

**CLONACION Y EVALUACION DE DIFERENTES PROCEDIMIENTOS
PARA LA TITULACION DEL RUBULAVIRUS PORCINO (RVP)
DE LA PIEDAD, MICHOACAN (LPM)**

Atalo Martínez¹, Julio Santiago², María Antonia Coba¹, María Eugenia Manjarrez², Pablo Correa¹, Noé Alvarado³;

1) Proyecto Paramixovirus Porcino, CENID-M, INIFAP, SAGAR; A.P. 41-682, C.P. 11001, México, D.F.; 2) Depto. de Virología, INER, SS. y 3) Depto. de Farmacología, INER, SS.

INTRODUCCION. La Enfermedad del Ojo Azul (EOA) afecta principalmente a los verracos, a las cerdas y a sus crías lactantes, y en menor grado a cerdos en crecimiento muchos de los cuales no mueren, pero sufren severos retrasos en su desarrollo. El agente etiológico de la EOA, fue aislado en México en 1981 (4). En 1984, en el CENID-M se hizo otro aislamiento que fue denominado virus de La Piedad, Michoacán (VLPM)(1, 2), el cual fue caracterizado y recientemente clasificado como Rubulavirus porcino (RVP) (3). Entre los métodos empleados para titular al RVP/LPM están la hemaglutinación (HA), la hemadsorción (HAD), la hemólisis, el ensayo en placa (EP) y mediante la determinación de la dosis infectante en cultivos celulares (DICC) (2). Dado que se considera que es necesario contar con clones del RVP/LPM para la producción del antígeno para la elaboración de vacunas, reactivos para el diagnóstico, etc., los objetivos de este trabajo fueron: a) propagar el RVP/LPM en células PK-15 y Vero; b) clonar al RVP/LPM; c) titular al RVP/LPM clonado, por los métodos clásicos de HA, EP, DICC, y por los métodos alternos de fijación del complemento (FC) y espectrofotometría.

MATERIAL Y METODOS. Propagación del RVP/LPM en células Vero.- Con el fin de amplificar al RVP/LPM del sexto pase realizado en células PK-15, (virus que había recibido 5 pases en células de cornete de bovino) y con 0.75 ml de la suspensión viral, se inoculó un monoestrato confluyente de células Vero de 2 días de edad, contenido en uno de los 6 pozos de una caja múltiple. A las 48 h postinfección se desarrolló solo una placa sincitial; y a los 7 días PI, cuando había 100% de efecto citopático (ECP) en la monocapa, se colectó el fluido sobrenadante del pozo; con el que se hicieron alícuotas que fueron congeladas a -196 C (previa centrifugación a 3,000 rpm x 10 min). A esta primera cosecha se le denominó primera clona. Propagación del RVP/LPM en células PK-15.- Con 1 ml del inóculo mencionado, se infectó otro monoestrato confluyente de células PK-15 de 2 días de edad, contenido en un pozo de una caja múltiple de 6 pozos.

Clonación del RVP/LPM.- Se descongeló una alícuota de aproximadamente 0.9 ml de la primera clona obtenida en células Vero, con la que se hicieron diluciones logarítmicas (de 10^{-1} hasta 10^{-7}). Con cada dilución se inocularon por repetición 24 monoestratos confluentes de células Vero y 24 de PK-15, de 2 días de edad, contenidas en microplacas de 96 pocitos. Previo a la inoculación, los monoestratos fueron lavados con solución buffer de fosfatos (PBS); después de haber agregado el inóculo los monoestratos se incubaron durante 1 h a 37° C; después se retiró el inóculo y se volvieron a lavar con PBS; a ambos tipos de células se les agregaron aproximadamente 150 ul de metilcelulosa al 0.5 %; además, a las PK-15 se les adicionó 2% de suero fetal bovino (SFB), y se incubaron a 37° C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% (durante 7 días las células Vero y durante 9 días las células PK-15). Se cuantificaron las placas sincitiales en las células Vero y se cosecharon las clonas individuales. La cantidad de virus en las células PK-15 fue medida por espectrofotometría a los 9 días PI. Un aislamiento de RVP, obtenido de un caso clínico, también fue clonado mediante este sistema.

Amplificación de clonas.- Dos de las clonas obtenidas (clona 1 y clona 2), se amplificaron en células PK-15 (clona 1) y Vero (clona 2).

RESULTADOS Y DISCUSION. Amplificación viral en células Vero.- A las 48 h PI, se observó una placa sincitial, grupos de células desprendidas, células grandes redondas adheridas y células muertas flotando. A las 168 h PI (7 días), células redondas gigantes, así como sincitios de varios tamaños (conteniendo alrededor de 15 o más núcleos), racimos de células arrugadas, suspendidas

del monoestrato mediante un apéndice, el monoestrato sólo tenía aproximadamente un 10% de células pegadas.

Clonación del RVP.- Se obtuvieron 10 clonas, 6 del virus LPM y 4 del aislamiento de un caso clínico, cada una de las cuales se identificó por inhibición de la HA y seroneutralización (SNT). Se observó que el procedimiento óptimo para clonar y reproducir al RVP/LPM, y posiblemente a otros virus, es el siguiente: a) Amplificar el virus en 1 botella de 25 cm²; b) titular por ensayo en placa (con metil celulosa al 0.5%) en 1 caja múltiple de 6 pozos, para observar las placas con claridad; y c) en un experimento similar al anterior, sin metil celulosa, inocular a diferentes multiplicidades de infección (MDI) para encontrar la óptima; d) finalmente evaluar las cosechas de este último paso. Se observó que para titular el virus es mejor detener la prueba a los 7 días PI y ésta se debe hacer en células Vero, en las cuales las placas se desarrollan en forma más definida y son más regulares en tamaño y forma. Con el RVP/LPM los títulos de los aislados estudiados expresados en unidades formadoras de placas (UFP) fueron bastante similares a los obtenidos por DICC. En particular se consideraron a las UFP como el método de referencia, junto con los títulos expresados en DICC_{50%}. La correlación entre UFP y FC para cuantificar la producción viral no fue tan buena, más bien fue variable; en cambio el método espectrofotométrico aparentemente resulta aceptable y bastante reproducible. En general, el ECP se observó más rápido y con mayor claridad en las células Vero. Se concluye que con el RVP/LPM, en células Vero, los métodos en placa y espectrofotométrico son los mejores; aunque, la FC resulta un procedimiento más rápido y bastante práctico. Por otro lado, sería interesante investigar si el método espectrofotométrico podría usarse en ensayos de neutralización (NT).

BIBLIOGRAFIA

1. Martínez L., A. y Cols. (1985). En: Correa G., P. y Morilla G., A. (eds.). Mem. Encuentro Sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo, AMVEC, Méx., D.F. p. 15.
2. Moreno-López J. y Cols. (1986). Arch Virol, 1986(91):221-231.
3. 231.
4. Murphy F.A., et al. (1995). Virus Taxonomy. Sixth Report of The ICTV. Springer-Verlag, Wien, New York.
5. Stephano H., A.; Gay G., M. (1985) En: Correa G., P. y Morilla G., A. (eds.). Mem. Encuentro Sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo, AMVEC, México, D.F., 1-13.