

II A.L.V.E.C.
XXII A.M.V.E.C.
III U.N.P.C.

TITULO : CURVA DE CRECIMIENTO DEL PARAMYXOVIRUS PORCINO DE LA
PIEDAD, MICHOACAN, EN LA LINEA DE CELULAS PK-15

AUTOR (ES) : Colinas T., A.; Martínez L., A.; Correa G., P.;
Fajardo M., R.

INSTITUCION (ES) : INIFAP-SARH. Km 15½ Carretera Méx.-Toluca, Deleg. Cuajimalpa

Resumen 05110, México, D.F. A.P. 41-652.

INTRODUCCION

En 1980 se observó en granjas de La Piedad, Michoacán, México, una enfermedad caracterizada por producir en cerdos, de diferentes edades, opacidad de la córnea - en uno o en ambos ojos. Este padecimiento fue denominado "Síndrome del ojo azul o cerdos zarcos", y se le atribuyó a una deficiencia de riboflavina (1 y 2). En mayo de ese mismo año se presentó un brote de encefalitis con opacidad de la córnea en lechones lactantes, de donde se aisló un virus con propiedades hemaglutinantes (9). Posteriormente este agente denominado virus del síndrome del ojo azul fue ubicado como un nuevo miembro de la Familia Paramyxoviridae (10). En 1984 se aisló otro virus parecido a los Paramyxovirus, que también mostró propiedades hemaglutinantes (6). En estudios posteriores, este virus creció en varias líneas celulares de origen porcino, bovino, simio, células pulmonares de visón y células fetales de origen humano. Mostró actividad hemaglutinante, hemadsorbente, hemolítica y de neuraminidasa. Mató al ratón y al embrión de pollo. Sus proteínas estructurales fueron similares a las de otros Paramyxovirus. En pruebas de sueroneutralización, fijación del complemento, inmunodifusión e inhibición de la hemaglutinación, los sueros hiperinmunes contra los virus de: la parainfluenza humana tipos 1, 2 y 3, paperas, sarampión, sincitial respiratorio, Newcastle y parainfluenza bovina tipo 3, no reaccionaron con el virus. En base a estos resultados el virus fue caracterizado como un miembro del Género Paramyxovirus y se le denominó Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (LPM) (4 y 7).

El presente trabajo se hizo con la finalidad de conocer la secuencia de reproducción viral asociada con los cambios celulares que van sufriendo las células PK-15 infectadas con el Paramyxovirus porcino LPM.

MATERIAL Y METODOS

Virus.- Se utilizó al Paramyxovirus porcino LPM (4,6 y 7) de noveno pase en cultivos celulares; los primeros 7 pases en células de cornete bovino y los 2 últimos en PK-15. El virus inoculado tuvo un título por hemaglutinación (HA) de 1:32/0.05 ml ante eritrocitos de gallo y solución salina con pH de 6.2; y con base en el efecto citopático (ECP) producido se observó un título de $10^{5.47}$ DICC₅₀/ml, en células PK-15.

Cultivos celulares.- Se utilizaron monoestratos celulares de la línea PK-15 (de riñón de cerdo) de 2 días de edad y con 90-100 % de confluencia; en las cuales el virus se ha replicado con anterioridad (6 y 7). Las células se propagaron en: a) 32 tubos de Leighton (TL) sin laminillas; b) 32 TL con laminillas; y c) 19 botellas de dilución de leche (DL).

Infección de los cultivos celulares.- Los monoestratos fueron infectados, cuando había alrededor de 218 y 185 mil células por ml, en los TL y en las botellas de DL, respectivamente. Aplicando las siguientes dosis: a) Los TL recibieron 0.1 ml cada uno (virus diluido 1:10), dejando 3 TL como controles; b) Otros TL 0.1 ml (sin diluir), dejando 4 TL como controles; y c) Las botellas, 3 ml cada una (diluido 1:10), dejando 2 monoestratos como controles.

Para inocular los monoestratos, se retiró el medio de crecimiento (Minimun Essential Medium *) el cual contenía 10 % de suero de ternera irradiado y ultrafiltrado (3), luego se agregó el inóculo y se permitió la adsorción, moviendo los monoestratos cada 10 min durante 1 h, a 37 C, después se desechó el inóculo y se agregó medio de mantenimiento (MEM + 2% de suero); a los TL, con y sin laminilla,

* MEM de GIBCO, Cat. 410-1500 EB

se les puso 1 ml de medio, y a las botellas 20 ml Los monoestratos se incubaron a 37 C.

Ciclo de crecimiento.-A intervalos diferentes, postinoculación (PI), se observaron en el microscopio invertido uno o dos monoestratos de TL, o botellas DL inoculados, comparándolos siempre con un monoestrato control, y enseguida se congelaron, a -70 C, según los tres esquemas siguientes: a) Observación y congelación cada 8 h, durante un período de 9.75 días ; los TL controles a los 7.4, 8 y 8.75 días PI; b) Cada 12 h durante los primeros 5 días, y cada 24 h durante los últimos 5 días, utilizando 2 TL infectados; los controles se congelaron a los 3, 6 y 10 días PI. En este caso, después de sacarle el medio sobrenadante, se extrajeron las laminillas para fijarlas y posteriormente teñirlas; c) Cada 12 h durante los primeros 5 días y cada 24 h en los siguientes 7 días. En esta ocasión en cada observación se usó una botella DL. Y una botella DL control se congeló a los 5.2 días y otra hasta los 12.2 días PI. Los monoestratos de las botellas (c) y los sobrenadantes de los TL con laminilla (b) se congelaron y descongelaron 3 veces, y los monoestratos de los TL sin laminilla (a) 4 veces; y en forma semejante los controles. Para separar los restos celulares, las suspensiones descongeladas fueron centrifugadas a 600 x G durante 15 min, en refrigeración; luego se cosecharon los sobrenadantes y se repartieron en alícuotas, que de nuevo fueron congeladas a -70 C, hasta su titulación.

Titulación viral.-Las alícuotas de todas las suspensiones, incluyendo las controles, fueron descongeladas e inmediatamente tituladas por HA (5) y ECP (8) por el sistema de microtitulación.

Observaciones citológicas.- Durante los primeros 5 días, los monoestratos de las laminillas(b) fueron observadas cada 12 h y en los siguientes 5 cada 24 h ; enseguida se extrajo el medio sobrenadante y luego las laminillas fueron fijadas en solución de Clarke y posteriormente fueron teñidas con hematoxilina y eosina.

RESULTADOS.

Ciclo de crecimiento.- La curva de crecimiento del Paramyxovirus porcino LPM en la línea celular PK-15 utilizada, se muestra en la Figura 1, en donde se observa que no se detectó virus a las 17 h y posteriormente : a) En los TL sin laminilla, a los 1.75 días PI se empezó a observar ligero ECP, que aumentó gradualmente, de modo que a los 3.7 días PI se observó un 50 % y de los 6.4 días en adelante, fue del 100%. La HA se detectó a partir de las 34 h con un título de 1:4/0.05 ml, el cual subió gradualmente hasta alcanzar un máximo de 1:64 a los 4.4 días cuando se observó un 85% de ECP; de ahí en adelante el título osciló entre 1:16 y 1:64, con excepción de 2 monoestratos que tuvieron títulos de 1:8 (a los 6 y 7.75 días). El título por ECP se detectó a partir de las 18 h PI y a los 1.75 días alcanzó un título máximo de 10^5 DICC₅₀/0.025 ml. Desde los 2 días hasta los 6.4 días se observaron títulos que variaron de $10^{3.75}$ a $10^{4.87}$; b) En los TL con laminilla, a las 30 h PI se observó ligero ECP, el cual aumentó gradualmente, y a partir de los 5.25 días en adelante fue de 100 % . El título por ECP se empezó a observar a las 18 h PI, y a los 4.25 días hubo un título máximo de $10^{4.18}$ DICC₅₀/0.025 ml. De los 4.75 días en adelante el título descendió paulatinamente hasta llegar a 10^3 a los 10.25 días; c) En las botellas DL, a las 41 h PI se observó ligero ECP, que aumentó gradualmente y a los 3.2 días fue de 50-60 % y de los 7.2 días en adelante fue de 100 %. La HA se detectó a las 29 h PI con un título de 1:2/0.05 ml. Entre los 2.7 y 6.2 días los títulos oscilaron entre 1:16 y 1:32. A los 7.2 y 8.2 días el título se elevó al máximo, hasta 1:64, para después seguir oscilando entre 1:32 y 1:16. El título por ECP se detectó a las 29 h PI (10^5 DICC₅₀/ 0.025 ml) y a los 3.2 días subió a $10^{4.75}$, después bajó, y subió de nuevo a $10^{4.87}$, a los 7.2 y 9.2 días; y posteriormente fue descendiendo hasta $10^{2.5}$ a los 12.2 días.

Cambios citológicos.- En los monoestratos fijados de las 18 a las 42 h PI, hubo

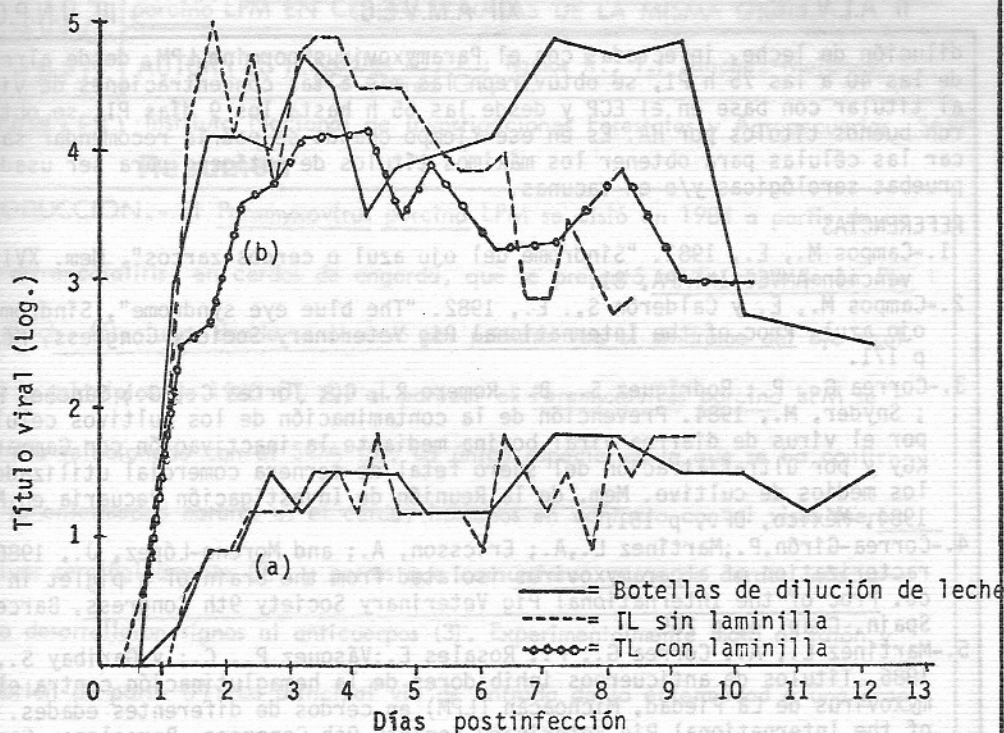


Figura 1.- Curva de crecimiento del Paramyxovirus porcino LPM, en la línea celular PK-15, titulado por HA (a) y ECP (b)

un 100% de confluencia y células en mitosis, que indicaban una actividad celular aparentemente normal. De los 2.25 a los 4.25 días persistió un 100% de confluencia pero con muy escasa actividad celular. De los 2.25 a 4.75 días se observó moderada cantidad de vacuolas intracitoplásmicas. Y de los 5.25 días en adelante hubo gran cantidad de vacuolas. A partir de los 4.25 días se empezaron a ver grandes grupos de células en diferentes fases de muerte. A los 6.25 días sólo quedaba vivo el 30% del monoestrato, y a partir de los 8.25 días éste desapareció. El monoestrato control fijado a los 6.25 días estaba homogéneo con 100% de confluencia y escasas vacuolas intracitoplásmicas.

DISCUSION

Hubo ligeras variaciones en los títulos encontrados por ECP; y lo mismo sucedió con los títulos detectados por HA. En el muestreo realizado a las 17 h PI no fue posible detectar al virus, ni con base en el ECP, ni por la prueba de HA. Esto se debió muy probablemente a que en ese momento ocurrió la fase de eclipse.

En general se pudo apreciar que el título viral, calculado por ECP, alcanzó títulos máximos de $10^{4.18}$ en los sobrenadantes estudiados; mientras que cuando se estudiaron los especímenes que contenían células y sobrenadante el título llegó a ser de 10^5 (TL sin laminilla). Este título viral en los TL sin laminilla aumento más rápido

alcanzó niveles ligeramente más altos y declinó más rápidamente que el título viral detectado en las botellas de leche, en las cuales los títulos altos persistieron hasta el noveno día; para entonces en los TL con y sin laminilla el título ya había descendido aproximadamente 2 logatimos. Por otra parte el título HA tanto en las botellas de leche como en los TL sin laminilla presentó títulos semejantes durante los diferentes muestreos.

Se concluye que en monoestratos de células PK-15, preparados en TL y en botellas de

dilución de leche, infectadas con el Paramyxovirus porcino LPM, desde alrededor de las 40 a las 75 h PI, se obtuvieron las más altas concentraciones de virus, al titular con base en el ECP y desde las 65 h hasta los 9 días PI, se obtuvieron buenos títulos por HA. Es en ese tiempo cuando se podría recomendar sacrificar las células para obtener los máximos títulos de antígeno para ser usado en pruebas serológicas y/o en vacunas.

REFERENCIAS

- 1.-Campos M., E., 1981. "Síndrome del ojo azul o cerdos zarcos". Mem. XVII Convención AMVEC-IXTAPA, 81.
- 2.-Campos M., E, y Calderón S., E., 1982. "The blue eye syndrome", Síndrome del ojo azul. Proc of the International Pig Veterinary Society Congress, México, p 171.
- 3.-Correa G., P.; Rodríguez S., B.; Romero R., C.; Torres C., G.; Sánchez H., C.; Snyder, M., 1984. Prevención de la contaminación de los cultivos celulares por el virus de diarrea viral bovina mediante la inactivación con Gammas a 25 KGy y por ultrafiltración del suero fetal de ternera comercial utilizado en los medios de cultivo. Mem. de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1984, México, DF., p 151.
- 4.-Correa-Girón, P.; Martínez L., A.; Ericsson, A.; and Moreno-López, J., 1986. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in México. Proc of the International Pig Veterinary Society 9th Congress, Barcelona, Spain. Chap. 4, p 205.
- 5.-Martínez L., A.; Correa G., P.; Rosales E.; Vásquez P., C.; y Garibay S., M., 1986. Títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el Paramyxovirus de La Piedad, Michoacán (LPM) en cerdos de diferentes edades. Proc of the International Pig Veterinary Society 9th Congress, Barcelona, Spain. - Chap. 4, p 313.
- 6.-Martínez L., A.; Correa G., P.; Fajardo M., R.; y Garibay S., M., 1985. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los Paramyxovirus. Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. AMVEC, ed. por P. Correa y A. Morilla, p 15.
- 7.-Moreno-López, J.; Correa-Girón, P.; Martínez L., A.; and Ericsson, A., 1986. Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the Brain of a Piglet in México. Arch of Virol 91: 221.
- 8.-Snyder, M.L.; Stewart, W.C.; and Kresse, J.I., 1981. Microtitration Neutralization Test for Pseudorabies and Transmissible Gastroenteritis Viruses, In: Serologic Microtitration Techniques. USDA, APHIS, VS of NVSL, Ames, Iowa, p 44.
- 9.-Stephano H., A.; Gay G., M.; Ramírez T., C.; Maqueda A., J.J., 1981. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Mem de la XVII Convención AMVEC-Ixtapa 81.
- 10.-Stephano H., A.; Gay G., M.; and Kresse, J., 1986. Properties of a Paramyxovirus associated to a new syndrome (blue eye syndrome) characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proc of the International Pig Veterinary Society 9th Congress, Barcelona, Spain, p 455.