
EVALUACION DE DIFERENTES MULTIPLICIDADES DE INFECCION (MDI), PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCION DE PARTICULAS VIRALES DEL RUBULAVIRUS PORCINO (RVP) DE LA PIEDAD, MICHOACAN (LPM)

Martínez L., A.^{*1}; Santiago C., J.R.²; Coba A., M.A.¹; Correa G., P.¹; Manjarrez Z., M.E.².

¹CENID-M, INIFAP, SAGAR, Carr., México-Toluca, Km 15 ½, Col. Palo Alto, Cuajimalpa, D.F., C.P. 05110. ²Depto. De Virología, INER, SS.¹

INTRODUCCION.

Para la obtención de la mayor cantidad posible de partículas virales en cultivos celulares, es conveniente conocer con que MDI se puede propagar de manera óptima el virus de interés. Es importante conocer esto, ya que con suspensiones virales de mayor título se pueden preparar mejores reactivos para diagnóstico, vacunas, etcétera. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo es evaluar con que MDI se obtiene el mayor rendimiento viral del RVP/LPM.

MATERIAL Y METODOS.

Amplificación y clonación del RVP/LPM.- Con el quinto pase en células PK-15, se prepararon diluciones seriadas, de 10^{-1} a 10^{-5} y se inocularon, por duodecaplicado, monoestratos confluentes de células Vero, en cajas múltiples de 96 pozos (CM_{96}). Las monocapas se cubrieron con medio esencial mínimo (MEM) complementado con 0.5 %, de metilcelulosa. Se incubaron 3 días y se observaron bajo contraste de fases, para contar las placas virales individuales, por pozo. Se marcaron los pozos que presentaron una sola placa, y se les quitó el medio de cultivo, se lavaron suavemente tres veces con amortiguador salino de fosfatos, se adicionó MEM (sin metilcelulosa) y se incubaron por dos días más. Finalmente se cosechó el medio, se centrifugó y con el sobrenadante se inoculó una botella que contenía una monocapa de 25 cm^2 de células Vero. La botella se incubó hasta observar más del 90% de efecto citopático (ECP). Se cosechó el virus, se centrifugó y se congeló el sobrenadante en alícuotas de 0.5 ml. Con uno de los virus obtenidos de este modo se repitió este procedimiento dos veces más y a la serie de clonas obtenidas se les dio una numeración progresiva.

Infección de las células Vero con el RVP-LPM a diferentes multiplicidades de infección.- Se descongeló una alícuota del RVP-LPM (Clona 1) y con la suspensión viral se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} . Con la suspensión viral sin diluir y con cada una de las diluciones se inocularon monoestratos confluentes de células Vero, en botellas de 25 cm^2 , con los siguientes inóculos: botella 1, 1 ml de la suspensión sin diluir, botella 2, 0.1 ml de la misma suspensión; botella 3, 0.1 ml de la dilución 10^{-1} y así sucesivamente. Se dejó como testigo una botella a la cual se le adicionó sólo MEM. Los cultivos se incubaron 1 h. a 37°C , en atmósfera húmeda y con 5% de CO_2 . Después se retiró el inóculo y se agregaron 6 ml de MEM a cada botella. Las botellas se incubaron durante 6 días en las mismas condiciones que antes y las suspensiones virales se cosecharon diariamente con restitución de medio fresco.

Ensayo en placa. Tanto las clonas como la cosechas virales se titularon inoculando por triplicado $100\mu\text{l}$ de cada una de las diluciones: 10^{-1} a 10^{-5} , en monoestratos de células Vero preparadas en cajas múltiples de 24 pozos (CM_{24}). El inóculo se incubó como en la técnica anterior, se retiró y se le agregó 1 ml de MEM con 0.5 % de metilcelulosa. Las CM_{24} se incubaron durante 3 días, se retiró el sobrenadante y se tñieron con colorante de Giemsa para contar las placas.

RESULTADOS

Todas las botellas inoculadas con virus presentaron ECP, las botellas inoculadas con las 3 mayores concentraciones, presentaron el ECP desde las 24 h. postinfección (PI), las botellas inoculadas con las dos mayores diluciones lo presentaron a las 48 h.; en ese momento los porcentajes de células con ECP en cada botella fueron los siguientes: botella 1 80%; 2, 40%; 3, 5%; 4 y 5, de 2 a 5%. Todas las botellas presentaron títulos de virus desde las 48 h. postinfección (Tabla 1).

Tabla 1.- Títulos virales de las cosechas obtenidas a partir del día 2 PI, en células Vero inoculadas con diferentes multiplicidades de infección, con el Rubulavirus porcino de La Piedad, Michoacán.

Días PI	Multiplicidad de infección utilizada*				
	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001
2	3.74	¿?	3.3	4.39	3.47
3	5.69	5.47	5.3	5.54	5.81
4	5.0	4.17	4.39	0.69	4.84
5	4.17	3.17	3.39		4.06
6	2.47	2.69	3.0		

Abreviaturas: PI, postinfección. Los títulos están expresados como el \log_{10} de las unidades formadoras de placas (ufp)/ml. * La multiplicidad de infección está expresada como el cociente que resulta del número de partículas infecciosas y el número de células inoculadas (6×10^6 en botellas de 25 cm^2).

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En el presente se trató de encontrar la mejor multiplicidad de infección para producir el RVP, lo cual no se ha reportado en la bibliografía. Así entonces se observó que los títulos más altos de virus correspondientes a las diferentes MDI utilizadas, se produjeron, para todas las botellas, en el tercer día postinfección y variaron de $10^{5.3}$ a $10^{5.81}$ ufp/ml; es decir, que la variación estuvo dentro del mismo logaritmo. Después de este día, los títulos fueron descendiendo paulatinamente y, como era de esperar, dado que sólo quedaban pocas células en las botellas, los títulos más bajos se obtuvieron el día 6. Por esta razón se considera que el mejor día para cosechar el virus usando cualquiera de las multiplicidades estudiadas es el tercero. En un experimento parecido, con una MDI de 0.02 en células PK-15 y con el noveno pase del mismo virus, se había encontrado que los mayores títulos ensayados por ECP, se empezaron a obtener a partir del día 2.7 (69 h PI) (Colinas, 1989). Los resultados del presente trabajo indican que las MDI de 0.1 y 0.0001 fueron las mejores para propagar el virus; aunque las otras tres también dan muy buenos títulos en el tercer día. Con la MDI de 0.5, además, se obtienen también buenos títulos los días cuarto y quinto de cosecha, lo cual aumenta la productividad de virus por botella.

* Trabajo parcialmente financiado por el CONACYT (Proyecto K022-P9702); y por la Fundación Guanajuato Produce, A.C. (Proyecto 17/98).

LITERATURA CITADA

1.- Colinas T., A. Curva de multiplicación del Paramyxovirus Porcino LPM en la línea de celular PK-15, con base en el título viral, determinado por hemaglutinación y por efecto citopático. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán, UNAM, Estado de México. 1989.