

DETECCION DEL VIRUS DE COLERA PORCINO EN CULTIVOS CELULARES  
 MEDIANTE LA PRUEBA DE HEMOADSORCION PASIVA.

A. MONROY, G. ELIAS Y A. VELAZQUEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA  
 Y VIROLOGIA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, MEXICO D.F.

El desarrollo de Virus de Cólera Porcino (VCP) en cultivos celulares ha sido demostrado, sin embargo su detección en los mismos ha planteado ciertos problemas ya que el VCP no produce efecto citopatogénico (ECP) en las células en que se replica.

Varios son los métodos que se han utilizado para comprobar su desarrollo.

Prueba de inhibición metabólica.- La prueba se basa en que las células infectadas no acidifican el medio de cultivo con la rapidez de las células no infectadas, esta prueba es poco específica y es una prueba cualitativa.

Prueba de los anticuerpos fluorescentes (9).- Es una de las pruebas que más trascendencia ha tenido, se utiliza un conjugado anticólera porcino que se agrega a los cultivos infectados, la prueba es bastante sensible, específica y rápida, pero pueden surgir problemas en la interpretación ya que el exceso en la manipulación y la fragilidad de las células dificulta el desarrollo correcto de la prueba.

Pruebas de interacción viral.- Estas pruebas han sido ampliamente descritas (2,3,4,5,6,8). Se basan en la inoculación de un segundo virus de marcado ECP en cultivos previamente infectados con el VCP. El resultado puede ser la exaltación de ECP del segundo virus como en las pruebas de la Exaltación con Virus de la Enfermedad de Newcastle (END) y Exaltación con Virus de la Enfermedad de Teschen (ETV) o bien la inhibición del ECP por el fenómeno de interferencia.

Las pruebas de exaltación son de difícil interpretación ya que no existe un parámetro establecido como referencia.

La microscopía electrónica es otra posibilidad para comprobar el desarrollo del VCP en cultivos celulares, pero la compleja técnica de preparación de la muestra para la observación, el alto costo del equipo y material hacen difícil el empleo rutinario de esta técnica.

La utilización de la Serología también es de utilidad para la detección del VCP, se han utilizado pruebas como la Precipitación en Agar, Conglutinación, Fijación de Complemento, Inmunolectroforesis etc., estas están en desventaja con pruebas más específicas como la de END y la de Anticuerpos Fluorescentes, además no dan una imagen real del grado de replicación viral.

La implementación de ésta nueva prueba fue con el objeto de simplificar la técnica, interpretación, reducir costos y tiempo al compararla con END.

La prueba se basa en la adsorción pasiva de anticuerpos contra el VCP a glóbulos rojos (GR) de bovino tanizados, para realizar una prueba de hemoadsorción pasiva en cultivos infectados con el VCP, el cual como se sabe no hemoadsorbe espontáneamente.

MATERIAL Y METODOS. La fracción gamma de un suero hiperinmune contra el VCP fue enfrentada a una suspensión de polvo de riñón de cerdo para eliminar reacciones inespecíficas, con diluciones dobles seriadas de gammaglobulinas se sensibilizó 0.5 ml de un paquete GR tanizados, estos se resuspendieron al 0.5% en PBS, cada una de las suspensiones de GR fueron adicionadas a cultivos de células PK-15 previamente infectadas con 100 DITC 50% del VCP cepa PAV-250, así como a controles negativos.

El punto final de sensibilización fue considerado como la máxima dilución de gammaglobulinas, capaz de sensibilizar a una cantidad

constante de GR tanizados y que se manifestó por un 50% o más de hemoadsorción, el punto final se consideró como una Unidad Sensibilizante (US).

TITULACION DEL VIRUS. Diluciones décuples del VCP cepa PAV-250 fueron inoculadas a monoestratos celulares de la línea PK-15, contando también con controles positivos y negativos. Se incubaron durante 4 días y se realizó la prueba de Hemoadsorción utilizando GR sensibilizados con 8 US.

Los resultados fueron procesados por el método de Reed y Muench, los títulos obtenidos no fueron superiores a  $10^{2.5}$  DITC 50%/ml, no se encontró variación significativa en los resultados finales con el método de END, sin embargo varias fueron las ventajas encontradas en cuanto a la lectura, esta es a simple vista, la subjetividad es menor y el tiempo de incubación se acorta.

DETECCION Y TITULACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES. Se hicieron diluciones de base 5 de suero y se enfrentaron a 200 DITC del VCP cepa PAV-250, se incubaron a 37 C durante 30 minutos, posteriormente la mezcla suero-virus fué inoculada a monoestratos celulares, inoculando también células solo con el VCP y teniendo células sin inocular, se incubaron durante 4 días, al final de estos se realizó la prueba de Hemoadsorción utilizando GR sensibilizados con 8 US.

Se encontró un título de inhibición de 1/625 la prueba fue denominada inhibición de la Hemoadsorción pasiva.

La prueba de Titulación y Neutralización resultaron fácilmente estandarizables, sensibles y específicas.

Entre las utilidades prácticas que se pueden dar a esta técnica están; auxiliar en el diagnóstico del Cólera Porcino cuando se intenta el aislamiento del virus en cultivos celulares, la constatación de la viabilidad del virus vacunal de Cólera Porcino en cultivos celulares una vez correlacionado con la prueba de potencia, para en esta forma abatir costos en el control de vacunas a virus activo contra el Cólera Porcino.

REFERENCIAS.

- 1) Aynaud et al. Seminar of Diagnosis and Epidemiology of Classical Swine Fever; Netherlands; April 30 1975; p. 13.
- 2) Ikeda et al. 1963. Natl. Inst. Animal Health Quart. 3: p. 169.
- 3) Korn et al. Sem. Diag. Epizoot. of CSF; Netherlands; April 30 1975; p. 19.
- 4) Kumagai et al. 1958. Science 128: p. 366.
- 5) Kumagai et al. 1961. J. Immunol. 87: p. 245.
- 6) Kumagai et al. 1964. Natl. Inst. Animal Health Quart. 4: p. 135.
- 7) Liess y Prager. Sem Diag. Epizoot. of CSF.; April 30 1975; p. 117.
- 8) Matumoto et al. 1961. J. Immunol. 87: p. 257.
- 9) Mengeling, W.L. 1967. Am. J. Vet. Res. 128: p. 1653.