contrastando la hipótesis de normalidad. La densidad de 80.000 células/mL presentó menor cantidad de datos dispersos reflejándose en el  $R=0,993$ .

Tabla 5

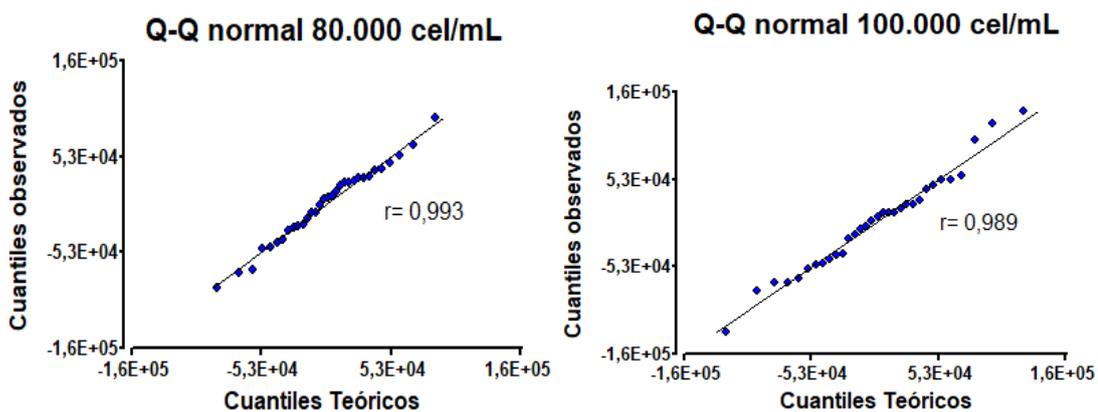
Estadístico y valor  $p$  de la prueba Shapiro-Wilks para el supuesto de normalidad

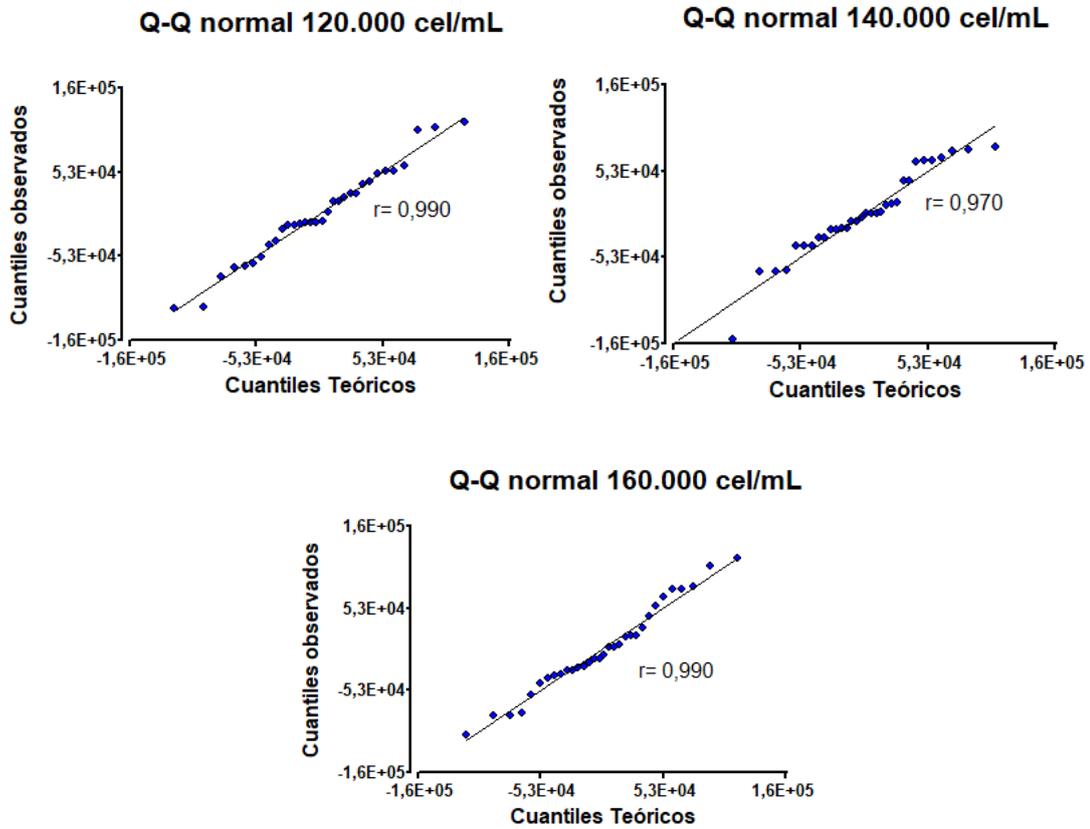
Inóculo celular (células/mL)	Estadístico (W)	$p$ -valor
80.000	0,98	0,920
100.000	0,97	0,867
120.000	0,96	0,5483
140.000	0,94	0,2176
160.000	0,96	0,5144

Nota. Creado en Infostat versión 2020

Figura 22

Gráficas Q-Q normal para los cinco inóculos celulares





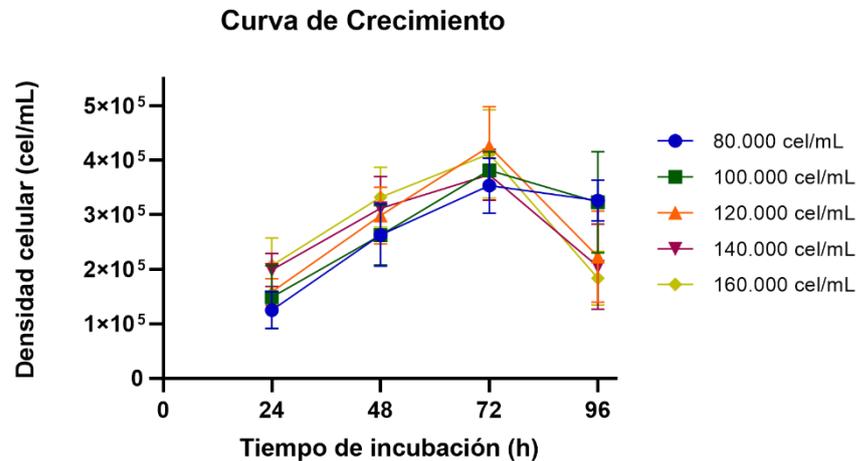
*Nota.* Las gráficas representan la linealidad como criterio de homocedasticidad para los cinco inóculos celulares. Creado en Infostat versión 2020. R: factor de correlación.

### ***Representación gráfica de las curvas de crecimiento***

Con los datos validados para los cinco inóculos celulares, se realizó las curvas de crecimiento. En la figura 23 se observa que el incremento de la población celular de los inóculos de  $1,2 \times 10^5$ ,  $1,4 \times 10^5$ ,  $1,6 \times 10^5$  células/mL, aumentan hasta las 72 horas alcanzando la fase estacionaria, seguido de la fase de declive. Mientras que para los inóculos más bajos se observa una viabilidad hasta las 76 horas.

**Figura 23**

*Análisis de la curva de crecimiento de la línea celular BHK-21.*

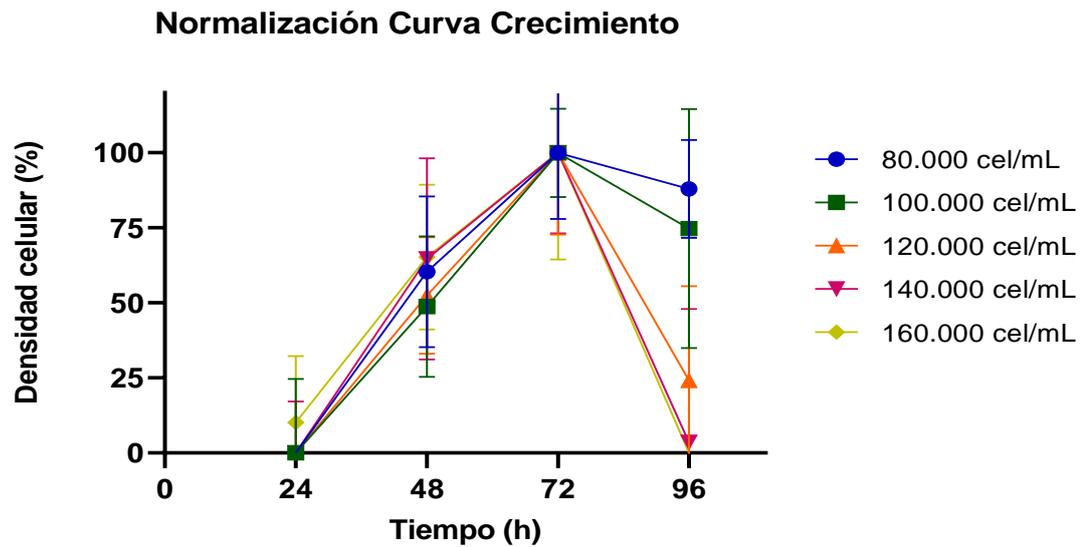


*Nota.* Crecimiento poblacional de los cinco inóculos celulares respecto al tiempo de incubación. La gráfica muestra la media (símbolo) y la desviación estándar (barras) del crecimiento celular para cada tiempo. Software: GrahpPad-Prism v 9.0.

Para poder realizar comparaciones más significativas, las poblaciones celulares de los cinco inóculos celulares a diferentes tiempos se ajustaron a una misma escala de porcentaje. En la figura 24 se observa que el inóculo de  $8 \times 10^5$  células/mL presentó mayor replicación celular a las 48 y 72 horas. Mientras que el inóculo  $1,6 \times 10^5$  células/mL presentó una mortalidad del 75 % del total de células a las 96 horas. De acuerdo, con estos resultados se escogió las concentraciones celulares de  $8 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células/mL como las densidades idóneas para sembrar en las placas de 96 pocillos debido que presentaron un crecimiento exponencial hasta las 48 horas.

**Figura 24**

*Análisis de la curva normalizada del crecimiento de la línea celular BHK-21*



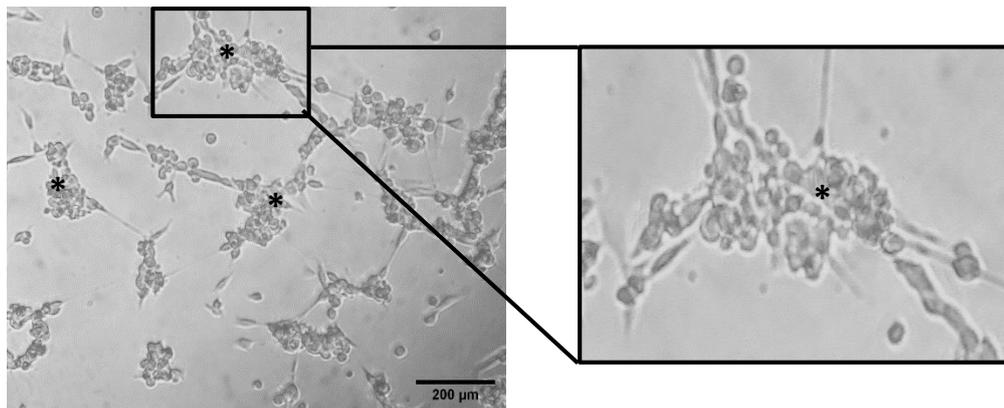
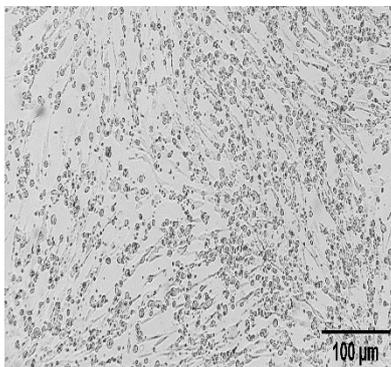
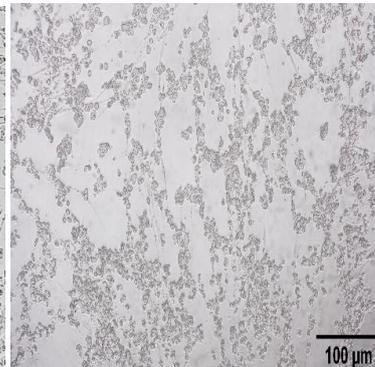
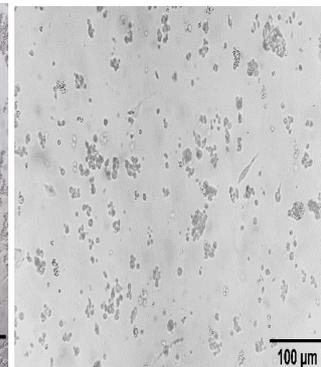
*Nota.* Curvas de crecimiento celular normalizadas respecto al tiempo de incubación. La gráfica muestra la media (símbolo) y la desviación estándar (barras) del crecimiento celular para cada tiempo. Software: GraphPad-Prism v9.0.

### **Replicación del VEV-NJ en la línea celular BHK-21**

Al cabo de 24 horas de inoculación de 300  $\mu$ L VEV-NJ en la monocapa preformada de BHK-21 se observó cambios morfológicos en más del 60 % de células. A las 48 horas de infección se observó agrupaciones celulares en forma de “racimos de uva” que caracteriza al ECP (Figura 25-A). Finalmente, a las 72 horas se evidenció el 100 % de muerte celular (Figura 25-B).

**Figura 25**

*Efecto Citopático del VEV-NJ en la línea celular BHK-21.*

**A****B****24 horas****48 horas****72 horas**

*Nota.* Micrografías a campo claro de: A) Características morfológicas del ECP del VEV-NJ en BHK-21 (\*): agrupaciones celulares. Magnificación: 400X B) Inoculación de VEV-NJ en BHK-21 a las 24, 48 y 72 horas Magnificación: 100X. Software: ImageJ.

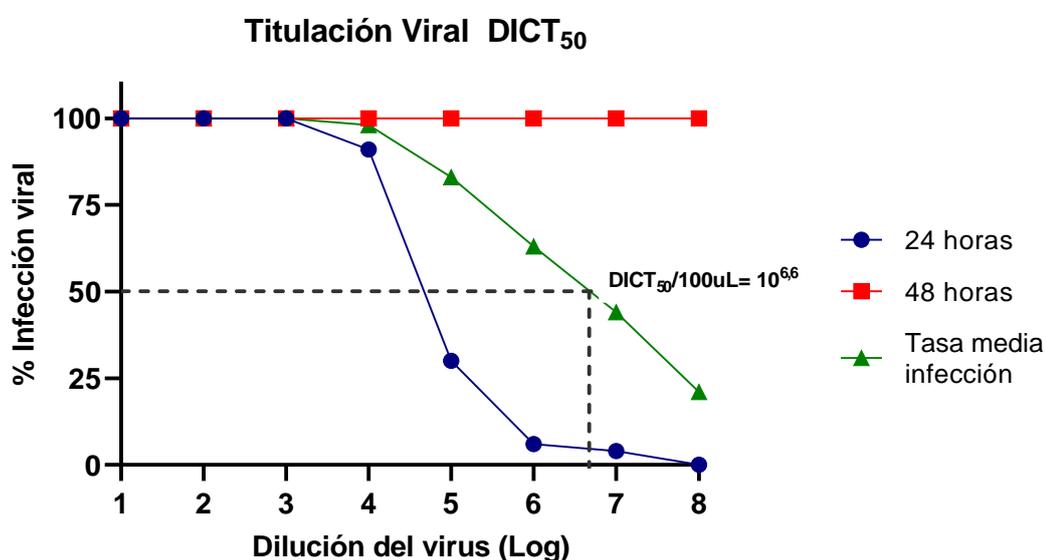
**Ensayo de Titulación Viral por el método de *Reed & Muench*.**

A partir de las ocho observaciones de ausencia o presencia de ECP por cada dilución ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) del VEV-NJ, a las 24 y 48 horas se obtuvo el título

promedio del virus siendo  $7,59 \pm 0,35 \log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{mL}$ . El cálculo del título viral por el método de *Reed & Muench* se observa en el Anexo 5. En la figura 26 se muestra el 100 % de infección viral a las 48 horas en las 8 diluciones, mientras que a las 24 horas el 100 % de infección viral se encuentra solo en las tres primeras diluciones.

**Figura 26**

*Análisis del título promedio del VEV-NJ.*



*Nota.* Curvas de porcentaje de infección del VEV-NJ en 8 diluciones las 24 y 48 horas.

Adicionalmente se muestra el valor  $\text{DICT}_{50}/100 \text{ uL}$  de virus obtenido del promedio del título viral de los dos días de infección. Software: GraphPad-Prism v9.0.

A partir del título viral se calculó la  $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$  para las ocho diluciones (Tabla 6). De las cuales se escogió las tres primeras por estar dentro del rango de concentración estándar ( $2000 \text{ DICT}_{50}/\text{mL}$ ) recomendada por la OIE para el ensayo de VN.

**Tabla 6***Titulación (DICT<sub>50</sub>/mL) de las ocho diluciones del VEV-NJ*

No	Título log <sub>10</sub>	Dilución	DICT <sub>50</sub> /mL
<b>Estoque viral</b>	7,59	1	38904514
1	6,59	0,1	3890451
2	5,59	0,01	389045
3	4,59	0,001	38905
4	3,59	0,0001	3890
5	2,59	0,00001	389
6	1,59	0,000001	39
7	0,59	0,0000001	4
8	-0,41	0,00000001	0

**Prueba de Screening**

Los resultados de las 222 muestras séricas evaluadas mediante NV en placas de 96 pocillos, fueron clasificados como: negativo para las muestras que presentaron ECP y positivo para las muestras que no presentaron ECP. En la tabla 7 se presenta un total de 145 muestras negativas en donde el mayor porcentaje fue para la provincia de Manabí con el 20% del total de muestras. Con respecto al resultado positivo (figura 27) se obtuvo un total de 76 muestras, donde el mayor porcentaje fue para las provincias de Cañar y Cotopaxi con un 10,22 % y 11,11% del total de las muestras respectivamente. El resultado positivo NC presentó solo 3 muestras con un 0,44 % del total.

Tabla 7

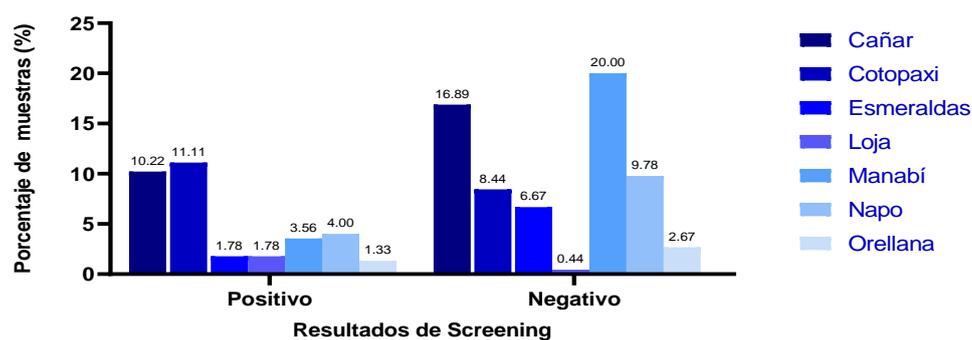
Resultados de la prueba de Screening por provincia

Resultado por Screening	Provincias							Total
	Cañar	Cotopaxi	Esmeraldas	Loja	Manabí	Napo	Orellana	
Negativo	38	19	15	1	45	22	6	146
Positivo	23	25	4	4	8	9	3	76
Total	61	46	19	5	54	31	9	222

Nota. Creado en Infostat versión 2008.

Figura 27

Análisis del resultado de Screening



Nota. Diagrama de barras porcentual para los resultados *Screening*. Los números sobre las barras indica el porcentaje para la provincia del total de muestras (n=222). Software: GrahpPad-Prism v9.0

Se seleccionaron 44 sueros al azar con resultado positivo para realizar el ensayo de VN. En el anexo 7 se presenta la información de los sueros que se seleccionaron.

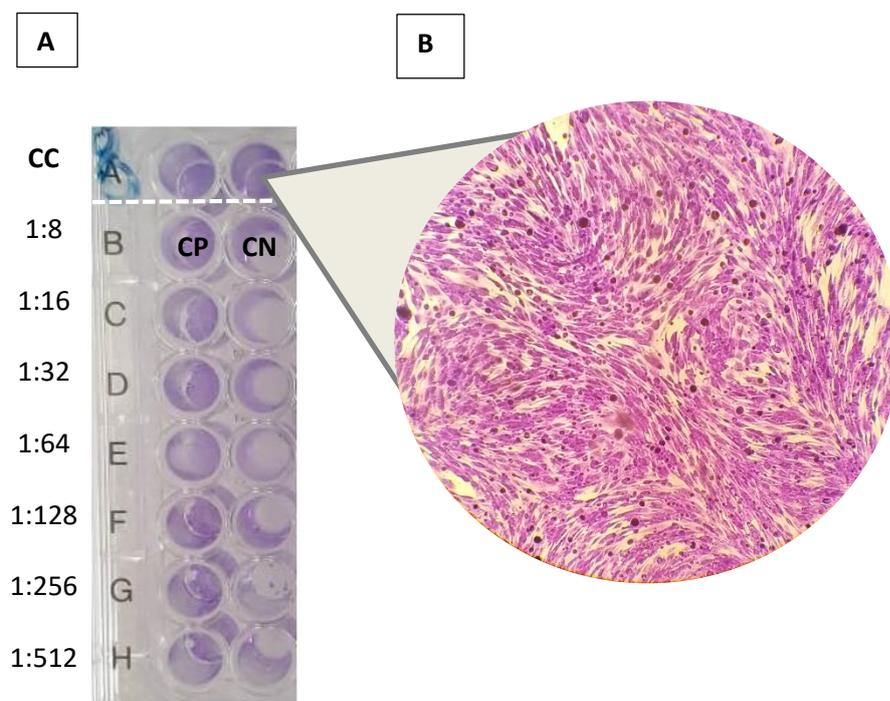
### Ensayo de Neutralización Viral (VN)

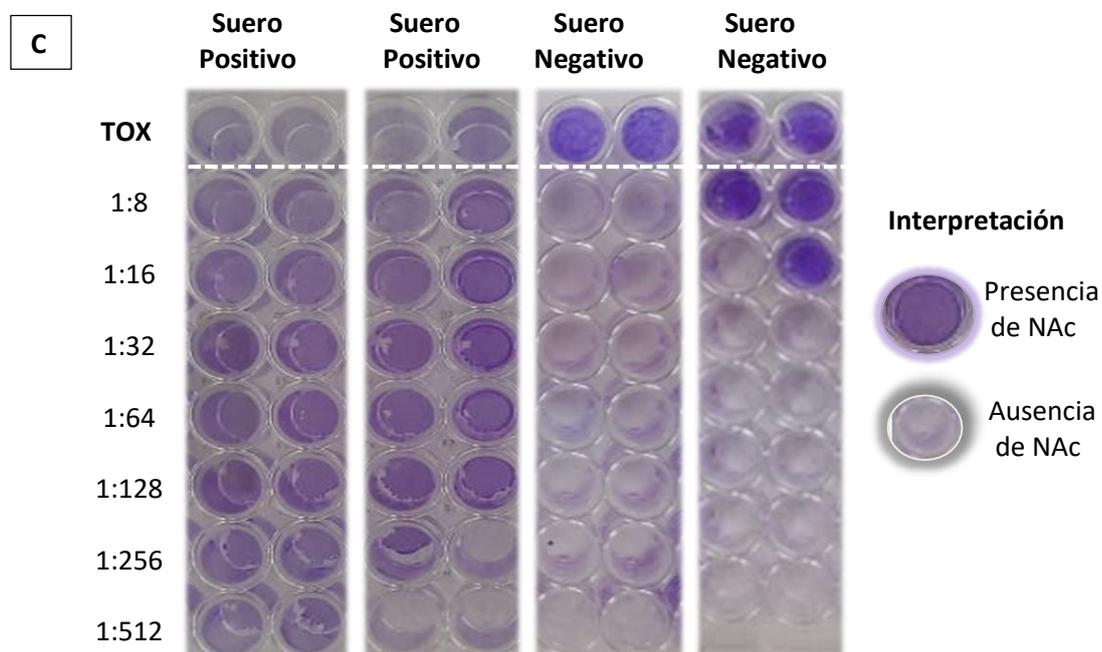
#### *Tinción cristal violeta 1% de las placas de VN*

El resultado de la tinción cristal violeta 1 % a las 48 horas del ensayo de VN, mostró la monocapa de las células BHK-21 teñidas. En la figura 29.A se observó el resultado visual del ensayo, donde el control positivo se tiñe indicando la presencia de NAc, a diferencia del control negativo que no tiñó ninguno de los pocillos. En la micrografía de células BHK-21 se observa una confluencia del 90% y una morfología de células alargadas característica de la línea celular (Figura 29.B). En los sueros a testear la prueba de toxicidad se tiñó demostrando la viabilidad del suero al no causar daño en la línea celular (Figura 29.C).

### Figura 28

*Resultado visual del ensayo de neutralización viral a las 48 horas*





*Nota.* A) Pruebas de control del VN; CC: Control Celular, CP: Control Positivo; CN: Control Negativo (Suero de Fiebre Aftosa); B) Micrografía de campo claro del control celular teñido con cristal violeta 1%. Magnificación 100X; C) Resultados visuales para sueros positivos y negativos. TOX: control de toxicidad. NAc: Anticuerpos Neutralizantes.

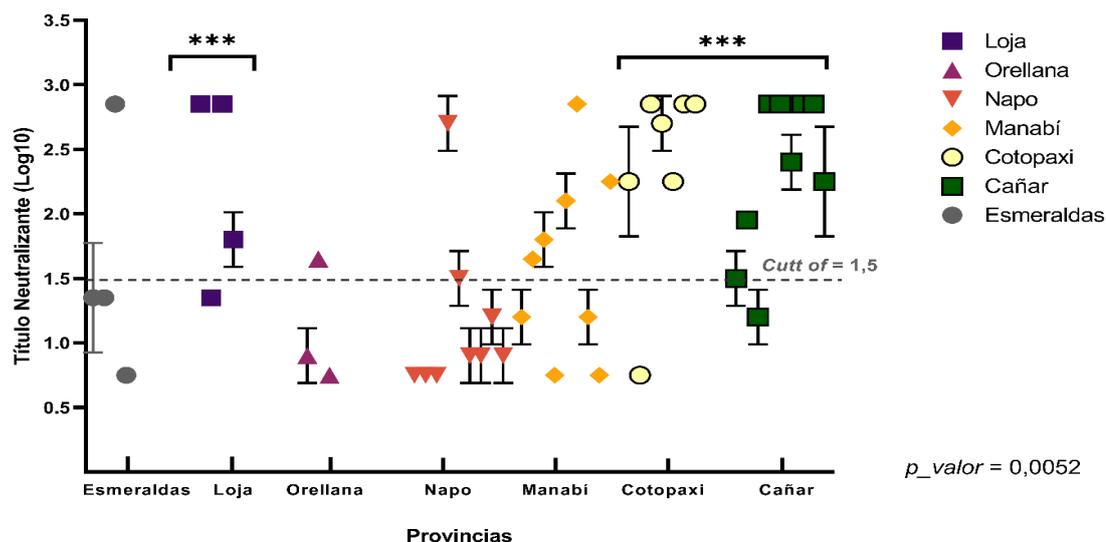
#### ***Quantificación del Título de Neutralización mediante el método de Spearman-Kärber***

Al contar los pocillos teñidos se obtuvo el título neutralizante para los 44 sueros mediante la fórmula de *Spearman Karber* expresado en (Log 10), reportando un total de 24 (54,4%) sueros positivos y 20 (45,5%) negativos. En la figura 29 se observa el título neutralizante promedio para los sueros de cada provincia, presentando mayor número de sueros positivos (título >1,5) para las provincias de Cañar y Cotopaxi. El análisis estadístico ANOVA de una sola vía con una significancia de 0,05 demostró que existe una diferencia significativa del título neutralizante promedio en las siete provincias con un p\_valor = 0,0052. La prueba de diferencia de medias de Duncan con un  $\alpha = 0,05$  ratificó a las

provincias de Cañar , Cotopaxi y Loja con los títulos más altos que difieren significativamente de las demás provincias.

**Figura 29**

*Análisis de los títulos medios de NAc de los sueros agrupados por provincia*



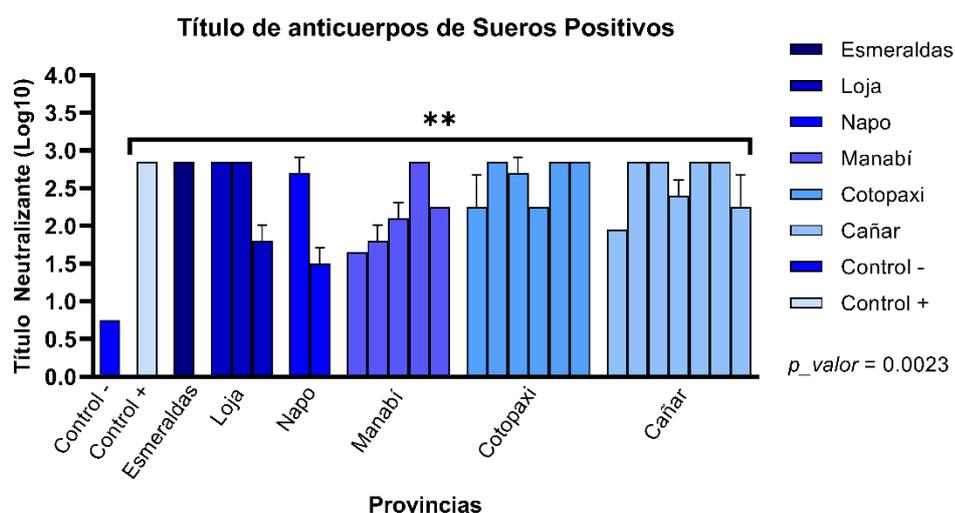
*Nota.* Representación gráfica de los títulos medios de anticuerpos neutralizantes determinados por VN de sueros provenientes de siete provincias. La gráfica muestra la media (símbolo) y la desviación estándar (barras) para cada título. \* $p < 0,05$  diferencias significativas del título neutralizante en las provincias de Loja, Cotopaxi y Cañar con respecto a las demás provincias, *Duncan test*. Software: GrahpPad-Prism v9.0, Infostat.

En la figura 30 se observa el diagrama de barras indicando el título medio neutralizante para los sueros positivos de cada provincia. Se visualiza que al menos un suero por provincia presenta con un título alto  $> 2,5$  y que el mayor número de casos fue para la provincia de Cañar ( $n=7$ ). Estadísticamente la prueba de ANOVA de una sola vía con un  $\alpha = 0,05$  demostró que existe una diferencia significativa entre los títulos de las seis provincias con los controles con un  $p\_valor = 0.0023$ , contrastando está hipótesis con la prueba de

medias de Duncan a un  $\alpha = 0,05$ , el cual reflejó que el control negativo difiere significativamente del título de las seis provincias.

**Figura 30.**

*Análisis del título medio de anticuerpos para sueros positivos*



*Nota.* Diagrama de barras del título medio de anticuerpos para los sueros positivos evaluador por VN. Control positivo (+), Control negativo (-). \* $p < 0,05$  diferencias significativas del título neutralizante de las seis provincias respecto al control negativo, *Duncan test*.

Software: GraphPad-Prism v9.0, Infostat.

### Ensayo de Control de Dosis Viral

El resultado del control de dosis viral mediante el método de *Spearman Karber* para las tres diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) del virus titulado usadas en el ensayo de VN que se mostraron en la tabla 8, estuvieron dentro del rango aceptable (32 a 320 DICT<sub>50</sub>/pocillo).

**Tabla 8**

*Resultados del control de dosis viral del VEV-NJ*

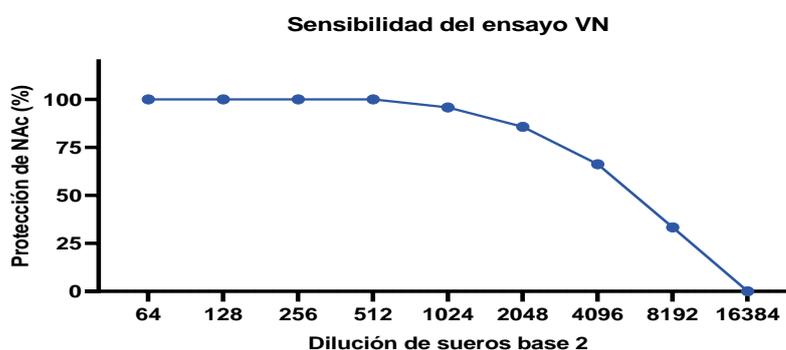
Dilución Viral	Número de cavidades con ECP	Dosis calculadas	Anti log DICT <sub>50</sub> /pocillo
1	35	2,475	299
2	26	1,800	63
3	31	2,175	150

### Ensayo de Sensibilidad Analítica (ASe)

El ensayo de ASe fue determinada por la evaluación visual de cavidades teñidas correspondiente a la protección por NAc en las 8 muestras por duplicado. Los datos fueron transformados a frecuencias acumulativas para determinar el porcentaje de neutralización (Anexo 8). En la figura 32 se observa una protección de neutralización del 33% hasta la dilución (1:8192), mientras que para la dilución (1:16384) la protección por anticuerpos en los 8 sueros es casi nula.

### Figura 31

*Análisis de la sensibilidad del ensayo de VN*



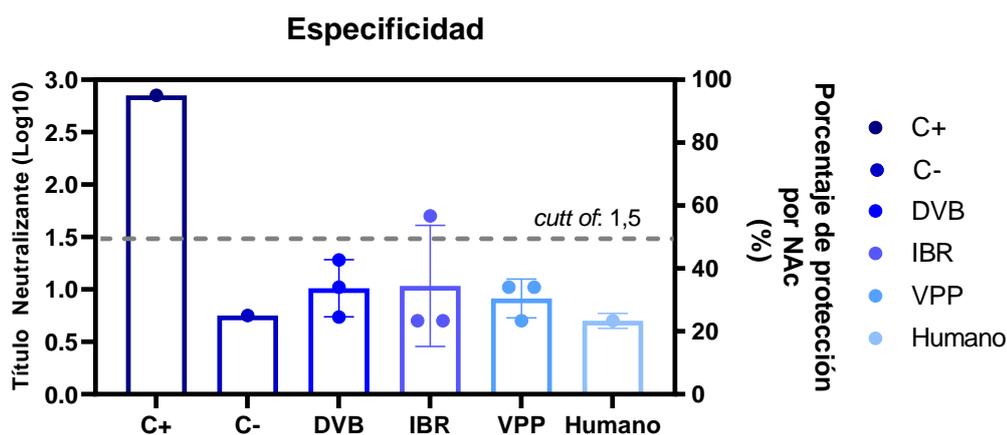
*Nota.* La curva representa el promedio de neutralización (%) de las 8 muestras séricas las cuales fueron diluidos hasta (1:16384). Los resultados se muestran con la media. Software: GrahpPad-Prism v9.0

### Ensayo de Especificidad Analítica (ASp)

La evaluación del título neutralizante para las dos enfermedades clínicamente indistinguibles del VEV (DVB n=3, IBR n=3) y muestras de sueros de especies no bovinas (porcino n=3, humano n=1) enfrentadas contra el VEV por duplicado. Mostraron resultados por debajo del *cut off*= 1,5 y una protección de anticuerpos por debajo del 40%, concluyendo que de los 10 sueros evaluados 9 fueron negativos para VEV, y un suero de IBR fue positivo para VEV con un título de  $1,8 \pm 0,21$  (Figura 32).

**Figura 32**

*Análisis de la Especificidad Analítica*



*Nota.* Diagrama de barras del título medio neutralizante de los sueros de DVB: Diarrea viral bovina, IBR: Rinotraqueína infecciosa bovina, VPP: Peste porcina clásica y un suero de humano evaluados por VN. La gráfica muestra la media y la desviación estándar (barras) para cada suero y el porcentaje de protección de anticuerpos neutralizantes (NAc). C-: Control negativo; C+: Control positivo. Software: Grahpad-Prism v9.0

### Ensayo de Repetibilidad

La repetibilidad del ensayo se evaluó con tres réplicas para tres sueros a diferentes concentraciones de título neutralizante; título positivo (Cañar 2,85), título positivo débil: (Orellana 1,65) y título negativo (Napo 0,75) evaluados previamente con VN. En la tabla 9 se observa el que el coeficiente de variación (CV) de los tres sueros fueron menor del 25% considerada como una variabilidad aceptable (Pimentel, 1990). Estos resultados garantizan la repetibilidad del ensayo de VN como óptima.

**Tabla 9.**

*Evaluación de la repetibilidad del ensayo VN*

Muestras Séricas	Título neutralizante			Medidas Estadísticas		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	DE ±	CV %
<b>Suero</b>						
<b>fuertemente positivo: Cañar</b>	2,75	2,85	2,85	2,80	0,09	3,09
<b>Título=2,75</b>						
<b>Suero positivo</b>						
<b>débil Orellana</b>	1,95	1,65	1,65	1,75	0,17	9,90
<b>Título=1,65</b>						
<b>Suero negativo</b>						
<b>Napo</b>	0,75	1,05	0,75	0,85	0,17	20,38
<b>Título=0,75</b>						

Nota: La tabla recopila el título neutralizante y las medidas estadísticas para las tres réplicas de cada uno de los sueros. DE: Desviación estándar, CV: Coeficiente de variación. Tomado de Infostat.

## Capítulo VI: Discusión

En Ecuador la ganadería bovina representa un pilar fundamental en el sector agropecuario, contribuyendo con el 1,4 % del Producto Interno Bruto (PIB), además de aportar a la economía campesina a través de la oferta de productos de leche y carne, alimentos que forman parte de la canasta básica (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2016).

El sector pecuario se puede ver afectado económicamente por enfermedades vesiculares que causan la pérdida de peso en los animales, entre ellas la EV (Ellis & Kendall, 1964). Esta enfermedad es clínicamente indistinguible de otras enfermedades vesiculares del ganado vacuno como la FA. (MacLachlan & Dubovi, 2017). Motivo que representa la importancia de implementar técnicas de diagnóstico que garanticen resultados diferenciales de otras enfermedades vesiculares.

En la actualidad los métodos de diagnósticos usados en Ecuador se centran en la detección del antígeno viral por Elisa indirecta y RT-PCR (Agrocalidad, 2020b). Sin embargo, es necesario incluir pruebas serológicas que evalúen el estado inmunitario para transportar animales procedentes de zonas enzooticas (MacLachlan & Dubovi, 2017).

Por tal motivo, se decidió estandarizar la prueba de neutralización viral, técnica considerada como la “*Gold standar*” por su alta especificidad para detectar la respuesta de anticuerpos contra virus provocados por exposición natural o vacunación (Knipe & Howley, 2013).

El sistema celular que se usó para el ensayo de neutralización viral y los procesos de replicación y titulación del VEV-NJ, fue la línea celular BHK-21 que de acuerdo con Lee et al. (2003), se caracteriza por tener una alta tasa de división, subcultivos ilimitados, y alta eficacia de plaqueo. Además se considera una línea celular idónea para la producción de

virus, debido a que la producción de un agente viral usando cultivos celulares depende mayormente en la respuesta de las células huésped, algunas líneas celulares son altamente resistentes a la infección por virus debido a su fuerte respuesta al interferón anti-viral sin embargo, líneas celulares como BHK-21 presenta una baja respuesta al interferón y por lo tanto es un substrato ideal para para la replicación de virus como el VEV, *adenovirus*, *simplexvirus*, entre otros (Emeny & Morgan, 1979; Schountz et al., 2019; Stanwick & Hallum, 1974).

La morfología de las células BHK-21 en confluencia, observada en la figura 22 presentó una estructura alargada, fusiforme, e irregular, y un crecimiento en orientación paralela, características también descritas por Stoker & Macpherson (1964). Con respecto a la densidad celular en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> a una confluencia del 80% fue de  $2,3 \times 10^6 \pm 0,45 \times 10^6$  células/mL a las 48 horas. Este densidad celular está relacionada a la expone la guía de Thermo Fisher. En los estudios de Brandão et al. (2020) y Quddus et al. (2016), se reportan una confluencia del 90% de células BHK-21 a las 48 horas en frascos de 25cm<sup>2</sup>, sin embargo no se indica la concentración inicial de células. Los resultados de la curva de crecimiento (figura 24) presentaron el mayor incremento celular hasta las 72 horas con una densidad de  $4,2 \times 10^5 \pm 0,72 \times 10^5$  células/mL. De acuerdo con Cytiva (2020), las células BHK-21 a una confluencia del 100% en placas de 96 pocillos alcanzan una densidad de  $4,5 \times 10^5$  células/mL seguida de una fase de muerte.

Las densidades escogidas de acuerdo a la transformación sobre la escala (figura 25) fueron de  $8 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células/mL por estar dentro de la fase exponencial hasta las 72 horas. La ventaja de transformar los datos a una misma escala permite tener desviaciones estándar pequeñas que logran suprimir el efecto de valores atípicos (Raschka, 2014). Además, es necesario que las células se encuentren en fase exponencial, debido a que en

esta etapa alcanzan la tasa más alta de división celular y por lo tanto la población celular es la más viable (Sigma-Aldrich, 2016). El inóculo celular de  $1 \times 10^5$  células/mL mostró un incremento promedio de  $1,49 \times 10^5 \pm 0,57 \times 10^5$  células/mL a las 24 horas, este valor está dentro del rango que reporta Rabbani et al. (2008).

En los resultados del efecto citopático provocado por VEV-NJ en la línea celular BHK-21 a las 24 y 48 horas (figura 26), se observó la presencia de agrupaciones celulares en forma de “racimos de uva”. Esta morfología se debe a la proteína de la matriz (M) del VEV, responsable de inducir el redondeo celular, y de contribuir a la citopatogenia (Black & Lyles, 1992; Blondel et al., 1990). Además de la proteína M, Jayakar & Whitt (2002) informó que el gen M codifica dos polipéptidos adicionales denominados M2 y M3. Estas formas más cortas provocan otros efectos citopáticos como la desorganización del citoesqueleto, la inhibición de la expresión génica celular y la inducción de apoptosis (Rajani et al., 2012). En el estudio de Redondo et al. (2015), se proporcionó la primera evidencia de que las proteínas M2 y M3 suprimen la expresión génica celular al interferir con la exportación de ARNm del núcleo citoplasmático, lo que conduce a un defecto en la síntesis de las proteínas de la célula huésped.

La titulación del VEV-NJ mediante la dilución de punto final fue de  $7,59 \log_{10}$   $\text{DICT}_{50}/\text{mL} \pm 0,35$  a las 48 horas, usando 8 réplicas por dilución. En los datos reportados por Scherer et al. (2007), con títulos de  $6-8 \log_{10}$   $\text{DICT}_{50}$  se evidencia lesiones vesiculares durante un período de 72 horas.

Estos valores de  $\text{DICT}_{50}$  son intrínsecamente discontinuos es decir los intervalos entre dos valores no son idénticos por lo tanto, para aumentar la precisión de la medición se requiere un número de réplicas lo suficientemente alto (Grigorov et al., 2011). En los

estudios de Brandolini et al. (2021), Gómez & Jiménez (2013) y Grigorov et al.(2011) se ha realizado 8 repeticiones por cada dilución para estimar el título viral.

Las muestras séricas seleccionadas (n=222) para el ensayo de neutralización viral provenientes de las provincias de Cañar, Cotopaxi, Esmeraldas, Loja, Manabí, Napo, y Orellana durante los años 2020 y 2021, pasaron por un cribado o *Screening* usando como criterio de inclusión muestras con diagnóstico negativo a fiebre aftosa, debido a que aumenta la probabilidad de que el animal haya presentado lesiones vesiculares a causa del VEV, por ser enfermedades clínicamente indistinguibles. Además de considerar que Ecuador desde el 2015 es un país declarado libre de FA por parte de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2021).

Como resultado de la prueba de *Screening* se obtuvo 146 (64,89%) muestras positivas, 76 (34,23%) muestras negativas (figura 28). Estos resultados no deben considerarse como un diagnóstico positivo al VEV debido a que las pruebas de *Screening* no está diseñadas para diagnosticar enfermedades, estas pruebas principalmente se utilizan para determinar la probabilidad de que una población en específica desarrolle una enfermedad en particular (Prinzi, 2020). Para ensayos pilotos de VN se recomienda realizar primero una prueba de *Screening* como primer paso antes de pasar a procedimientos más exigentes (Hitchner, 1973).

En los ensayos de neutralización viral no se utilizó un control positivo de referencia, sin embargo, el suero proveniente de un animal convaleciente, presentó en todos los ensayos un título alto  $>2,7$  cumpliendo con el criterio de aceptación de la prueba de VN. El punto de corte utilizado para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes en los sueros a testear fue el promedio  $\pm 3$  desviaciones estándar de los controles negativos siendo 1,5 (expresado en log) o 32 (expresado aritmético) según lo

indicado por el Manual de la OIE (2018). Los títulos menores a 1:32 son considerados inespecíficos, o negativos pero no se han realizados estudios para determinar el tipo de proteína capaz de neutralizar al VEV hasta la dilución 1:16 o que fueron anticuerpos de reciente aparición o de extinción (Carruitero H. et al., 2013). Con respecto a la concentración celular usada  $1,6 \times 10^5$  células/mL que equivale a 16.000 células por pocillo mostró una monocapa completa a las 48 horas, por lo que se la consideró como una densidad celular óptima (Figura 29.B). En estudios de Alvarado et al. (2002) y Mayling et al. (2014) se han utilizado densidades celulares desde 10.000 a 30.000 células por pocillo.

De los 44 sueros evaluados por VN, 24 (54,4%) sueros presentaron anticuerpos neutralizantes contra VEV-NJ, y 20 (45,5%) no presentaron protección. Dentro del grupo de sueros positivos el título promedio de anticuerpos más altos ( $>2,7$ ) fueron para las provincias de Loja, Cañar y Cotopaxi ( $p\_valor=0,0052$ ), pero existe al menos un suero con título alto ( $>2,7$ ) en el resto de las provincias; Esmeraldas, Napo, y Manabí. A pesar de que estas muestras contenga títulos altos no es posible determinar, si la presencia de anticuerpos sea resultado de un infección avanzada o debido a la larga vida de anticuerpos IgG en suero por ser muestras pertenecientes a zonas endémicas (Turell et al., 2005). Los datos registrados en 1986, reportaron a la provincia de Loja como una zona endémica alta de VSV-NJ, mientras que a las provincias de Manabí, Cotopaxi se las considero como zonas endémicas ocasionales de VSV-NJ (Astudillo et al., 1986) . Esta distribución fue consistente en los brotes suscitados en el 2018 (Salinas et al., 2021).

Dentro de los objetivos del estudio se planteó detectar anticuerpos neutralizantes contra la cepa de Indiana (IND), sin embargo en Ecuador la prevalencia para esta cepa es muy baja, en el 2018 de 399 brotes solo 5 (1,25%) pertenecieron a VSV-IND (Salinas et al., 2021). Por tal motivo el obtener sueros de animales positivos a VSV-IND por ELISA-SI, para

usarlos como controles en su etapa de ser prevalencia fue de baja posibilidad obtenerlos. Actualmente en el país el único laboratorio que diagnóstica VEV-IND por ELISA-SI y RT-PCR mediante epitelios es Agrocalidad, por lo tanto no se cuenta con muestras séricas (Agrocalidad, 2020b).

Actualmente no existen registros oficiales de casos positivos para el VEV durante los años 2020 y 2021 por parte de Agrocalidad o de PANAFTOSA. Sin embargo, en los reportes de los meses de abril y marzo del 2020 de Agrocalidad se reportó casos con diagnóstico positivo al VEV mediante RT-PCR en la provincia de Loja y Napo (Agrocalidad, 2020a, 2020b). Comprobando la concordancia de los resultados presentados con la distribución del VEV-NJ en el país.

A pesar de que los anticuerpos neutralizantes pueden durar ocho años en el ganado expuesto (Sorensen et al., 1958). Esta protección es cuestionable ya que la mayoría de los bovinos en áreas endémicas de VEV tienen anticuerpos capaces de neutralizar la cepa del virus que causa su enfermedad clínica (Rodriguez et al., 1990; Vanleeuwen et al., 1995; Vernon et al., 1990) pero pueden ser re infectados con esa cepa tan pronto en períodos de 30 a 60 días (Hanson, 1952; Vanleeuwen et al., 1995; Vernon et al., 1990). La reinfección, en presencia de anticuerpos neutralizantes específicos de la cepa, dificulta las estrategias de vacunación eficaces, por lo que, se necesitan más dianas moleculares para interrumpir la transmisión y la infección.

El límite de detección del estado serológico positivo de 8 sueros convalecientes por NV evaluados hasta la dilución 1: 16384, mostró una protección de anticuerpos en dos sueros hasta la dilución 1:8192 (Figura 33). De acuerdo con la capacitación brindada por Pituco (2021), los sueros de referencia llegan a presentar protección de anticuerpos hasta las diluciones (1:8192) en las que se reporta en este estudio. En los primeros estudios

serológicos para la detección de NAc contra VEV en Colombia se reportó una protección hasta la dilución (1:1048448) (Hanssen et al., 1979).

Los resultados de especificidad para los 9 sueros de campo diagnosticados para DVB, IBR, VPP y un suero de humano presentaron títulos por debajo del punto de corte ( $<1,5$ ). Sin embargo, uno de los sueros positivos para IBR proveniente de la provincia de Manabí presentó un título de 1,78 por encima del punto de corte (Figura 34). Coincidiendo con una de las provincias donde hay la presencia de EV. Además al ser sueros de campo son susceptibles de presentar anticuerpos contra muchos antígenos distintos tras la exposición (Neurath, 2008). Los sueros de especies de porcino y humana no presentaron anticuerpos contra el VEV con títulos  $<0,85$  afirmando la especificidad exclusividad contra el VEV-NJ en bovinos. A pesar de que no existe evidencia de relaciones serológicas de enfermedades vesiculares, se ha evidenciado que puede existir reacciones cruzadas para la nucleoproteína viral (N) y en menor grado para la proteína matriz (M) de ambos serotipos (NJ / IND) (Cajas et al., 2003; Flanagan et al., 2001).

Los ensayos de repetibilidad para los tres sueros con diferentes concentraciones de título evaluadas con tres réplicas, presentó un coeficiente de variación menor del 25%, considerada como una variabilidad aceptable según Pimentel (1990). En el reporte de Nie et al. (2020)

se concluyó que el CV para un ensayo de neutralización usando pocillos duplicados por dilución debe ser  $\leq 30\%$

Entre las desventajas que presenta la prueba de VN, esta requiere de virus vivos, cultivos celulares en condiciones asépticas, cantidad elevada de muestra, demanda mucho tiempo, y es una prueba altamente costosa (Kibenge et al., 2016). En la actualidad existen diferentes tipos de ELISA que tienen la misma sensibilidad de las pruebas de neutralización,

entre ellas la ELISA de bloqueo que ha logrado detectar anticuerpos específicos frente a virus (Van Oirschot, 1999). Por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud indica que se debe implementar primero la prueba neutralización viral para confirmar y correlacionar los resultados de una prueba de ELISA (Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE, 2018).

## Capítulo VI: Conclusiones

La valoración del título viral del VEV-NJ en la línea celular BHK-21 mediante el método de *Reed & Muench* a través de la evaluación del efecto citopático fue de  $7,59 \pm 0,35$   $\log_{10}$  DICT<sub>50</sub>/mL a las 48 horas.

Las condiciones biológicas que se usaron para el ensayo de neutralización fueron: 160.000 células BHK-21/mL, 2000 DICT<sub>50</sub> VEV-NJ/mL, sueros diluidos en base 2 empezando por la dilución 1:8 hasta 1:512 en medio completo. El día óptimo para teñir la prueba de neutralización con cristal violeta al 1% fue al segundo día (48 horas) por presentar una monocapa preformada de células BHK-21. El punto de corte para diferenciar un suero seropositivo de un suero seronegativo para VEV-NJ fue de 1,5 (expresado en  $\log_{10}$ ) con  $\pm 3$  desviaciones estándar. Los 44 sueros evaluados por neutralización viral para VEV-NJ no presentaron toxicidad en las células BHK-21 y cumplieron con los criterios de aceptación para el ensayo de neutralización viral expuestos por la OIE. Se obtuvo un total de 24 (54,4%) sueros positivos y 20 (45,5%) negativos, presentando el mayor título neutralizante ( $>2,7$ ) mediante el método de *Spearman–Karber*, para las provincias de Loja, Cotopaxi y Cañar ( $p\_valor=0,0052$ ). No se obtuvo datos de anticuerpos contra el VEV-IND, debido a que la baja prevalencia de la enfermedad en el país impidió obtener sueros positivos.

La sensibilidad analítica del ensayo detectó la presencia de anticuerpos hasta la dilución 1:8192, y la especificidad analítica frente a enfermedades clínicamente indistinguibles presentó títulos bajo el punto de corte para sueros de diarrea viral bovina (DVB), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), peste porcina clásica (VPP) y un suero de humano con una protección de anticuerpos por debajo del 40%.

## Capítulo VII. Recomendaciones

En el ensayo de neutralización viral, se recomienda primero sembrar la placa con células BHK-21 y dispensar posteriormente la solución suero/virus, para asegurar que previamente exista un crecimiento correcto de las células antes de iniciar el ensayo.

Se debe alicuotar virus en crioviales que contengan la concentración de referencia 2000 DICT<sub>50</sub> y que sean de un solo uso para evitar congelar y descongelar las diluciones virales.

Se recomienda realizar ultracentrifugación para tener virus de alta pureza y poder realizar titulaciones. También se recomienda realizar más ensayos que verifiquen la presencia de las proteínas virales G Y N frente anticuerpos neutralizantes de sueros mediante la técnica de Western Blot.

Entre otras técnicas se puede evaluar la neutralización de anticuerpos a partir de la inhibición de proteínas fluorescentes como la GFP expresados en virus recombinantes.

Para evaluar a futuro la seroprevalencia se debería usar muestras pareadas de al menos una población de 500 bovinos en el que se indique el aumento de anticuerpos a lo largo de la seroconversión.

Con el fin de disminuir costos se recomienda a futuro implementar técnicas más baratas como ELISA de bloqueo para realizar ensayos de seroprevalencia dentro de la población de ganado bovino.

Entre otras pruebas de diagnóstico frente al VEV se puede realizar inmunohistoquímica para detectar VSV-NJ mediante la interacción entre estreptavidina-biotina conjugada con fosfatasa alcalina.

## Bibliografía

- Abdul-Cader, M. S., Amarasinghe, A., & Abdul-Careem, M. F. (2016). Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. *Archives of Virology* 2016 161:8, 161(8), 2075–2086. <https://doi.org/10.1007/S00705-016-2904-X>
- Acree, J. A., Hodgson, D. R., & Page, R. W. (1964). Epizootic Indiana vesicular stomatitis in southwestern U.S. *Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association*.
- Addgene. (2016). *Addgene: Fluorescence Titering Assay*. <https://www.addgene.org/protocols/fluorescence-titering-assay/>
- Afshar, A., Shakarchi, N. H., & Dulac, G. C. (1993). Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine, ovine, porcine, and equine antibodies to vesicular stomatitis virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(7), 1860–1865. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.7.1860-1865.1993>
- Agrocalidad. (2020a). *NOTIFICACIONES DE ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES TERRESTRES ECUADOR-MARZO 2020. N° N° ORDEN PROVINCIA CANTÓN PARROQUIA ENFERMEDAD ESPECIE AFECTADA N° SUSCEPTIBLES N° CASOS FECHA DE CONFIRMACIÓN*.
- Agrocalidad. (2020b). *Virología listado de pruebas de diagnóstico* . <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/04/Virolog%a-Listado-an+lisis-2020.pdf>
- Akira, S. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Advances in Immunology*, 78, 1–56. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(01\)78001-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(01)78001-7)
- Al-Hatamleh, M. A. I., Hatmal, M. M., Sattar, K., Ahmad, S., Mustafa, M. Z., Bittencourt, M. D. C., & Mohamud, R. (2020). Antiviral and Immunomodulatory Effects of Phytochemicals

from Honey against COVID-19: Potential Mechanisms of Action and Future Directions.

*Molecules* 2020, Vol. 25, Page 5017, 25(21), 5017.

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25215017>

Aleman, M. del R., Enrique, N., Tamayo, A., Dubed, M., Padilla, S., Alvarez, G., Geada, D., Dorta, L., Navea, L., Gonzalez, T., Reyes, B., Fernández Núñez, E. G., & Valdés, R. (2007). A Revalidation Study of Viral Clearance in Purification of Monoclonal Antibody CB.Hep-1. *Biopharm International*, 20, 46–55.

Allende, R., Sepúlveda, L., Mendes da Silva, A., Martins, M., Söndahl, M. S., & Alonso, A. (1992). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Preventive Veterinary Medicine*, 14(3–4), 293–301.  
[https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90025-B](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90025-B)

Almahboub, S. A., Algaissi, A., Alfaleh, M. A., ElAssouli, M.-Z., & Hashem, A. M. (2020). Evaluation of Neutralizing Antibodies Against Highly Pathogenic Coronaviruses: A Detailed Protocol for a Rapid Evaluation of Neutralizing Antibodies Using Vesicular Stomatitis Virus Pseudovirus-Based Assay. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2020.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02020>

Alonso F., A., & Sondahl, M. S. (1985). Antigenic and immunogenic characterisation of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol. Cent. Panamerican. Fiebre Aftosa*, 23–30.

Alvarado, J., Dolz, G., Herrero, M., McCluskey, B., & Salman, M. (2002). Comparison of the serum neutralization test and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to vesicular stomatitis virus New Jersey and vesicular stomatitis virus Indiana. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc,*

14(3), 240–242. <https://doi.org/10.1177/104063870201400309>

Arbeláez, G., De Bustos, M., De Gerardino, A., Lobo, C., Estupiñán, J., & Barrera, J. (1979).

Estandarización de la técnica de microneutralización para anticuerpos del virus de fiebre aftosa. *Revista Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)*, 2, 87–92.

<https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/654>

Arredondo, B., & Voltolina, D. (2006). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Capítulo 2. 2. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

[https://www.researchgate.net/publication/253237563\\_CONCENTRACION\\_RECUESTO\\_CELULAR\\_Y\\_TASA\\_DE\\_CRECIMIENTO](https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO)

Astudillo, V. M., Estupiñán, J., Rosenberg, F. J., Silva, A. J. M., Dora, J. F. P., Urbina, M.,

Tamayo, H., Lora, J. Q., Marrero, J. C., & Salud, O. P. de la. (1986). Estudio epidemiológico de la estomatitis vesicular en América del Sur. *Serie de Monografías Científicas y Técnicas*;15, 21–26. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51164>

Atala, A., & Yoo, J. J. (2015). Essentials of 3D Biofabrication and Translation. In *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-18665-5>

ATCC. (2021, August 4). *BHK-21 [C-13]*. <https://www.atcc.org/products/ccl-10>

Bachmann, M. F., Kündig, T. M., Kalberer, C. P., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1994).

How many specific B cells are needed to protect against a virus? *The Journal of Immunology*, 152(9).

Basak, S., & Chattopadhyay, D. (2008). Chandipura Virus. *Encyclopedia of Virology*, 497–503.

<https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00368-X>

Basu, M., Maitra, R., Xiang, Y., Meng, X., Banerjee, A., & Bose, S. (2006). Inhibition of

- vesicular stomatitis virus infection in epithelial cells by alpha interferon-induced soluble secreted proteins. *The Journal of General Virology*, 87(Pt 9), 2653–2662.  
<https://doi.org/10.1099/VIR.0.82039-0>
- Bi, Z., & Reiss, C. S. (1995). Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide. *Journal of Virology*, 69(4), 2208. /pmc/articles/PMC188889/?report=abstract
- Biberstein, E., & Vergés, M. (1994). *TRATADO DE MICROBIOLOGIA VETERINARIA - E. L. BIBERSTEIN - 9788420007663* (1ra ed.). Editorial Acribia, S.A.
- BioCision. (2012). *Virus Cryopreservation Protocol*. <https://www.tataa.com/wp-content/uploads/2012/10/BioCision-Virus-Cryopreservation-Protocol.pdf>
- Black, B. L., & Lyles, D. S. (1992). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo. *Journal of Virology*, 66(7), 4058–4064.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.66.7.4058-4064.1992>
- Blondel, D., Harmison, G. G., & Schubert, M. (1990). Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*, 64(4), 1716–1725.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.64.4.1716-1725.1990>
- Bordignon, J., & Roberto Zanetti, C. (2014). Rabies Diagnosis: Demonstration of Viral Antibodies by Flow Cytometry. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*, 1, 133–140. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800014-4.00013-5>
- Bourgeois, M. A., & Oaks, J. L. (2014). Laboratory Diagnosis of Viral Infections. *Equine Infectious Diseases: Second Edition*, 132-140.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0891-8.00012-9>
- Brandão, P. E., Leite, B. A., & Miyagi, S. A. T. (2020). Evolution of Avian coronavirus (AvCoV) in BHK-21 and VERO cells. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*,

57(2), e166086–e166086. <https://doi.org/10.11606/ISSN.1678->

4456.BJVRAS.2020.166086

BRANDLY, C. A., & HANSON, R. P. (1957). Epizootiology of vesicular stomatitis. *American Journal of Public Health*. <https://doi.org/10.2105/ajph.47.2.205>

Brandly, C. A., Hanson, R. P., & Chow, T. L. (1951). Vesicular stomatitis with particular reference to the 1949 Wisconsin epizootic. *Vesicular Stomatitis with Particular Reference to the 1949 Wisconsin Epizootic*.

Brandolini, M., Taddei, F., Marino, M. M., Grumiro, L., Scalcione, A., Turba, M. E., Gentilini, F., Fantini, M., Zannoli, S., Dirani, G., & Sambri, V. (2021). Correlating qRT-PCR, dPCR and Viral Titration for the Identification and Quantification of SARS-CoV-2: A New Approach for Infection Management. *Viruses*, 13(6).

<https://doi.org/10.3390/V13061022>

Bridges, V. E., McCluskey, B. J., Salman, M. D., Hurd, H. S., & Dick, J. (1997). Review of the 1995 vesicular stomatitis outbreak in the western United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211(5), 556–560.

Brouillette, C. G., Compans, R. W., Brandts, J. F., & Segrest, J. P. (1982). Structural domains of vesicular stomatitis virus. A study by differential scanning calorimetry, thermal gel analysis, and thermal electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 257(1), 12–15. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)68314-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)68314-6)

Bründler, M. A., Aichle, P., Bachmann, M., Kitamura, D., Rajewsky, K., & Zinkernagel, R. M. (1996). Immunity to viruses in B cell-deficient mice: Influence of antibodies on virus persistence and on T cell memory. *European Journal of Immunology*, 26(9), 2257–2262. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260943>

Cajas, J.-G., Rojas, J., Manrique, J. E. A., Wilches, M., Sánchez, C., & Acosta, O. (2003).

- Comparación de la respuesta inmunológica a las proteínas del virus de la estomatitis vesicular entre bovinos vacunados e infectados de manera natural o inducida. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 4(1), 1–5. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol4\\_num1\\_art:8](https://doi.org/10.21930/rcta.vol4_num1_art:8)
- Cargnelutti, J. F., Olinda, R. G., Maia, L. A., de Aguiar, G. M. N., Neto, E. G. M., Simões, S. V.D., de Lima, T. G., Dantas, A. F. M., Weiblen, R., Flores, E. F., & Riet-Correa, F. (2014). Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(6), 788–794. <https://doi.org/10.1177/1040638714553428>
- Carruitero H., S., Rivera G., H., Ramírez V., M., More B., J., Zúñiga H., A., & Romero S., M. (2013). ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR EN HUANGANAS (Tayassu pecari) EN MADRE DE DIOS, PERÚ. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i1.1673>
- Cartwright, B., & Brown, F. (1972). Serological relationships between different strains of vesicular stomatis virus. *The Journal of General Virology*, 16(3), 391–398. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-16-3-391>
- Cotton, W. E. (1926). The causal agent of vesicular stomatitis proved to be a filter-passing virus. *J Am Vet Med Assoc*, 23, 168-179.
- Centro Pan-American de Febre Aftosa PANAFTOSA- OPS/OMS. (2020). *Replicação, titulação e estoque viral*.
- Centro Panamericano de Fiebre Aftosa-OPS/OMS. (2007). *Informe Anual 2007. Laboratorio* . [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51708/informeannual2007\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51708/informeannual2007_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS). (2010). *Informe Anual - 2010. Laboratorio*.

[https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=informes-802&alias=231-informe-anual-laboratorio-2010-1&Itemid=518](https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=informes-802&alias=231-informe-anual-laboratorio-2010-1&Itemid=518)

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Organización Panamericana de la Salud, & Organización Mundial de la Salud. (2019). *Informe de Situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa en Sudamérica y Panamá.*

<https://www.paho.org/es/documentos/informe-situacion-programas-erradicacion-fiebre-aftosa-sudamerica-panama-ano-2019>

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa PANAFTOSA- OPS/OMS. (2017). *II Taller Internacional de Diagnóstico Diferencial de Fiebre Aftosa.*

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y Salud Pública Veterinaria (PANAFTOSA), Organización Panamericana de la Salud (OPS), & Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). *Informe Anual 2019. Laboratorio de Referencia OIE/FAO para Fiebre Aftosa Y Estomatitis Vesicular PANAFTOSA-OPS/OMS .*

[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52817/LREFINF2019\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52817/LREFINF2019_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Cheedarla, N., & Hanna, L. E. (2018). Functional and protective role of neutralizing antibodies (NABs) against viral infections. In *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 83–93). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00007-6>

CHOW, T. L., & MCNUTT, S. H. (1953). Pathological changes of experimental vesicular stomatitis of swine. *American Journal of Veterinary Research*, 14(52), 420—424. <http://europepmc.org/abstract/MED/13065657>

Clemens, M. J., & Elia, A. (1997). The Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR: Structure and Function. *JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH*, 17, 503–

524.

Creative Biolabs. (2007). *Líneas celulares BHK* . [https://www.gmp-creativebiolabs.com/bhk-cell-lines\\_66.htm](https://www.gmp-creativebiolabs.com/bhk-cell-lines_66.htm)

Cytiva. (2020). *Effect of laboratory lights on cell culture media*.

Delgado, A., Sandoval, R., & Montenegro, M. (2015). *Estomatitis vesicular: enfermedad confundible con fiebre aftosa en el Perú - Engormix*.

<https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/estomatitis-vesicular-enfermedad-confundible-t32342.htm>

Detmer, S., Gramer, M., Goyal, S., Torremorell, M., & Torrison, J. (2012). Diagnostics and Surveillance for Swine Influenza. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 370, pp. 85–112). Curr Top Microbiol Immunol.

[https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_220](https://doi.org/10.1007/82_2012_220)

Dörner, T., & Radbruch, A. (2007). Antibodies and B Cell Memory in Viral Immunity.

*Immunity*, 27(3), 384–392. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2007.09.002>

Drolet, B. S., Campbell, C. L., Stuart, M. A., & Wilson, W. C. (2005). Vector competence of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) for vesicular stomatitis virus. *Journal of Medical Entomology*, 42(3), 409–418.

Drolet, B. S., Stuart, M. A., & Derner, J. D. (2009). Infection of *Melanoplus sanguinipes* grasshoppers following ingestion of rangeland plant species harboring vesicular stomatitis virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3029–3033.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02368-08>

Dulbecco, R., Vogt, M., Virology, A. S.-, & 1956, U. (1956). A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Elsevier*.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682256900174>

Dunn, E. F., Fearn, R., & Connor, J. H. (2009). Akt Inhibitor Akt-IV Blocks Virus Replication through an Akt-Independent Mechanism. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 83(22), 11665–11672. <https://doi.org/10.1128/JVI.01092-09>

El Comercio. (2018, September 25). *La estomatitis afecta al ganado de cuatro provincias | El Comercio*. <https://www.elcomercio.com/actualidad/estomatitis-afectacion-ganado-provincias-ecuador.html>

Ellis, M. E., & Kendall, H. E. (1964). THE PUBLIC HEALTH AND ECONOMIC EFFECTS OF VESICULAR STOMATITIS IN A HERD OF DAIRY CATTLE. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 144, 377–380.

Emeny, J. M., & Morgan, M. J. (1979). Regulation of the Interferon System: Evidence that Vero Cells have a Genetic Defect in Interferon Production. *Journal of General Virology*, 43(1), 247–252. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>

Federer, K. E., Burrows, R., & Brooksby, J. B. (1967). Vesicular stomatitis virus--the relationship between some strains of the Indiana serotype. *Research in Veterinary Science*. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)34659-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)34659-9)

Ferris, D. H., Hanson, R. P., Dicke, R. J., & Roberts, R. H. (1955). Experimental transmission of vesicular stomatitis virus by Diptera. *The Journal of Infectious Diseases*, 184–192.

Figueroa, M., Vargas, L., Mendoza, L., Acevedo, O., Chavarría, M., Fonseca, E., & Moya, F. (1983). *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica* (Primera Edición). Universidad Estatal a Distancia .  
<https://books.google.com.ec/books?id=rfbtdNOg1dIC&pg=PA411&dq=Estomatitis+vesicular&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjEr-PfzeruAhULTN8KHZmyBV0Q6AEwA3oECAIQAg#v=onepage&q=Estomatitis>

vesicular&f=true

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), 7306–7311.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.1214441110>

Finlay, W. J. J., & Almagro, J. C. (2012). Natural and man-made V-gene repertoires for antibody discovery. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue NOV, p. 342). Frontiers.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00342>

Finney, D. (1971). *Statistical Method in Biological Assay* (Segunda). Arnold.

Flanagan, E. B., Zamparo, J. M., Ball, L. A., Rodriguez, L. L., & Wertz, G. W. (2001).

Rearrangement of the Genes of Vesicular Stomatitis Virus Eliminates Clinical Disease in the Natural Host: New Strategy for Vaccine Development. *Journal of Virology*, 75(13),

6107. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6107-6114.2001>

Freshney, R. I. (2005). Culture of Animal Cells. In *Culture of Animal Cells*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780471747598>

Gagnon, S. (2019). *Estomatitis vesicular - MSU Extension Animal and Range Science* .

Universidad Estatal de Montana.

[https://animalrangeextension.montana.edu/equine/vesicular\\_stomatitis.html](https://animalrangeextension.montana.edu/equine/vesicular_stomatitis.html)

Garcia, I. (2020). *Virusneutralização para detecção de anticorpos para Estomatite Vesicular*. 1–20.

Gauger, P. C., & Vincent, A. L. (2020). Serum Virus Neutralization Assay for Detection and Quantitation of Serum Neutralizing Antibodies to Influenza A Virus in Swine. *Methods in Molecular Biology*, 2123, 321–333. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_23)

Gibbons, W. (1963). *Diseases of Cattle* (American Veterinary, pp. 509–516).

<https://www.amazon.com/Diseases-Cattle-Walter-J-Gibbons/dp/B0010V3KD2>

Gómez, C., & Jiménez, M. Á. (2013). *Estudios epidemiológicos y moleculares sobre virus entéricos porcinos en España: aplicaciones al diagnóstico del virus de la enfermedad vesicular del cerdo*. Universidad Complutense de Madrid.

Govindarajulu, Z. (2001). *Statistical Techniques in Bioassay* (Segunda). Karger Basel.

Grigorov, B., Rabilloud, J., Lawrence, P., & Gerlier, D. (2011). Rapid Titration of Measles and Other Viruses: Optimization with Determination of Replication Cycle Length. *PLOS ONE*, 6(9), e24135. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0024135>

Haller, O., & Kochs, G. (2002). Interferon-Induced Mx Proteins: Dynamin-Like GTPases with Antiviral Activity. *Traffic*, 3(10), 710–717. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0854.2002.31003.X>

Hanson, R. P. (1952). The natural history of vesicular stomatitis. *Bacteriological Reviews*. <https://doi.org/10.1128/membr.16.3.179-204.1952>

Hanson, R. P. (1968). Discussion of the natural history of vesicular stomatitis. In *American Journal of Epidemiology* (Vol. 87, Issue 2). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120815>

Hanson, R. P., Estupiñan, J., & Castañeda, J. (1968a). Vesicular stomatitis in the Americas. *Bulletin de l'Office International Des Epizooties*, 70(1), 37–47.

Hanson, R. P., Estupiñan, J., & Castañeda, J. (1968b). Vesicular stomatitis in the Americas. *Bulletin - Office International Des Epizooties*, 70(1), 37–47.

Hanson, R. P., & Karstad, L. (1959). Feral Swine in the Southeastern United States. *The Journal of Wildlife Management*, 23(1), 64. <https://doi.org/10.2307/3797747>

Hanssen, H., Zuluaga, F. N., & Hanssen, G. (1979). Evidencia serológica de estomatitis vesicular en empleados de matadero, Antioquia, Colombia. *Boletín de La Oficina*

*Sanitaria Panamericana (OSP)*;86(2),Feb. 1979.

<https://iris.paho.org/handle/10665.2/17299>

Hitchner, S. B. (1973). A virus neutralization screening test: Its limitations in classifying field isolates of infectious bronchitis virus . *Avian Pathology*, 2(2), 103–109.

<https://doi.org/10.1080/03079457309353788>

Holzhauser, M., Deventer, R. P., Smits, D., & Swart, W. (2017). Comparing the curative efficacy of topical treatment with thiamphenicol and oxytetracycline on digital dermatitis lesions in dairy cattle. *Veterinary Record*, 180(20), 500–500.

<https://doi.org/10.1136/VR.103758>

Ibiza, S., & Serrador, J. M. (2008). The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses. *Inmunología*, 27(3), 103–117. [https://doi.org/10.1016/S0213-9626\(08\)70058-1](https://doi.org/10.1016/S0213-9626(08)70058-1)

Jayakar, H. R., & Whitt, M. A. (2002). Identification of two additional translation products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus cytopathology. *Journal of Virology*, 76(16), 8011–8018. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.8011-8018.2002>

Jenney, E. W., & Brown, C. L. (1972). Surveillance for vesicular stomatitis in the United States—January, 1968 through July, 1972. *Proc. US Anim. Health Assoc*, 76, 183.

JONKERS, A. H., SHOPE, R. E., AITKEN, T. H., & SPENCE, L. (1964). COCAL VIRUS, A NEW AGENT IN TRINIDAD RELATED TO VESICULAR STOMATITIS VIRUS, TYPE INDIANA. *American Journal of Veterinary Research*, 25, 236–242.

Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 162(4), 480–483. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>

- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 2010 11:5, 11(5), 373–384.  
<https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00461>
- Kibenge, F. S. B., Godoy, M. G., & Kibenge, M. J. T. (2016). Diagnosis of Aquatic Animal Viral Diseases. *Aquaculture Virology*, 49–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801573-5.00004-8>
- Klasse, P. J. (2014). Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Advances in Biology*, 2014, 1–24. <https://doi.org/10.1155/2014/157895>
- Klasse, P. J., & Sattentau, Q. J. (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *Journal of General Virology*, 83(9), 2091–2108.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-9-2091>
- Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2013). *Fields Virology* (W. Lippincott & Wilkins (eds.); 6th ed., Vol. 1). LWW.
- LaBarre, D. D., & Lowy, R. J. (2001). Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID<sub>50</sub> and plaque assays. *Journal of Virological Methods*, 96(2), 107–126. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00316-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00316-0)
- Laven, R., & Hunt, H. (2001). Comparison of valnemulin and lincomycin in the treatment of digital dermatitis by individually applied topical spray. *The Veterinary Record*, 149(10), 302–303. <https://doi.org/10.1136/VR.149.10.302>
- Lee, J. A., Parrett, B. M., Conejero, J. A., Laser, J., Chen, J., Kogon, A. J., Nanda, D., Grant, R. T., & Breitbart, A. S. (2003). Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Annals of Plastic Surgery*, 50(6), 610–617.

<https://doi.org/10.1097/01.SAP.0000069069.23266.35>

- Lefrancois, L. (1984). Protection against lethal viral infection by neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies: distinct mechanisms of action in vivo. *Journal of Virology*, 51(1), 208–214. <https://doi.org/10.1128/jvi.51.1.208-214.1984>
- Lester, S. N., & Li, K. (2014). Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity. *Journal of Molecular Biology*, 426(6), 1246–1264. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2013.11.024>
- Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., & Barrera, J. D. C. (1999). Vesicular stomatitis. *Veterinary Journal*, 157(3), 239–260. <https://doi.org/10.1053/tvjl.1998.0303>
- Letchworth, Geoffrey J., Barrera, J. D. C., Fishel, J. R., & Rodriguez, L. (1996). Vesicular stomatitis New Jersey virus RNA persists in cattle following convalescence. *Virology*, 219(2), 480–484. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0275>
- Lord, C. C., & Tabachnick, W. J. (2002). Influence of Nonsystemic Transmission on the Epidemiology of Insect Borne Arboviruses: A Case Study of Vesicular Stomatitis Epidemiology in the Western United States. *Journal of Medical Entomology*, 39(3), 417–426. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.3.417>
- MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2017). Chapter 18 - Rhabdoviridae. In N. J. MacLachlan & E. J. Dubovi (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)* (Fifth Edit, pp. 357–372). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00018-0>
- Martinez, I., Rodriguez, L. L., Jimenez, C., Pauszek, S. J., & Wertz, G. W. (2003). Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Is a Determinant of Pathogenesis in Swine, a Natural Host. *Journal of Virology*, 77(14), 8039–8047. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.14.8039-8047.2003>
- Mason, J. (1978). *EPIDEMIOLOGÍA DE LA ESTOMATITIS VESICULAR*. <https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol2/CVv2c4.pdf>

- Mayling, D. C., Vera, Á., Danay Díaz, D., Rosmari, D. C., Roche, R., Luis, L., Diaz, M., María, D. C., & Guzmán Tirado, G. (2014). Neutralizing antibody titers in sera from patients post-convalescing from dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *66*(1), 132–142. <http://scielo.sld.cu><http://scielo.sld.cu>
- Mcdougal, J. S., Kennedy, M. S., Orloff, S. L., Nicholson, J. K. A., & Spira, T. J. (1996). Mechanisms of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) neutralization: irreversible inactivation of infectivity by anti-HIV-1 antibody. *JOURNAL OF VIROLOGY*, *70*(8), 5236–5245. <http://jvi.asm.org/>
- McGregor, B. L., Stenn, T., Sayler, K. A., Blosser, E. M., Blackburn, J. K., Wisely, S. M., & Burkett-Cadena, N. D. (2019). Host use patterns of *Culicoides* spp. biting midges at a big game preserve in Florida, U.S.A., and implications for the transmission of orbiviruses. *Medical and Veterinary Entomology*, *33*(1), 110–120. <https://doi.org/10.1111/mve.12331>
- Mead, D. G., Mare, C. J., & Cupp, E. W. (1997). Vector competence of select black fly species for vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *57*(1), 42–48.
- Mead, D. G., Maré, C. J., & Ramberg, F. B. (1999). Bite transmission of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) to laboratory mice by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, *36*(4), 410–413.
- Mead, D. G., Ramberg, F. B., Besselsen, D. G., & Maré, C. J. (2000). Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to noninfected black flies co-feeding on nonviremic deer mice. *Science*, *287*(5452), 485–487. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.485>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. J. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, *173*(1), 89–97. <https://doi.org/10.1034/J.1600->

065X.2000.917309.X

Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca. (2016). *La Política Agropecuaria Ecuatoriana. Hacia el desarrollo territorial rural sostenible 2015-2025*.

<http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu183434.pdf>

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación de España. (2020). *GUIDELINE: DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST ORBIVIRUS BY SERONEUTRALIZATION TEST*.

[https://www.mapa.gob.es/en/ganaderia/temas/laboratorios/guidelinesntfororbivirusantibodiesdetection\\_tcm38-536633.pdf](https://www.mapa.gob.es/en/ganaderia/temas/laboratorios/guidelinesntfororbivirusantibodiesdetection_tcm38-536633.pdf)

Mukherjee, P., & Simpson, R. (1987). Transcriptionally defective nucleocapsids of vesicular stomatitis virus from cells treated with indomethacin. *Virology*, *156*(1), 25–31.

[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90432-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90432-6)

Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, *82*(1), 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>

Neurath, A. R. (2008). Immune Response to Viruses: Antibody-Mediated Immunity.

*Encyclopedia of Virology*, 56. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00591-4>

Nie, J., Li, Q., Wu, J., Zhao, C., Hao, H., Liu, H., Zhang, L., Nie, L., Qin, H., Wang, M., Lu, Q., Li, X., Sun, Q., Liu, J., Fan, C., Huang, W., Xu, M., & Wang, Y. (2020). Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay. *Nature Protocols* *2020 15:11*, *15*(11), 3699–3715. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0394-5>

Nikolic, J., Belot, L., Raux, H., Legrand, P., Gaudin, Y., & A. Albertini, A. (2018). Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nature Communications* *2018 9:1*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03432-4>

Nunamaker, R. A., De León, A. A. P., Campbell, C. L., & Lonning, S. M. (2000). Oral infection of

- Culicoides sonorensis (Diptera: Ceratopogonidae) by vesicular stomatitis virus. *Journal of Medical Entomology*, 37(5), 784–786.
- Nunamaker, R. A., Lockwood, J. A., Stith, C. E., Campbell, C. L., Schell, S. P., Drolet, B. S., Wilson, W. C., White, D. M., & 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.
- OIE. (2021). *Fiebre aftosa - OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal*.  
<https://www.oie.int/es/enfermedad/fiebre-aftosa/#ui-id-2>
- Olitsky, P. K. (1927). Physical, Chemical, and Biological Studies on the Virus of Vesicular Stomatitis of Horses : Comparison with the Virus of Foot-and-Mouth Disease. *J Exp Med*.
- Organización de Sanidad Animal (OIE). (2009). *Principios y Métodos de Validación de las Pruebas de Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas*.  
[https://www.oie.int/esp/normes/fmanual/1.1.02\\_validation.pdf](https://www.oie.int/esp/normes/fmanual/1.1.02_validation.pdf)
- Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE. (2018). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas para los Animales Terrestres (Manual Terrestre)*.  
<https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2005). *Situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa*.  
[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50406/situacionprogramas2004\\_spa.pdf?sequence=2](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50406/situacionprogramas2004_spa.pdf?sequence=2)
- Pal, R., Barenholz, Y., & Wagner, R. R. (1987). Vesicular stomatitis virus membrane proteins and their interactions with lipid bilayers. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 906(2), 175–193. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(87\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0304-4157(87)90011-6)

PANAFTOSA. (2018). *Provisorio enfermedades vesiculares*.

[https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1794:provisorio-enfermedades-vesiculares&Itemid=0](https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=1794:provisorio-enfermedades-vesiculares&Itemid=0)

Payne, S. (2017). Methods to Study Viruses. In *Viruses* (pp. 37–52). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803109-4.00004-0>

Peaper, D. R., & Landry, M. L. (2014). Laboratory diagnosis of viral infection. *Handbook of Clinical Neurology*, 123, 123–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00005-5>

Pieters, M., Jerling, J. C., & Weisel, J. W. (2002). Effect of freeze-drying, freezing and frozen storage of blood plasma on fibrin network characteristics. *Thrombosis Research*, 107(5), 263–269. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(02\)00344-4](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(02)00344-4)

Pituco, E. (2021). *CAPACITACIÓN: DIAGNÓSTICO DE ESTOMATITIS VESICULAR*.

Power, A. T., Wang, J., Falls, T. J., Paterson, J. M., Parato, K. A., Lichty, B. D., Stojdl, D. F.,

Forsyth, P. A. J., Atkins, H., & Bell, J. C. (2007). Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Molecular Therapy*, 15(1), 123–130.

<https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300039>

Prinzi, A. (2020, December 7). *Screening Versus Diagnostic Tests for COVID-19, What's the Difference?* American Society for Microbiology.

<https://asm.org/Articles/2020/December/Screening-Versus-Diagnostic-Tests-for-COVID-19,-Wh>

Public Health Agency of Canada. (2004). *The Laboratory Biosafety Guidelines 3rd Edition*.

Quddus, M., Hossen, M., Chowdhury, M., Chakrobarty, T., Mahmud, S., Nazir, K., Nasiruddin, K., & Rahman, M. (2016). RT-PCR based detection and adaptation of foot and mouth disease virus serotype “A” in BHK-21 cell line. *Progressive Agriculture*, 27(1), 64–69.

<https://doi.org/10.3329/PA.V27I1.27542>

Rabbani, M., Muhammad, K., & Iqball, Z. (2008). Studies on In Vitro Culture Characteristics of Adherent Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21) Cell Line. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*. <http://www.fspublishers.org>

Rajani, K. R., Kneller, E. L. P., McKenzie, M. O., Horita, D. A., Chou, J. W., & Lyles, D. S. (2012). Complexes of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein with Host Rae1 and Nup98 Involved in Inhibition of Host Transcription. *PLOS Pathogens*, *8*(9), e1002929. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002929>

Raschka, S. (2014). *About Feature Scaling and Normalization*.

[https://sebastianraschka.com/Articles/2014\\_about\\_feature\\_scaling.html#z-score-standardization-or-min-max-scaling](https://sebastianraschka.com/Articles/2014_about_feature_scaling.html#z-score-standardization-or-min-max-scaling)

Redelman, D., Nichol, S., Klieforth, R., Van Der Maaten, M., & Whetstone, C. (1989).

Experimental vesicular stomatitis virus infection of swine: extent of infection and immunological response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *20*(4), 345–361.

Redondo, N., Madan, V., Alvarez, E., & Carrasco, L. (2015). Impact of Vesicular Stomatitis Virus M Proteins on Different Cellular Functions. *PLOS ONE*, *10*(6), e0131137.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0131137>

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology*, *27*(3), 493–497.

<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A118408>

Reis, J. L., Mead, D., Rodriguez, L. L., & Brown, C. C. (2009). Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis viruses. *Braz J Vet Pathol*, *2*(1), 49–58. [www.bjvp.org.br](http://www.bjvp.org.br)

Reis Jr, J. L., Rodriguez, L. L., Mead, D. G., Smoliga, G., & Brown, C. C. (2011). Lesion

- development and replication kinetics during early infection in cattle inoculated with Vesicular stomatitis New Jersey virus via scarification and black fly (*Simulium vittatum*) bite. *Veterinary Pathology*, 48(3), 547–557.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A., & Gaudin, Y. (2006). Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*, 313(5784), 187–191.  
<https://doi.org/10.1126/science.1127683>
- 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)
- Rodriguez, L. L., Vernon, S., Morales, A. I., & Letchworth, G. J. (1990). Serological monitoring of vesicular stomatitis New Jersey virus in enzootic regions of Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(3), 272–281.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.272>
- Rodriguez, Luis L., Bunch, T. A., Fraire, M., & Llewellyn, Z. N. (2000). Re-emergence of vesicular stomatitis in the western United States is associated with distinct viral genetic lineages. *Virology*, 271(1), 171–181. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0289>
- Rose, J., & Whitt, M. (2001). *Rhabdoviridae: The Viruses and their replication* (Fourth). Fields Virology.
- Rozo-Lopez, P., Drolet, B. S., & Londoño-Rentería, B. (2018). Vesicular stomatitis virus transmission: A comparison of incriminated vectors. In *Insects* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/insects9040190>
- Ryu, W.-S. (2017). Diagnosis and Methods. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, 47–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00004-7>
- Ryu, W. S. (2016). Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses. In *Molecular Virology of*

- Human Pathogenic Viruses*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/c2013-0-15172-0>
- Salinas, M. T., De La Torre, E. J., Moreno, P. K., Vaca, A. A., & Maldonado, R. A. (2021). A Spatio-temporal distribution analysis of vesicular stomatitis outbreak in Ecuador, 2018. *Revista Bionatura*, 6(2), 1785–1791. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.02.19>
- Sánchez, O. M., Vivas-Ruiz, D., Neira, M., Sandoval, G. A., Machuca, O. M., Rodríguez-Landauro, A. J., & Chacón, R. D. (2019). Rol de los interferones tipo I y tipo III: Una revisión de conceptos. *Revista Científica Ágora*, 6(2), e6–e6. <https://doi.org/10.21679/ARC.V6I2.133>
- Saura, M., Zaragoza, C., McMillan, A., Quick, R. A., Hohenadl, C., Lowenstein, J. M., & Lowenstein, C. J. (1999). An Antiviral Mechanism of Nitric Oxide: Inhibition of a Viral Protease. *Immunity*, 10(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80003-5)
- Scherer, C., O'donnell, V., Golde, W., Gregg, D., Estes, D. M., Rodríguez, L., Serrano, C. F. C., O'donnell, V., Gentry, W. T., Gentry, D., Mark, D., & Ruppel, L. L. (2007). *Vesicular stomatitis New Jersey virus (VSNJV) infects keratinocytes and is restricted to lesion sites and local lymph nodes in the bovine, a natural host*. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007001i>
- Schmidtman, E. T., Tabachnick, W. J., Hunt, G. J., Thompson, L. H., & Hurd, H. S. (1999). 1995 epizootic of vesicular stomatitis (New Jersey serotype) in the western United States: an entomologic perspective. *Journal of Medical Entomology*, 36(1), 1–7.
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology*, 32, 513. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032713-120231>
- Schountz, T., Campbell, C., Wagner, K., Rovnak, J., Martellaro, C., DeBuysscher, B. L., Feldmann, H., & Prescott, J. (2019). Differential Innate Immune Responses Elicited by

Nipah Virus and Cedar Virus Correlate with Disparate In Vivo Pathogenesis in Hamsters.

*Viruses*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/V11030291>

Sigma-Aldrich. (2016). *FUNDAMENTAL TECHNIQUES IN CELL CULTURE LABORATORY*

*HANDBOOK 3 RD EDITION* (3rd ed.). European Collection of Authenticated Cell

Cultures (ECACC). [https://www.phe-](https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/101902/fundamental-techniques-in-cell-culture-3rd-edition.pdf)

[culturecollections.org.uk/media/101902/fundamental-techniques-in-cell-culture-3rd-](https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/101902/fundamental-techniques-in-cell-culture-3rd-edition.pdf)

[edition.pdf](https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/101902/fundamental-techniques-in-cell-culture-3rd-edition.pdf)

Silverman, R. H. (1997). 2-5A-Dependent RNase L: A Regulated Endoribonuclease in the

Interferon System. *Ribonucleases*, 515–551. [https://doi.org/10.1016/B978-012588945-](https://doi.org/10.1016/B978-012588945-2/50017-0)

[2/50017-0](https://doi.org/10.1016/B978-012588945-2/50017-0)

Simovic, B., Yonghong, W., & Scott, R. (2015). Mechanistic insights into the oncolytic activity

of vesicular stomatitis virus in cancer immunotherapy. *Oncolytic Virotherapy*, 4–157.

<https://doi.org/10.2147/OV.S66079>

Singh, H., Koury, J., & Kaul, M. (2021). Innate Immune Sensing of Viruses and Its

Consequences for the Central Nervous System. *Viruses 2021, Vol. 13, Page 170, 13(2)*,

170. <https://doi.org/10.3390/V13020170>

Smith, P F, Howerth, E. W., Carter, D., Gray, E. W., Noblet, R., Smoliga, G., Rodriguez, L. L., &

Mead, D. G. (2011). Domestic cattle as a non-conventional amplifying host of vesicular

stomatitis New Jersey virus. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(2), 184–191.

Smith, Paul F., Howerth, E. W., Carter, D., Gray, E. W., Noblet, R., Berghaus, R. D.,

Stallknecht, D. E., & Mead, D. G. (2012). Host predilection and transmissibility of

vesicular stomatitis New Jersey virus strains in domestic cattle (*Bos taurus*) and swine

(*Sus scrofa*). *BMC Veterinary Research*, 8(1), 183. [https://doi.org/10.1186/1746-6148-](https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-183)

[8-183](https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-183)

- Smith, Paul F., Howerth, E. W., Carter, D., Gray, E. W., Noblet, R., & Mead, D. G. (2009). Mechanical transmission of vesicular stomatitis New Jersey virus by simulium vittatum (Diptera: Simuliidae) to domestic swine (*Sus scrofa*). *Journal of Medical Entomology*, 46(6), 1537–1540. <https://doi.org/10.1603/033.046.0643>
- Sorensen, D. K., Chow, T. L., Kowalczyk, T., Hanson, R. P., & Brandly, C. A. (1958). Persistence in cattle of serum-neutralizing antibodies of vesicular stomatitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, 19(70), 74–77.
- Soukharev, S., Hammond, D., Ananyeva, N. M., Anderson, J. A. M., Hauser, C. A. E., Pipe, S., & Saenko, E. L. (2002). Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 28(2), 234–248. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0508>
- Stallknecht, D. E., Perzak, D. E., Bauer, L. D., Murphy, M. D., & Howerth, E. W. (2001). Contact transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 62(4), 516–520. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.516>
- Stanwick, T. L., & Hallum, J. V. (1974). Role of Interferon in Six Cell Lines Persistently Infected with Rubella Virus. *Infection and Immunity*, 10(4), 810. [/pmc/articles/PMC423026/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/abstract/PMC423026/)
- Stoker, M., & Macpherson, I. (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and its Derivatives. *Nature* 1964 203:4952, 203(4952), 1355–1357. <https://doi.org/10.1038/2031355a0>
- Sur, J. H., Allende, R., & Doster, A. R. (2003). Vesicular stomatitis virus infection and neuropathogenesis in the murine model are associated with apoptosis. *Veterinary Pathology*, 40(5), 512–520. <https://doi.org/10.1354/vp.40-5-512>
- Tesh, R. B., Chaniotis, B. N., & Johnson, K. M. (1972). Vesicular stomatitis virus (Indiana

- serotype): Transovarial transmission by phlebotomine sandflies. *Science*, 175(4029), 1477–1479. <https://doi.org/10.1126/science.175.4029.1477>
- Tesh, R. B., Peralta, P. H., & Johnson, K. M. (1969). Ecologic studies of vesicular stomatitis virus: I. Prevalence of infection among animals and humans living in an area of endemic vsv activity. *American Journal of Epidemiology*, 90(3), 255–261. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121068>
- The Center for Food Security & Public Health (CFSPH). (2008). *Estomatitis Vesicular. Vesículas en la Boca del Ganado Vacuno y Equino, Fiebre Indiana* . [https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/!replaced/!estomatitis\\_vesicular.pdf](https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/!replaced/!estomatitis_vesicular.pdf)
- Thermo Fisher. (n.d.). *Useful Numbers for Cell Culture*. Retrieved August 21, 2021, from <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>
- Thomas, D. C., & Roth, M. G. (1994). The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence but having diverse targeting activities. *Journal of Biological Chemistry*, 269(22), 15732–15739. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40742-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40742-3)
- Thrusfield, M. (2007). *Veterinary epidemiology* (Third).
- Trujillo, L. M. (2009). *Antecedentes y Avances en aspectos de epidemiología, diagnóstico y control de la Estomatitis Vesicular* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8427/tesis399.pdf;jsessionid=30A2176111A4CE395A81090CEEC07240?sequence=1>
- Turell, M. J., O'Guinn, M. L., Jones, J. W., Sardelis, M. R., Dohm, D. J., Watts, D. M., Fernandez, R., Travassos da Rosa, A., Guzman, H., Tesh, R., Rossi, C. A., Ludwig, V.,

- Mangiafico, J. A., Kondig, J., Wasieloski, L. P. J., Pecor, J., Zyzak, M., Schoeler, G., Mores, C. N., ... Klein, T. A. (2005). Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *Journal of Medical Entomology*, 42(5), 891–898. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2005\)042\[0891:IOVFMD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042[0891:IOVFMD]2.0.CO;2)
- Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotani, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005). Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *Journal of Experimental Medicine*, 201(6), 915–923. <https://doi.org/10.1084/JEM.20042372>
- United States Department of Agriculture (USDA). (2019). *Vesicular Stomatitis*. <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/animal-disease->
- Urie, N. J., Lombard, J. E., Marshall, K. L., Digianantonio, R., Pelzel-McCluskey, A. M., McCluskey, B. J., Traub-Dargatz, J. L., Koprak, C. A., Swenson, S. L., & Schiltz, J. J. (2018). Risk factors associated with clinical signs of vesicular stomatitis and seroconversion without clinical disease in Colorado horses during the 2014 outbreak. *Preventive Veterinary Medicine*, 156, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.05.002>
- Van Oirschot, J. T. (1999). Bovine Viral Vaccines, Diagnostics, and Eradication: Past, Present, and Future. *Advances in Veterinary Medicine*, 41(C), 197–216. [https://doi.org/10.1016/S0065-3519\(99\)80017-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3519(99)80017-2)
- Vanleeuwen, J., Rodriguez, L., & Waltner-Toews, D. (1995). Cow, farm, and ecologic risk factors of clinical vesicular stomatitis on Costa Rican dairy farms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(4), 342–350. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1995.53.342>
- Verma, A. S., & Singh, A. (2013). *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*.

In *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/C2011-0-05210-9>

Vernon, S., Rodriguez, L., & Letchworth, G. (1990). Vesicular stomatitis New Jersey virus glycoprotein gene sequence and neutralizing epitope stability in an enzootic focus.

*Virology*, 177(1), 209–215. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90474-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90474-6)

Virginia Department of Health (VDH). (2020). *Screening for SARS-CoV-2: Sample Size and Sampling Technique Overview*.

Webb, P. A., Monath, T. P., Reif, J. S., Smith, G. C., Kemp, G. E., Lazuick, J. S., & Walton, T. E.

(1987). Epizootic Vesicular Stomatitis in Colorado, 1982: Epidemiologic Studies along the Northern Colorado front Range. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(1), 183–188. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1987.36.183>

Wellehan, J. (2006). Understanding Diagnostic Testing. *Reptile Medicine and Surgery*, 1062–1067. <https://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50086-9>

Whelan, S. P. J. (2008). Vesicular Stomatitis Virus. In *Encyclopedia of Virology*.

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

Wolkers, W. F., Tablin, F., & Crowe, J. H. (2002). From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular &*

*Integrative Physiology*, 131(3), 535–543. <https://doi.org/10.1016/S1095->

6433(01)00505-0

