

UNIVERSIDAD NACIONAL  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
POSGRADO EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES

**PCVET**  
Posgrado  
Regional  
en Ciencias  
Veterinarias  
Tropicales

**PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL VIRUS DE  
ESTOMATITIS VESICULAR ( serotipos *New Jersey e Indiana*) EN PERSONAS  
RESIDENTES EN DOS ZONAS LECHERAS DE COSTA RICA**

INGRID AYUB CARBONI

HEREDIA, DICIEMBRE DEL 2002

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado en Ciencias Veterinarias Tropicales,  
con mención en Enfermedades Tropicales, para optar al grado de Magister Scientiae

**PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL VIRUS DE  
ESTOMATITIS VESICULAR ( serotipos *New Jersey e Indiana*) EN PERSONAS  
RESIDENTES EN DOS ZONAS LECHERAS DE COSTA RICA**

INGRID AYUB CARBONI

Tesis presentada para optar al grado Magister Scientae. Cumple con los requisitos establecidos por el sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

Miembros del Tribunal Examinador

José Rodríguez Zelaya, M.Sc.  
Presidente Consejo Central de Posgrado

Sandra Estrada Konig, M.Sc.  
Directora de PCVET

Gaby Dolz Wiedner, Ph.D.  
Tutora

Ana Jimenez Rocha, M.Sc.  
Lectora

Carlos Jiménez Sánchez, Ph.D.  
Lector

Ingrid Ayub Carboni  
Sustentante

## RESUMEN

La primera parte de esta investigación tuvo como objetivo determinar la prevalencia de anticuerpos contra el virus de estomatitis vesicular, serotipos New Jersey e Indiana, en la población humana de las regiones lecheras de Poás y Tilarán, Costa Rica. Para este fin se realizó un censo a la población humana de 31 fincas lecheras en estas dos áreas de producción de leche, se tomaron muestras de sangre a la totalidad de los habitantes y trabajadores de dichas fincas y mediante ensayo de seroneutralización se determinó la presencia de anticuerpos contra los serotipos New Jersey (NJ) e Indiana (IN) del virus de estomatitis vesicular (VEV). En el área de Poás se determinó una seroprevalencia de 40.80% para VEV-NJ y 16.66% para VEV-IN, mientras que en la zona de Tilarán se determinó una prevalencia de 26.19% para VEV-NJ y 3.57% para VEV-IN. En las dos regiones se encontró que el grupo de trabajadores agrícolas (peones y trabajadores de ordeño) presentaban un mayor número de seropositivos al VEV-NJ que el grupo de familiares residentes ( $p < 0.01$ ). En el área de Poás el VEV-IN también mostró mayor número de seropositivos ( $p < 0.01$ ) en el grupo de trabajadores agrícolas que en el de familiares. En las dos regiones se determinó además mayor número de seropositivos para los dos serotipos en el grupo que tenía contacto directo con ganado vacuno en comparación a aquellos que tenían contacto indirecto ( $p < 0.01$ ).

La segunda parte de esta investigación consistió en comparar las pruebas diagnósticas inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA-c) y seroneutralización (SN) para la detección de anticuerpos contra el VEV-NJ y VEV-IN analizando 255 sueros humanos procedentes de fincas lecheras de las regiones de Poás y Tilarán, Costa Rica. Para el VEV-NJ la prueba de SN detectó 95 sueros positivos (37%) y 160 sueros negativos (63%), mientras que la prueba de ELISA-c detectó 81 sueros positivos (32%) y 174 sueros negativos (68%). La prueba de ELISA-c mostró una sensibilidad de 79% y una especificidad del 96% asumiendo la SN como prueba de oro, además la prueba J de Youden determinó una concordancia de 0.75 entre ambas pruebas para el diagnóstico de anticuerpos contra VEV-NJ. Para el VEV-IN, la prueba de seroneutralización detectó 32 sueros positivos (13%) y 223 sueros negativos (87%), mientras que la prueba de ELISA-c detectó 56 sueros positivos (22%) y 199 sueros negativos (78%). El ELISA-c mostró una sensibilidad del 94% y una especificidad del 88% asumiendo la seroneutralización como prueba de oro y la J de Youden determinó una concordancia de 0.82 entre ambas pruebas para VEV-IN. Además, se estandarizó y utilizó un Western Blot (WB) para la confirmación de sueros con resultados incongruentes en las pruebas de ELISA-c y SN para VEV-NJ. El WB confirmó como positivos el 100% de los 15 sueros con resultados incongruentes en las pruebas de SN y ELISA-c (13 sueros positivos en SN y negativos en ELISA-c y 2 sueros negativos en SN y positivos en ELISA-c). Estos sueros mostraron anticuerpos contra las diferentes proteínas virales G, N, P, y M del VEV-NJ.

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. Gaby Dolz Wiedner, por su constante ayuda en la realización y análisis de las pruebas de laboratorio y su guía durante la escritura del documento.

Al Proyecto de Estomatitis Vesicular dirigido por el Dr. Marco Vinicio Herrero, por proporcionar el financiamiento para esta investigación y a su personal, especialmente a Flor Vargas y Rodolfo Pereira por su valiosa colaboración y apoyo.

Al Laboratorio de Virología, por facilitar las instalaciones, y al personal técnico, Rocío Cortés y Jorge Prendas por su asesoría.

A Edith Ulate por su valiosa colaboración en el Laboratorio.

A Sacha Trellez y Luis Forero por su ayuda en la localización de las fincas y la ayuda en la introducción de las personas en estudio de esta investigación.

A Eddy Gómez por su valiosa colaboración en la ejecución de este proyecto en la zona de Tilarán.

A Alvaro Dobles, Libia Herrero y Max Solano por la revisión del anteproyecto.

A Juan José Romero Zúñiga por su orientación en el análisis estadístico.

A Ana Jiménez y Carlos Jiménez por las acertadas observaciones hechas al documento.

A todo el personal de las fincas en estudio, sin cuya colaboración, la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

## INDICE

INTRODUCCION GENERAL.....	1
---------------------------	---

### ARTICULO 1

RESUMEN.....	
1. INTRODUCCION.....	
2. MATERIALES Y METODOS.....	
2.1 AREA DE ESTUDIO.....	
2.2 CENSO Y ENCUESTA.....	
2.3 SUEROS HUMANOS.....	
2.4 SERONEUTRALIZACION.....	
2.5 ANALISIS DE DATOS.....	
3. RESULTADOS.....	
3.1 HALLAZGOS GENERALES.....	
3.2 AREA DE POAS.....	
3.2.1 VEV-NJ.....	
3.2.2 VEV-IN.....	
3.2.3 COMPARACION VEV-NJ y VEV-IN.....	
3.3 AREA DE TILARAN.....	
3.3.1 VEV-NJ.....	
3.3.2 VEV-IN.....	
3.3.3 COMPARACION VEV-NJ y VEV-IN.....	
4. DISCUSION.....	
5. REFERENCIAS.....	

### ARTICULO 2

RESUMEN.....	
1. INTRODUCCION.....	
2. MATERIALES Y METODOS.....	
2.1 SUEROS HUMANOS.....	
2.2 PRUEBAS DE LABORATORIO.....	
2.2.1 Seroneutralización.....	
2.2.2 ELISA competitivo.....	
2.2.3 Western Blot.....	
2.3 ANALISIS DE DATOS.....	
3. RESULTADOS.....	
3.1 VEV-NJ.....	
3.2 VEV-IN.....	
4. DISCUSION.....	
5. REFERENCIAS.....	
CONCLUSIONES GENERALES.....	

# LISTA DE CUADROS

## ARTICULO 1

- Cuadro 1.** Seroprevalencia al VEV-NJ y VEV-IN en humanos de dos áreas lecheras de Costa Rica
- Cuadro 2.** Porcentajes de seropositividad por grupos de ocupación, edad y contacto con vacunos para VEV-NJ en el área de Poás
- Cuadro 3.** Porcentajes de seropositividad por grupos de ocupación, edad y contacto con vacunos para VEV-IN en el área de Poás
- Cuadro 4.** Porcentajes de seropositividad por grupos de ocupación, edad, contacto con vacunos, tiempo de residencia y residencia previa en otras fincas para VEV-NJ en el área de Tilarán

## ARTICULO 2

- Cuadro 1.** Detección de anticuerpos contra el VEV-NJ en 255 sueros humanos mediante las pruebas de SN y ELISA-c
- Cuadro 2.** Evaluación de la prueba ELISA-c para el VEV-NJ con respecto a la prueba de SN con 255 sueros humanos
- Cuadro 3.** Detección de anticuerpos contra el VEV-IN en 255 sueros humanos mediante las pruebas de SN y ELISA-c.
- Cuadro 4.** Evaluación de la prueba ELISA-c para el VEV- IN con respecto a la prueba de SN con 255 sueros humanos

## INTRODUCCION GENERAL

La estomatitis vesicular es una enfermedad de los bovinos, equinos y suinos, causada por un vesiculovirus, el virus de la estomatitis vesicular (VEV). En el pasado la enfermedad ha sido de interés principalmente económico y veterinario debido a su similitud con la fiebre aftosa y el exantema vesicular. Actualmente se sabe que el VEV infecta naturalmente a un amplio espectro de huéspedes incluyendo al hombre (Tesh y Johnson, 1975; Fenner *et al.*, 1993).

El virus de la estomatitis vesicular (VEV) pertenece a la familia Rhabdoviridae y al género Vesiculovirus (Frazier y Shope, 1979). Solamente un serogrupo, el serogrupo de la estomatitis vesicular se ha establecido dentro de este género, al cual pertenecen los serotipos **Chandipura, Isfahan, Marabá, Piry, Alagoas, New Jersey e Indiana** (Fields *et al.*, 1996). Los serotipos New Jersey (VEV-NJ) e Indiana (VEV-IN) causan la mayoría de los casos de estomatitis vesicular (Jiménez *et al.*, 1996).

Los VEV son virus en forma de bala de 100 a 430 nm de largo y 45 a 100 nm de diámetro. Tienen dos componentes estructurales, la envoltura y la nucleocápside. Ambas unidades estructurales contienen proteínas. (Fields *et al.*, 1996). Poseen un genoma ARN negativo (complementario a ARN mensajero) y se replican en el citoplasma de la célula infectada (Kucera y Myrvick, 1985 citados por Van Regenmortel y Neurath, 1990). La envoltura está compuesta por una bicapa lipídica en la que se encuentran peplómeros de la proteína G (glicoproteína) y la proteína M (matriz). La nucleocápside o ribonucleoproteína muestra una simetría helicoidal con un diámetro de 30 a 70 nm (Fields *et al.*, 1996).

La nucleocápside contiene una hebra simple de ARN negativa encerrada por la proteína N (nucleoproteína) a la cual se encuentran asociadas la proteínas L (polimerasa ARN-ARN dependiente) y la proteína P (fosfoproteína) (Fenner *et al.*, 1993; Emerson, 1976; Van Regenmortel y Neurath, 1990).

La proteína G se encuentra en la superficie externa de los rhabdovirus (excepto en la parte planar) en forma de espículas o proyecciones (peplómeros formados por trímeros) de 5 a 10 nm de largo y 3 nm de diámetro. El VEV-NJ contiene 517 aminoácidos y el VEV-IN contiene 511 aminoácidos. La proteína G es el principal determinante antigénico, responsable de la especificidad del tipo (serotipo) y la producción de anticuerpos neutralizantes. Solo existe un 50 % de homología a nivel de aminoácidos entre la proteína G de los dos serotipos principales, New Jersey e Indiana (Fields *et al.*, 1996).

La proteína G es la responsable de la unión del virus al receptor putativo celular durante la infección, por lo que los anticuerpos contra G en general inhibirán la infección (Wunner *et al.*, 1985b citado por Van Regenmortel y Neurath, 1990).

Se han encontrado 4 epítomos antigénicos en cada proteína G los cuales reaccionan con anticuerpos monoclonales neutralizantes. Estos anticuerpos neutralizantes no muestran reacción cruzada entre las proteínas G de los 2 serotipos New Jersey e Indiana. Existe un

quinto epitopo compartido por ambas proteínas G (Fields *et al.*, 1996). También se han definido epitopos no neutralizantes para la proteína G de ambos serotipos, y la mayoría de anticuerpos monoclonales usados para identificar estos epitopos, muestran reacción cruzada entre los dos principales serotipos New Jersey e Indiana.

La proteína de matriz (proteína M) del VEV contiene 202 aminoácidos. Su función es la de regular negativamente la síntesis de ARN viral y se propone que su función principal es la de interactuar con el dominio citoplasmático de la proteína G y la ribonucleoproteína durante el ensamblaje del virus y el proceso de gemación (Fields *et al.*, 1996).

La proteína N del VEV contiene 422 aminoácidos y es el antígeno común de grupo para el género vesiculovirus. Existe una homología del 68 % a nivel de aminoácidos entre los dos serotipos principales New Jersey e Indiana. (Fields *et al.*, 1996).

La proteína P contiene 274 aminoácidos en el VEV-NJ y 265 aminoácidos en el VEV- IN, y solo muestra un 33% de homología a nivel de aminoácidos entre los principales serotipos New Jersey e Indiana. Esta proteína presenta múltiples sitios de fosforilación (Fields *et al.*, 1996).

La proteína L es la proteína más grande de los rhabdovirus y contiene 2109 aminoácidos en el VEV. Entre sus funciones están la síntesis de ARN, metilación y polyadenilación de ARN viral (Fields *et al.*, 1996).

Los valores de masa para las cinco proteínas virales del VEV-NJ y VEV-IN son los siguientes: proteína L=150 kDa, proteína G=70-80 kDa, proteína N=50-62 kDa, proteína P=40-50 kDa y proteína M=20-30 kDa. (Fenner *et al.*, 1993)

La estomatitis vesicular es una enfermedad del Hemisferio Oeste. Ha ocurrido esporádicamente en Africa y en Europa debido a la introducción de animales infectados pero no ha persistido (Hanson, 1963, citado en Monath, 1989; Tesh y Johnson, 1975). La estomatitis vesicular ocurre en forma epizootica y enzoótica. Las zonas epizooticas comprenden Norte América hasta el Sur de Canadá y Suramérica hasta Argentina. Las epizootias de estomatitis vesicular son de ocurrencia esporádica, con marcada incidencia estacional, aparece de repente y afecta a gran proporción del hato dentro de 24 a 48 horas (Jonkers, 1965 citado por Tesh y Johnson, 1975).

El VEV es enzoótico en regiones tropicales y subtropicales de América. Los serotipos New Jersey e Indiana son enzoóticos en el este de México, Colombia, Venezuela, Panamá y Costa Rica. La región enzoótica para el serotipo New Jersey se extiende al sureste de los Estados Unidos en las planicies de Georgia, Carolina del Sur y Florida (Karstad y Hanson, 1957; Jensen y Mackey, 1979 citados por Monath, 1989).

Aunque no se sabe si la actividad del virus es continua o esporádica, las áreas endémicas se caracterizan por una alta prevalencia de infección entre humanos y animales (domésticos y silvestres) que habitan en la región (Tesh *et al.*, 1969, citado por Tesh y Johnson, 1975).

Costa Rica es considerada un área endémica para la estomatitis vesicular, los investigadores Pérez y Cornelissen (1987) realizaron un estudio retrospectivo en el cual analizaron los casos positivos a estomatitis vesicular en vacunos y concluyeron que la enfermedad se encontraba diseminada por todo el país con un porcentaje Omega de 80.13 para ambos serotipos (64.95% para VEV-NJ y 11.36% para VEV-IN).

El VEV-NJ es el serotipo más frecuente en Costa Rica, al igual que en otros países de América (Astudillo, 1984 en Pérez y Cornelissen, 1989). En Costa Rica los cantones Central, Grecia y San Carlos de Alajuela, y Santa Bárbara de Heredia presentaron un porcentaje Omega mayor a 12 por lo que se clasificaron como endémicos, mientras que los cantones de Coronado de San José, Naranjo y Alfaro Ruíz de Alajuela, La Unión de Cartago y Coto Brus de Puntarenas presentaron un porcentaje Omega de 6.09 a 7.80, lo que indicó un intervalo entre ocurrencias de 18 meses, por lo que se clasificaron como ocasionales. Los demás cantones presentaron porcentajes Omega inferiores a 5 %, por lo que se clasificaron como esporádicos. Los autores consideraron al VEV serotipo Indiana como esporádico en Costa Rica.

El primer reporte de infección humana con el VEV se da en 1917, en el cual se describen tres casos de enfermedad aguda en tres personas que trabajaban con caballos afectados por estomatitis (Burton, 1917 citado por Reif *et al.*, 1987). Enfermedad humana debida a VEV-NJ fue documentada serológicamente por primera vez en trabajadores de laboratorio después de manejar animales enfermos o fluidos de cultivo (Fellowes *et al.*, 1955)

A diferencia de lo que ocurre en zonas con actividad endémica, en las zonas epizooticas las personas afectadas son las que están expuestas intensivamente a animales infectados con el VEV (Reif *et al.*, 1982). Entre las personas afectadas en estas zonas se encuentran veterinarios, investigadores, personal de laboratorio y finqueros. Reif *et al.* (1982) citó como factores de riesgo el hecho de que animales infectados estornudaran en la cara de los afectados y el hecho de examinar equinos y bovinos.

Estudios serológicos de personal de laboratorio y trabajadores de campo expuestos al VEV mostraron rápida seroconversión y altas tasas de seroprevalencia a ambos serotipos del VEV (Patterson, 1958). Los VEV-NJ y VEV-IN han causado numerosas epizootias en los Estados Unidos de América afectando animales domésticos y humanos (Hanson, 1981). Excepto por una pequeña zona de actividad viral del VEV-NJ en el suroeste de Estados Unidos, la estomatitis vesicular enzoótica parece estar restringida a áreas boscosas de Centroamérica y Suramérica. Aunque no se sabe con certeza si la actividad del VEV es continua o esporádica en áreas endémicas, estas áreas se caracterizan por una alta prevalencia de infección en humanos y animales (Hanson, 1952; Tesh *et al.*, 1969 citados por Walton *et al.*, 1982).

Un estudio realizado en varias poblaciones humanas de Panamá muestra un alto título de anticuerpos para ambos serotipos del VEV (Indiana y New Jersey). La prevalencia de anticuerpos neutralizantes en humanos aumentó con la edad, sugiriendo una relación directa entre las tasas de infección y el tiempo de residencia en el área endémica. La mayoría de los adultos mostraron anticuerpos neutralizantes contra ambos serotipos del VEV y no hubo diferencia significativa en la tasa de infección por sexo (Tesh *et al.*, 1969). Las tasas de

infección con el VEV-NJ y VEV-IN mostraron marcada diferencia geográfica y varió de 0 a 94% (Tesh *et al.*, 1969). Panamá se considera un área de actividad endémica para la estomatitis vesicular (Peralta y Johnson, manuscript; Kuns, 1962; Brody *et al.*, 1967, citados en Tesh *et al.*, 1969).

Otro estudio realizado en Panamá por Brody *et al.* (1967) durante un brote de VEV-NJ demostró anticuerpos en el 71% de las personas que trabajaron con hatos bovinos infectados, comparado con un 34% de prevalencia en personas que trabajaron con hatos bovinos no infectados. Además, entre la población residente no empleada como manejadora de animales la prevalencia de anticuerpos fue 6 veces mayor en los que tenían en su historia el haber trabajado alguna vez con bovinos, en comparación con los que nunca tuvieron esa ocupación. Estos datos dan soporte a la importancia de tener contacto con animales para adquirir la infección con el VEV-NJ.

Otro estudio publicado por Cline (1976) analizó 3232 sueros de un banco de sueros de personas residentes de por vida en 189 comunidades rurales de Centroamérica y Panamá, encontrando una mayor prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra VEV-NJ en personas que vivían en elevaciones entre los 350 y 649 metros, con áreas relativamente abiertas y vegetación seca. Estas mismas asociaciones ecológicas encontradas fueron similares para VEV-IN.

En bovinos, equinos y suinos la enfermedad clínica causada por el VEV se manifiesta rápidamente después de un período de incubación de 1 a 5 días. En bovinos y equinos los primeros signos en presentarse son la excesiva salivación y fiebre. Se presentan lesiones vesiculares en lengua, mucosa oral, ubre y banda coronaria. La laminitis es frecuente en cerdos. Las lesiones sanan entre el séptimo al décimo día sin dejar secuelas, si no hay complicación con infecciones bacterianas secundarias (Fenner *et al.*, 1993). Sin embargo, según Rodríguez *et al.* (1990) en la mayoría de los casos la estomatitis vesicular ocurre en forma subclínica en Costa Rica.

La estomatitis vesicular en humanos se presenta como una enfermedad aguda y autolimitante de 3 a 5 días de duración (Quiroz *et al.*, 1988). Esta se caracteriza por síntomas similares a los de la influenza, que aparecen después de un período de incubación de 2 a 6 días. En la mayoría de los casos se desarrolla fiebre acompañada por mialgia, dolores de cabeza y escalofríos (Reif *et al.*, 1987; Fenner *et al.*, 1993; Tesh y Johnson, 1975; Fields *et al.*, 1996). Algunas de las personas afectadas presentan signos de faringitis y vómitos, y ocasionalmente aparecen lesiones vesiculares en lengua, boca, labios y nariz (Yuill, 1980, citado en Reif *et al.*, 1987; Tesh y Johnson, 1975; Quiroz *et al.*, 1988). Se ha reportado además un caso de meningoencefalitis asociado a un caso de infección natural con VEV-IN en un niño panameño de 3 años de edad y en la India se logró aislar el VEV serotipo *Chandipura* de la sangre de un paciente con síndrome de encefalopatía aguda (Quiroz *et al.*, 1988). Lo anterior sugiere que la infección con VEV puede causar enfermedad severa en el humano.

En cuanto al aislamiento viral Fenner *et al.* (1993) citan que el VEV puede recobrase de los fluidos vesiculares y granos de tejido por medio de técnicas que utilizan cultivos celulares (o huevos embrionados o ratón recién nacido con inóculo intracerebral). A su vez

Monath (1988), menciona que el aislamiento viral es fácil si se utilizan células de riñón de mono verde africano (células VERO).

En cuanto a la detección de anticuerpos contra el VEV se han desarrollado diferentes pruebas diagnósticas, siendo las más utilizadas la seroneutralización (SN), la fijación de complemento (FC) y las pruebas inmunoenzimáticas, por ejemplo ELISA (Ahmad *et al.*, 1993; Alonso *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 1987; Ferris y Donaldson, 1988, citados por Alvarado 1999).

Los ensayos de neutralización se basan en el principio de que los anticuerpos se unen específicamente al virus con un resultado neutralizante de la infectividad viral. (Burlison *et al.*, 1992). La SN detecta anticuerpos neutralizantes contra el VEV-NJ y VEV-IN. Esta prueba ha sido ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos en humanos en estudios realizados en Panamá, Centroamérica y Colorado (E.U.A.) (Tesh *et al.*, 1969; Quiroz *et al.*, 1988; Cline, 1976; Walton *et al.*, 1987; Reif *et al.*, 1987 y Webb *et al.*, 1987). También se ha utilizado para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VEV serotipo Alagoas en humanos en Colombia (Tesh *et al.*, 1987). En los trabajos anteriormente citados se realizaron pruebas de neutralización en monocapas de células VERO utilizando el método de reducción de placa. La desventaja que presenta la prueba de seroneutralización es que requiere de un laboratorio con capacidad para el manejo de cultivos celulares con condiciones asépticas y mantenimiento de virus vivo, lo cual constituye un riesgo para la salud del personal de laboratorio, además de que se requiere de dos a tres días para obtener resultados (Afshar *et al.*, 1993<sup>a</sup>, citado por Alvarado, 1999).

La prueba de fijación de complemento ó FC es la prueba más usada para el diagnóstico específico y para determinar infección temprana. Sin embargo, dificultadas en la detección de anticuerpos por FC en suinos, especies silvestres y algunos bovinos, hicieron que se empezaran a utilizar otras pruebas como la técnica de ELISA (Workman *et al.*, 1986, citado por Monath, 1988).

Recientemente se han reportado en la literatura diferentes tipos de ELISA para la detección de anticuerpos contra el VEV-NJ y VEV-IN, sin embargo no se ha encontrado en la literatura ningún estudio que estudie la infección con VEV en humanos y que utilice este tipo de prueba.

En 1986 Workman *et al.* desarrollaron un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra el VEV a partir de animales infectados experimentalmente, la que se caracterizó por ser una prueba sensible, rápida y fácil de realizar. En 1993 Afshar *et al.* describieron un ELISA competitivo (ELISA-c) para la detección de anticuerpos contra el VEV-NJ y VEV-IN, basados en la competencia de anticuerpos policlonales producidos en fluidos ascíticos de ratón. Ellos sugieren que usando antígenos específicos de serotipo del VEV en el ELISA-c esta técnica puede sustituir a la seroneutralización (citado por Alvarado 1999). Las ventajas que tiene la prueba ELISA-c es que no requiere de equipo sofisticado, que existe menos riesgo de infección y que es una prueba rápida (3 ó 4 horas). Eernisse *et al.*, (1996, citado por Alvarado 1999) reportaron, que el ELISA-c posee una sensibilidad y especificidad aceptables para detectar anticuerpos contra VEV-NJ y VEV-IN (88% y 99%, respectivamente).

Cuando se realizan pruebas serológicas rápidas como el ELISA, los resultados de estas pruebas generalmente se comparan con los resultados de pruebas de neutralización (prueba de oro). Debe tenerse presente que las pruebas rápidas normalmente detectan anticuerpos unidos a diferentes epitopos, mientras que las pruebas de neutralización solo detectan anticuerpos unidos a epitopos neutralizantes. El hecho de que la prueba ELISA-c detecta anticuerpos unidos a diferentes epitopos virales aumenta la oportunidad de detectar anticuerpos, que se encuentran en el suero en etapas tempranas post infección, y que no son necesariamente neutralizantes. En estos casos los sueros tempranos producen resultados negativos en la neutralización y positivos en el ELISA-c (Dinter, 1989).

El WB se ha convertido en una herramienta analítica común para la detección de proteínas virales, caracterización de anticuerpos monoclonales y policlonales y para determinar la especificidad de la respuesta inmune a antígenos virales. En el WB las proteínas virales se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfieren electroforéticamente a papel de nitrocelulosa y las proteínas individuales se detectan inmunológicamente (Burleson, 1992).

Otras técnicas serológicas que han sido utilizadas en el estudio del VEV son la inmunodifusión, inmunofluorescencia, aglutinación e inmunolectroforesis (Wilks et al, 1984, citado por Monath 1988).

El presente trabajo tuvo como objetivo el establecer la prevalencia de anticuerpos contra VEV-NJ y VEV-IN en la población humana de fincas lecheras en dos zonas de producción de leche en Costa Rica, utilizando las pruebas de seroneutralización y ELISA-c, además de comparar ambas pruebas y determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA-c, utilizando la seroneutralización como prueba de referencia, y determinar el índice de concordancia entre SN y ELISA-c.

# ARTICULO 1

**PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE ESTOMATITIS  
VESICULAR (serotipos *New Jersey* e *Indiana*) EN PERSONAS RESIDENTES EN  
DOS ZONAS LECHERAS DE COSTA RICA**

**RESUMEN**

Se realizó un censo a la población humana de 31 fincas lecheras en dos áreas de producción de leche en Costa Rica. Las áreas seleccionadas fueron Poás y Tilarán. Se tomaron muestras de sangre a la totalidad de los habitantes y trabajadores de dichas fincas. Mediante ensayo de seroneutralización se detectó la presencia de anticuerpos contra los serotipos New Jersey (NJ) e Indiana (IN) del virus de estomatitis vesicular (VEV). Se encontró en el área de Poás una seroprevalencia de 40.80% para VEV-NJ y 16.66% para VEV-IN, mientras que la población humana de fincas lecheras en la zona de Tilarán mostró una prevalencia de 26.19% para VEV-NJ y 3.57% para VEV-IN.

En ambas regiones se encontró, que en el grupo de trabajadores agrícolas (peones y trabajadores de ordeño) había un mayor número de seropositivos que en el grupo de familiares residentes para VEV- NJ( $p < 0.01$ ). En el área de Poás también se logró detectar mayor seropositividad para VEV-IN ( $p < 0.01$ ) en el grupo de trabajadores agrícolas que en el grupo de familiares. En ambas regiones se detectó además mayor seropositividad al VEV-NJ y VEV-IN en el grupo que tenía contacto directo con ganado vacuno en comparación a aquellos que tenían contacto indirecto ( $p < 0.01$ ).

**PALABRAS CLAVES.**

Virus de estomatitis vesicular, humanos, fincas lecheras, Costa Rica, seroneutralización.

## 1. INTRODUCCION

La estomatitis vesicular es una enfermedad zoonótica causada por un rhabdovirus del continente americano, el virus de estomatitis vesicular (VEV). Entre los animales domésticos mayormente afectados están los bovinos, equinos y suinos. Actualmente se sabe que el VEV infecta naturalmente a un amplio espectro de huéspedes incluyendo al hombre (Tesh y Johnson, 1975; Fenner *et al.*, 1993). El VEV serotipo New Jersey (VEV-NJ) y serotipo Indiana (VEV-IN) causan la mayoría de los casos de estomatitis vesicular en América (Jiménez *et al.*, 1996).

La estomatitis vesicular se presenta en humanos como una enfermedad aguda y autolimitante de 3 a 5 días de duración (Quiroz *et al.*, 1988). Esta se caracteriza por síntomas similares a los de la influenza, que aparecen después de un período de incubación de 2 a 6 días. En la mayoría de los casos se desarrolla fiebre acompañada por mialgia, dolores de cabeza y escalofríos (Tesh y Johnson, 1975; Reif *et al.*, 1987; Fenner *et al.*, 1993; Fields *et al.*, 1996). Algunas de las personas afectadas presentan signos de faringitis y vómitos, y ocasionalmente aparecen lesiones vesiculares en lengua, boca, labios y nariz (Tesh y Johnson, 1975; Yuill, 1980, citado en Reif *et al.*, 1987; Quiroz *et al.*, 1988).

La infección humana y enfermedad clínica ocurre con mayor frecuencia en personas con exposición ocupacional a animales infectados, tanto en condiciones enzoóticas como epizooticas. El VEV se transmite al ser humano (típicamente veterinarios y finqueros) generalmente por fluidos vesiculares y tejidos de animales infectados (Fenner *et al.*, 1993).

El primer reporte de infección humana con el VEV se dio en 1917, cuando se describieron tres casos de enfermedad aguda en tres personas que trabajaban con caballos afectados clínicamente por estomatitis vesicular (Burton, 1917, citado por Reif *et al.*, 1987). La enfermedad en humanos fue documentada serológicamente por primera vez en trabajadores de laboratorio, después de manejar animales enfermos o fluidos de cultivo (Fellowes *et al.*, 1955).

Reif *et al.* (1987) estudiaron los patrones de infección humana y prevalencia de anticuerpos neutralizantes en veterinarios, investigadores y personal expuesto al virus durante una epizootia causada por VEV-NJ en 1982-83 en Colorado, Estados Unidos. En este trabajo encontraron que la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra VEV-NJ está asociada a la historia de exposición en todos los grupos estudiados. Basados en la historia de exposición y análisis de riesgo Reif *et al.* (1987) sugirieron como modos de transmisión al humano la transmisión directa por aerosol, la infección a través de membranas mucosas e inyección percutánea.

Un estudio realizado en varias poblaciones humanas de Panamá determinaron una prevalencia de anticuerpos contra el VEV-NJ de 61% y contra VEV-IN de 56% en un total de 173 personas muestreadas. La prevalencia de anticuerpos neutralizantes en humanos

aumentó con la edad, sugiriendo una relación directa entre las tasas de infección y el tiempo de residencia en el área endémica.

La mayoría de los adultos mostraron anticuerpos neutralizantes contra ambos serotipos del VEV y no se pudo demostrar diferencia significativa en la tasa de infección por sexo (Tesh *et al.*, 1969). Las tasas de infección con VEV-NJ y VEV-IN mostraron marcada diferencia geográfica y varió de 0 a 94 % (Tesh *et al.*, 1969). Panamá se considera un área de actividad endémica para la estomatitis vesicular (Peralta y Johnson, manuscript; Kuns, 1962 y Brody *et al.*, 1967, citados en Tesh *et al.*, 1969).

En otro estudio realizado en Panamá por Brody *et al.* (1967) durante un brote de VEV-NJ encontraron anticuerpos en un 71% de personas que trabajaban con hatos bovinos infectados, comparado con un 34% en personas que trabajaban con hatos bovinos no infectados. Además, entre la población residente no empleada como manejadora de animales, la prevalencia de anticuerpos fue 6 veces mayor en los que tenían en su historia el haber trabajado alguna vez con bovinos, en comparación, con los que nunca tuvieron esa ocupación. Estos datos dan soporte a la importancia del contacto directo con animales para adquirir la infección con VEV-NJ.

Otro estudio publicado por Cline (1976) analizó 3232 sueros de un banco de sueros de personas residentes de por vida en 189 comunidades rurales de Centroamérica y Panamá, encontrando una mayor prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra VEV-NJ en personas que vivían en elevaciones entre los 350 y 649 metros, con áreas relativamente abiertas y vegetación seca. Estas mismas asociaciones ecológicas fueron encontradas para VEV-IN.

Se ha reportado además un caso de meningoencefalitis asociado a un caso de infección natural con VEV-IN en un niño panameño de 3 años de edad. El virus se recobró de la garganta del niño al quinto día de la enfermedad y se logró determinar un aumento en el título de anticuerpos neutralizantes utilizando sueros pareados (agudo y convalesciente). El título de anticuerpos neutralizantes contra VEV-IN fue de 1:8 en el suero agudo y de 1:4,096 en el suero convalesciente. El niño habitaba en una zona rural de Panamá y el padre y la madre mostraron títulos de anticuerpos contra VEV-IN de 1:128 y 1:256, respectivamente.

En la India se reportó un caso fatal de encefalopatía aguda viral en un niño, asociada al VEV serotipo *Chandipura* (Quiroz *et al.*, 1988). Estos dos reportes sugieren que la infección con VEV puede causar enfermedad severa en el humano.

Costa Rica es considerada un área endémica para la estomatitis vesicular. Los investigadores Cornelissen y Pérez (1987) realizaron un estudio retrospectivo, en el cual analizaron los casos clínicos de estomatitis vesicular en vacunos y concluyeron que la enfermedad se encontraba diseminada por todo el país con un porcentaje Omega de 80.13 para ambos serotipos (64.95% para VEV-NJ y 11.36% para VEV-IN). Sin embargo, en Costa Rica no se han realizado estudios en la población humana.

El objetivo del presente trabajo fue establecer la prevalencia de anticuerpos contra VEV-NJ y VEV-IN en la población humana de fincas lecheras de dos zonas de producción de leche

en Costa Rica utilizando la prueba de SN y determinar diferencias significativas en el porcentaje de seropositividad por grupo de ocupación, edad, contacto con vacunos, tiempo de residencia y residencia previa en otras fincas para VEV-NJ y VEV-IN en Tilarán y Poás.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. Area de estudio**

Las dos áreas de estudio seleccionadas corresponden a localidades donde el Programa de Producción y Manejo Automatizado (VAMPP) de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional tiene sus unidades de estudios experimentales. Estas áreas son la región de Poás y la región de Tilarán.

En la región de Poás, situada en la Cordillera Volcánica Central, se contó con un grupo de 21 fincas dedicadas a la producción de leche, localizadas en Poás (latitud 10° 06 03" N longitud 84° 14 45" O), Santa Barbara (latitud 10° 04 36" N longitud 84° 09 24" O) y Vara Blanca (latitud 10° 10 25" N longitud 84° 09 35" O), provincias de Alajuela y Heredia, Costa Rica, con altitudes que van de los 1500 a los 2500 metros sobre el nivel del mar y en una zona catalogada como de clima muy húmedo, de templado a frío y con una estación seca de corta a moderada, con una precipitación media anual de 2300 a 5100 mm y una temperatura media anual de 12 a 15°C (Herrera, 1985). Esta zona es de actividad principalmente lechera, aunque en los últimos años ha aumentado la floricultura y el cultivo de helechos. También es de importancia económica la producción de fresa y mora. Las fincas de la región de Poás tienen un mínimo de 3 personas por finca (entre trabajadores y residentes) y un máximo de 18 personas por finca.

En la zona de Tilarán y alrededores, situada en la Cordillera de Tilarán, se contó con 10 fincas dedicadas a la producción de leche, dispuestas a colaborar. De estas fincas, 8 se localizaron en Quebrada Grande, Arenal Viejo, Tronadora, Tierras Morenas, El Aguacate y 2 fincas se localizaron en Guayabo de Bagaces. Las 10 fincas de esta área de estudio se encuentran entre los 500 y 1000 metros sobre el nivel del mar, y en una zona de clima húmedo, caliente con una estación seca moderada, con una precipitación anual de 2500 a 3100 mm y una temperatura media anual de 22 a 26°C (Herrera, 1985). Esta es una zona de actividad lechera y de ganado de doble propósito. En la zona de Tilarán las fincas tienen un mínimo de 5 (entre trabajadores y residentes) y un máximo de 12 personas por finca.

### **2.2. Censo y encuesta**

Se procedió a realizar un censo en las fincas en estudio, en el que se incluyó a la totalidad de los residentes y trabajadores. Se excluyeron del censo a los niños menores de 4 años. El número de personas aportadas por el censo fue de 269. De las 269 personas, 184 correspondieron a la zona de Poás (136 hombres y 48 mujeres) y 86 personas a la zona de Tilarán (54 hombres y 32 mujeres).

A cada una de las personas en el censo se le realizó una encuesta. A cada persona se le explicó el objetivo del estudio y se le garantizó la confidencialidad de los resultados de las pruebas. Las encuestas correspondientes a niños menores de 12 años fueron contestadas por uno de sus padres o encargado.

En las fincas de la zona de Poás la encuesta se realizó durante los meses de noviembre y diciembre de 1998 y en las fincas de la zona de Tilarán la encuesta se realizó durante el mes de mayo de 1999. Las fincas se visitaron varias veces cada una para realizar la encuesta a la totalidad de las personas en estudio.

Para llenar la encuesta, el encuestador se reunió con cada una de las personas y el encuestado contestó a las preguntas hechas por el encuestador. El encuestador fue el mismo para todas las personas. La encuesta incluyó el nombre completo del encuestado, número de cédula, género, lugar de nacimiento, nacionalidad, finca en la que reside o trabaja, altitud de la finca, grupo etáreo (4-10 años, 10-20 años, 20-30 años, 30-40 años, 40-50 años, 50-60 años o mayores de 60 años), grupo ocupacional (ordeñador, peón, familiar residente, ama de casa, administrador, veterinario u otro), tiempo de residir en la finca (< 1 año, 1-5 años, 5-10 años, > 10 años), si residió en otras fincas lecheras antes (sí o no), en cuáles, grado de contacto con vacunos (diario-directo, ocasional-directo, diario-indirecto, ocasional-indirecto) y disponibilidad para permitir la toma de muestra de sangre (sí o no). También se preguntó, si alguna vez notaron la aparición de vesículas asociadas a estado gripal y se anotaron algunas observaciones. Se asignó un número no repetido a cada uno de los encuestados y este fue el número de referencia.

### **2.3. Sueros humanos**

La toma de muestras de sangre se realizó durante junio, julio y agosto de 1999. Se visitaron de nuevo cada una de las fincas y se procedió a tomar la muestra de sangre de cada uno de los encuestados (excepto a 6 personas del área de Poás y 2 de Tilarán, 5 de ellas decidieron no participar en el estudio y de tres no fue posible obtener una cantidad suficiente de sangre aunque se intentó en varias ocasiones).

En total se colectaron 262 muestras de suero de las cuales 178 correspondieron a la zona de Poás y 84 a la zona de Tilarán. Se extrajo aproximadamente 2 ml de sangre mediante punción venosa a cada persona. Las muestras de sangre se colocaron en tubos vacutainer sin anticoagulante y con etiqueta. Se mantuvieron en una hielera con hielo por varias horas y se centrifugaron al finalizar el día de muestreo en una centrífuga portátil a 5000 r.p.m. por 10 minutos. El suero se guardó en tubos Eppendorf en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar las pruebas.

### **2.4. Pruebas de laboratorio**

Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Se analizaron las muestras de suero mediante el ensayo de seroneutralización, según el protocolo de Rodríguez *et al.* (1990). Las muestras de suero se analizaron en placas de microtítulo por duplicado, se realizaron diluciones en base de dos de 1:8 hasta 1:32768. Paralelamente se

corrió control de virus (CV), control de células (CC), control de suero positivo (C+) y control de suero negativo (C-). Los sueros se diluyeron con medio esencial mínimo Dulbecco (D-MEM). A cada pozo se le adicionó 100- 200 TCID<sub>50</sub> de VEV-NJ o VEV-IN, los cuales se obtuvieron de virus propagado en células VERO-E6 en el Laboratorio de Virología. La mezcla suero-virus se incubó por 1 hora a 37°C 6%CO<sub>2</sub>, luego del período de incubación se añadieron células VERO-E6. Las placas se volvieron a incubar como se describe arriba y se leyeron a las 48 horas para determinar el efecto citopático. Se consideró un suero como positivo si a partir de títulos de 1:8 en adelante el virus era neutralizado por los anticuerpos.

## 2.5. Análisis de datos

Del total de sueros colectados, 12 mostraron ser citotóxicos en la prueba de seroneutralización, por lo que el análisis de datos se realizó con 174 sueros de Poás y 84 sueros de Tilarán.

En la zona de Tilarán solo se encontraron 3 casos seropositivos para VEV-IN, por consiguiente muchas categorías de la encuesta mostraron ceros en la casilla de seropositivos para este serotipo. Debido al tamaño de la muestra, los datos de la encuesta se reagruparon de la siguiente forma: en cuanto a ocupación, los peones y ordeñadores formaron el grupo de trabajadores agrícolas, los familiares residentes y amas de casa se unieron bajo el grupo de familiares, y los administradores, veterinarios y otros se agruparon en el grupo de otros. La edad se reagrupó en los grupos de 0-10 años, 10 -20 años, 20-60 años y > 60 años. El tiempo de residencia se reagrupó en 2 grupos, uno de menos de 1 año de residencia en la finca y otro de un tiempo de residencia mayor a un año. El contacto con vacunos, caballos, cabras y cerdos se reagrupó en contacto directo e indirecto.

El ensayo de seroneutralización generó datos dicotómicos, positivos y negativos, y datos numéricos discontinuos relativos a los títulos de anticuerpos. Se tomó como muestra positiva la que mostró un título de anticuerpos de 1:8 o mayor y se tomó como muestra negativa la que no mostró título de anticuerpos en las diluciones igual o mayor a 1:8.

La primera variable determinada fue el porcentaje de seropositividad definido como el número de muestras seropositivas multiplicado por 100 y dividido entre el número total de muestras colectadas. Esta variable se calculó para cada una de las dos zonas.

Para determinar si existía o no diferencia significativa en cuanto a la seropositividad entre grupos de la misma zona, todos los grupos de cada **clase** se compararon entre sí uno a uno, aplicando una prueba de hipótesis para proporciones para categorías mutuamente excluyentes y utilizando el programa estadístico Microstat.

No se hizo una comparación por grupos entre las dos zonas en estudio, debido al tamaño de muestra insuficiente. Se aplicó una prueba de proporciones a la comparación de seropositividad entre serotipos para un mismo grupo, para esto se asumió que la seropositividad es un evento independiente para cada serotipo.

También se utilizó la prueba de proporciones para determinar, entre grupos, cual es el que tiene mayor número de seropositivos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Hallazgos generales

En el área de Poas se encontró una seroprevalencia de 40.80% para VEV-NJ y de 16.66% para VEV-IN. En el área de Tilarán la seroprevalencia fue de 26.19% para VEV-NJ y de 3.57 % para VEV-IN. En el área de Poas se encontraron casos seropositivos para VEV-NJ en la totalidad de las 21 fincas estudiadas, mientras que solamente 15 de las fincas mostraron casos seropositivos para VEV-IN. En el área de Tilarán 8 de las 10 fincas en estudio mostraron casos seropositivos para VEV-NJ, mientras que solo 3 de las fincas mostraron casos seropositivos para VEV-IN (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Seroprevalencia al VEV-NJ y VEV-IN en humanos de dos áreas lecheras de Costa Rica

Area	n	NJ	IN
Poás	174	40.80%	16.66%
Tilarán	84	26.19%	3.57%

#### 3.2. Area de Poás

##### 3.2.1. VEV- NJ

En cuanto a la ocupación, se encontró que existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) en cuanto a seropositividad entre el grupo que se dedica a labores agrícolas (peones de campo y trabajadores de lechería) y el grupo de los familiares residentes que no se dedican a estas labores. También existe diferencia significativa entre el grupo de familiares y el grupo otros ( $p < 0.01$ ). Los resultados se muestran en el cuadro 2.

En cuanto a grupos etarios, se encontró diferencia significativa entre los grupos de 0-10 años con los grupos de 20-60 y mayores de 60 años con  $p < 0.01$ . El grupo de 10-20 años también muestra diferencia significativa con el grupo de 20- 60 años y con el grupo de más de 60 años con  $p < 0.01$  (Cuadro2).

Se encontró diferencia significativa en cuanto a seropositividad entre las personas que tenían contacto directo con el ganado vacuno y los que no tenían contacto directo ( $p < 0.01$ ).

No se encontró diferencia significativa en seropositividad entre los otros grupos por clase (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Porcentajes de seropositividad por grupos de ocupación, edad y contacto con vacunos para VEV-NJ en el área de Poás

<b>CLASE</b>	<b>GRUPO</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>Ocupación</b>	Agrícola	54.08
	Familiares	15.51
	Otros	52.94
<b>Edad</b>	0-10 años	0
	10-20 años	17.14
	20-60 años	50.40
	> 60 años	60.00
<b>Contacto con vacunos</b>	Directo	46.15
	Indirecto	29.82

### 3.2.2. VEV-IN

En cuanto a la ocupación, se encontró que existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) en cuanto a seropositividad entre el grupo que se dedica a labores agrícolas (peones de campo y trabajadores de lechería) y el grupo de familiares residentes que no se dedican a estas labores (Cuadro 3).

En cuanto a grupos por edad, se encontró diferencia significativa entre el grupo de 0-10 años con el grupo de mayores a 60 años ( $p < 0.01$ ). El grupo de 10- 20 años también mostró diferencia significativa con el grupo de 20-60 años y con el grupo de más de 60 años con una  $p < 0.01$ . También se encontró diferencia significativa entre el grupo de 20-60 años y el grupo de mayores de 60 con una  $p < 0.01$ (Cuadro 3).

Finalmente se encontró diferencia significativa en cuanto a seropositividad entre las personas que tenían contacto directo con el ganado vacuno y los que no tenían contacto directo ( $p < 0.01$ ). No se encontró diferencia significativa en seropositividad entre los otros grupos por clase (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Porcentajes de seropositividad por grupos de ocupación, edad y contacto con vacunos para VEV-IN en el área de Poás

<b>CLASE</b>	<b>GRUPO</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>Ocupación</b>	Agrícola	25.51
	Familiares	1.72
	Otros	17.64
<b>Edad</b>	0-10 años	0
	10-20 años	5.71
	20-60 años	19.51
	> 60 años	60.00
<b>Contacto con vacunos</b>	Directo	22.22
	Indirecto	5.26

### 3.2.3. Comparación VEV-NJ y VEV-IN en el área de Poás

En cuanto a la comparación de los dos serotipos (VEV-NJ y VEV-IN), se determinó que en el área de Poas existe una diferencia significativa en cuanto a seropositividad a VEV- NJ y VEV-IN en el grupo de trabajadores agrícolas ( $p < 0.01$ ) así como en familiares residentes ( $p < 0.01$ ).

En cuanto a los grupos de edad se encontraron diferencias significativas en el grupo de 20-60 años y en el grupo de más de 60 años ( $p < 0.01$ ).

El grupo de personas que tenía contacto directo con vacunos mostró un número significativamente mayor de seropositivos a ambos serotipos, que aquellos que tenían contacto indirecto con vacunos.

## 3.3. Area de Tilarán

### 3.3.1. VEV-NJ

En cuanto a la ocupación, se encontró que existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) en cuanto a seropositividad entre el grupo que se dedica a labores agrícolas (peones de campo y trabajadores de lechería) y el grupo de los familiares residentes que no se dedican a estas labores. También se encontró diferencia ( $p < 0.01$ ) entre el grupo de agricultores y el grupo otros (Cuadro 4).

En cuanto a grupos etarios se encontró diferencia significativa entre los grupos de 0-10 años con los grupos de 20-60 y mayores de 60 años con  $p < 0.01$ . El grupo de 10-20 años

también mostró diferencia significativa con respecto al grupo de 20-60 años y con el grupo de más de 60 años con una  $p < 0.01$  (Cuadro 4).

Se encontró además diferencia significativa en cuanto a seropositividad entre las personas que tenían contacto directo con el ganado vacuno y los que no tenían contacto directo ( $p < 0.01$ ), como se muestra en el cuadro 4.

A diferencia de Poás, se encontró diferencia entre el grupo de personas que tenían menos de un año de vivir en la finca en comparación con los que tenían más de un año de vivir en la finca y también entre los que habían vivido antes en otras fincas lecheras y los que no habían vivido antes en otras fincas lecheras ( $p < 0.01$ ). No se encontró diferencia significativa en seropositividad entre los otros grupos por clase. (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Porcentajes de seropositividad por grupos de ocupación, edad, contacto con vacunos, tiempo de residencia y residencia previa en otras fincas para VEV-NJ en el área de Tilarán

<b>CLASE</b>	<b>GRUPO</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>Ocupación</b>	Agrícola	30.43
	Familiares	6.89
	Otros	66.66
<b>Edad</b>	0-10 años	0
	10-20 años	10.52
	20-60 años	34.61
	> 60 años	100.00
<b>Contacto con vacunos</b>	Directo	32.30
	Indirecto	5.26
<b>Tiempo de residencia</b>	< 1 año	8.82
	> 1 año	38.00
<b>Residencia previa</b>	Vivió en otras lecherías	15.78
	No vivió en otras lec.	34.78

### 3.3.2. VEV-IN

En el área de Tilarán la seropositividad fue más baja que en el área de Poás, de 84 sueros analizados en Tilarán, 22 fueron positivos a VEV-NJ y solo 3 sueros fueron positivos a

VEV-IN. Debido al bajo número de sueros positivos a VEV-IN no se pudo encontrar diferencia significativa al comparar los diferentes grupos por clase.

### 3.3.3. Comparación VEV-NJ y VEV-IN

En cuanto a la comparación de serotipos por grupo, se determinó una diferencia significativa en cuanto a la seropositividad a VEV-NJ y VEV-IN en los tres grupos ocupacionales con una  $p < 0.01$ . En cuanto a los grupos de edad se encontraron diferencias significativas en el grupo de 10-20 años y 20-60 años con una  $p < 0.01$ .

El grupo de personas con más de 1 año de residencia en las fincas dónde laboraban mostró mayor número de seropositivos que el grupo de personas que tenían menos de un año de residir en las fincas.

## 4. DISCUSION

Con el presente trabajo se demostró que la población humana que trabaja y/o reside en fincas lecheras del área de Poás y Tilarán muestran anticuerpos contra el VEV-NJ y VEV-IN.

En ambas áreas el serotipo de mayor prevalencia fue el VEV-NJ, con una seroprevalencia de 40.80% para Poás y 26.19% Tilarán, mientras que la prevalencia de VEV-IN fue del 16.66% y 3.57% para Poás y Tilarán, respectivamente. Los datos concuerdan con lo encontrado por Cornelissen y Pérez (1987), quienes reportaron un porcentaje Omega de 64.95 para VEV-NJ y 11.36 para VEV-IN en suero bovino, por lo que consideraron más frecuente al VEV-NJ en Costa Rica.

La seroprevalencia determinada en el presente estudio también concuerda con la seroprevalencia encontrada por el Middle América Research Unit (MARU), institución que analizó 20000 sueros humanos colectados en 5 países de Centroamérica y Panamá. Los sueros correspondían a personas de 189 comunidades rurales, y en un 48% de los sueros se pudieron determinar anticuerpos neutralizantes contra VEV- NJ y en un 18% contra VEV-IN ( Cline, 1976).

La diferencia significativa determinada entre los grupos ocupacionales para el área de Poás y Tilarán es diferente. En Poás, tanto para VEV-NJ como para VEV-IN, el grupo de trabajadores agrícolas muestra mayor porcentaje de seropositividad, seguido por el grupo otros y por último el grupo de familiares residentes.

En contraste, en el área de Tilarán el grupo otros es el que muestra mayor porcentaje de seropositividad, tanto para VEV-NJ como para VEV-IN, seguido por el grupo de trabajadores agrícolas y por último del grupo de familiares residentes para VEV-NJ. Para VEV-IN el grupo otros es seguido por el grupo de familiares residentes y finalmente por el grupo de trabajadores agrícolas. Esta diferencia podría deberse por un lado a que el VEV tenga diferentes ciclos de vida en las áreas de Poás y Tilarán, o por el otro lado a que en el grupo de otros se incluyen a administradores de finca, los cuales en el área de Tilarán

tienen más contacto con el ganado. En el área de Tilarán, el manejo de la finca está a cargo del dueño de la finca o de un familiar cercano, quien vive en la finca y la administra, mientras que en el área de Poás los administradores no tienen tanto contacto con el ganado. Finalmente la diferencia se puede haber debido también al tamaño de la muestra. Los resultados concuerdan con lo expuesto por Reif *et al.* (1987), quien mencionó que personas usualmente afectadas durante epizootias son veterinarios, finqueros, trabajadores de finca y personal de laboratorio. Como factor de riesgo cita el contacto con animales infectados. Estudios serológicos a personal de laboratorio y trabajadores de campo expuestos al VEV demostraron rápida seroconversión y altas tasas de seroprevalencia. Para la misma epizootia, Webb *et al.* (1987), mencionó que solo se confirmaron casos de VEV en personas que tenían contacto íntimo o prolongado con animales infectados como es el caso de los ordeñadores.

Otro estudio realizado en Panamá por Brody *et al.* (1967) durante un brote de VEV-NJ determinó anticuerpos en el 71 % de personas que trabajaban con hatos bovinos infectado, mientras que el porcentaje de seropositividad de los que no trabajaron con bovinos infectados fue mucho menor.

Un estudio realizado en Costa Rica por Alvarado, (1999) detectó seropositividad de 37.1 % para VEV-NJ y 13.7 % para VEV-IN en sueros bovinos de la región de Poás, lo cuál es similar a lo encontrado en sueros humanos en este estudio.

Se pudo determinar además para ambas áreas y para ambos serotipos, que las personas que tuvieron contacto directo con vacunos tuvieron porcentajes de seropositividad mayores que personas que tuvieron contacto indirecto. Esto sugiere que el riesgo de infección está relacionado con el contacto.

En ambas áreas de estudio en Costa Rica se encontró que el porcentaje de seropositividad aumenta con la edad tanto para el VEV-NJ como para el VEV-IN. Esto concuerda con lo encontrado por Tesh *et al.* (1969), quien menciona un aumento de la prevalencia de anticuerpos con la edad en la población humana de El Aguacate, Panamá. **Esto lo atribuyen a que VEV-NJ y VEV-IN son endémicos en El Aguacate y explica el que a mayor edad, existe mayor probabilidad de haber tenido contacto con el virus. Los resultados encontrados en el presente trabajo sugieren lo mismo, que VEV-NJ y VEV-IN son endémicos en Poás y Tilarán.** También la relación directa que se encontró entre la tasa de infección con VEV y el tiempo de residencia en la comunidad, en el área de Tilarán sugiere según Tesh *et al.* (1969), que el VEV-NJ y VEV-IN es endémico en Tilarán.

## 5. REFERENCIAS

- Alvarado, F. 1999.** Respuesta inmune humoral del virus de estomatitis vesicular (*serotipos New Jersey e Indiana*) en bovinos de la región de Poás, Costa Rica. M.Sc.Tesis,. Posgrado en Ciencias Veterinarias Tropicales, Universidad Nacional, Costa Rica.
- Brody J.A., Fischer G.F. y Peralta P.H. 1967.** Vesicular stomatitis virus in Panamá: Human serologic patterns in a cattle raising area. *Am. J. Epidemiol.* 86: 158-161.
- Cline B. 1976 .** Ecological associations of vesicular stomatitis virus in rural Central America and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25:875-882.
- Cornelissen B.P.M. y Pérez E. 1987.** Algunos aspectos del comportamiento epidemiológico de la estomatitis vesicular (E.V.) en Costa Rica. Estudio Retrospectivo, 1972-1986. *Ciencias Veterinarias* 9: 143-151.
- Fellowes O.N., Dimopoulos, G.T. and Callis, J.J. 1955.** Isolation of vesicular stomatitis virus from an infected laboratory worker. *Am. J. Vet. Res.*16: 623-626.
- Fenner F.J., Gibbs E.P., Murphy, F.A., Rott R., Studdert M.J. and White D.O. 1993.** *Veterinary Virology.* Academic Press Inc, San Diego, California.
- Fields B.N., Nipe D.M. y Howley P.M. 1996.** *Virology*, 3 ra edición, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia.
- Herrera W. 1985.** Clima de Costa Rica. Vegetación y Clima de Costa Rica. Vol. 2. EUNED. San José, C.R. 118 pp.
- Jiménez A. E., Jiménez C., Castro L. and Rodriguez L.L. 1996.** Serological survey of small mammals in a vesicular stomatitis virus enzootic area. *J. Wildf. Dis.* 32: 274-279.
- Quiroz E., Moreno N., Peralta P.H., and Tesh R.B. 1988.** A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39:312-314.

- Reif J.S., Webb P.A., Monath T.P., Emerson J.K., Poland J.D., Kemp G.E. and Cholas G. 1987.** Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: infection in occupational risk groups. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 177-182.
- Rodriguez L. L., Vernon S., Morales A.I. and Letchworth G. J. 1990.** Serological monitoring of vesicular stomatitis New Jersey virus in enzootic regions of Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42:272-281.
- Tesh R.B., Peralta P.H. and Johnson K.M. 1975.** Vesicular stomatitis. Diseases transmitted from animals to man. (Hubbert W.T. McCulloch W.F. Schnurrenberger P.R. eds) Springfield, Illinois: C.C Thomas, 897-910. UI:7500492
- Yuill, T.M. 1980.** Vesicular stomatitis. Pages 125-142 in J. H. Steele and G. W. Beran, eds., *CRC Handbook Series in Zoonoses. Section B: Viral Zoonoses I.* CRC Press, Boca Raton, Florida.

# ARTICULO 2

**COMPARACION DE UN ELISA COMPETITIVO Y LA  
SERONEUTRALIZACION PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA  
EL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR (serotipos *New Jersey e Indiana*)  
EN HUMANOS**

**RESUMEN**

Se compararon las pruebas diagnósticas de inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA-c) y seroneutralización (SN) para la detección de anticuerpos contra el VEV-NJ y VEV-IN analizando 255 sueros humanos procedentes de fincas lecheras de las regiones de Poás y Tilarán, Costa Rica. Para el VEV-NJ la prueba de SN detectó 95 sueros positivos (37%) y 160 sueros negativos (63%), mientras que la prueba de ELISA-c detectó 81 sueros positivos (32%) y 174 sueros negativos (68%). La prueba de ELISA-c mostró una sensibilidad de 79% y una especificidad del 96% asumiendo la SN como prueba de oro, además la prueba J de Youden determinó una concordancia de 0.75 entre ambas pruebas para el VEV-NJ.

Para el VEV-IN, la prueba de seroneutralización detectó 32 sueros positivos (13%) y 223 sueros negativos (87%), mientras que la prueba de ELISA-c detectó 56 sueros positivos (22%) y 199 sueros negativos (78%). El ELISA-c mostró una sensibilidad del 94% y una especificidad del 88% asumiendo la seroneutralización como prueba de oro y la J de Youden determinó una concordancia de 0.82 entre ambas pruebas para VEV-IN.

Además, se estandarizó y utilizó un Western Blot para la confirmación de resultados de sueros que mostraron resultados incongruentes en las pruebas de ELISA-c y seroneutralización. El WB confirmó positivos el 100% de los 15 sueros con resultados incongruentes en las pruebas de seroneutralización y ELISA-c (13 sueros positivos en SN y negativos en ELISA-c y 2 sueros negativos en SN y positivos en ELISA-c). Estos sueros mostraron anticuerpos contra las diferentes proteínas virales G, N, P, y M del VEV-NJ.

**PALABRAS CLAVES**

**Estomatitis vesicular, seroneutralización, ELISA-c, Western Blot, humanos, Costa Rica.**

## 1. INTRODUCCION

La estomatitis vesicular es una enfermedad viral que ocurre en forma enzoótica y epizootica en áreas tropicales y subtropicales de América. Afecta a bovinos, suinos, equinos y humanos (Hanson *et al.*, 1952; Nichol, 1994).

El virus de la estomatitis vesicular (VEV) pertenece al orden Mononegavirales, familia Rhabdoviridae y al género Vesiculovirus (Wagner y Rose, 1996). Los VEV son virus en forma de bala de 100 a 430 nm de largo y 45 a 100 nm de diámetro. Tienen dos componentes estructurales, la envoltura y la nucleocápside. Ambas unidades estructurales contienen proteínas (Fields *et al.*, 1996). Poseen un genoma ARN negativo (complementario a ARN mensajero) y se replican en el citoplasma de la célula infectada (Kucera y Myrvick, 1985, citados por Van Regenmortel y Neurath, 1990). La envoltura está compuesta por una bicapa lipídica en la que se encuentran peplómeros de proteína G (glicoproteína) y proteína M (matriz). La nucleocápside muestra una simetría helicoidal con un diámetro de 30 a 70 nm (Fields *et al.*, 1996). La nucleocápside contiene una hebra simple de ARN negativa encerrada por la proteína N (nucleoproteína) a la cual se encuentran asociadas las proteínas L (polimerasa ARN-ARN dependiente) y P (fosfoproteína) (Fenner *et al.*, 1993 ; Emerson, 1976; Van Regenmortel y Neurath, 1990).

El VEV contiene 5 proteínas estructurales. La proteína G se encuentra en la superficie externa de los rhabdovirus (excepto en la parte planar) en forma de espículas o proyecciones (peplómeros formados por trímeros) de 5 a 10 nm de largo y 3 nm de diámetro. En el VEV-NJ contiene 517 aminoácidos y en el VEV-IN contiene 511 aminoácidos. Esta proteína es el principal determinante antigénico, responsable de la especificidad del tipo (serotipo) y la producción de anticuerpos neutralizantes. Solo existe un 50 % de homología a nivel de aminoácidos entre la proteína G de los dos serotipos principales, VEV-NJ y VEV-IN (Fields *et al.*, 1996). El antígeno G es el responsable de la unión del virus al receptor putativo celular durante la infección por lo que los anticuerpos contra la proteína G en general inhibirán la infección (Wunner *et al.*, 1985b, citado por Van Regenmortel y Neurath, 1990).

Se han encontrado 4 epitopos antigénicos en cada proteína G los cuales reaccionan con anticuerpos monoclonales neutralizantes. Estos anticuerpos neutralizantes no muestran reacción cruzada entre las proteínas G de los 2 serotipos New Jersey e Indiana. Existe un quinto epitopo compartido por ambas proteínas G (Fields *et al.*, 1996). También se han definido epitopos no neutralizantes para la proteína G de ambos serotipos, y la mayoría de anticuerpos monoclonales usados para identificar estos epitopos, muestran reacción cruzada entre los dos principales serotipos New Jersey e Indiana.

La proteína de matriz (proteína M) del VEV contiene 202 aminoácidos. Su función es la de regular negativamente la síntesis de ARN viral y se propone que su función principal es la

de interactuar con el dominio citoplasmático de la proteína G y la ribonucleoproteína durante el ensamblaje del virus y el proceso de gemación (Fields *et al.*, 1996).

La proteína N del VEV contiene 422 aminoácidos y es el antígeno común de grupo para el género vesiculovirus. Existe una homología del 68% a nivel de aminoácidos entre los dos serotipos principales New Jersey e Indiana (Fields *et al.*, 1996).

La proteína P contiene 274 aminoácidos en el VEV-NJ y 265 aminoácidos en el VEV-IN, y solo muestra un 33% de homología a nivel de aminoácidos entre los dos principales serotipos New Jersey e Indiana. Esta proteína presenta múltiples sitios de fosforilación (Fields *et al.*, 1996).

La proteína L es la proteína más grande de los rhabdovirus y contiene 2109 aminoácidos en el VEV. Entre sus funciones están la síntesis de ARN, metilación y polyadenilación de ARN viral (Fields *et al.*, 1996).

Los valores de masa para las cinco proteínas virales del VEV-NJ y VEV-IN son los siguientes: proteína L=150 kDa, proteína G=70-80 kDa, proteína N=50-62 kDa, proteína P=40-50 kDa, proteína M=20-30 kDa (Fenner *et al.*, 1993).

Para la detección de anticuerpos contra la estomatitis vesicular se han desarrollado diferentes pruebas diagnósticas, siendo las más utilizadas la seroneutralización (SN), la fijación de complemento (FC) y las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) (Katz *et al.*, 1987; Ferris y Donaldson, 1988; Alonso *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 1993, citados por Alvarado 1999). Los ensayos de neutralización se basan en el principio de que los anticuerpos virales se unen específicamente al virus con un resultado neutralizante de la infectividad viral. (Burlison *et al.*, 1992). La SN detecta anticuerpos neutralizantes contra el VEV-NJ y VEV-IN. Esta prueba ha sido ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos en humanos en estudios realizados en Panamá, Centroamérica y Colorado (E.U.A.) (Tesh *et al.*, 1969; Cline, 1976; Walton *et al.*, 1987; Reif *et al.*, 1987; Webb *et al.*, 1987 y Quiroz *et al.*, 1988). También se ha utilizado para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VEV serotipo Alagoas en humanos en Colombia (Tesh *et al.*, 1987). En los trabajos anteriormente citados se realizaron pruebas de neutralización en monocapas de células VERO, utilizando el método de reducción de placa.

La desventaja que presenta la SN es que requiere de un laboratorio con capacidad para el manejo de cultivos celulares, condiciones asépticas y mantenimiento de virus vivo, lo cual constituye un riesgo para la salud del personal de laboratorio, además de que se requiere de dos a tres días para obtener el resultado (Afshar *et al.*, 1993<sup>a</sup>, citado por Alvarado 1999).

La FC es la prueba más usada para el diagnóstico específico y para determinar infección temprana. Sin embargo, dificultadas en la detección de anticuerpos de suinos, especies silvestres y algunos bovinos mediante FC hicieron, que se empezaran a utilizar otras pruebas como la técnica de ELISA (Workman *et al.*, 1986, citado por Monath, 1988).

Recientemente se han reportado en la literatura diferentes tipos de ELISA para la detección de anticuerpos contra el VEV-NJ y VEV-IN. Sin embargo, no se ha encontrado en la

literatura estudio alguno que investigara la infección de VEV en humanos y que utilizara este tipo de prueba. En 1986 Workman *et al.* desarrollaron un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra el VEV-NJ, utilizando animales infectados experimentalmente con VEV-NJ, y el cual se caracterizó por ser una prueba sensible, rápida y fácil de realizar. En 1993 Afshar *et al.* describieron un ELISA competitivo (ELISA-c) para la detección de anticuerpos contra VEV-NJ y VEV-IN, basados en la competencia de anticuerpos policlonales producidos en fluidos ascíticos de ratón. Usando antígenos específicos de serotipo del VEV en el ELISA-c esta técnica podía sustituir la seroneutralización (citado por Alvarado, 1999). Las ventajas que tiene la prueba ELISA es que no requiere de equipo sofisticado, que existe menos riesgo de infección y que es una prueba rápida (3 ó 4 horas).

Cuando se realizan pruebas serológicas rápidas como el ELISA, los resultados de estas pruebas generalmente se comparan con los resultados de pruebas de neutralización. Debe tenerse presente, que las pruebas rápidas normalmente detectan anticuerpos unidos a diferentes epitopos, mientras que las pruebas de neutralización solo detectan anticuerpos unidos a epitopos neutralizantes.

El hecho de que la prueba ELISA detecta anticuerpos unidos a diferentes epitopos virales aumenta la oportunidad de detectar anticuerpos que se encuentran en el suero en etapas tempranas post infección y que no son necesariamente neutralizantes. En estos casos los sueros tempranos producen resultados negativos en la neutralización y positivos en el ELISA (Dinter, 1989).

En 1999 Alvarado comparó el ELISA-c con la SN (prueba de oro) analizando 1106 sueros bovinos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: el ELISA-c de VEV-NJ demostró tener una sensibilidad del 87,8%, especificidad del 99,0%, valor predictivo positivo del 98,0%, valor predictivo negativo del 92,2% y un Kappa de 0.89, mientras que el ELISA-c del VEV-IN mostró una sensibilidad del 63,6%, especificidad del 98,2%, valor predictivo positivo del 85,0%, valor predictivo negativo del 94,5% y un Kappa de 0.70.

Alvarado (1999) encontró similitud diagnóstica entre las pruebas de SN y ELISA-c para el VEV-NJ, ya que el 95 % de los sueros (1049) fueron concordantes en ambas pruebas y únicamente el 5 % de los sueros (57) mostraron resultados incongruentes, estableciendo una concordancia entre SN y ELISA-c de 0,89, es decir que el ELISA-c tiene una similitud diagnóstica del 89 % comparado con la SN. Para el VEV-IN la concordancia encontrada entre SN y ELISA-c fue de 0,70, lo que quiere decir que el ELISA-c tiene una similitud diagnóstica del 70% comparado con la SN.

Otras técnicas serológicas que han sido utilizadas en el estudio del VEV son la inmunodifusión, inmunofluorescencia, aglutinación e inmunoelectrosmoforesis (Wilks *et al.*, 1984 citado por Monath 1988).

El Western Blot (WB) se ha convertido en una herramienta analítica común para la detección de proteínas virales, caracterización de anticuerpos monoclonales y policlonales y para determinar la especificidad de la respuesta inmune a antígenos virales. En el WB las proteínas virales se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfieren

electroforéticamente a papel de nitrocelulosa, y las proteínas individuales se detectan inmunológicamente (Burlison, 1992).

Alvarado (1999) analizó mediante WB sueros bovinos con resultados incongruentes en SN y ELISA-c y determinó para el VEV-NJ, que 50 sueros considerados negativos en ELISA-c y positivos en SN, 23 resultaron negativos y 27 se confirmaron positivos en WB. Estos sueros mostraron en WB anticuerpos contra las proteínas virales G,N,P y M. Los sueros que resultaron negativos a WB no mostraron bandas o mostraron bandas inespecíficas en la región de 55 y 60 kDa.

El presente trabajo tuvo como objetivo la comparación de las pruebas de Elisa-c y SN para la detección de anticuerpos contra el VEV-NJ y VEV-IN en humanos residentes en 2 zonas lecheras de Costa Rica, utilizando la seroneutralización como prueba de referencia y el WB como prueba confirmatoria para los sueros que presentaron resultados incongruentes en Elisa-c y SN para VEV-NJ.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. Sueros humanos**

Se utilizaron 255 muestras de suero humano provenientes de las zonas de Poás y Tilarán. Las muestras de sangre se colectaron durante Junio, Julio y Agosto de 1999. A cada persona se le extrajo aproximadamente 2 ml de sangre por punción venosa. Las muestras de sangre se colocaron en tubos vacutainer sin anticoagulante y con etiqueta. Se mantuvieron en una hielera con hielo por varias horas y se centrifugaron al finalizar el día de muestreo en una centrífuga portátil a 5000 r.p.m. por 10 minutos. El suero se guardó en tubos Eppendorf en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de correr las pruebas.

### **2.2. Pruebas de laboratorio**

Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Las muestras de suero se analizaron mediante test de seroneutralización, ELISA competitivo (ELISA-c) y Western Blot (WB).

#### **2.2.1. Seroneutralización**

Los sueros se analizaron mediante la prueba de seroneutralización (SN) en placas de microtítulo, por duplicado, se probaron en diluciones en base de dos de 1:8 hasta 1:32768 según lo descrito por Rodríguez *et al.* (1990). Paralelamente se corrieron control de virus (CV), control de células (CC), control de suero positivo (C+) y control de suero negativo (C-). Los sueros se diluyeron con medio esencial mínimo Dulbecco- MEM (D-MEM). A cada pozo se le añadió de 100-200 TCID<sub>50</sub> de VEV-NJ o VEV-IN, que se obtuvo de virus propagado en células VERO-E6 en el Lab. de Virología. La mezcla suero-virus se incubó por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  6%CO<sub>2</sub>, luego del período de incubación se añadieron células VERO-E6. Las placas se volvieron a incubar por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  6%CO<sub>2</sub>, y se leyeron 48 horas

después, para determinar el efecto citopático. Se consideró un suero como positivo, si a títulos de 1:8 en adelante el virus fue neutralizado por los anticuerpos del paciente.

### **2.2.2. ELISA-c**

El Elisa-c se realizó según protocolo del Centro de Biología Veterinaria y Servicio Nacional de Laboratorios Veterinarios (NSLD, Ames, Iowa, EEUU), con algunas modificaciones:

El antígeno recombinante (proteína N) del VEV-NJ y VEV-IN se diluyó 1: 2500 en PBS 0.01M, pH 7,4, se agregó 75 µl a cada pozo de una placa de microtítulo Polysorb (Fa. Nunc) menos en los pozos G11 y G12, que se utilizaron como blancos, y luego se incubó a 4°C durante 16 horas. Se decantó el contenido de la placa, y ésta se bloqueó utilizando PBS 0.01M, 5% de leche en polvo sin grasa (NFDM), 100µl por pozo, se incubó por una hora a 37°C con agitación constante y finalmente las placas se lavaron 3 veces con PBS 0,002M, 0,05% Tween-20. Los sueros a probar se diluyeron 1:8 en PBS 0,01M, 1% NFDM, agregando por duplicado 50µl a cada pozo, menos en los pozos A1-2 (control del diluyente), G11-12 (blanco) y H11-12 (control positivo). Posteriormente se incubaron a 37°C por 30 minutos con agitación constante. Los anticuerpos policlonales anti-VEV se diluyeron a 1:2500 en PBS 0,01M, 1% NFDM, se agregó 50 µl por pozo y se incubó a 37°C por 30 minutos con agitación constante. Las placas se lavaron 3 veces y se depositaron 50 µl por pozo del conjugado cabra anti-IgG (H+L) ratón-peroxidasa ( $\alpha$  ratón-HRP, Fa. Zymed), diluido 1:450 en 0,01M PBS, 1% NFDM, 12.5% suero de cabra y se incubó la placa a 37°C por una hora con agitación. Posteriormente se procedió a lavar de nuevo la placa 3 veces. Finalmente se mezcló 1,0 mg de 3,3,5,5-Tetrametilbencidina dihidrocloruro (TMB), 20µl de peróxido de hidrógeno al 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en 10 ml de tampón fosfato-citrato 0,05M, pH 5, y se agregó 50µl de esta mezcla por pozo. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2M a los 15 minutos para el VEV-IN y a los 60 minutos para VEV-NJ. Inmediatamente se procedió a leer las densidades ópticas de los pozos de las placas en el lector ELISA a 450 nm. Los resultados se interpretaron como porcentajes de reducción de la densidad óptica (DO). El control de diluyente (A1-2) se consideró como 0% de reducción. Para calcular el porcentaje de reducción se multiplicó el promedio de las densidades ópticas del suero por 100 y se dividió entre el promedio de las densidades ópticas del diluyente. A este resultado se le restó 100, se le cambió el signo y este resultado final se estableció como el porcentaje de reducción.

### **2.2.3. Western Blot**

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó según el método descrito por Laemmli (1970), utilizando geles discontinuos verticales (8x8 cm), con geles espaciadores (Tris HCL 0.5M, pH 6,8) de 4% y geles separadores (Tris HCL 1.5M, pH 8,8) de 12 %.

Como muestra se utilizó VEV-NJ o VEV-IN, concentrados previamente por ultracentrifugación (200µg / 100µl), los cuales se diluyeron 1:1 con solución de muestra (Tris HCL 0,01M, pH 6,8, 2% SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol y 0.02 de azul de bromofenol). Las muestras se sometieron a temperatura de ebullición por 5

minutos, y posteriormente se depositaron 200  $\mu$ l de las muestras sobre el gel espaciador utilizando una jeringa Hamilton.

La fase inicial de la electroforesis se realizó con un voltaje de 75 voltios (voltaje constante) mientras las muestras corrieron por el gel espaciador, y se aumentó el voltaje a 100 al iniciar el paso de proteínas virales al gel separador. Al momento en que faltaba 1 cm para que las proteínas terminaran de correr se agregó 25  $\mu$ l de verde de metilo 0,03% en 30% de glicerol. La transferencia de proteínas virales a la nitrocelulosa se llevó a cabo según la técnica de Towbin *et al.* (1979), requiriéndose de un tampón de transferencia (0,025 M Tris- Base, 0,192 M glicina, 20 % de metanol, pH 8,3) y un equipo de Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, durante 6 horas a corriente constante (70mA). Terminada la transferencia, la nitrocelulosa se introdujo en una solución de caseína hidrolizada al 4 % durante 6 horas a temperatura ambiente en agitación constante. Después de la fase de bloqueo, la nitrocelulosa se guardó en una solución de 50% glicerol, PBS, para posteriormente ser utilizada en el WB. Para realizar el WB, la nitrocelulosa sensibilizada con VEV-NJ o VEV-IN se cortó en tiras de 3mm de ancho y se procedió a lavarla tres veces con PBS 0.002M, 0,05% Tween-20 por 10 minutos, luego se agregaron los sueros a probar en una dilución de 1:50 en PBS 0,01 M, 0,05% Tween-20, pH 7,4, y se incubaron a temperatura ambiente en agitación constante durante 12 a 16 horas. Se procedió a lavar 3 veces por 10 minutos para luego agregar el conjugado cabra anti IgG humano (IgG (H+L)-POD) en una dilución de 1:20000 en PBS 0,01M, 0.05% Tween-20, y se incubó por 3 horas a temperatura ambiente, en agitación constante. Posteriormente se realizó otra fase de lavado, se agregó el sustrato (10mg de 3,3 diaminobencidina en 20 ml Tris-Base 0,01M, 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3%), se puso en agitación constante y se esperó a que las bandas aparecieran en la tira de nitrocelulosa. La reacción se paró con agua destilada.

### **2.3. Análisis de datos**

Los sueros se analizaron mediante pruebas de seroneutralización, ELISA competitivo y Western Blot para determinar anticuerpos contra los 2 serotipos VEV-NJ y VEV-IN. El análisis de datos se realizó con un número de 255 sueros humanos.

El ensayo de seroneutralización generó datos dicotómicos, positivos y negativos, y datos numéricos discontinuos relativos a los títulos de anticuerpos. Se tomó como muestra positiva la que mostró un título de anticuerpos de 1: 8 o mayor y se tomó como muestra negativa la que no mostró título de anticuerpos en las diluciones igual o mayor a 1:8.

El ELISA también generó datos dicotómicos, positivos y negativos y datos numéricos continuos de porcentajes de reducción de la densidad óptica. El punto de corte del ELISA-c para VEV-NJ y VEV-IN se obtuvo calculando la media de los porcentajes de reducción de sueros negativos en SN a VEV-NJ y VEV-IN, respectivamente, a los cuales se les sumaron tres desviaciones estandar, obteniéndose los siguientes puntos de corte: 29.66 para VEV-NJ y 9.57 para VEV-IN.

La determinación de la sensibilidad, especificidad y concordancia por J de Youden del ELISA-c se realizó por medio del programa Win Episcopy 2.0 (Trusfield *et al.*, 2001), utilizando como prueba de oro la prueba de seroneutralización.

El Western Blot generó datos dicotómicos, positivo o negativo. Se realizó la prueba de WB a 15 sueros con resultados incongruentes en las pruebas de SN y ELISA-c para el VEV-NJ. Se determinó una muestra como positiva al VEV-NJ cuando se encontró una de las bandas específicas; en este caso anticuerpos contra las proteínas G, N, M ó P (la proteína G con un peso molecular (PM) de 63 kDa, la proteína N con un PM de 47 kDa, la proteína M con un PM de 26 kDa y la proteína P con un PM de 30 kDa).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. VEV-NJ

De un total de 255 sueros analizados, la prueba de SN detectó 95 (37.2 %) sueros positivos y 160 ( 62.8% ) sueros negativos al VEV-NJ, mientras que la prueba de ELISA-c detectó 81 (31.8%) sueros positivos y 174 (68.2%) sueros negativos al VEV-NJ (Cuadro 1). Comparado con la SN el ELISA-c mostró una sensibilidad del 78.90% y una especificidad del 96.25%, un valor predictivo positivo (VPP) de 92.59%, un valor predictivo negativo (VPN) de 88.50% y un valor de concordancia para ambas pruebas de 0.75 (Cuadro 2).

**Cuadro 1:** Detección de anticuerpos contra el VEV-NJ en 255 sueros humanos mediante pruebas de SN y ELISA-c

#### SERONEUTRALIZACION

E L I S A	SERONEUTRALIZACION		Σ
	+	-	
+	75 (29.4%)	6 (2.3%)	81 (31.76%)
-	20 (7.8 %)	154 (60.4 %)	174 (68.2%)
Σ	95 (37.2%)	160 (62.7 %)	255

**Cuadro 2.** Evaluación de la prueba ELISA-c para el VEV-NJ con respecto a la prueba de SN con 255 sueros humanos

Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	J de Youden
78.90	96.25	92.59	88.50	0.75

15 sueros con resultados incongruentes en las pruebas de ELISA-c y SN, los cuales fueron analizados en WB, dieron los siguientes resultados: 13 sueros con resultados negativos en ELISA-c y resultados positivos en SN (títulos entre 1:8 a 1:512) reaccionaron todos positivos en WB, mostrando anticuerpos contra las diferentes proteínas virales G (12 sueros), N (11 sueros), P(8 sueros) y M (4 sueros). 2 sueros con resultados negativos en SN y resultados positivos en ELISA-c reaccionaron positivos en WB, uno de los sueros mostró anticuerpos contra las proteínas G y N, mientras que el otro suero mostró anticuerpos contra las proteínas P y N. Los anticuerpos contra la proteína G del VEV-NJ se mostraron en WB como bandas siempre fuertes y de un grosor más ancho comparado a las bandas N,P, y M.

### 3.2. VEV-IN

De un total de 255 sueros analizados, la prueba de SN detectó 32 (12.6%) sueros positivos y 223 (87.4%) sueros negativos al VEV-IN, mientras que la prueba de ELISA-c detectó 56 (22.0%) sueros positivos y 199 (78.0%) sueros negativos (Cuadro 3). Comparado con la SN, el ELISA-c mostró una sensibilidad del 93.75% y una especificidad de 88.34%, VPP de 53.57%, VPN de 98.99% y un valor de concordancia para ambas pruebas de 0.82, (Cuadro 4).

**Cuadro 3:** Detección de anticuerpos contra el VEV-IN en 255 sueros humanos mediante las pruebas de SN y ELISA-c

<b>SERONEUTRALIZACION</b>				
<b>E L I S A</b>		+	-	$\Sigma$
	+	30 (11.8%)	26 (10.2%)	56 (22.0%)
	-	2 (0.8%)	197 (77.2%)	199 (78.0%)
	$\Sigma$	32 (12.6%)	223 (87.4%)	255 (100%)

**Cuadro 4.** Evaluación de la prueba ELISA-c para el VEV-IN con respecto a la prueba de SN con 255 sueros humanos

Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	J de Youden
93.75	88.34	53.57	98.99	0.82

#### 4. DISCUSION

Con los resultados obtenidos en SN y ELISA-c para el VEV-NJ se pudo demostrar una similitud diagnóstica buena entre las dos pruebas, ya que un total de 229 sueros (89.8%) fueron concordantes en ambas pruebas y únicamente 26 sueros (10.2%) mostraron resultados incongruentes en ambas pruebas. La concordancia entre SN y ELISA-c fue de 0.75, es decir que el ELISA-c tiene una similitud diagnóstica del 75% comparado con la SN. También se demostró que el ELISA-c tiene una capacidad aceptable para diagnosticar verdaderos positivos y una capacidad aceptable para detectar verdaderos negativos, lo que concuerda con lo reportado por Eernisse *et al.* (1996) y Alvarado (1999), quienes determinaron una sensibilidad del 88% y 87.8%, respectivamente y una especificidad del 99%, comparado con la SN.

Para el serotipo Indiana la concordancia entre SN y ELISA-c fue de 0.82 es decir que el ELISA-c tiene una similitud diagnóstica del 82% al compararse con la Seroneutralización. También se demostró que el ELISA-c tiene una capacidad aceptable para diagnosticar verdaderos positivos ya que tiene una sensibilidad del 93.75 % y una capacidad aceptable para detectar verdaderos negativos, ya que presenta una especificidad del 88.34 % lo que concuerda con lo reportado por Eernisse *et al.* (1996), quienes afirman que el ELISA-c tiene una sensibilidad del 88 % y una especificidad del 99 % al compararse con la SN..

De los 15 sueros con resultados incongruentes que se corrieron en Western Blot (WB), 13 sueros mostraron resultados congruentes entre SN y WB. En el WB para sueros incongruentes que fueron positivos en SN y negativos para el ELISA-c, se detectaron con más frecuencia anticuerpos contra la proteína G del VEV-NJ (92 %) y con menor frecuencia anticuerpos contra las proteínas N(85%), proteína P (62%), y proteína M (31%). Se pudo observar que los anticuerpos de la proteína N se presentaron como bandas tenues en WB, lo que probablemente se debió a una baja concentración de anticuerpos contra dicha proteína viral

En contraste los anticuerpos contra la proteína G se presentaron generalmente como bandas fuertes, lo que hace suponer que la concentración de anticuerpos contra la proteína G es siempre alta.. Esto podría explicar porque 13 sueros detectados positivos en SN y WB, fueron negativos en Elisa-c, o sea que esta última prueba falló en detectarlos.. Esto podría deberse a que el título de anticuerpos contra la proteína N estaba por debajo de los límites de detección del ELISA-C, sin embargo el WB pudo detectar estos bajos niveles de anticuerpos contra la proteína N (Buenger *et al.*,1994). Las bandas contra las proteínas P y M también fueron muy tenues en el WB.

La incongruencia mostrada por ambas pruebas puede deberse a que ambas pruebas están detectando proteínas diferentes, la prueba de Seroneutralización detecta la proteína G mientras que la prueba de ELISA-c detecta anticuerpos contra la proteína N.

Los WB realizados, mostraron siempre una banda G fuerte, razón por la cual esta prueba confirmó el 100 % de sueros positivos por SN y negativos por ELISA-c.

Los dos sueros que tuvieron resultado positivo en ELISA-c y negativo en SN, fueron confirmados positivos por WB, estos falsos negativos en SN pudieron deberse a una baja concentración de anticuerpos contra la proteína G, sin embargo el WB demostró que la proteína G es la proteína antigénica más importante en humanos.

Con los resultados preliminares obtenidos en WB para el VEV-NJ se puede concluir que la diferencia en los resultados obtenidos en SN y ELISA.c se debieron probablemente a que los anticuerpos detectados por ambas pruebas son diferentes, ya que la prueba de SN se miden los títulos de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína G, mientras que los anticuerpos detectados en el ELISA-c son los anticuerpos dirigidos contra la proteína N. El hecho de que el ELISA no logró detectar como positivos algunos sueros, se puede deber a que los títulos de anticuerpos contra la proteína N de estos sueros estuvo por debajo de los límites de detección del ELISA-c.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, nos permiten concluir que el ELISA -c puede ser una prueba prometedora para ser utilizada en la detección de anticuerpos contra el VEV-NJ y VEV-IN ya que presenta una sensibilidad y especificidad aceptable. Además es una prueba que requiere de equipo menos sofisticado y no requiere personal tan especializado como el requerido para las pruebas de seroneutralización, pudiéndose obtener los resultados en menor tiempo en comparación con la SN.

## REFERENCIAS

- Alvarado, F. 1999.** Respuesta inmune humoral del virus de estomatitis vesicular (*serotipos New Jersey e Indiana*) en bovinos de la región de Poás, Costa Rica. Tesis. Posgrado en Ciencias Veterinarias Tropicales, Universidad Nacional, Costa Rica.
- Atwill, E.R., L.L. Rodríguez, Hird, D.W. & Rojas, O. 1993.** Environmental and host factors associated with seropositivity to New Jersey and Indiana vesicular stomatitis viruses in Costa Rica cattle. *Prev. Vet. Med.* 15: 303-314.
- Brody, J.A., Fischer, G.F., and Peralta, P.H. 1967.** Vesicular stomatitis virus in Panamá: Human serologic patterns in a cattle raising area. *Am. J. Epidemiol.*, 86: 158-161.
- Burleson, F., Chambers, T., and Wiedbrauk, D. 1992.** *Virology: a laboratory manual.* Academic Press Inc. USA.
- Celis, E. 1990.** Eds. M. H. V. van Regenmortel and A.R. Neurath. *Immunochemistry of viruses, II. The basis of serodiagnosis and vaccines.* 1990 Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division).
- Cline, B. 1976.** Ecological associations of vesicular stomatitis virus in rural Central America and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25:875-882.

- Cornelissen, B.P.M. y E. Pérez. 1987.** Algunos aspectos del comportamiento epidemiológico de la estomatitis vesicular (E.V.) en Costa Rica. Estudio Retrospectivo, 1972-1986. *Ciencias Veterinarias* Vol 9: 143-151.
- Dinter, Z 1989.** Diagnostic Virology. A review of methods at the National Veterinary Institut. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Emerson, S.U. 1976.** Vesicular Stomatitis virus: structure and function of virion components. *Current Topics Microbiological Immunology*. 73: 3-34.
- Fellowes, O.N., Dimopoulos, G.T., and Callis, J.J., 1955.** Isolation of vesicular stomatitis virus from an infected laboratory worker. *Am. J. Vet. Res.*, 16: 623-626.
- Fenner, F.J.; Gibbs, E.P.; Murphy, F.A.; Rott, R.; Studdert, M.J. and White, D.O. 1993.** *Veterinary Virology*. Academic Press, Incc. San Diego California.
- Fields, B.N.; Nipe, D:M., and Howley, P.M. 1996.** *Fields Virology*, 3 ra edición, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia.
- Frazier, C.L., and R.E. Shope. 1979.** Serological relationships among animal rhabdoviruses, p. 43-63. In D. H. L. Bishop (ed), *Rhabdoviruses*, vol.I. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Hanson, R.P., 1981.** Vesicular stomatitis. pages 517-539 in E.P. J. Gibbs, ed., *Virus Diseases of food animals, a World Geography of Epidemiology and Control*. Academic Press , New York.
- Herrera, W. 1985.** *Clima de Costa Rica. Vegetación y Clima de Costa Rica. Vol. 2.* EUNED. San José, C.R. 118 pp.
- Jiménez, A. E.; Jiménez, C; Castro, L and Rodriguez, L.L. 1996.** Serological survey of small mammals in a vesicular stomatitis virus enzootic area. *J. Wildf. Dis.* 32: 274-279.
- Monath, T.P. 1989.** *The arbovirus : Epidemiology and Ecology*. CRC Press. Inc. Boca Ratón, Florida, USA.
- Patterson, W.C., Mott, L.O., and Jenney, E., 1958.** A study of vesicular stomatitis in man. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 19: 57-62.
- Quiroz, E., Moreno, N., Peralta, P.H., & Tesh, R.B., 1988.** A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39(3):312-314.

- Reif, J.S.; Webb, P.A.; Monath, T.P.; Emerson, J.K.; Poland, J.D.; Kemp, G.E.; and Cholas, G. 1987.** Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: infection in occupational risk groups. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 177-182.
- Rodriguez, L. L., S. Vernon , A.I. Morales & G. J. Letchworth. 1990.** Serological monitoring of vesicular stomatitis New Jersey virus in enzootic regions of Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42:272-281.
- Tesh RB; Boshell J, Modi GB, Morales A, Young DG, Corredor A, Carrasquilla CF, Rodriguez C, Walters LL, Gaitan MO, 1987.** Natural infection of humans, animals, and phlebotomine sandflies with the Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 36: 653-661. UI:87210811
- Tesh RB, Johnson KM, 1975.** Vesicular stomatitis. Diseases transmitted from animals to man. Hubbert WT, McCulloch WF, Schnurrenberger PR, eds. Springfield, Illinois: C.C Thomas, 897-910. UI:7500492
- Tesh RB, Peralta PH, Johnson KM, 1969.** Ecologic studies of vesicular stomatitis virus. I. Prevalence of infection among animals and humans living in an area of endemic VSV activity. *Am J Epidemiol* 90: 255-261. UI:69290010
- Walton, T.E., Webb, P.A., Kramer, W.L., Smith, G.C., Davis, T., Holbrook, F.R., Moore, C.G., Schiefer, T.J., Jones, R.H., and Janney, G.C., 1987.** Epizootic vesicular stomatitis in northwestern Colorado, 1982. Epidemiologic and entomologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36: 166-176.
- Webb, P.A., Monath, T.P.; Reif, J.S.; Smith, G.C., Kemp, G.E.; Lazuick, J.S., and Walton, T.E., 1987.** Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982 : Epidemiological studies along the northern Colorado front range. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36: 183-188.
- Yuill, T.M.,** Vesicular stomatitis, in Handbook Series in Zoonoses, Section B : Viral Zoonoses, Vol. 1, Beran ,G.W., Ed., CRC Press, Boca Ratón, Fla., 1981.

