

USO DE LA PRUEBA DE SUERO NEUTRALIZACIÓN DE ALTO DESEMPEÑO PARA LA EVALUACIÓN *IN VITRO* DE UNA VACUNA INACTIVADA EMULSIONADA CONTRA EL RUBULAVIRUS PORCINO.

Quezada M. F., Echeveste G. R., Lozano D. B., Sarfati M. D., Soto P. E., Lara P. J. H.*

Laboratorio Avi-Mex, S. A. de C. V.,

Palabras clave: Rubulavirus Porcino, suero neutralización, diagnóstico. horacio.lara@avimex.com.mx

Introducción

Los anticuerpos inducidos por la aplicación de cualquier vacuna pueden ser evaluados por medio de pruebas *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas *in vitro* pueden ser: a) No Funcionales, como la prueba de ELISA y la Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), que no son capaces de evidenciar las funciones biológicas, por si mismas, de los anticuerpos y deben ser relacionadas con pruebas *in vivo* y; b) Funcionales, que permiten correlacionar resultados con protección, midiendo para esto, la actividad metabólica de las células¹. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad metabólica de células inoculadas con el Rubulavirus Porcino (RVP) por medio de la prueba de Suero Neutralización de Alto Desempeño (SNAD).

Material y Método

Se utilizaron 11 virus de campo aislados entre los años 1998 a 2015 e identificados con letras de la A a la K. El Virus A fue utilizado para elaborar una vacuna inactivada emulsionada (VIE) experimental. Se empleó un suero positivo contra el RVP con un título de 1:256, el cual fue obtenido por inmunización de un cerdo con la VIE. La prueba implementada es una modificación de la empleada por Hause *et al*² y se realizó utilizando una suspensión viral con $10^{4.5}$ DICC por pozo, de cada uno de los RVP, mezclada con el suero positivo al RVP ajustado a un título de 1:8 por pozo. Por cada suspensión se trabajaron 8 pozos, dejándolos incubar por 1 hora $37^{\circ} C/5\% CO_2$. Transcurrido este tiempo se adicionó una concentración de células PK-15 con $1 \times 10^{4.0}$ por pozo, dejando 8 pozos como control celular. Las placas se incubaron a $37^{\circ} C/72$ horas/ $5\% CO_2$. Terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio de todos los pozos y se depositaron 100 μl de colorante (Alamar Blue), las placas se incubaron durante 1 hora bajo las mismas condiciones de temperatura y CO_2 . Posteriormente, se realizó la medición en un lector de ELISA (VERSAmax) utilizando los filtros 570 y 600 de longitud de onda. Una vez obtenidas las lecturas, se siguieron las indicaciones del fabricante para el cálculo de resultados³. También se realizó la prueba para conocer el comportamiento metabólico de las células infectadas únicamente con cada uno de los RVP empleados. La prueba se realizó igual que en el procedimiento arriba mencionado, pero eliminando la fase de incubación con el suero positivo contra RVP.

Resultados

Los resultados que se muestran en el Cuadro 1 indican el porcentaje de actividad metabólica celular (AMC) que refleja el porcentaje de inhibición del crecimiento celular (ICC), y que se obtienen con relación al control celular. De

un total de once aislamientos, ocho de ellos tuvieron un 100% AMC, lo que indica que el cultivo celular no se vio afectado. Por otro lado, tres aislamientos restantes presentaron entre un 94.53% a 96.28% de AMC, lo que indica que se presentó algún tipo de daño celular, pero que el virus pudo ser neutralizado. El Virus A, empleado para la elaboración de la VIE, presentó una AMC del 100% con su homólogo y con relación a los virus heterólogos, se observó un 98.67% de AMC en promedio. En cuanto a la lectura de las células inoculadas solo con los virus (sin suero), se observó que dos de ellos no afectaron la AMC mientras que el resto estuvo en un rango del 72.29% al 98.46%.

Cuadro 1. Porcentajes de AMC e ICC con relación al control celular.

Año	Identificación	Virus + Suero		Virus solo	
		% AMC	% ICC	% AMC	% ICC
1998	Virus A	100	0	81.96	18.04
1999	Virus B	95.95	4.05	93.47	6.53
2000	Virus C	100	0	100	0
	Virus D	100	0	93.50	6.50
2006	Virus E	100	0	90.61	9.39
2007	Virus F	100	0	93.73	6.27
	Virus G	94.53	5.47	86.33	13.67
	Virus H	100	0	92.24	7.76
2010	Virus I	96.28	3.72	72.29	27.71
	Virus J	100	0	100	0
2015	Virus K	100	0	98.46	1.54
PROMEDIO		98.67	1.32	91.14	8.86

Discusión y Conclusión

Independientes de las diferencias genéticas que pudieran existir y de la distancia en el tiempo con relación al virus A, se observó un 98.67% de neutralización, de este, hacia los virus heterólogos y una reducción del daño celular de un 8.86% a un 1.32% en promedio. Hause *et al* han empleado esta técnica para comparar virus de Influenza Porcina H3N2 y encontraron que aún y con títulos positivos de IH (80-160 UHA) los resultados de neutralización pueden ser negativos. La prueba de SNAD es una modificación a la prueba de suero neutralización y no solo nos sirve para evaluar los anticuerpos contra la hemoaglutinina (HA), como en el caso de la IH, sino también para detectar la presencia de epítopes inmunogénicos en otras proteínas diferentes a esta; utilizándose para estudiar la homología entre diferentes virus o para la selección de candidatos para la elaboración de una vacuna.

Bibliografía

1. Ochoa A. R. Bases para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos. Ediciones Finlay. Cuba. 2008.
2. Hause B. M. Antigenic categorization of contemporary H3N2 swine influenza virus. J. Vet. Diagn. Invest. 22:352-359 (2010).
3. Alamar Blue Assay. Invitrogen.