

38 "XXI REUNION NACIONAL DE AMVEC 86"

PUEBLA-TLAXCALA

Título: Diferenciación de Cepas del Virus de la Enf. de Aujeszky por Métodos de Lab.

Autor (es): Iglesias, S.G: Díaz, R.C.

Institución (es): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Area: Departamento de Producción Animal: Cerdos

DIFERENCIACION DE CEPAS DEL VIRUS DE LA ENF.
DE AUJESZKY POR METODOS DE LABORATORIO.

INTRODUCCION.

Existen varias cepas del virus de la enfermedad de Aujeszky o pseudorrabia. La diversidad de cepas es importante porque está demostrado que las características de las cepas pueden ser determinantes en la presentación clínica de la enfermedad. El mejor ejemplo que existe de esta relación es el hecho que el cuadro clínico de animales afectados en algunas ocasiones incluye neumonía además de la encefalitis que es el signo más constante, está descrito que esto ocurre por que sólo algunas cepas tienen la habilidad de replicarse en tejidos del tracto respiratorio y causar lesiones (Baskerville 1972). Así mismo se ha postulado que la habilidad para cruzar la placenta e infectar a los fetos es una característica que solo algunas cepas poseen, pero ésta aseveración requiere ser confirmada en forma experimental. Así mismo se ha descrito que existen pruebas de laboratorio que permiten diferenciar entre cepas, la utilización de dichas pruebas es altamente conveniente ya que permiten evitar el alto costo de experimentos que involucren cerdos. Además se ha reportado que algunas características detectables en el laboratorio pueden ser utilizadas como indicadores de virulencia puesto que cepas de virulencia conocida mostraron marcadas diferencias, tal es el caso de sensibilidad a calor o a tripsina (Bartha et al Lloyd y Baskerville 1978).

En trabajos anteriores se publicó el resultado de los estudios de comparación de la virulencia de dos cepas del virus de la enfermedad de Aujeszky que fueron aislados del mismo caso de pseudorrabia. Las cepas fueron claramente diferentes en cuanto a su virulencia para cerdos (L-1 alta virulencia L-2 baja virulencia). El objetivo del presente trabajo fue someter dichas cepas a pruebas de laboratorio para obtener primero una evidencia adicional de su diversidad y además observar si existía relación entre alguno de los parámetros detectables en laboratorio y su virulencia, para esto último se decidió incluir en el estudio otras 2 cepas cuya virulencia era conocida. La cepa Stanley (altamente virulenta) y la cepa NIA-4 (apatógena).

Materiales y Métodos.

Las cepas virales fueron propagadas en monoestratos de células de riñón de feto de cerdo. Las pruebas realizadas fueron ser

sibilidad a tripsina, sensibilidad a calor y análisis del patrón electroforético del genoma viral luego del tratamiento con enzimas de restricción.

El tratamiento con tripsina se llevó a cabo en solución salina glucosada la cual se describe como óptima para experimentos de inactivación viral (Davies y Beran 1981), la concentración de tripsina fue de 0.03 mg/ml el tratamiento se llevó a cabo a 30°C. En el momento que hizo la dilución de virus en la solución de tripsina se tomó una muestra que se consideró el título viral al tiempo cero, se colectaron muestras para titulación a los 15, 25, 35, 45 y 55 minutos luego de hecha la mezcla. Las muestras se diluyeron inmediatamente luego de colectadas 1:10 en medio mínimo esencial (MEM). El tratamiento con calor se llevó a cabo a 48°C como diluyente viral se usó la solución antes mencionada se colectaron --- muestras al inicio del experimento y 10, 20, 30, 40 y 50 minutos después de las cuales fueron diluidas 1:10 en MEM frío. Los virus se titularon en placas de microtitulación utilizando células de riñón de feto de cerdo, los títulos fueron expresados como porcentaje de sobrevivencia viral. Para el análisis del DNA viral los virus fueron tratados de acuerdo con el método descrito por; Buchman y Cols. (1979). Una vez que el DNA viral fué purificado se trató con las enzimas Bam HI, Pst I y Kpn I. El tratamiento de digestión enzimática se llevó a cabo por un período mínimo de 8 hrs. posteriormente se llevó a cabo el corrimiento electroforético en geles de agarosa 0.9%. Las bandas de DNA fueron visualizadas por métodos autoradiográficos utilizando para tal fin placas de fotografía.

RESULTADOS.

Tanto el efecto del calor como de la tripsina sobre la actividad infectante del virus se evaluó haciendo un análisis comparativo de las curvas de actividad a los diferentes tiempos; y además determinando por métodos estadísticos la relevancia en las diferencias de las pendientes de las curvas de inactivación. El efecto del calor fue poco notable. Al cabo de 60 minutos el porcentaje de virus con capacidad infectante fue superior al 80% en los 4 casos. La única diferencia detectable observando las curvas, fué que las cepas L-1 y L-2 mostraron mayor resistencia al efecto inmediato del calor es decir no se apreció ningún efecto en las muestras colectadas durante los primeros 30 minutos. La comparación de las pendientes reveló que no existía diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

El tratamiento con tripsina causó una considerable disminución en el número de partículas infectantes en dos de las cepas. Luego de 55 minutos de tratamiento de la cepa L-1 el título de partículas infectantes había disminuído hasta el 58%, mientras que para la cepa L-2 fue de 51.6% y de 80% y 79% para las cepas Stanley y NIA-4 respectivamente. Las diferencias entre los 2 grupos de cepas fueron estadísticamente significativas.

El análisis de los patrones electroforéticos de los fragmentos de DNA viral mostró que existían diferencias claras entre al-

gunas de las cepas. La enzima Pst I produce un alto número de -- fragmentos y cuando existen muchas bandas la diferenciación es -- complicada en este caso sólo la cepa NIA-4 fue claramente diferen- te ya que el fragmento más pesado fue notablemente diferente en -- su peso molecular. La enzima Bam HI diferenció las cepas L-1 y - Stanley de las cepas NIA-4 y L-2 por que en las 2 primeras apare- ció un fragmento en la posición 7 que en las otras no fue observa- do y por último la diferenciación entre Stanley y L-1 se llevó a -- cabo con la enzima Kpn I en este caso se apreció que la disposi- ción de los fragmentos 3, 4 y 5 era claramente diferente.

DISCUSION.

Los métodos de laboratorio aquí utilizados demostraron ser -- eficientes para la diferenciación de cepas. Esto confirma lo re- portado por otros autores tal como; Platt et al, 1980, debe tomar se en cuenta el hecho que la utilización de una sola prueba puede ser insuficiente para tal fin por que las diferencias entre cepas pueden ser mínimas, tal fue el caso de la sensibilidad de las cepas al calor. La combinación de los resultados de varias pruebas da por resultado un conjunto de características y estos conjuntos son fácilmente diferenciables.

El patron electroforético de los fragmentos de DNA luego del tratamiento con enzimas de corte revela diferencias que estable- cen en forma incuestionable que una cepa es distinta a la otra. Se ha postulado que este método de estudio es ideal para saber la trayectoria de las cepas en estudios epidemiológicos ya que en el caso de infección en granjas vecinas es importante establecer si la cepa involucrada es la misma u otra (Lawrence 1983).

Los resultados aquí reportados no confirman lo reportado por otros autores en cuanto a la relación entre sensibilidad a calor o tripsina y la virulencia de las cepas. En conclusión es claro que los métodos de laboratorio permiten una diferenciación de cepas especialmente cuando se forma un conjunto de características para cada cepa ya que 2 cepas pueden coincidir en una u otra ca- racterística pero no en un conjunto de éstas.

REFERENCIAS

Bartha, A., Belak, S. and Benyeda, J. (1969). Trypsin and heat resistance of some strains of the herpesvirus group.

Acta. Vet. Acad. Hung. 19: 97-99.

Baskerville, A. (1973). Histopathology of experimental -- pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus.

Res. Vet. Sci. 14: 223-228.

Buchman, T.G., Rozman, B. and Nahmias, A.J. (1979). Demonstration of exogenous genital reinfection with herpes simplex virus type 2 by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA.

J. Infect. Dis. 140: 295-304.

Davies, E.B. and Beran, G.W. (1981). Influence of environmental factors upon the survival of Aujeszky's disease virus.

Research in Veterinary Science 31: 32-36.

Lawrence, W. C. (1983). Evaluation of D.N.A. fingerprinting for strain specific identification of pseudorabies virus.

Proceedings Annual Meeting Papers livestock conservation institute 139-145.

Lloyd, G. and Baskerville, A. (1978). In vitro markers to differentiate an avirulent from a virulent strain of Aujeszky's disease virus.

Vet. Microbiol. 3: 65-70.

Platt, K.B., Maré, C.J. and Hinz, P.N. (1980). Differentiation of vaccine strains and field isolates of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: Trypsin sensitivity and mouse virulence markers.

Arch. Virol. 63: 107-114.