



Estandarización de la prueba del anticuerpo neutralizante unido a una peroxidasa (NPLA) para la detección de anticuerpos contra el virus de Peste Porcina Clásica.

Jimenez Poma, Karen Lisbeth

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 Ingeniería en Biotecnología

Ph.D. Reyna Bello, Armando

07 de septiembre del 2021

Curiginal

Document Information

Analyzed document	Estandarización de la prueba del anticuerpo neutralizante unido a una peroxidasa.docx (D111437583)
Submitted	9/7/2021 14:21:26 PM
Submitted by	Guamán Guamán Rocio Noemi
Submitter email	rnguaman@espe.edu.ec
Similarity	45
Analysis address	rnguaman.espe@analysis.urfund.com

Sources included in the report

W	URL: https://docplayer.es/22635137-Evaluacion-de-la-respuesta-postvacunal-a-pesta-porcina-clasica-por-medio-de-diferentes-pruebas-diagnosticas-en-cerdos-desafiados-experimentalmente.html Fetched: 7/9/2021 2:21:09 AM	1
W	URL: https://docplayer.es/22635137-Evaluacion-de-la-respuesta-postvacunal-a-pesta-porcina-clasica-por-medio-de-diferentes-pruebas-diagnosticas-en-cerdos-desafiados-experimentalmente.html Fetched: 11/12/2020 8:45:32 AM	2
W	URL: https://www.reuters.com/article/salud-coronavirus-india-tests-id.TARBK27D1U4 https://www.oie.int/FilesAdmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.08.03_Peste_porcina_c1NE23809A0ica.pdf Fetched: 6/16/2020 8:17:56 PM	2
W	URL: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8737/186276_2011.pdf?sequence=1 Fetched: 3/28/2020 10:25:16 AM	1
W	URL: https://www.notiutti.com/las-mutaciones-ayudan-a-la-variante-del-coronavirus-de-epsilon-a-evadir-la-inmunidad-a-la-vacuna-estudio/ Fetched: 7/23/2021 11:21:40 AM	1
W	URL: https://www.conprueba.es/anticuerpos-neutralizantes-frente-sars-cov-2-0 Fetched: 6/8/2021 18:23:10 PM	1

Firma:



ARMANDO
REYNA

Reyna Bello, Armando PhD.

C. C.: 1758891830

Director del Proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, "Estandarización de la prueba del anticuerpo neutralizante unido a una peroxidasa (NPLA) para la detección de anticuerpos contra el virus de Peste Porcina Clásica." fue realizado por la señorita Jimenez Poma, Karen Lisbeth 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.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 07 de septiembre del 2021



ARMANDO
REYNA

Reyna Bello, Armando PhD.

C. C.: 1758891830

Director del Proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo **Jimenez Poma, Karen Lisbeth** con cédula de ciudadanía n° 2300423486, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Estandarización de la prueba del anticuerpo neutralizante unido a una peroxidasa (NPLA) para la detección de anticuerpos contra el virus de Peste Porcina Clásica."** 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.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 07 de septiembre de 2021

Jimenez Poma, Karen Lisbeth
C.C.: 2300423486



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo *Jimenez Poma, Karen Lisbeth* con cédula de ciudadanía n° 2300423486 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Estandarización de la prueba del anticuerpo neutralizante unido a una peroxidasa (NPLA) para la detección de anticuerpos contra el virus de Peste Porcina Clásica." en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 07 de septiembre de 2021

Jimenez Poma, Karen Lisbeth
C.C.: 2300423486

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo hacia mi familia y Dios, a mi madre quien con su apoyo incondicional me ha ayudado a crecer tanto académicamente como persona, quien fue mi mayor apoyo en tiempos de angustia. También a mi padre por su afecto y esfuerzo de ayudarme en todo lo que he necesitado. A mi hermano por estar siempre pendiente de mí y por último mis amigos Joselyn, Pamela, Erika, Brandon, Harry y Jorge quienes supieron brindarme apoyo y compañía.

*La vida no es fácil para ninguno de nosotros.
Debemos tener perseverancia y, sobre todo,
confianza en nosotros mismos. Debemos creer
que estamos dotados para algo y
que esto debe ser alcanzado.*

“Marie Curie”

Agradecimiento

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE sede Santo Domingo por los conocimientos que me impartieron los docentes durante toda la etapa de mi desarrollo profesional.

La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario-AGROCALIDAD por darme todas las herramientas, recursos y permitirme desarrollar el proceso de mi investigación.

Al ing. Alex Maldonado, por haber despertado en mí la pasión por cultivo celular, por su confianza, compromiso, dedicación, por impartirme sus conocimientos, su infinita ayuda y contribución, por ser el guía y tutela durante todo mí proceso de investigación.

Al Mgs. Euclides DeLaTorre, por a verme permito realizar el proyecto en los laboratorios de Diagnostico Animal, por la confianza brindada, ayuda y tiempo durante mi investigación.

A la Mzv. Bedia Banegas, por su contribución, por transmitirme sus conocimientos e información necesaria para el desarrollo de la investigación.

Dra. Maritza Barrera, por compartir sus conocimientos sin reservas durante todo el proceso de investigación.

Dr. Armando Reyna, por su asistencia y colaboración durante el proceso de integración curricular. Por su enseñanza e impartición de conocimientos durante toda la carrera de ingeniería.

A mi familia y a Dios por ser pilares fundamentales en mi vida, ya que con su apoyo he seguido adelante en mis estudios.

A Jorge, por apoyarme, creer y brindarme apoyo emocional durante mis estudios. Haider y Josselyn que han estado junto a mí siempre apoyándome en todo ámbito. Muchas gracias de todo corazón a todas las personas mencionadas anteriormente.

Índice de Contenido

Carátula.....	1
Análisis Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de Contenido	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
Listado de abreviaturas.....	15
Resumen	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Formulación del Problema	18
Justificación del Problema.....	19
Objetivos de la Investigación	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos.....	19

Capítulo II: Marco teórico	20
Peste Porcina Clásica.....	20
Generalidades	20
Historia de la enfermedad.....	20
Etiología	21
Genoma del virus	22
Propiedades del virus	23
Características de las proteínas y glicoproteínas.....	23
Proteína C.....	24
Proteína E1 y E2	24
Proteína Erns	24
Replicación Viral.....	25
Epidemiología	26
Transmisión.....	26
Signos Clínicos	27
Técnicas de Diagnóstico	29
Ensayo de neutralización ligada a peroxidasa (NPLA)	30
Anticuerpos Neutralizantes.....	31
Inmunización frente al VPPC	32
Respuesta inmune de las células por VPPC	32

Líneas Celulares.....	33
Línea celular PK15	34
Hipótesis	34
Capítulo III: Materiales y Métodos	35
Obtención de las muestras.....	35
Evaluación de muestras de suero mediante enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-I)	35
Cultivo celular	36
Preparación de medio de crecimiento	36
Descongelación	36
Subcultivo celular	37
Conteo celular	38
Estimación de viabilidad.....	38
Congelación celular	38
Curva de crecimiento de la línea celular PK-15	39
Replicación del virus.....	39
Titulación viral.....	40
Solución de trabajo	40
Neutralización ligado a peroxidasa (NPLA).....	40
Fijación y tinción de las células con Inmunoperoxidasa Directa.....	41
Cálculo del título de anticuerpos neutralizantes	42

Control de dosis viral.....	42
Sensibilidad Analítica	43
Especificidad Analítica.....	43
Diseño experimental	44
Análisis funcional.	44
Capitulo IV: Resultados y Discusión	45
Inoculación del VPPC en la línea celular PK-15.....	53
Titulo viral	54
Detección de anticuerpos neutralizantes.....	56
Sensibilidad y especificidad analítica	61
Capítulo V: Conclusiones.....	64
Capítulo VI: Recomendaciones.....	66
Capitulo VII: Bibliografía.....	67

Índice de Tablas

Tabla 1 Métodos de diagnóstico para PPC.....	29
Tabla 2 Análisis de Varianza para el número de células/pocillo.....	47
Tabla 3 Resultados del Análisis Tukey ($P>0,05$) respecto al tiempo de incubación para el número de células.	48
Tabla 4 Resultados del Análisis Tukey ($P>0,05$) para el Factor B de la variable de número de células/pocillo.	49
Tabla 5 Resultados del Análisis Tukey ($P>0,05$) para Número de células por Densidad celular y Tiempo de la variable de número de células/pocillo.	49
Tabla 6 Análisis de Varianza para el % viabilidad celular	50
Tabla 7 Dosis infectiva de los stocks virales.	55
Tabla 8 Resumen de los resultado de anticuerpos neutralizantes por NPLA	57
Tabla 9 Resumen de resultados del ELISA.....	59
Tabla 10 Resumen de resultados de Elisa y NPLA.....	59
Tabla 11 Resumen del control de dosis infectiva.....	63

Índice de Figuras

Figura 1 Mapa del estatus oficial de peste porcina clásica	21
Figura 2 Estructura del genoma del VPPC	22
Figura 3 Diagrama esquemático del ciclo de vida del VPPC.	26
Figura 4 Signos clínicos y lesiones post-mortem de Peste Porcina Clásica.	27
Figura 5 Signos clínicos y lesiones en fase sub-aguda de Peste Porcina Clásica.	28
Figura 6 Porcino no infectado con el virus de la PPC.	30
Figura 7 Porcino infectado con el virus de la PPC.....	31
Figura 8 Tipo de crecimiento de los cultivos celulares de acuerdo a sus características del soporte y el origen celular.	33
Figura 9 Línea celular PK-15	45
Figura 10 Gráfico de la densidad celular respecto al tiempo de incubación	46
Figura 11 Gráfico de normalización de la curva de crecimiento	47
Figura 12 Gráfico de superficie de respuesta.....	51
Figura 13 Gráfico del % de viabilidad respecto al tiempo de incubación	52
Figura 14 Cultivo celular de la línea PK-15	54
Figura 15 Diluciones de los stocks virales para la dosis infectiva.	56
Figura 16 Resultados de anticuerpos neutralizantes mediante NPLA.....	58
Figura 17 Resultados de anticuerpos neutralizantes de ELISA y NPLA	60

Figura 18 Gráficos de los resultados de sensibilidad analítica. 61

Figura 19 Resultados de las cavidades sin protección de especificidad analítica. 62

Listado de abreviaturas

AcM	Anticuerpo monoclonal
Cel/poc.	Número de células por pocillo
CN	Control Negativo
CP	Control Positivo
DICT50	Dosis infectiva para el 50% de cultivo
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
H	Horas
mL	Mililitros
NPLA	Ensayo de neutralización ligada a peroxidasa
PPC	Peste porcina clásica
Rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovido
SNV	Seroneutralización viral
S	Segundos
TOX	Toxicidad
UI	Unidad Internacional
uL	Microlitros
ug	Microgramo
VPPC	Virus de Peste Porcina clásica

Resumen

La Peste Porcina clásica (PPC) es una de las enfermedades más infecciosas y contagiosas que afectan a los cerdos domésticos y silvestres. Existen diferentes métodos serológicos de diagnóstico, el ensayo de neutralización ligada a peroxidasa (NPLA) es un método considerado como el Gold Standard para esta enfermedad. El NPLA permite evaluar la capacidad de los anticuerpos presentes en un suero para neutralizar la infección del *virus in vitro*, esta técnica mediante anticuerpos monoclonales permite identificar entre animales enfermos y vacunados. Para la estandarización del ensayo primero se determinó el crecimiento de la línea celular de riñón de cerdo (PK-15) y su viabilidad celular con distintas densidades celulares y tiempos de incubación, estableciendo una densidad inicial de 12×10^3 células/pocillo para todos los ensayos y realizando una lectura a las de 72 h post-infección del virus de PPC. Mediante inmunoperoxidasa directa se evaluó la replicación viral en la línea celular y la cuantificación de los títulos virales infectivos ($\text{DICT}_{50}/\text{mL}$) replicando el virus semilla (cepa Alfort 187) en la línea celular PK-15 logrando después de 4 subcultivos sucesivos un título infectivo de $10^{8.26}$ $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$. Los títulos de anticuerpos neutralizantes mediante NPLA de las muestras de suero fueron altos entre 1.8 y 7.85 (\log_{10}). En sensibilidad analítica los sueros con títulos de 7.8 (\log_{10}) son capaces de neutralizar el virus hasta una dilución 1:1280. El ensayo de NPLA demostró una alta especificidad al no neutralizar sueros exclusivos ni inclusivos del género *Pestivirus*.

Palabras claves:

- **NPLA**
- **PESPE PORCINA CLÁSICA**
- **LÍNEA CELULAR PK-15**
- **DIAGNÓSTICO**

Abstract

Classical swine fever (CSF) is one of the most infectious and contagious diseases that affect domestic and wild pigs. There are different serological methods of diagnosis, the peroxidase-linked neutralization assay (NPLA) is a method considered the Gold Standard for this disease. The NPLA allows the evaluation of the capacity of the antibodies present in a serum to neutralize the virus infection in vitro, this technique by means of monoclonal antibodies allows to identify between sick and vaccinated animals. For the standardization of the assay, the growth of the pig kidney cell line (PK-15) and its cell viability were first determined with different cell densities and incubation times, establishing an initial density of 12×10^3 cells/well for all the assays and performing a reading at 72 h post-infection of the CSF virus. Using direct immunoperoxidase, viral replication in the cell line and the quantification of infective viral titers ($TCID_{50}$ /mL) were evaluated by replicating the seed virus (strain Alfort 187) in the PK-15 cell line, achieving an infective titer after 4 successive subcultures of $10^{8.26} TCID_{50}$ / mL. The neutralizing antibody titers by NPLA of the serum samples were high between 1.8 and 7.85 (\log_{10}). In analytical sensitivity, sera with titers of 7.8 (\log_{10}) are capable of neutralizing the virus up to a 1:1280 dilution. The NPLA assay demonstrated high specificity by not neutralizing exclusive or inclusive sera of the genus *Pestivirus*.

Keywords:

- **NPLA**
- **CLASSICAL SWINE FEVER**
- **PK-15 CELL LINE**
- **DIAGNOSTIC**

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

Una de las enfermedades más infecciosas y contagiosas que afectan a los cerdos domésticos y silvestres es la peste porcina clásica (PPC). Siendo una enfermedad endémica con gran potencial de transmisión en ciertos países de Centroamérica, Sudamérica, Europa, Asia y partes de África genera un impacto socio-económico severo en los sistemas de producción porcina tanto en países industrializados como en desarrollo de casi todo el mundo (F. I. Wang & Chang, 2020).

Ecuador es uno de los países endémicos portadores de la enfermedad de PPC, fue notificada por primera vez en la década de los 40, y desde entonces ha ocasionado grandes pérdidas a la porcicultura nacional por su elevado índice de morbilidad, que va entre el 40 y 60% en las regiones de la sierra y la costa, y con menor proporción en la amazonia (Agrocalidad, 2012).

Existen diferentes métodos de diagnóstico para la detección de PPC que han demostrado ser muy útiles para el diagnóstico de la enfermedad. En el caso de las serológicas la neutralización de la peroxidasa (NPLA) es una técnica recomendada por la OIE para la detección de anticuerpos generados de animales frente PPC. Si no existe un control de las poblaciones porcinas del Ecuador puede aumentar el índice de prevalencia de la enfermedad dificultando su control para la erradicación. Mediante la vacunación es una de las estrategias más efectivas para la prevención y el control de esta enfermedad (Li, Chiou, & Lin, 2020).

Justificación del Problema

Estandarizar el ensayo de NPLA es importante debido a que es un método preciso, sensible y específico en comparación de otras pruebas serológicas para la detección de PPC. Consiste el ensayo en valorar la capacidad de los anticuerpos presentes en un suero para neutralizar la infección del virus *in vitro* (Terpstra, Bloemraad, & Gielkens, 1984a). Permite determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones enfermos o tras la vacunación mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Además es un método idóneo para confirmar casos clínicos en comparación del ELISA (OIE, 2019).

Así, el presente trabajo permitiría estandarizar la técnica de NPLA empleando un monoclonal específico para evaluar el estado inmunitario de animales infectados de PPC.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Estandarizar la prueba de neutralización ligado a peroxidasa (NPLA) para la detección de anticuerpos contra el virus de peste porcina clásica (VPPC).

Objetivos Específicos

- ✓ Obtener la curva de crecimiento de la línea celular PK-15
- ✓ Cultivar el virus de Peste Porcina Clásica en la línea celular de Riñón de Cerdo (PK-15).
- ✓ Calcular el título viral.
- ✓ Detectar mediante la prueba de neutralización ligada a peroxidasa (NPLA) la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero.
- ✓ Determinar la especificidad y sensibilidad analítica de la prueba.

Capítulo II: Marco teórico

Peste Porcina Clásica

Generalidades

La peste porcina clásica (PPC) o también conocida como Cólera Porcino es una enfermedad vírica contagiosa más devastadoras en los cerdos (OIE, 2019). El virus de la peste porcina clásica (VPPC) es un patógeno de alta consecuencia. La infección con cepas VPPC de alta virulencia generalmente conduce a la muerte de los animales infectados, mientras que las cepas de virulencia moderada a baja inducen una enfermedad crónica. Debido a la conmoción en la producción porcina, el control y la prevención de la enfermedad ha sido una de las principales prioridades en los países productores de cerdos (Blome, Staubach, Henke, Carlson, & Beer, 2017c).

Historia de la enfermedad

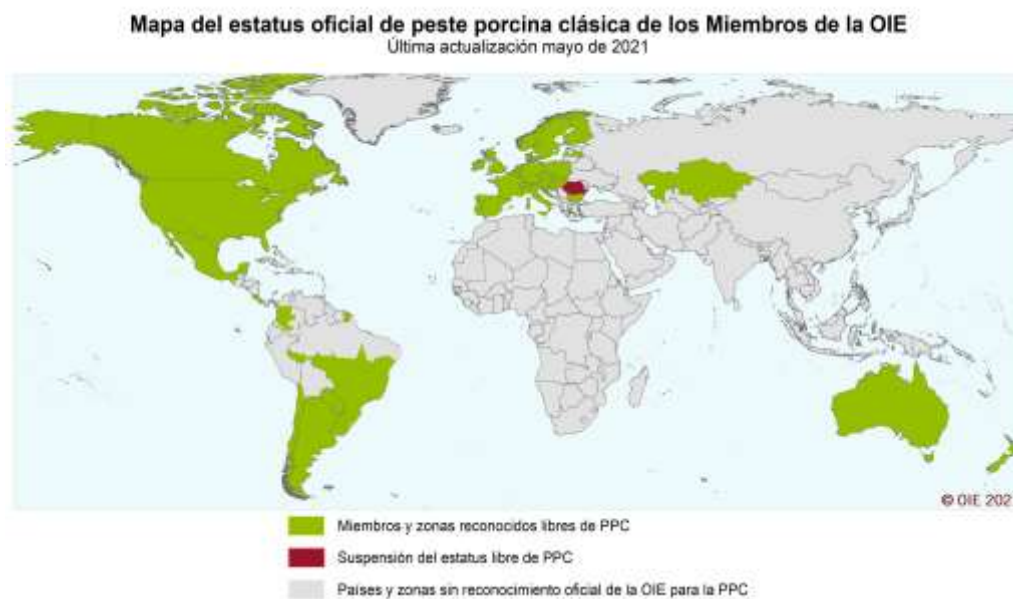
La PPC se detalló por primera vez en 1810 en Estados Unidos de Norteamérica (Edwards et al., 2000). No obstante, en 1830 se describió en el estado de Ohio de Estados Unidos. A partir de 1862 la enfermedad pasó a Inglaterra y después al resto de Europa. Según Tratschin, Moser, Ruggli, & Hofmann en 1998, comprobaron la etiología viral de la enfermedad, ya que anteriormente se creía que era producto de agentes bacterianos tales como *Salmonella choleraesuis*, agentes aislados con frecuencia cuando se presentaba la enfermedad.

En Ecuador la PPC fue descrita por primera vez por el año de 1940. Durante el 2006 se expusieron 4 focos en la provincia de Napo y la enfermedad estuvo presente de forma subclínica hasta el 2008 (Ferrer, Fonseca, Percedo, & Abeledo, 2010). En la Figura 1 se observa los

miembros reconocidos libres de PPC del 2021, dentro de estas zonas se incluye el territorio insular de Galápagos.

Figura 1

Mapa del estatus oficial de peste porcina clásica



Nota: El gráfico representa a los países reconocidos y sin reconocimiento de PPC en el año 2021.

Tomado de la OIE (2021).

Etiología

El VPPC se caracteriza por ser un virus ARN perteneciente al género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae* (D. J. Paton & Greiser-Wilke, 2003). En esta familia de igual forma están presentes los géneros *Flavivirus* y *Hepacivirus* (Rodríguez & Josué Díaz de Arce Landa, 2008a). El virus se caracteriza por tener proteínas de membrana glicosiladas y una envoltura con un tamaño de 40-60 nm de diámetro.

El género *Pestivirus* engloba los virus de la enfermedad fronteriza (BDV) y la Diarrea Viral Bovina (BVD), virus que también pueden afectar a los cerdos. Se ha informado de protección cruzada contra PPC en el caso del virus DVB, ya que los *pestivirus* están estrechamente relacionados estructural y antigénicamente (Blome, Staubach, Henke, Carlson, & Beer, 2017a).

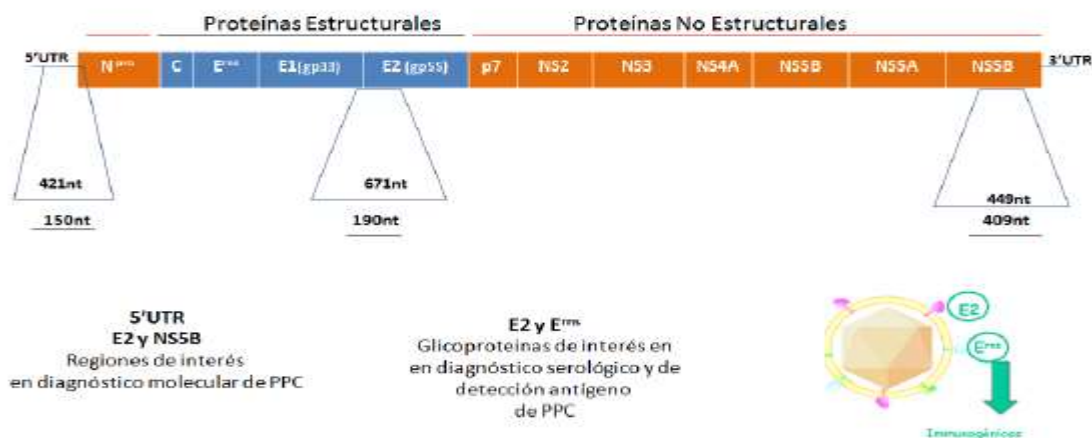
Genoma del virus

Es de cadena sencilla de polaridad positiva el genoma ARN que lo constituye con un peso de 12.2 kb el cual posee un marco abierto de lectura (Open Reading Frame) que codifica 3.898 aminoácidos de 435 kDa. El marco abierto está rodeado por regiones no codificantes (UTR), una de aproximadamente de 400 nucleótidos ubicado en el extremo 5' denominado 5'UTR y otro de 200 nucleótidos en el extremo 3' llamado 3'UTR. La 3'UTR está envuelta en la iniciación de la replicación del genoma de los *Pestivirus* y también está relacionada con la traducción y la replicación. En cambio la 5'UTR regula la traducción del genoma (Lindenbach, Thiel, & Rice, 2006).

La cápside tiene un diámetro de 25-35 nm, con el peso molecular de 4×10^6 Dalton. El extremo 5' está bloqueado por un casquete (cap), que le da al ARN la propiedad de actuar como ARN mensajero (ARNm) y el extremo 3' está poliadenilado. El genoma viral posee una longitud de 12.284 nucleótidos (Blome et al., 2017a).

Figura 2

Estructura del genoma del VPPC



Nota: El gráfico representa a la estructura del genoma del VPPC. Tomado de *Genetic typing of classical swine fever virus*, por D. Paton et al., (2000)

Propiedades del virus

Características de las proteínas y glicoproteínas

Las partículas virales envueltas constan de cuatro proteínas estructurales, la proteína central (C) y las glicoproteínas de la envuelta E1, E2 y Erns (Krey, Thiel, & Rümenapf, 2005). La región codificante está flanqueada por regiones no traducidas (NTR) en ambos extremos. El procesamiento co y postraduccional de la proteína precursora por las proteasas virales y celulares da como resultado 13 proteínas maduras, las cuales son proteínas estructurales y las proteínas no estructurales como la Npro, p7, NS2-3, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Estos últimos tienen varias funciones en la replicación viral (Lackner, Thiel, & Tautz, 2006).

El virus de la PPC en la glicoproteína E2 presenta dos unidades estructurales de la mitad N-terminal cuatro dominios antigénicos (A, B, C y D). Son altamente conservados los dominios B y C. En cambio A es totalmente conservado entre todas las cepas de PPC e inducen Anticuerpos Monoclonales (AcM) neutralizantes (Rodríguez & Josué Díaz de Arce Landa, 2008b).

Proteína C

La proteína C esta proteína en el genoma viral sigue a la Npro, está constituyendo la nucleocápside del virión. Es un polipéptido de 14 kDa el cual está altamente conservado en los virus de PPC. Sirve como secuencia señal de inicio de la translocación de la proteína Erns al lumen del retículo endoplásmico (Lindenbach et al., 2006).

Proteína E1 y E2

La E2 es una proteína transmembranal que tiene mayor inmunogenicidad que la E1. Las proteínas E1 y E2 están asociadas como heterodímeros unidos por puentes disulfuro, pero la proteína E2 también se encuentra como homodímero. La E2 tiene una característica que le atribuye a la envoltura una composición muy particular no observada en otros virus ARN distintos a *Pestivirus* que forman dímeros unidos por enlaces disulfuro. Por otra parte, algo considerable es que estimulan anticuerpos neutralizantes (Moennig, Floegel-Niesmann, & Greiser-Wilke, 2003a).

Proteína Erns

Es una proteína esencial para la infección celular, al igual que la E1 y E2 puesto que son necesarias para la absorción celular (Borca et al., 2019). La Erns es el blanco de los anticuerpos neutralizantes induciendo una inmunidad protectora frente al virus de PPC y es esencial para la unión del virus y su translocación a través de la membrana plasmática, lo cual se considera necesario para la infección de las células eucariotas por parte de los *Pestivirus* (L. Chen, Xia, Pan, & Zhang, 2007). Además la Erns está asociada con la envoltura y es necesaria en la infección viral (Borca et al., 2019).

Replicación Viral

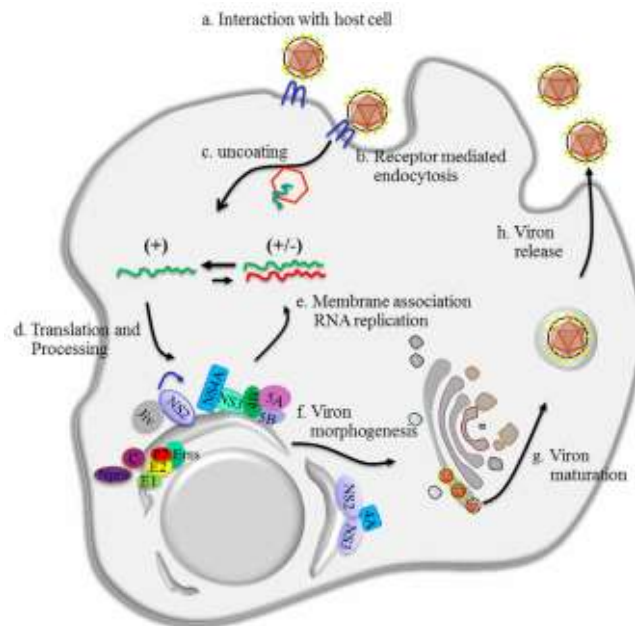
La replicación del virus tiene lugar en el citoplasma después de la endocitosis mediada por receptores y normalmente no conduce a un efecto citopático en el cultivo celular (Gray & Nettleton, 1987). Las glicoproteínas E2 y Erns son necesarias para la unión viral (Iqbal, Flick-Smith, & JW, 2000), y el contacto inicial con la célula huésped está mediado por la Erns que interactúa con los glicosaminoglicanos. Posteriormente con la membrana endosomal de la fusión de la envoltura del virus, el núcleo del virus se libera en el citoplasma (Donis, 1995).

Se libera el ARN viral en el citoplasma y tiene lugar la traducción. La unión de los ribosomas en el retículo endoplasmático rugoso se realiza a través de un sitio de entrada ribosómico interno (IRES) en el 5' NTR, lo que permite una traducción independiente del casquete (Rijnbrand, Van der Straaten, Van Rijn, Spaan, & Bredenbeek, 1997).

En la Figura 3 se observan los viriones que interactúan con moléculas receptoras en la superficie celular (a) y se transportan por endocitosis mediada por receptor (b) en una vesícula, generando cambios en el virión y liberación de ARN viral en el citoplasma (c). El ARN genómico es traducido a un solo poliproteína (d). Las proteínas maduras replican el ARN genoma a través de un intermedio replicativo de cadena negativa para producir ARN de cadena positiva de progenie (f). Los virones siguen la vía secretora celular y durante en este transporte se produce la maduración de las partículas infecciosas (g). Los virones maduros son liberados de la célula (h). Es ARN genómico de sentido positivo es el intermedio replicativo de hebra negativa asociado con la hebra positiva ARN (Ji, Guo, Ding, & Cheng-Qiang He, 2015).

Figura 3

Diagrama esquemático del ciclo de vida del VPPC.



Nota: El gráfico representa el ciclo de vida del VPPC. Tomado de *Studying classical swine fever virus: Making the best of a bad virus*, por Ji Wei et al., (2015)

Epidemiología

Transmisión

El virus de la PPC se puede transferir tanto vertical como horizontalmente. La transmisión horizontal resulta a través del contacto indirecto o directo entre cerdos infectados y susceptibles. Generalmente por contacto de animales enfermos por PPC a animales sanos, siendo las secreciones y demás fluidos corporales la principal fuente de contagio. Además han encontrado que vectores mecánicos como operarios, artrópodos, pájaros, mascotas y roedores pueden transmitir la enfermedad. Se puede presentar la transmisión por vía aerógena hasta en una distancia de 1 km de radio del foco primario (Weesendorp, Stegeman, & Loeffen, 2009). La

transmisión aerogénica informaron en condiciones experimentales según Z. Wang et al., (2004) que posiblemente desempeña un papel en la transmisión dentro del rebaño.

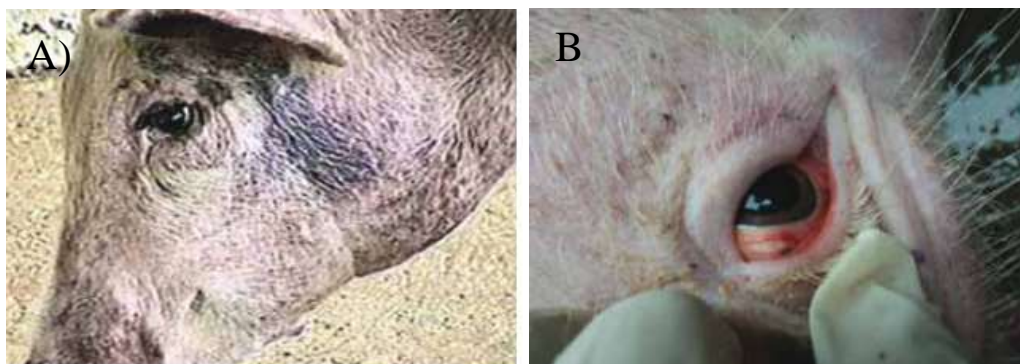
La transmisión vertical de las cerdas preñadas a los fetos es posible en las etapas de la gestación y puede dar lugar a una descendencia infectada de forma persistente (Blome, Staubach, Henke, Carlson, & Beer, 2017b).

Signos Clínicos

Los signos clínicos de la PPC varían según susceptibilidad de los cerdos como la edad y la cepa del virus. Por ejemplo las cepas menos virulentas pueden ocasionar un alto porcentaje de infestaciones crónicas asintomáticas o leves. En cambio las cepas más virulentas generan enfermedades críticas. La PPC aguda se caracteriza por síntomas como temperaturas altas de 41°C, debilidad, conjuntivitis y algunos cerdos presentan incoordinación o el apareamiento de una marcha oscura de color azul en algunas partes de su cuerpo (OIE, 2010).

Figura 4

Signos clínicos y lesiones post-mortem de Peste Porcina Clásica.



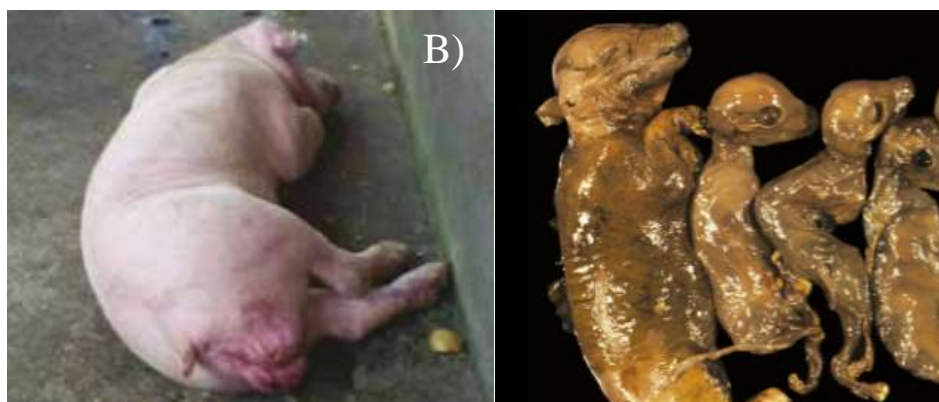
Nota: El gráfico representa los signos clínicos y lesiones post-mortem de Peste Porcina Clásica.

A) Cianosis y eritema en la cara. **B)** Conjuntivitis catarral Tomado de un *informe de Peste Porcina Clásica* por AGROCALIDAD, (2019).

La sintomatología de forma subaguda se presenta de menor gravedad como por ejemplo el animal puede estar con fiebre por 2 a 3 semanas. Generalmente los cerdos que tienen infecciones crónicas mueren o pueden sobrevivir durante el primer o tercer mes. Las cerdas ocasionalmente al estar infectadas producen abortos, generar momificados o lechones con malformaciones. Los lechones que nacen con malformaciones pueden presentar decaimiento, retraso en el crecimiento, diarrea y conjuntivitis. (OIE, 2010).

Figura 5

Signos clínicos y lesiones en fase sub-aguda de Peste Porcina Clásica.



Nota: El gráfico representa los signos clínicos y lesiones en fase sub-aguda de Peste Porcina Clásica. **A)** Rigidez en la cola y **B)** Fetos momificados. Tomado de un *informe de Peste Porcina Clásica* por AGROCALIDAD, (2019).

El virus de la PPC también tiene la capacidad de generar cuadros hemorrágicos afectando varios tejidos producto de la trombosis y daño en el endotelio vascular. Las lesiones macroscópicas son principalmente hemorragias con presencia de equimosis o petequias en la mayoría de los órganos (Moennig, Floegel-Niesmann, & Greiser-Wilke, 2003b).

Técnicas de Diagnóstico

De acuerdo al Manual Terrestre de la OIE (2019), los métodos analíticos para el diagnóstico de VPPC se basan en la identificación del agente viral o en la detección de la respuesta inmunitaria (Tabla 1).

Tabla 1

Métodos de diagnóstico para PPC

Detección	Método de diagnóstico	Descripción	Muestras
virus	Aislamiento del virus	Consiste en aislar el virus en líneas celulares como PK-15 y SK6 u otra línea celular.	Macerado de órganos (ganglios, bazo y riñón)
Proteínas y ácido nucleico	-Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) -PCR Tiempo Real (RT-qPCR) -Secuenciación	La RT-PCR ha sido uno de los métodos más sensibles para la detección del virus de PPC. Estas técnicas consisten en extraer el ARN vírico de muestras clínicas infectados por VPPC, y realizar una a amplificación dentro de 5'NTR o del gen de E2.	Macerado de órganos, sangre, suero y sobrenadante de cultivos celulares infectados.
	Enzimoimmunoensayo ELISA (antígeno)	Se trata de una ELISA de captura-competición que emplea dos anticuerpos monoclonales específicos frente a dos epítopes diferentes de la proteína estructural E2.	Macerado de órganos, sangre, plasma y suero
Respuesta immune	Prueba del anticuerpo neutralizante unido a peroxidasa (NPLA) Prueba de neutralización vírica con anticuerpos fluorescentes (FAVN)	Se realizan en cultivos celulares utilizando un método de virus constante/suero variable. Como el VPPC no es citopático, cualquier virus no neutralizado debe detectarse, tras su multiplicación, por un sistema indicador con inmunoperoxidasa en NPLA y fluorescencia con FAVN.	Suero
	ELISA (anticuerpo)	Utiliza AcM para medir la unión de los Ags dirigidos contra la proteína E2. Los ELISA que detectan anticuerpos contra la glicoproteína Erns pueden utilizarse como pruebas discriminatorias de los vacúnales.	

Ensayo de neutralización ligada a peroxidasa (NPLA)

Es la prueba estándar de oro para el diagnóstico de PPC para el caso de las serologías. La prueba se realiza sobre cultivos celulares de la línea PK -15 (ATCC CCL 33) o SK6 libres de Virus de Diarrea Viral Bovina. Para su realización se precisa de un virus de referencia como es la cepa ALFORT (Meyers, Rüménapf, & Thiel, 1989) del cual se conocen sus diferentes grados de neutralización, de un suero control conocido previamente y de un cultivo celular. Dado que el virus no produce efecto citopático en los cultivos celulares, se detecta por un sistema indicador de marcado inmunológico la probable replicación de virus no neutralizado, en este sistema se emplea un conjugado de peroxidasa (Jensen, 1981).

La NPLA se basa en enfrentar una dilución del suero problema con una dilución de virus PPC que contenga 100 DICT₅₀ en un pocillo de la microplaca, si hay anticuerpos de la muestra de suero neutraliza el virus. Para poner en evidencia la presencia o ausencia de virus sin neutralizar, se utiliza un indicador constituido por un suero de cerdo altamente positivo o un anticuerpo monoclonal a PPC, en una dilución apropiada que detecte el virus no neutralizado; luego, se emplea un segundo anticuerpo Anti IgG porcino o murino seguido de una incubación y luego se agrega la solución de cromógeno AEC sustrato peróxido de H₂, que tiñe los citoplasmas de las células donde hay virus vivo o sea que no se neutralizó (OIE, 2010).

Figura 6

Porcino no infectado con el virus de la PPC.

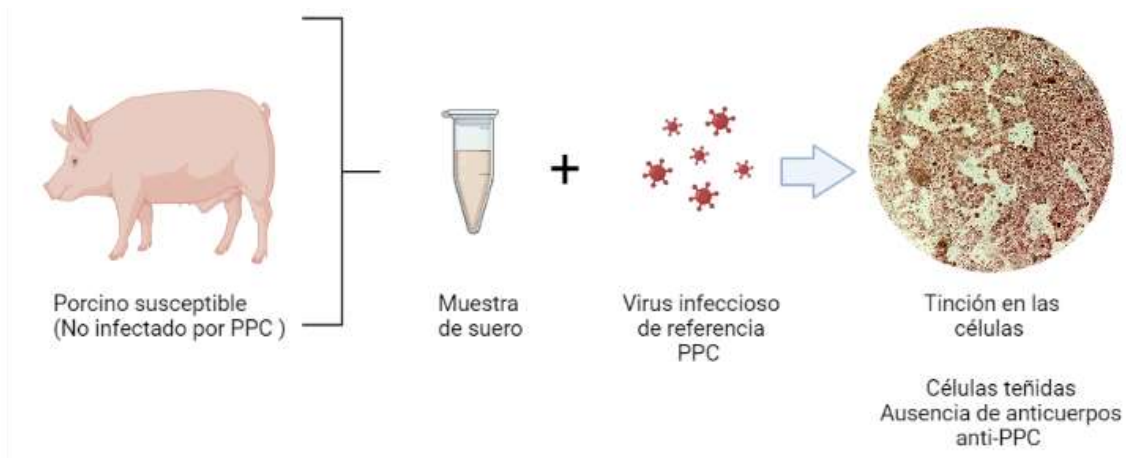
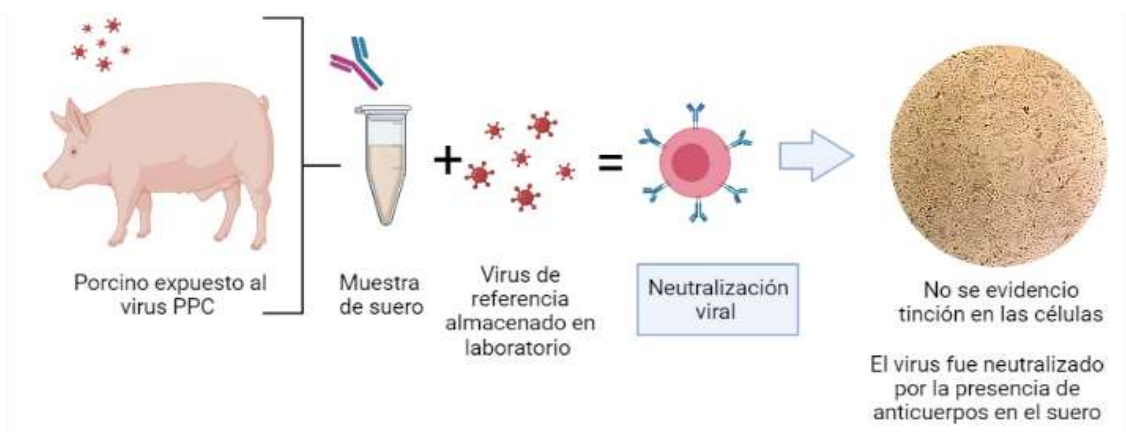


Figura 7

Porcino infectado con el virus de la PPC.



Anticuerpos Neutralizantes

Los anticuerpos neutralizantes son una defensa específica importante contra los invasores virales. Los anticuerpos neutralizantes no solo se unen a un virus, sino que se unen de una manera que bloquea la infección. Un anticuerpo neutralizante podría bloquear las interacciones con el receptor, o podría unirse a una cápside viral de una manera que inhiba la descubierta del genoma. Solo un pequeño subconjunto de los muchos anticuerpos que se unen

a un virus son capaces de neutralizarse. Después de una infección, el huésped puede tardar algún tiempo en producir anticuerpos neutralizantes altamente efectivos, pero estos persisten para proteger contra futuros encuentros con el agente (Payne, 2017).

Inmunización frente al VPPC

En la actualidad, las vacunas más utilizadas en diferentes programas de control de la PPC son las vacunas vivas atenuadas, provenientes del virus vacunal conocido como cepa China y cepa Thiverval. El plan de vacunación de Ecuador se emplea la cepa China lapinizada denominada cepa Suvac “C “y “K “. Tiene una rápida actividad protectora al inducir inmunidad, presenta interferencia viral con el virus patógeno (Hua ji, Rong, & Guang zhi, 2006).

Respuesta inmune de las células por VPPC

El VPPC se encuentra comúnmente en células T, células B y monocitos (Cai et al., 2017). La persistencia del VPPC en tejidos linfoides se considera la característica más significativa de la infección por PPC, que conduce a la condición de inmunosupresión adquirida y está asociada con la patogénesis del virus.

Según Summerfield & Ruggli, (2015) investigaron la participación de la inmunidad innata del huésped mediante la evaluación de la expresión de niveles muy altos de interferón (IFN) $-\alpha$ de tipo III y la activación de su señalización, así como la expresión de varios genes críticos estimulados por IFN después de la infección de células PK-15 y cerdos con la cepa Shimen de CSFV. Observaron que la infección por CSFV indujo la expresión de IFN de tipo III, además que provocó una regulación positiva de varios de estos genes críticos estimulados por IFN en células PK-15 y cerdos después de la infección. Estos datos indicaron que el CSFV puede activar

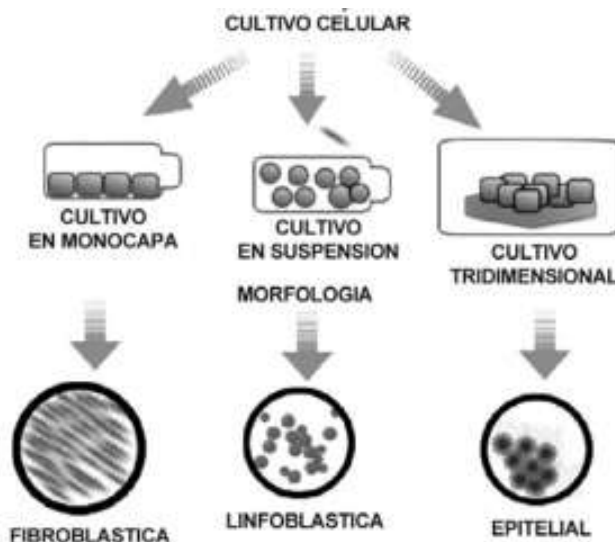
eficazmente el sistema inmunológico innato del huésped y por lo tanto, inicia una respuesta inmunitaria antiviral positiva tanto *in vitro* e *in vivo*.

Líneas Celulares

El cultivo primario consiste en la etapa después de que las células del tejido se aíslan y proliferan en las condiciones adecuadas hasta acabar todo el sustrato disponible en el frasco de cultivo hasta alcanzar una confluencia. Después de realizar el primer subcultivo, este cultivo primario se conoce como línea celular. Cabe mencionar que las líneas celulares tienen una vida útil limitada derivadas de cultivos primarios y a medida que se realizan más subcultivos, prevalecen las células con la mayor capacidad de crecimiento, es decir un resultado un grado de uniformidad fenotípica y genotípica en la población (Fay, 1967).

Figura 8

Tipo de crecimiento de los cultivos celulares de acuerdo a sus características del soporte y el origen celular.



Nota: El gráfico representa el tipo de crecimiento de los cultivos celulares de acuerdo a sus características del soporte y el origen celular. Tomado de *Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica* por Montalván & Ortega García, (2010).

Línea celular PK15

La línea celular de Riñón de Cerdo (PK-15) son células epiteliales de forma poligonal, sus propiedades de crecimiento son adherentes. Esta línea celular alberga un retrovirus de tipo C endógeno. Además las células son positivas para antígenos de circovirus porcino (PCV)(Gonzales Zapatero & Santiago Redel,1984).

Hipótesis

H1: La estandarización del ensayo de neutralización viral permite la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VPPC.

Ho: La estandarización del ensayo de neutralización viral no permite la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VPPC.

Capítulo III: Materiales y Métodos

Obtención de las muestras

Las muestras de sueros porcinos analizadas (n=30) proceden del banco de sueros del Laboratorio de Virología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario AGROCALIDAD, Tumbaco.

Evaluación de muestras de suero mediante ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA-I)

Mediante el Kit comercial ELISA PrioCHECK® CSFV se evaluó las muestras de suero empleando un AcM para medir la unión de los anticuerpos dirigidos contra la proteína E2 del VPPC. Primero se colocó 50 μ L de los controles positivos, negativos y las muestras, después se procedió a colocar en cada pocillo una dilución al 1:30 del conjugado (50 μ L). Luego se agregó el antígeno liofilizado con una dilución al 1:30 (50 μ L). La microplaca se incubó por 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la eliminación del contenido de la microplaca y se realizó 6 lavados con solución de lavado diluido 1/200 en agua destilada (200 μ L). Para evidenciar la unión del conjugado al complejo antígeno-anticuerpo, se añadió a todos los pocillos 100 μ L de la solución de sustrato. Después de 18 minutos de incubación a temperatura ambiente se agregó 100 μ L de una solución de frenado, luego se realizó con un lector ELISA, a una longitud de onda de 450 nm, lo que permite determinar la densidad óptica (DO) de la reacción colorimétrica.

Para la interpretación de los resultados se siguieron los criterios de validación del kit. Por lo tanto se obtuvo el valor promedio de DO de los duplicados tanto en las muestras como en los controles positivos y negativos. La DO corregida de todas las muestras se expresa como la

inhibición porcentual (IP) según la DO media corregida del suero del control negativo. Para la interpretación del resultado de cada muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IP} = 100 - \frac{\text{DO corregido de la muestra}}{\text{DO coreegida del conrol negativo}} * 100$$

Los valores de IP menores de 30% se consideraron negativos, en cambio los valores entre 30 y 40% se consideraron dudosos y los valores mayores de 50% se consideraron positivos.

Cultivo celular

Preparación de medio de crecimiento

Para el crecimiento de la línea celular PK-15 se utilizó el Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementada con suero fetal bovino al 10%. Para evitar la contaminación bacteriana y fúngica se colocó 50-100 UI/mL de penicilina, 50-100 ug/mL de estreptomycin, 50 ug/mL de Gentamicina y 0.25-2.5 ug/mL de Anfotericina B.

Descongelación

Se preparó el medio de crecimiento y se agregó 4 mL de medio de cultivo en un tubo cónico de 15 mL. A continuación, se sacó un criovial del contenedor de nitrógeno líquido y se colocó a 37 °C en baño maría, evitando que el agua llegue hasta la tapa a fin de evitar la posibilidad de contaminación. Una vez que el criovial se descongeló en la cabina de bioseguridad se transfirió el contenido del criovial al tubo cónico de 15 mL que contiene el medio de cultivo. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, a una temperatura de 24°C (aceleración=9; frenado=9). Después se desechó el medio sobrenadante que contiene el

crioprotector teniendo cuidado de no desechar el pellet formado y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo para dispersar las células. A continuación, se transfirió el contenido a un frasco de cultivo de 25 cm² que contenía medio de cultivo fresco. Por último, se tapó el frasco de cultivo y se incubó a 37°C y 5% CO₂.

Subcultivo celular

El seguimiento a las células PK-15 en cultivo se realizó con un microscopio invertido, utilizando un objetivo de 10X. Cuando las células llegaron a una confluencia entre 80-90% en el frasco de cultivo, fueron transferidas a nuevos frascos de cultivo con medio de crecimiento suplementado fresco.

Para realizar el subcultivo, primero se eliminó el medio de crecimiento del frasco. A continuación se realizaron lavados utilizando 5 mL de PBS 1X, precalentado a 37 °C en baño María. Posteriormente se procedió a despegar las células de la superficie de cultivo al colocar con 2.5 mL de tripsina 1X y se llevó a incubación a 37 °C durante 6 minutos. Transcurrido ese tiempo se observaron las células bajo el microscopio a fin de comprobar que las células se hayan despegado por completo y se realizó durante 2 min lavados para despegar todas las células del frasco. Para detener la reacción de la tripsina se añadió 2.5 mL de medio de cultivo y la suspensión fue llevada a centrifugación por 10 minutos a 2000 rpm. Por último, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo para su posterior conteo.

Conteo celular

Para el conteo celular se recolectó 10 μL a partir del pellet resuspendido en 1 mL de medio de crecimiento y se lo colocó en el hemocitómetro Neubauer. Para determinar la concentración celular se empleó la siguiente fórmula:

$$c = \frac{n \times 10e4}{c} \times F.D$$

c: es la concentración de células (células/mL)

n: es el número de células contadas

C: es el número de cuadros contados de (1-mm²)

F.D: Factor de dilución

Estimación de viabilidad

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

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células muertas} + \text{Células vivas}} \times 100$$

Congelación celular

Se observó mediante el microscopio invertido la apariencia morfológica de la línea celular asegurando una apariencia saludable para realizar el proceso de almacenamiento de la

línea celular. A continuación se realizó el levantamiento de las células y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos. Posteriormente se resuspendió 1.5×10^6 células /mL en medio de crecimiento y se diluyó las células en medio de congelación con 500 μ L de las células resuspendidas y 500 μ L con el 60% DMEM, 20% SFB y 20% Dimetilsulfóxido (DMSO). Por último, se trasladó los crioprotectores en hielo seco a congelación a -80°C antes de transferirlas al nitrógeno líquido.

Curva de crecimiento de la línea celular PK-15

Se realizó una curva de crecimiento con diferente número de células cultivadas en placas de 96 pocillos (12×10^3 , 15×10^3 , 18×10^3 células / pocillo), se sembraron las células para cada densidad celular ($n = 3$) y se procedió a levantar las mismas a diferentes intervalos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas) (Anexo 1).

Replicación del virus

La infección del virus de la línea celular se realizó al mezclar el virus semilla Alfort 187 (10^8 DICT₅₀/mL) en un frasco con células PK-15 en monocapa. Las células infectadas fueron creciendo en frascos de cultivos celulares e incubadas a 37°C y 5% CO_2 . Transcurridas las 72h post-infección las células fueron sometidas a tres ciclos sucesivos de congelación-descongelación de -80°C a 37°C y centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Por último el sobrenadante obtenido se pasó por un filtro de 0.5 μm a un criovial para posteriormente colocarlo a -80°C y lo restante fue recolectado para realizar una reinfección a otro subcultivo celular.

Titulación viral

A partir del sobrenadante filtrado, se obtuvo 1 mL de inóculo viral. Previamente se tuvo preparado 8 microtubos con 1800 μL de medio de crecimiento en cada microtubo. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 y en el primer microtubo se colocó 200 μL del inóculo viral. Después de homogenizar se extrajo 200 μL de contenido del primer microtubo, que posteriormente fueron transferidos al siguiente, y así sucesivamente. El siguiente paso fue colocar células PK-15 en suspensión con 100 μL de medio y 12×10^3 células por pocillo. Después se agregó 100 μL de las diluciones de los 8 microtubos en cada pocillo correspondiente. Se utilizó una placa de 96 pocillos para las diluciones realizadas con el virus (Anexo 2) y se trasladó el volumen de los microtubos a crioviales para llevarlos a congelación a -80°C . Por último se encontró el valor de dosis infectiva para el 50% del cultivo celular (DICT_{50}), por el método de Reed y Muench (1938).

Solución de trabajo

La solución de trabajo del virus se diluyó a un objetivo de $100\text{DICT}_{50}/50\mu\text{L}$. Primero se calculó el volumen total utilizado por placa para 50 μL tomando en cuenta las 100 dosis del virus por pocillo. A continuación se calculó el volumen a partir de la dilución de la titulación viral usando la siguiente formula:

$$\text{Volumen de la solución de trabajo} = \frac{\text{Dilución conocida} \times \text{volumen deseado}}{\text{Dilución de la dosis deseada}}$$

Neutralización ligado a peroxidasa (NPLA)

Los sueros fueron inactivados a $56^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos antes del ensayo de SNV. Primero se dispensó 90 μL medio DMEM suplementado para los pocillos de toxicidad y la

primera dilución 1:10 de las muestras de suero. Posteriormente se colocó 50 μ L de medio en los demás pocillos de la placa. El siguiente paso fue colocar 10 μ L de las muestras de suero en los pocillos correspondientes de toxicidad y en la primera dilución. A continuación se homogenizó las muestras de suero en los pocillos y se realizaron diluciones seriadas en base 2 extrayendo 50 μ L de contenido de la dilución 1:10, que fueron transferidos al siguiente pocillo, y así sucesivamente. Luego se agregó 50 μ L a cada pocillo de la solución de virus previamente preparado con 100 DICT₅₀/50 μ L y se incubó las placas a 5% CO₂ durante 1 hora a 37 ° C.

Previamente se preparó células PK-15 considerando que se coloca 12×10^3 células para un volumen de 50 μ L por pocillo. Por último, después de la colocación de las células se incubó a 37 ° C en 5% de CO₂ a 72h. En la prueba se incluyó un control celular, un suero de referencia positivo (título >1:10), un negativo a PPC (título <1:10) y se evaluó la toxicidad de los sueros (Anexo 3).

Fijación y tinción de las células con Inmunoperoxidasa Directa

Primero se descartó el medio de crecimiento en todos los pocillos y se lavó con 100 μ L de 0.15 M NaCl. A continuación se dejó fijar las células en una incubadora por 90 minutos a 80°C. Posterior se volvió a lavar con NaCl y se colocó 50 μ L del conjugado (PrioCON HRPO anti-CSFV 44.3) en toda la placa diluido 1/100 con 1x PBS+Tween80 y suero fetal equino. Se dejó a incubar durante 1 hora a 37°C.

Por último, se lavó con 100 μ L de 1X PBS+ Tween80 dos veces y se agregó 50 μ L del sustrato (AEC) por 45 min a 37°C.

Cálculo del título de anticuerpos neutralizantes

El título seroneutralizante se establece como la mayor dilución del suero que puede neutralizar el virus en el 50% de los pocillos. Para determinar el título final de anticuerpos neutralizantes se aplicó el método acumulativo Spaerman Karber (1931). Expuesto en la siguiente fórmula:

$$\text{Número de cavidades sin tinción} \times 0.5 \text{ (peso unitario de cada pocillo)} - 0.5 \text{ (título 50\%)} \times 0.3 \\ (\log_2) + 1 \text{ (Log de menor dilución de suero de la prueba).}$$

Control de dosis viral

Previamente se preparó una placa de 96 pocillos considerando que se coloca 100 µL de medio de crecimiento con 12×10^3 células por pocillo. Después se preparó 4 microtubos de ensayo con 450 µL de medio DMEM en cada uno. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 a partir del primer microtubo con 50 µL del inóculo viral, y después de homogenizar se extrajo 50 µL de contenido del primer microtubo que fue transferido al siguiente, y así sucesivamente. En el siguiente paso se colocó 100 µL de las diluciones de los 4 microtubos en cada pocillo correspondiente. (Anexo 4)

Después de las 72h post-infección se realizó la fijación y tinción con inmunoperoxidasa. El cálculo de dosis viral se realizó mediante Spaerman Karber (1931) con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de cavidades con tinción} \times 0.125 \text{ (Peso unitario de cada pocillo)} - 0.5 \text{ (título 50\%)} \times 0.3 \\ (\log_2)$$

Sensibilidad Analítica

Para determinar la sensibilidad analítica (Ase) se utilizó sueros (n=4) con títulos de anticuerpos 7.85 (\log_{10}). Primero se colocó 50 μ L de las muestras de suero por duplicado iniciando con una dilución 1:10 hasta una dilución final de 1:20480 del suero. Posteriormente se colocó 50 μ L del virus con 100 DICT₅₀/50 μ L y se incubó a 37 ° C en 5% de CO₂ por 1 hora.

A continuación se añadió 50 μ L de células PK-15 con 12×10^3 células para cada pocillo y se incubó a las mismas condiciones previamente descritas por 72 h. Por último se realizó la fijación y tinción mediante inmunoperoxidasa.

Especificidad Analítica

La especificidad analítica (ASp) es la capacidad de la prueba de distinguir el analito en cuestión de analitos no buscados que podrían estar rigurosamente relacionados con aquel (OIE, 2018). La ASp se clasifica en distintas formas de evaluación: selectividad, exclusividad e inclusividad.

Para determinar la ASp se utilizó un suero (n=1) de inclusividad positivo al Virus de Diarrea viral Bovina (VDVB) y sueros (n=3) de exclusividad positivos a Circovirus Porcino Tipo II (PCV2), virus de estomatitis vesicular (VEV) y Síndrome Reproductivo y Respiratorio del cerdo (PRRS).

Se colocó 50 μ L de las muestras de suero por duplicado con una dilución en base 2 iniciando 1:10. Posteriormente se agregó 50 μ L del virus con 100 DICT₅₀/50 μ L μ L y se incubó a 37 ° C en 5% de CO₂ por 1 hora. A continuación se añadió 50 μ L células PK-15 con 12×10^3 células para cada pocillo y se incubó bajo las mismas condiciones por 72h. Por último se realizó la fijación y tinción mediante inmunoperoxidasa para observar los resultados.

Diseño experimental

En la investigación para los factores de curva de crecimiento de la línea celular se utilizó un ANOVA multifactorial (AxB) con 4 niveles en el factor A (Tiempo), 3 niveles en el factor B (Densidad celular) con 8 repeticiones. Las variables evaluadas fueron el número de células y viabilidad celular. Se utilizaron los programas Statistica y Statgraphics versión 10.0.

En sensibilidad y especificidad analítica se realizó una estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa SPSS 20v.0. Por último los gráficos de titulación viral, los títulos de los anticuerpos neutralizantes y comparación entre NPLA vs Elisa se usó GraphPad versión 8.0.1

EL nivel de significancia elegido fue de 0.05.

Análisis funcional.

Para las variables, cuyos análisis de varianza resultaron significativos, se aplicó la prueba de significancia de Tukey al 5 %.

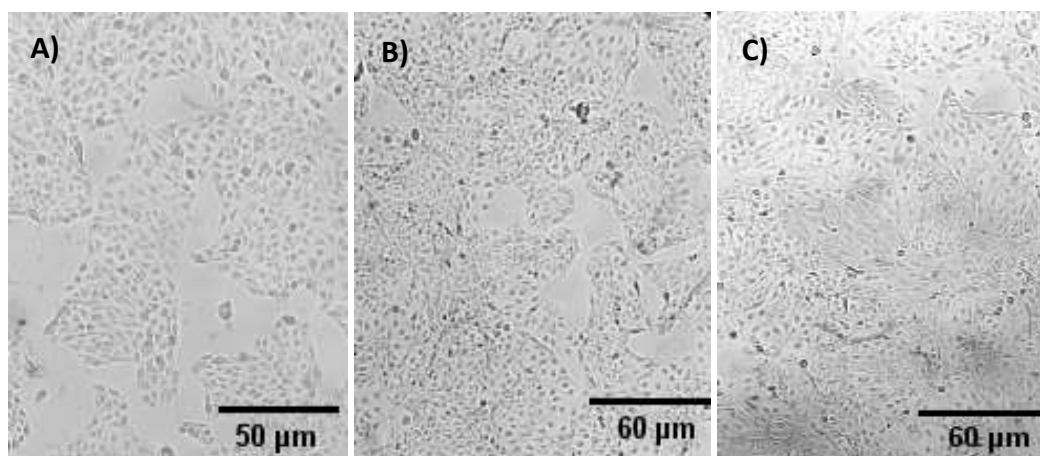
Capítulo IV: Resultados y Discusión

Crecimiento de la línea celular PK-15

La línea celular de Riñón de Cerdo (PK-15), fue cultivada bajo condiciones asépticas en el laboratorio manteniendo los cultivos libres de agentes contaminantes. Las células se observaron mediante microscopia óptica con el objetivo (10X), presentando una morfología epitelial de forma poligonal después de 24 horas, 48 horas y 72 horas en cultivo, evidenciándose un incremento de densidad celular. Figura 9

Figura 9

Línea celular PK-15



Nota. Células observadas con microscopio óptico invertido a 10X. **A)** células después 24 horas de incubación. **B)** células después 48 horas de incubación. **C)** células después 72 horas de incubación.

La morfología de células concuerdan con la investigación de Yin et al., (2020). Las células PK-15 son células epiteliales y según Schueren & Cassiman (1979), las células epiteliales tienden

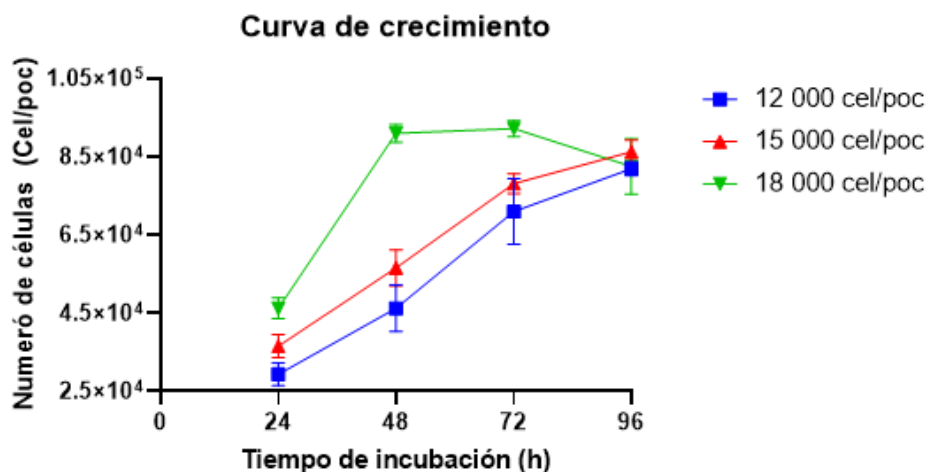
a agruparse en láminas de células de forma poligonal fuertemente adheridas. El tamaño de las células concuerda con el tamaño (μm) descrito por la casa comercial CLS (Cell Lines Service).

Curva de crecimiento

Con los datos de número de células y viabilidad celular obtenidos del conteo celular se elaboraron curvas de crecimiento considerando el tiempo de incubación y la densidad celular inicial.

Figura 10

Gráfico de la densidad celular respecto al tiempo de incubación

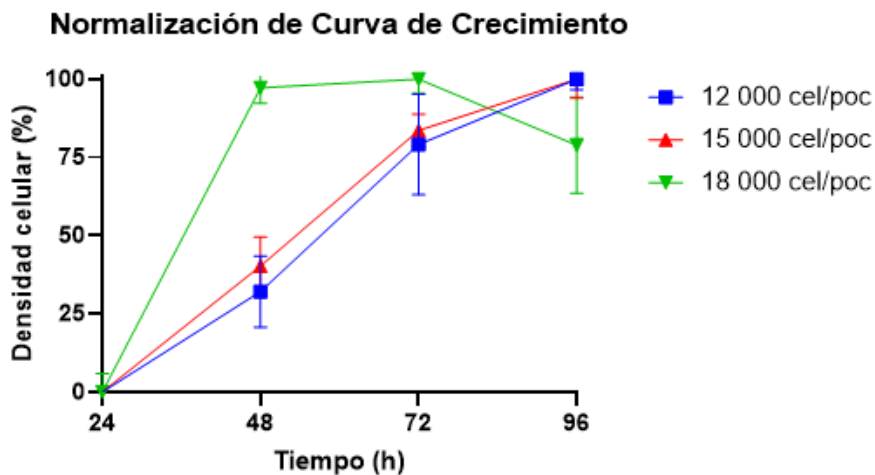


Nota: En el gráfico se muestra la desviación estándar del número de células medida para cada intervalo de tiempo.

Se normalizó la curva de crecimiento transformando la escala en porcentaje la distribución del número de células para comparar respecto al tiempo y observar que densidad inicial óptima se encuentra en fase exponencial dentro de los intervalos de tiempo.

Figura 11

Gráfico de normalización de la curva de crecimiento



Se observa que las curvas de crecimiento de las densidades iniciales de 12×10^3 célula/pocillo y 15×10^3 células/pocillo se encuentran todavía en fase exponencial a las 96 horas mientras que la de 18×10^3 células/pocillo se encuentran en fase de muerte.

Tabla 2

Análisis de Varianza para el número de células/pocillo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo (Horas)	3,227E10	3	1,07567E10	245,80	0,0000
B:Densidad celular	6,18398E9	2	3,09199E9	70,66	0,0000
C:Replicas	1,04622E8	7	1,49461E7	0,34	0,9323
INTERACCIONES					
AB	3,47904E9	6	5,79839E8	13,25	0,0000
RESIDUOS	3,3696E9	77	4,3761E7		
TOTAL (CORREGIDO)	4,54072E10	95			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Respecto al número de células, los resultados del ANOVA (Tabla 2) muestran diferencia significativa para los factores de tiempo de incubación, densidad celular inicial y su interacción, por lo que se concluye que influyen en la densidad celular. No se encontró diferencia significativa en replicas por lo que se concluye que existe normalidad en los datos de la curva de crecimiento.

Con la prueba de separación de medias se determinó un incremento del número de células llegando a su máximo a las 72 horas de incubación, pues no existió diferencia significativa respecto a las 96 horas. Tabla 3

Tabla 3

Resultados del Análisis Tukey ($P > 0,05$) respecto al tiempo de incubación para el número de células.

<i>A</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
24	24	37395,8	1350,32	A
48	24	62708,3	1350,32	B
72	24	80416,7	1350,32	C
96	24	83541,7	1350,32	C

Considerando la densidad celular inicial, existe un mayor número de células al emplear una densidad inicial de 18×10^3 células/pocillo, incrementándose el número de células junto con la densidad inicial.

Tabla 4

Resultados del Análisis Tukey ($P>0,05$) para el Factor B de la variable de número de células/pocillo.

<i>B</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
12000	32	57109,4	1169,41	A
15000	32	64375,0	1169,41	B
18000	32	76562,5	1169,41	C

Considerando ambos factores se determinó que el mayor número de células se obtiene aplicando una densidad inicial de 18×10^3 células/pocillo con un tiempo de incubación de 48, 72 o 96 horas, y con una densidad inicial de 15×10^3 células/pocillo a las 96 horas de incubación.

Tabla 5

Resultados del Análisis Tukey ($P>0,05$) para Número de células por Densidad celular y Tiempo de la variable de número de células/pocillo.

<i>A</i>	<i>B</i>	<i>Media LS</i>	<i>Casos</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
24	12000	29375,00	8	2338,83	A
24	15000	36562,50	8	2338,83	A
24	18000	46250,00	8	2338,83	B
48	12000	46250,00	8	2338,83	B C
48	15000	56562,50	8	2338,83	B C
72	12000	70937,50	8	2338,83	C
72	15000	78125,00	8	2338,83	D
96	12000	81875,00	8	2338,83	D E
96	18000	82500,00	8	2338,83	D E F
48	18000	85312,50	8	2338,83	E F
96	15000	86250,00	8	2338,83	E F
72	18000	92187,50	8	2338,83	F

Respecto a la viabilidad celular, los resultados del ANOVA (Tabla 6) no muestran diferencia significativa en los factores de tiempo de incubación, densidad celular inicial y su interacción, por lo que se concluye que los factores de estudio no influyen en la viabilidad celular. De igual forma con respecto a replicas se concluye que existe normalidad en los datos de la curva de crecimiento.

Tabla 6

Análisis de Varianza para el % viabilidad celular

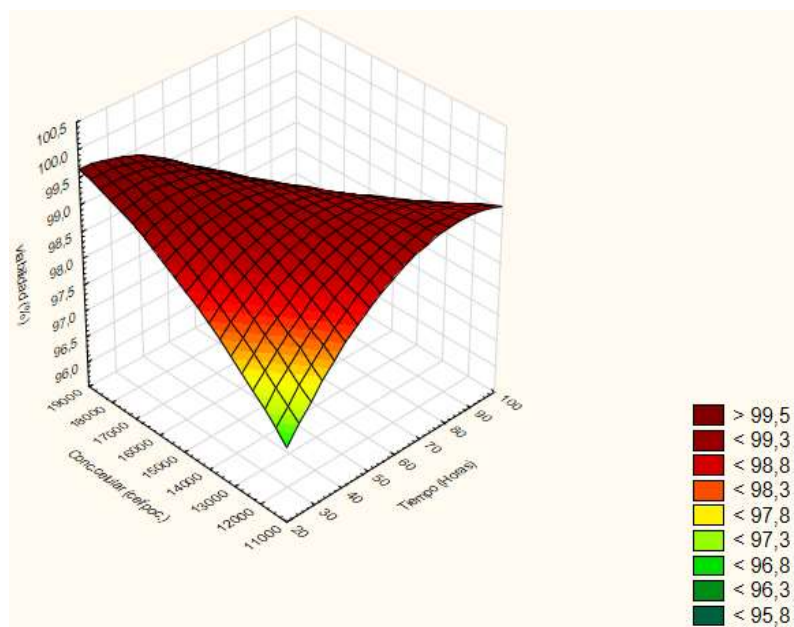
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo (Horas)	11,3479	3	11,3479	1,25	0,2966
B:Densidad celular	0,0461521	2	0,023076	0,00	0,9975
C:Replicas	59,0269	7	8,43241	0,93	0,4878
INTERACCIONES					
AB	39,4998	6	6,58331	0,73	0,6294
RESIDUOS	697,513	77	9,05861		
TOTAL (CORREGIDO)	830,13	95			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En vista a que no se pudo encontrar diferencia significativa en viabilidad celular mediante el ANOVA, se procedió a realizar un gráfico de superficie de respuesta para obtener más información acerca de cómo interactúa la densidad celular inicial y tiempo de incubación en función a la viabilidad celular.

Figura 12

Gráfico de superficie de respuesta.



Nota: Densidad celular inicial (Eje Y) con el tiempo (Eje X) y la viabilidad (Eje Z)

La interpretación del gráfico (Figura 12) demuestra que a una menor concentración celular inicial junto a un menor tiempo de crecimiento se obtiene viabilidades menores, de la misma forma que a mayores concentraciones celulares iniciales y mayores tiempos de crecimiento celular.

La viabilidad celular depende de algunos factores a considerar entre ellos, el agotamiento de nutrientes del medio y la cantidad de células presentes del medio debido a que cuando las células ya no son necesarias, se suicidan activando un programa de muerte intracelular, conocido como muerte celular programada (Alberts et al., 2002). Por lo tanto al inocular una densidad celular a largos periodos de incubación la viabilidad celular si va a ser afectada, no obstante los tiempos utilizados o la cantidad de densidad empleadas inicialmente en el estudio no llegan a ser significativos. Considerando que la línea celular PK-15 carece de inhibición por contacto, es el término utilizado para describir la detención abrupta del ciclo

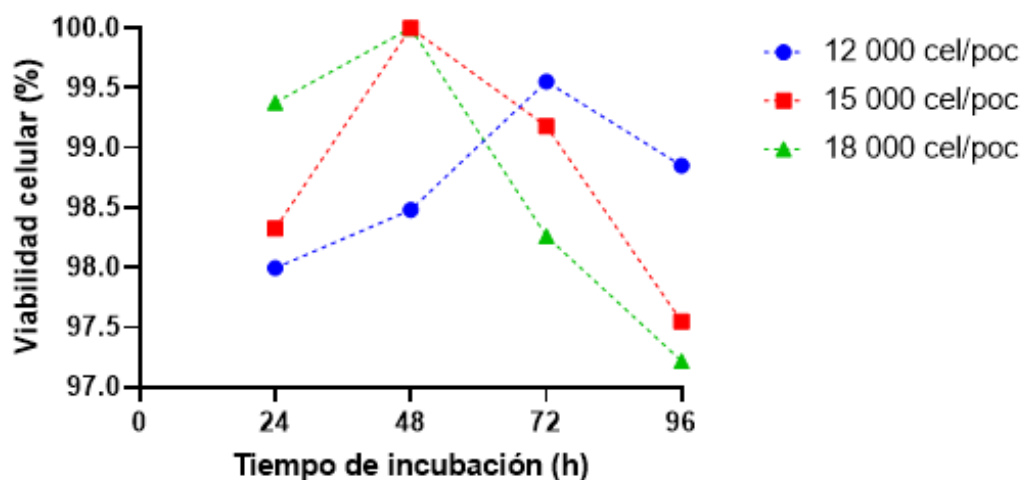
celular que se produce en cultivos de células epiteliales que proliferan rápidamente en el momento en que se forma una monocapa confluyente (Kramer, Gomperts, & Tatham, 2009), en la fase de confluencia pueden aparecer capas de células superpuestas aun viables.

Por lo que realizo realizó una gráfica demostrando el porcentaje de viabilidad celular tomando en cuenta las densidades iniciales empleadas en el estudio. Figura 13

Considerando los resultados anteriores, en la normalización de la curva de crecimiento indica que dentro de las 48 horas a 96 horas tiempo de incubación se encuentran las células en fase exponencial y según Stanbury, Whitaker, & Hall (2017), la tasa máxima de crecimiento de las células se encuentra en la fase exponencial, por ende son más viables.

Figura 13

Gráfico del % de viabilidad respecto al tiempo de incubación.



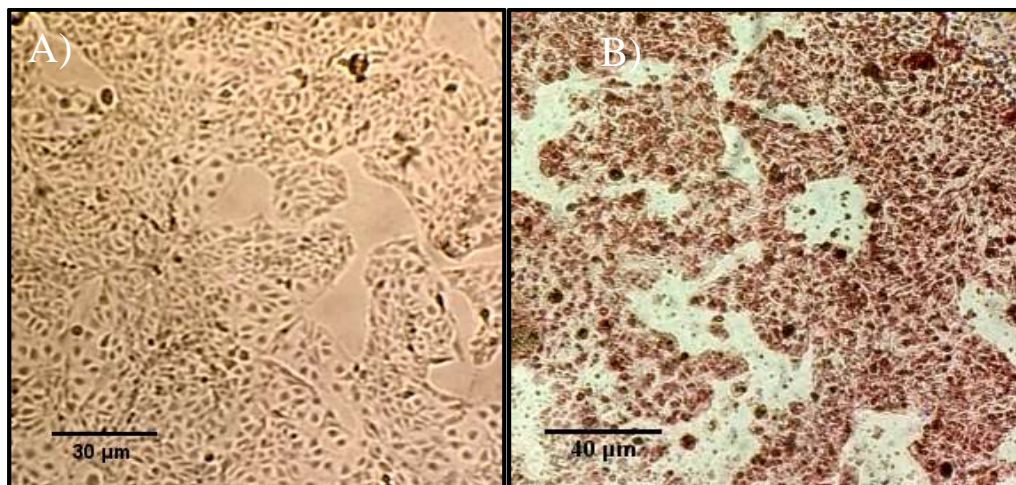
Con respecto a los resultados de separación de medias de la interacción de densidad inicial y tiempo de incubación en función de número de células, recomienda emplear una densidad inicial de 18×10^3 células/pocillo con un tiempo de incubación entre 48, 72 o 96 horas para una mayor cantidad celular, no obstante no significa que entre mayor cantidad celular sea los más óptimo debido a que existen otros factores a considerar como viabilidad celular para la obtención de una densidad inicial viable para los ensayos. Por lo tanto comparando las densidades iniciales con el porcentaje de viabilidad se puede emplear 15×10^3 células/pocillo o 18×10^3 células/pocillo hasta 48 horas de incubación. Para los ensayos se determinó emplear 12×10^3 células/pocillo debido que se encuentra dentro de la fase exponencial a las 72 horas y existe un alto porcentaje de viabilidad. A demás en otras investigaciones como Zhou N. (2015) y Zhu et al. (2019), para replicación de la línea celular PK-15 con el virus de PPC utilizaron 1×10^4 células/pocillo al igual OIE (2019) para los ensayos NPLA, densidad celular similar empleada para los ensayos.

Inoculación del VPPC en la línea celular PK-15

Se comprobó la infección del virus a la línea celular a las 72 horas realizando una tinción con inmunoperoxidasa directa y visualizando con un microscopio invertido. Las células observadas presentaron un color rojizo en el citoplasma.

Figura 14

Cultivo celular de la línea PK-15



Nota. Observación realizada con objetivo 10x de las células preformadas PK-15 **(A)** Células sin el virus a las 72 horas **(B)** células infectadas con el virus a las 72 horas.

Este color rojizo se debe a la replicación del virus tiene lugar en el citoplasma después de la endocitosis mediada por receptores (Gray & Nettleton, 1987). El virus de PPC no produce un efecto citopático en el cultivo celular PK-15 por lo tanto, se detecta por un sistema indicador de marcado inmunológico mediante un conjugado de peroxidasa para observar la replicación de virus (Jensen, 1981). Los resultados concuerdan con la investigación de Yin et al., (2020) empleando inmunoperoxida en células PK-15 con la cepa VPPC (SD19-15, subgenotipo 2.1b) y con la investigación de Relova et al., (2017), empleando la línea celular SK6 con la cepa Margarita.

Titulo viral

Se realizaron cuatro subcultivos de células PK-15 con el virus para aumentar la concentración viral. La dosis infectiva del virus se calculó mediante el método Reed y Muench,

obteniéndose un título viral de $10^{8.26}$ DICT₅₀/mL. En la Tabla 8, se observan las diluciones realizadas a partir de este stock inicial del virus. El cálculo para obtener 100DICT₅₀/50μL con las diluciones empleadas 1:10 y 1:100 se observa en el Anexo 5.

Tabla 7

Dosis infectiva de los stocks virales.

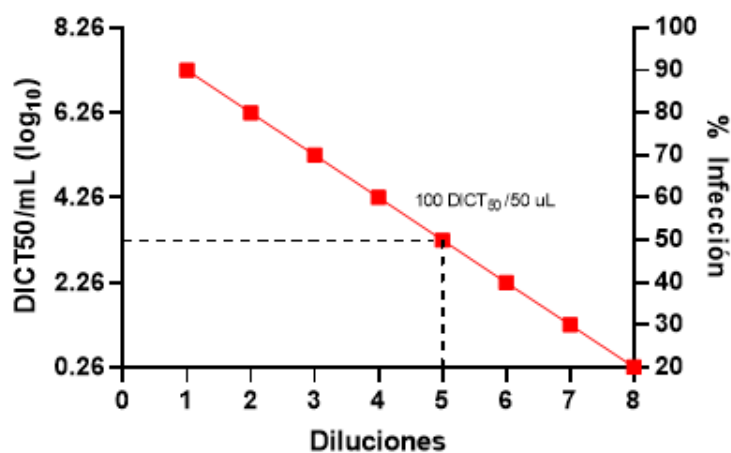
No° Diluciones	Título (DICT ₅₀ /mL)	Dilución	DICT ₅₀
stock viral	10^{8,26}	1	181970085,86
1	10 ^{7,26}	1:10	18197008,59
2	10 ^{6,26}	1:100	1819700,86
3	10 ^{5,26}	1:1000	181970,09
4	10 ^{4,26}	1:10000	18197,01
5	10 ^{3,26}	1:100000	1819,70
6	10 ^{2,26}	1:1000000	181,97
7	10 ^{1,26}	1:10000000	18,20
8	10 ^{0,26}	1:1000000000	1,82

El título viral obtenido de $10^{8.26}$ DICT₅₀/mL se debe a que se realizó cuatro subcultivos celulares seguidos con la cepa de referencia Alfort187 con un título inicial de 10^8 DICT₅₀ /mL. En base al resultado se comparó con otras investigaciones, según Ganges & Barrera (2007), después de realizar 11 subcultivos en células PK-15 y dos subcultivos en células SK6 con el VPPC cepa Alfort 187 obtuvieron un título de $10^{6.9}$ DICT₅₀ /mL. En otra investigación de Zayas, Yen, & Odio, (2019) demostraron sus resultados a las 4 subcultivos post-infección de células PK-15 con virus de la cepa C, lograron obtener 10^2 DICT₅₀ / mL y 10^6 DICT₅₀ /mL en el subcultivo número 23. En cambio en la investigación de Zhou et al., (2015) emplearon una cepa atenuada lapinizada china del virus de la PPC (cepa HCLV, 10^4 DICT₅₀/0.1mL) obteniendo en el subcultivo número 6 un título de 10^2 DICT₅₀ / 0.1 mL y en el subcultivo número 22 un total de 10^4 DICT₅₀ / 0.1 mL.

El título viral producido por la replicación y propagación de VPPC en líneas celulares cultivadas *in vitro* suele ser bajo como se observó en los resultados de las otras investigaciones, al menos que se realice subcultivos con una cepa de referencia de un título alto (Yin et al.,2020), como se lo realizó en esta investigación.

Figura 15

Diluciones de los stocks virales para la dosis infectiva.



Con los datos obtenidos de la Tabla 7, se graficó el límite de la dilución que se debe tomar para infectar el 50% de los cultivos. En este caso es hasta la dilución 10^{-5} para alcanzar al objetivo de 100 DICT₅₀ por 50 μ L. Se puede observar que entre mayor sea la dilución del virus la dosis infectiva disminuye.

Detección de anticuerpos neutralizantes

Se realizó la prueba de NPLA con una dilución inicial de suero 1:10 para todas las muestras. Se utilizaron dos diluciones diferentes de los stocks virales con 100 DICT₅₀/50 μ L. Para el stock viral de 10^{-1} se diluyó 0.48 μ L del virus en 4400 μ L de medio de crecimiento, mientras

que para el stock viral de 10^{-2} se diluyó 4.82 μL de virus con 4395 μL del medio. Los resultados obtenidos de anticuerpos neutralizantes se muestran en la Figura 16.

Tabla 8

Resumen de los resultado de anticuerpos neutralizantes por NPLA

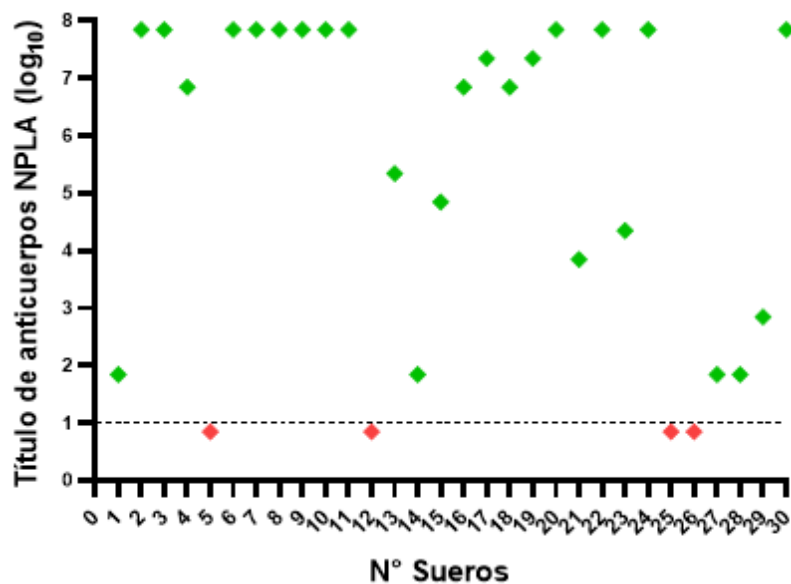
Título de anticuerpos neutralizantes (\log_{10})	Cepa Alfort 187-VPPC	
	Total	%
Sueros con títulos <1	4	13,33
Sueros con títulos Entre 1 y 2.85	4	13,33
Sueros con títulos >2.85	22	73,33
Total	30	100

Nota: Los sueros con títulos <1 se consideran negativos.

El índice de neutralización (IN) es el \log_{10} del factor de dilución del anticuerpo (recíproco de la dilución) cuando el 50% de los pocillos están protegidos de la infección (N. Chen et al., 2010a). Dado que el factor de dilución inicial fue 10 (Dilución inicial recomendada por la OIE), el valor de IN de 1 es el umbral de detección de nuestro ensayo de neutralización, por lo tanto los índices de neutralización por debajo de este se consideran negativos. El IN de basa en la dilución inicial y esto concuerda con la investigación de Chen et al.(2010a), emplearon una dilucion inicial de 50 dando su valor umbral 1.7 del NI en su ensayo de neutralización de diferentes cepas de PPC por sueros anti-PPC de cerdo.

Figura 16

Resultados de anticuerpos neutralizantes mediante NPLA



Nota: El índice de neutralización es 1 (\log_{10}), representa la línea entrecortada. Las figuras de color rojo representan los sueros negativos y de color verde los positivos.

Respecto a los resultados obtenidos, los títulos de anticuerpos mayores a una dilución 1:10 se consideran animales protegidos, los títulos de neutralización sobre 1:50 indican un grado alto de protección a los animales (Bouma, Smit, Kluijver, Terpstra, & Moormann, 1999). Es por esa razón que inician con esa dilución para evaluar las vacunas basadas en la subunidad E2 Jelsma et al. (2021). Los animales con títulos de anticuerpos neutralizantes mayores a una dilución 1:100 se consideran altos (Pérez et al., 2012). Existieron títulos de anticuerpos entre un rango de 1.85 a 7.85 (\log_{10}), superiores a los reportados de Terpstra, Bloemraad, & Gielkens (1984b), entre 1.3 a 3.7 (\log_{10}) para la detección de anticuerpos de animales no vacunados. La diferencia de los resultados varía en las dosis infectivas empleadas debido a que en sus ensayos

emplearon 200 DICT₅₀/50 µL, mayor a la dosis utilizada en la investigación de 31.62 y 42.16 DICT₅₀/50 µL según el control de dosis viral.

Para contrastar los resultados obtenidos del ensayo de NPLA se realizó una prueba ELISA para detección de anticuerpos a los mismos sueros.

Tabla 9

Resumen de resultados del ELISA

% IP	PrioCHECK®Ab	
	Total	%
Sueros <30	5	16,67
Sueros entre >30 y <50	1	3,33
Sueros >50	24	80,00
Total	30	100

Nota: Los sueros <30 se consideran negativos, entre 30 y <50 sospechosos, >50 positivos.

En el análisis de los resultados obtenidos con las dos pruebas diagnósticas utilizadas, se establecieron dos categorías de muestras, positivas o negativas respecto a la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes frente al virus PPC. Mediante la técnica de NPLA se detectó 26 sueros positivos del total de 30 sueros, lo que representa un 88,6% y por la técnica de ELISA, detectó 20 muestras como positivas, lo que corresponde al 66,6% de las muestras estudiadas. Figura 17

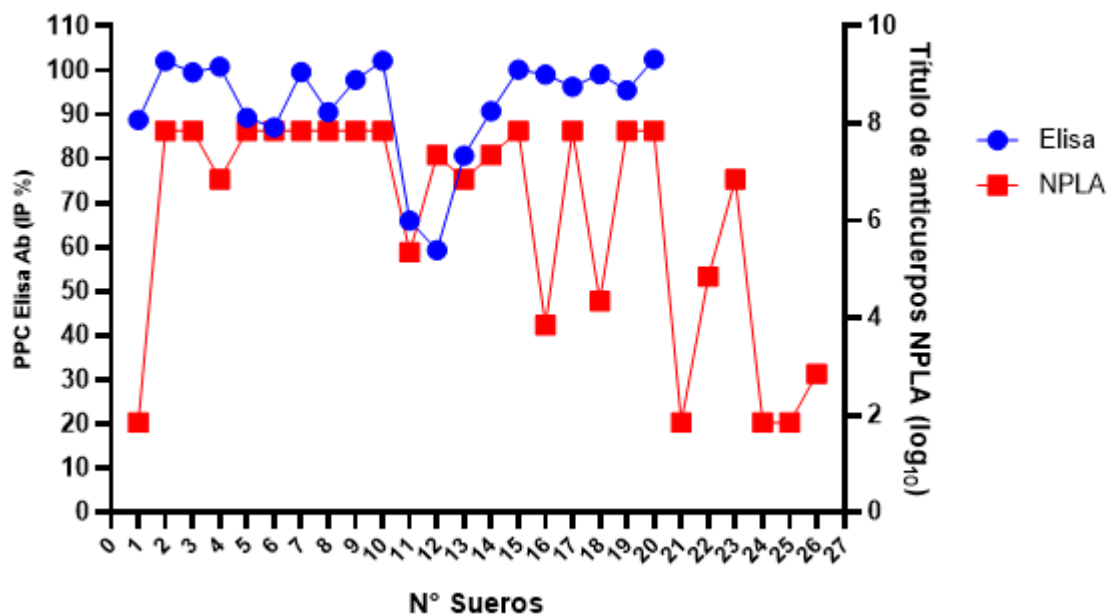
Tabla 10

Resumen de resultados de Elisa y NPLA

	PrioCHECK®Ab	%	NPLA	%
Positivos	20	66,66	26	86,66
negativos	10	33,33	4	13,33
Total	30	100	30	100

Figura 17

Resultados de anticuerpos neutralizantes de ELISA y NPLA



Nota: Títulos de anticuerpos positivos contra el VPPC se midieron por valor de IP ($\geq 50\%$ positivo) usando el ELISA PPC Ab y títulos (\log_{10}), mediante el ensayo de NPLA

Al comparar los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos de cada suero empleando NPLA y ELISA se puede observar que algunos sueros presentan títulos inferiores positivos a NPLA, que el ensayo ELISA los considera negativos. Esto es debido a que los sueros presentan un porcentaje bajo de IP o sospechosos en el ensayo ELISA, mientras el ensayo de NPLA por ser una prueba altamente sensible y específica para la detección de anticuerpos neutralizantes (Gauger & Vincent, 2020), los considera como positivos. Es la prueba estándar de oro para el diagnóstico de PPC en caso de las serológicas (Holinka et al., 2014) y es la técnica recomendada por la OIE (2019). Los sueros negativos por NPLA pertenecen al mismo grupo de

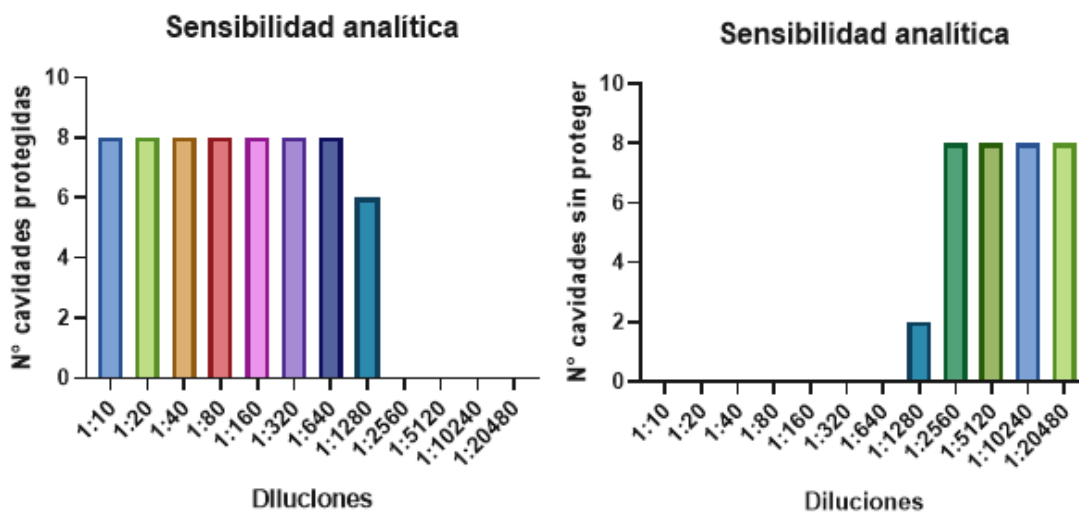
negativos por ELISA. Estos resultados tienen similitud con un estudio de (Colijn, M, & G, 1997) compararon Ceditest[®] ELISA para PPC E2 con NPLA.

Sensibilidad y especificidad analítica

Los resultados de sensibilidad analítica la prueba NPLA neutralizó el virus en todas las cavidades hasta la dilución 1:640, mientras que en la dilución 1:1280 neutralizó solo 6 cavidades y a partir de la dilución 1:2560 no existió neutralización.

Figura 18

Gráficos de los resultados de sensibilidad analítica.

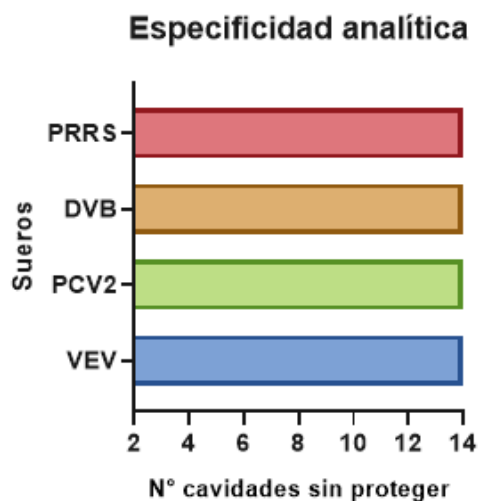


La sensibilidad analítica se calculó según el límite de detección inferior de anticuerpos neutralizantes de la prueba. El test Kruskal-Wallis determinó que la distribución de las cavidades no protegidas, no es la misma entre las diferentes diluciones, por lo tanto si influyen las diluciones del suero con la capacidad de neutralizar el virus. Según la prueba Post-hoc empleada la dilución 1:1280 se encuentra agrupada junto a las diluciones con cavidades protegidas, por lo

que la mayor sensibilidad se obtiene hasta esa dilución. Los resultados de los sueros con títulos de 7.85 (\log_{10}) son capaces de neutralizar el virus hasta una dilución 1:1280.

Figura 19

Resultados de las cavidades sin protección de especificidad analítica.



En los resultados de especificidad analítica, la prueba de NPLA no neutralizó el virus en ninguna cavidad de los anticuerpos de las diferentes enfermedades. Todas las enfermedades son excluyentes debido a que los virus pertenecen a diferentes familias a excepción de DVB que conforman el mismo género *Pestivirus*, de la familia *Flaviviridae* (Pearson, 1992). Por la estrecha relación antigénica entre los VPPC y DVB podría existir una reactividad cruzada (Islas et al., 1997). No obstante, para diferenciar los *Pestivirus* se utilizan anticuerpos monoclonales.

Control de dosis viral

Tabla 11

Resumen del control de dosis infectiva

Dilución Viral	Número de cavidades no protegidas	Dosis calculada (log₁₀)	Anti log DICT₅₀/cavidad
1	16	1.50	31.62
2	17	1.62	42.16

El control de dosis infectiva se realizó a las diluciones virales empleadas. Según la OIE (2019), los ensayos de NPLA deben contener 100 DICT₅₀ para el 50% del cultivo celular. Sin embargo se acepta una dilución entre 30 a 300 dosis infectivas. Los resultados obtenidos están dentro del rango de aceptación.

Capítulo V: Conclusiones

El protocolo establecido durante la investigación permitió un óptimo crecimiento y proliferación de la línea celular PK-15.

Se obtuvieron curvas de crecimiento del número total de células y viabilidad celular de las diferentes densidades iniciales que permitieron determinar la fase exponencial para la inoculación del virus de Peste Porcina Clásica.

El virus de Peste Porcina Clásica no genera efecto citopático, por lo tanto mediante un microscopio invertido se debe observar en el citoplasma la presencia o ausencia de virus con un marcador inmunológico.

La densidad celular empleada para los ensayos fue de 12×10^3 células/pocillo, además se determinó que después de la inoculación del virus de Peste Porcina Clásica con células en suspensión, se debe realizar la fijación y tinción con inmunoperoxidasa a las 72 horas.

El título viral mediante el método de Reed y Muench después de 4 subcultivos fue de $10^{8.26}$ DICT₅₀/mL.

Mediante en el ensayo de NPLA se detectó títulos de anticuerpos neutralizantes altos entre 1.8 y 7.85 (\log_{10}). El ensayo obtuvo mayor porcentaje de sueros positivos comparación al enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA) debido que el ensayo NPLA es más sensible y específica a pruebas serológicas.

En sensibilidad analítica se determinó que los sueros con títulos de 7.85 (\log_{10}) son capaces de neutralizar el virus hasta una dilución 1:1280.

En especificidad analítica se determinó que el ensayo de NPLA para la detección contra el VPPC es muy específica.

La dosis infectiva para el 50% de los cultivos celulares utilizada en los ensayos fue baja en comparación a la dosis recomendada, pero está dentro del rango de aceptación por la OIE.

La estandarización del ensayo de neutralización viral permite la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus de Peste Porcina Clásica.

Capítulo VI: Recomendaciones

Se recomienda realizar el mismo estudio con animales que estén vacunados contra a cepa C en Ecuador, para determinar el título de anticuerpos neutralizantes y comparar con los resultados de animales no vacunados obtenidos en la investigación.

Realizar más estudios para la obtención y estabilidad del virus para su almacenamiento.

Filtrar el virus después del proceso de congelación-descongelación para descartar desechos, toxinas o células muertas.

Capítulo VII: Bibliografía

- Agrocalidad. (2012). *PROYECTO DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE PESTE PORCINA CLÁSICA POR ZONIFICACIÓN*. Retrieved from <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/d1.pdf>
- AGROCALIDAD. (2019). PESTE PORCINA CLASICA, 1–48.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Programmed Cell Death (Apoptosis). *Pudmed*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873/>
- Blome, S., Staubach, C., Henke, J., Carlson, J., & Beer, M. (2017a). Classical Swine Fever—An Updated Review. *Viruses 2017, Vol. 9, Page 86, 9(4)*, 86. <https://doi.org/10.3390/V9040086>
- Blome, S., Staubach, C., Henke, J., Carlson, J., & Beer, M. (2017b). Classical Swine Fever—An Updated Review. *Viruses*, 9(4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/V9040086>
- Blome, S., Staubach, C., Henke, J., Carlson, J., & Beer, M. (2017c, April 21). Classical swine fever— an updated review. *Viruses*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v9040086>
- Borca, M. V., Holinka, L. G., Ramirez-Medina, E., Risatti, G. R., Vuono, E. A., Berggren, K. A., & Gladue, D. P. (2019). Identification of structural glycoprotein E2 domain critical to mediate replication of Classical Swine Fever Virus in SK6 cells. *Virology*, 526, 38–44. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2018.10.004>
- Bouma, A., Smit, A., Kluijver, E., Terpstra, C., & Moormann, R. (1999). Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, 66(2), 101–114. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00003-6)
- Cai, B., Bai, Q., Chi, X., Goraya, M. U., Wang, L., Wang, S., ... Chen, J.-L. (2017). Infection with

- Classical Swine Fever Virus Induces Expression of Type III Interferons and Activates Innate Immune Signaling. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC).
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02558>
- Chen, L., Xia, Y., Pan, Z., & Zhang, C. (2007). Expression and functional characterization of classical swine fever virus E(rns) protein. *Protein Expression and Purification*, 55(2), 379–387.
<https://doi.org/10.1016/J.PEP.2007.05.003>
- Chen, N., Tong, C., Li, D., Wan, J., Yuan, X., Li, X., ... Fang, W. (2010a). Antigenic analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein using pig antibodies identifies residues contributing to antigenic variation of the vaccine C-strain and group 2 strains circulating in China. *Virology Journal* 2010 7:1, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-378>
- Chen, N., Tong, C., Li, D., Wan, J., Yuan, X., Li, X., ... Fang, W. (2010b). Antigenic analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein using pig antibodies identifies residues contributing to antigenic variation of the vaccine C-strain and group 2 strains circulating in China. *Virology Journal*, 7, 378. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-378>
- Colijn, E., M, B., & G, W. (1997). An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, 59(1), 15–25.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00178-8)
- Donis, R. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 11(3), 393–423.
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30459-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30459-X)
- Edwards, S., Fukusho, A., Lefèvre, P. C., Lipowski, A., Pejsak, Z., Roehe, P., & Westergaard, J. (2000). Classical swine fever: The global situation. *Veterinary Microbiology*, 73(2–3), 103–

119. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00138-3)

Fay, D. L. (1967). Culture of animal cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.

Ferrer, E., Fonseca, O., Percedo, M., & Abeledo, M. (2010). Classical Swine Fever in the Americas and the Caribbean: Present Situation and Prospects for Control and Eradication. *Revista de Salud Animal*, 32(1), 11–21.

Gonzales Zapatero, A., & Santiago Redel, E. (1984). Crecimiento celular de cultivos PK-15 inoculados con la cepa Aranjuez del virus de la enfermedad de New-Castle (NDV), X, 1–6. Retrieved from [https://digital.csic.es/bitstream/10261/84828/1/Crecimiento celular de cultivos PK-15 inoculados con la cepa Aranjuez del virus de la enfermedad de Newcastle %28NDV%29.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/84828/1/Crecimiento%20celular%20de%20cultivos%20PK-15%20inoculados%20con%20la%20cepa%20Aranjuez%20del%20virus%20de%20la%20enfermedad%20de%20Newcastle%20NDV.pdf)

Gray, E., & Nettleton, P. (1987). The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *The Journal of General Virology*, 68 (Pt 9), 2339–2346. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-9-2339>

Hua ji, Q., Rong, S., & Guang zhi, T. (2006). The Lapinized Chinese Strain Vaccine Against Classical Swine Fever Virus: A Retrospective Review Spanning Half A Century. *Agricultural Sciences in China*, 5(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(06\)60013-8](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(06)60013-8)

Iqbal, M., Flick-Smith, H., & JW, M. (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 2), 451–459. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-451>

Islas, A., Quinteros, G., FLORES, M., QUEZADA, M., DIAZ, N., & SIERRA, M. (1997). Detección de anticuerpos contra el virus de la peste porcina clásica mediante la prueba inmunoenzimática

- (CIV-ELISA) y seroneutralización. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 29(2), 213–220.
<https://doi.org/10.4067/S0301-732X1997000200006>
- Jelsma, T., Post, J., Born, E. van den, Segers, R., & Kortekaas, J. (2021). Assessing the Protective Dose of a Candidate DIVA Vaccine against Classical Swine Fever. *Vaccines* 2021, Vol. 9, Page 483, 9(5), 483. <https://doi.org/10.3390/VACCINES9050483>
- Jensen, M. H. (1981). Detection of Antibodies Against Hog Cholera Virus and Bovine Viral Diarrhea Virus in Porcine Serum. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1981 22:1, 22(1), 85–98.
<https://doi.org/10.1186/BF03547210>
- Ji, W., Guo, Z., Ding, N.-Z., & Cheng-Qiang He, . (2015). Studying classical swine fever virus: Making the best of a bad virus. *Virus Research*, 197, 35–47.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.006>
- Kramer, I., Gomperts, B., & Tatham, P. (2009). Signal Transduction. *Signal Transduction*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369441-6.X0001-3>
- Krey, T., Thiel, H.-J., & Rüménapf, T. (2005). Acid-Resistant Bovine Pestivirus Requires Activation for pH-Triggered Fusion during Entry. *Journal of Virology*, 79(7), 4191.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4191-4200.2005>
- Lackner, T., Thiel, H., & Tautz, N. (2006). Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1510–1515.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0508247103>
- Li, Y. C., Chiou, M. T., & Lin, C. N. (2020). Serodynamic analysis of the piglets born from sows vaccinated with modified live vaccine or e2 subunit vaccine for classical swine fever.

Pathogens, 9(6), 427. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060427>

Lindenbach, B. D., Thiel, H.-J., & Rice, C. M. (2006). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication, 1–52.

Meyers, G., Rümenapf, T., & Thiel, H. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, 171(2), 555–567. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90625-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90625-9)

Moennig, V., Floegel-Niesmann, G., & Greiser-Wilke, I. (2003a). Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 165(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00112-0)

Moennig, V., Floegel-Niesmann, G., & Greiser-Wilke, I. (2003b). Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 165(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00112-0)

Montalván, C., & Ortega García, A. (2010). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica . *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 1–13. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006>

OIE. (2010). Peste Porcina Clásica, 1–6.

OIE. (2018). *Manual Terrestre de la OIE (Elección y uso de tipos y control de muestras de referencia)*. Retrieved from <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/productos-veterinarios/reactivos-de-referencia/>

OIE. (2019). Peste Porcina clásica (Infección por virus de la Peste Porcina Clásica) . In *Manual Terrestre de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la*

OIE (pp. 1–28).

- Paton, D. J., & Greiser-Wilke, I. (2003). Classical swine fever--an update. *Research in Veterinary Science*, 75(3), 169–178. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00076-6](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00076-6)
- Paton, D., McGoldrick, A., Greiser-Wilke, I., Parchariyanon, S., Song, J., PP, L., ... S, B. (2000). Genetic typing of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, 73(2–3), 137–157. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00141-3)
- Payne, S. (2017). Immunity and Resistance to Viruses. *Viruses*, 61–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00006-4>
- Pearson, J. E. (1992). Hog cholera diagnostic techniques. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 15(3), 213–219. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(92\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0147-9571(92)90094-8)
- Pérez, L. J., Díaz de Arce, H., Perera, C. L., Rosell, R., Frías, M. T., Percedo, M. I., ... Ganges, L. (2012). Positive selection pressure on the B/C domains of the E2-gene of classical swine fever virus in endemic areas under C-strain vaccination. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(7), 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2012.04.030>
- Relova, D., Pérez, L. J., Ríos, L., Coronado, L., Hinojosa, Y., Acevedo, A. M., ... Perera, C. L. (2017). Stability and integrity of classical swine fever virus RNA stored at room temperature. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(3). <https://doi.org/10.5424/SJAR/2017153-10776>
- Rijnbrand, R., Van der Straaten, T., Van Rijn, P., Spaan, W., & Bredenbeek, P. (1997). Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *Journal of Virology*, 71(1), 451–457. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.1.451-457.1997>

- Rodríguez, P., & Josué Díaz de Arce Landa, L. (2008a). *Peste Porcina Clásica: diagnóstico y control (Classical Swine Fever: diagnosis and control)* (Vol. IX). Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvetVol.IX,Nº11Noviembre/2008->
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108.html>
- Rodríguez, P., & Josué Díaz de Arce Landa, L. (2008b). Peste Porcina Clásica: diagnóstico y control (Classical Swine Fever: diagnosis and control), IX, 11. Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvetVol.IX,Nº11Noviembre/2008->
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108.html>
- Schueren, B. Vander, & Cassiman, J.-J. (1979). Morphological Characteristics of Epithelial and Fibroblastic Cells Growing Out from Biopsies of Human Skin, 74.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). Microbial growth kinetics. *Principles of Fermentation Technology*, 21–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1.00002-8>
- Summerfield, A., & Ruggli, N. (2015). Immune Responses Against Classical Swine Fever Virus: Between Ignorance and Lunacy. *Frontiers in Veterinary Science*, 2(MAY). <https://doi.org/10.3389/FVETS.2015.00010>
- Terpstra, C., Bloemraad, M., & Gielkens, A. L. J. (1984a). The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, 9(2), 113–120. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(84\)90026-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(84)90026-9)
- Terpstra, C., Bloemraad, M., & Gielkens, A. L. J. (1984b). THE NEUTRALIZING PEROXIDASE-LINKED ASSAY FOR DETECTION OF ANTIBODY AGAINST SWINE FEVER VIRUS.
- Tratschin, J.-D., Moser, C., Ruggli, N., & Hofmann, M. A. (1998). Classical Swine Fever Virus Leader Proteinase N pro Is Not Required for Viral Replication in Cell Culture . *Journal of Virology*,

- 72(9), 7681–7684. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.9.7681-7684.1998>
- Wang, F. I., & Chang, C. Y. (2020). Classical swine fever: A truly classical swine disease. *Pathogens*, 9(9), 1–3. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090745>
- Wang, Z., Nie, Y., Wang, P., Ding, D., & Deng, H. (2004). Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology*, 330(1), 332–341. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2004.09.023>
- Weesendorp, E., Stegeman, A., & Loeffen, W. (2009). Quantification of classical swine fever virus in aerosols originating from pigs infected with strains of high, moderate or low virulence. *Veterinary Microbiology*, 135(3–4), 222–230. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2008.09.073>
- Yin, M., Hu, D., Li, P., Kong, L., Ning, H., Yue, F., ... Wang, X. (2020). Cloning and Identification of PK15 Cells for Enhanced Replication of Classical Swine Fever Virus. *Journal of Veterinary Research*, 64(1), 9. <https://doi.org/10.2478/JVETRES-2020-0020>
- Zhou, N., Xing, G., Zhou, J., Jin, Y., Liang, C., Gu, J., ... Zhou, J. (2015). In Vitro Coinfection and Replication of Classical Swine Fever Virus and Porcine Circovirus Type 2 in PK15 Cells. *PLOS ONE*, 10(10), e0139457. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0139457>
- Zhu, E., Chen, W., Qin, Y., Ma, S., Fan, S., Wu, K., ... Zhao, M. (2019). Classical Swine Fever Virus Infection Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy to Sustain Viral Replication in vivo and in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2545. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02545>

