

MÉTODOS *in vitro* PARA TITULACIÓN DEL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA DE VENEZUELA

M.V.Z. DIÓDORO BATALLA C.¹
M.V.Z. ALEJANDRO DÍAZ GONZÁLEZ.²
M.V.Z. NADIA MANCISIDOR A.²

Resumen

Se describen diferentes métodos *in vitro* para aislamiento y titulación de virus de la *Encefalitis Equina de Venezuela* (EEV), empleando la misma línea de células en cada uno y se comparan estadísticamente los títulos obtenidos, entre sí y con el método *in vivo*.

Uno de los métodos *in vitro*, consiste en la observación al microscopio del efecto citopatogénico que el virus de la E.E.V., produce en las células cultivadas adicionando medios líquidos como nutrientes; y el otro, en la observación de la formación de placas, al cultivar las células en un medio gelificado.

No se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los títulos de los métodos *in vitro* y se observaron títulos superiores al método *in vivo* con diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

Existen diferentes métodos para el aislamiento y titulación de los arbovirus, los cuales se dividen en 2 grandes grupos: aquel en el que se emplean animales de laboratorio usando diferentes vías de inoculación (*Métodos in vivo*) y en los que se usan cultivos de diferentes tejidos de animales y humanos (*Métodos in vitro*), para lo cual se emplean un gran número de líneas celulares y técnicas de cultivo a diferentes escalas (Klein, Mahlandt y Lincoln, 1971; Hearn, Seliokas y Andersen, 1969; Stim y Handerson, 1969).

Hoy día los sistemas de cultivos celulares se están utilizando con mayor frecuencia que los métodos en los cuales se usan animales; esto es debido a que en los cultivos celulares, el virus se reproduce grandemente al encontrar células libres de substancias que las protejan, caso que no sucede con los animales (H'earn *et al.*, 1971).

En el presente trabajo se emplean dos diferentes métodos *in vitro* para aislamiento y titulación de virus de Encefalitis Equina de Venezuela (EEV), descritas por Thomas,

1966; Tribble, 1971 y C.D.C., 1970, a y b. Empleando la misma línea de células en cada uno y haciendo un estudio estadístico entre la sensibilidad de estos métodos, en comparación con el de inoculación intracerebral en ratón lactante. El diseño experimental fue un factorial completamente al azar 7×3 , con 7 niveles de lotes de vacuna y 3 métodos, usando la interacción como error.

Material y métodos

El virus empleado fue la cepa vacunal de virus vivo modificado, usando diferentes lotes de vacuna producida en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP).

Para el método *in vivo* se hicieron diluciones decuples del virus, inyectando por vía intracerebral 0.02 ml a ratones lactantes de 3 días de edad, utilizando una carnada para cada dilución y así calcular posteriormente, la dosis letal 50% por el método de Reed and Muench (1938).

Las técnicas *in vitro* para titulación de las vacunas fueron: la producción del efecto Citopatogénico y la formación de placas en monoestrato.

Las células empleadas en ambas técnicas fue la línea celular Vero de riñon de mono verde del África.

Se prepararon tubos y botellas con células de 72 a 96 horas de edad, para lo cual el primer paso fue la tripsinización de dichas

Recibido para su publicación el 23 de julio de 1973.

¹ Jefe del Departamento de Encefalitis Equina de Venezuela, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

² Departamento de Encefalitis Equina de Venezuela, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

células, para su desprendimiento de la pared de la botella. Una vez tripsinizadas, se pasan por una jeringa con aguja No. 26 para lograr una completa dispersión de las células.

La siembra se efectuó depositando 200,000 células en cada tubo y 1 millón por botella, agregando el medio descrito en el cuadro No. 1.

Cuando los tubos y las botellas presentaron un monoestrato celular completo, se procedió a la infección con diferentes diluciones de los lotes de vacuna, inoculando 1 ml de cada una de las diluciones a 5 tubos y 2 botellas, agregando el medio de cultivo descrito en el cuadro No. 1.

CUADRO 1

Medios de cultivo que se emplean para el crecimiento e infección de las células con virus de E.E.V.

Medio de Crecimiento empleado para Células VERO, en la prueba de tubo.

Medio Eagle pH-7.2
Suero Fetal Bovino 10%
Aminoácidos no Esenciales 1%

Medio para infectar las Células VERO con Virus E.E.V.

Medio Eagle pH-7.7
Albúmina Bovina Fracción V 0.5%
Aminoácidos no Esenciales 1%

Los tubos se observaron al microscopio cada 24 horas haciendo anotaciones del efecto citopatógeno, el cual se hizo apreciable a las 48 horas, en los inoculados con diluciones menores. La lectura se continuó durante 6 días, al final de los cuales, se calculó la dosis infectante 50% por el método de Reed and Muench (1938).

Las botellas infectadas se incubaron durante 1 hora a 37°C.; pasado este tiempo, se les agregó el primer Overlay (Cuadro No. 2) y se incubaron en posición invertida, es decir con la pared que tiene el monoestrato hacia arriba.

A las 48 horas, se efectuó la tinción agregando el segundo Overlay (Cuadro No. 3). Las botellas se incuban 24 horas, y prote-

giéndolas de la luz, se hace la lectura de cada una de las botellas para calcular las unidades formadoras de placas por medio de la aplicación de la siguiente forma: Número de placas por el recíproco de la dilución.

CUADRO 2

Medio para infectar las células en la prueba de placas

Primer Overlay

Solución I

Earle Bss (10 x)	19.6	ml
Agua destilada	63.0	ml
YELAH-Solución	6.6	ml
Suero Fetal Bovino	4.0	ml
NAHCO 3 (7.5%)	6.0	ml
Penicilina	40.000	U.I
Estreptomina	40	mg
Micostatin	20.000	U.I

Solución II

Agarosa	2.0	g
Agua Destilada	100.0	ml

CUADRO 3

Medio para teñir las células en la prueba de placas

Segundo Overlay

Solución I

Earle Bss (10 x)	19.6	ml
Agua destilada	55.5	ml
YELAH-Solución	6.6	ml
Suero Fetal Bovino	4.0	ml
NAHCO 3 (7.5%)	6.0	ml
Penicilina	40.000	U.I
Estreptomina	40	mg
Micostatin	20.000	U.I
Rojo Neutro (0.1%)	7.5	ml

Solución II

Noble Agar	2.0	g
Agua Destilada	100.0	ml

CUADRO 4

Títulos de virus obtenidos en lotes de vacuna contra E.E.V., empleando diferentes métodos, expresados en logaritmos

Lote No.	Ratón Lactante DL 50%	Efecto Citopatogénico en Células Vero DL 50%	Producción de Placas UFP
1	5	6.3	6.6
2	5	7.3	6.1
3	5.1	6.3	5.7
4	4.2	5.9	5.6
5	6.2	6.2	6.7
6	5	6.1	6.6
7	6.2	5.5	6.2
X	5.24	6.22	6.21

Resultados

Como puede observarse en el cuadro No. 4, los títulos encontrados en cada uno de los lotes de vacuna son similares, cuando empleamos las técnicas *in vitro*, siendo a su vez superiores en más o menos un logaritmo, en relación con la técnica *in vivo*, a excepción del lote No. 2 que fue superior en un logaritmo mediante la técnica de la observación del efecto citopatogénico que con la producción de placas, y en 2 logaritmos a la de inoculación en ratones.

Discusiones y conclusiones

Los métodos *in vitro* fueron más sensibles que el método *in vivo*, lo que concuerda con lo descrito por Hearn *et al.* (1971).

Las células VERO se pueden emplear con excelentes resultados, debido a su largo período de viabilidad y a su alta susceptibilidad al virus de la Encefalitis Equina de Venezuela.

En el análisis estadístico empleando la prueba de Duncan para comparar los diferentes métodos, no se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$), entre los títulos de los métodos *in vitro* siendo superiores a los observados en el método *in vivo*, con diferencia altamente significativa ($P < 0.01$).

Sunrmary

The tissue culture systems for isolation and titration of viruses, are taking a big advantage than the inoculation of laboratory animal methods.

That is probably due that the viruses attack cells free of protective substances and they can easily reproduce themselves; this do not happens when the animals are alive.

In this work we describe two different tissue culture systems for isolation and titration of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus, and the results are compared with the method of inoculation in mice.

One of the tissue culture methods is the citopathogenic effect observation and the other is the plaque test.

We did not obtain differences ($P < 0.05$) between the titres of the two tissue culture systems; and the results give superior titres than in the method of inoculation of mice

Literatura citada

G.D.C., 1970a, Laboratory Diagnosis of Viral Diseases, Course No. 8241-C U.S., Department of Health Education Welfare Public Health Service, Atlanta, Georgia.

- C.D.C., 1970b, Laboratory Methods in arbovirology, Course No. 8250-C U.S., *Department of Health Education and Welfare Public Health Service*, Atlanta, Georgia.
- HEARN, H. J., Z. SELIOKAS, A. A. ANDERSEN, 1969, Factors influencing Virulence and plaque Properties of Attenuated, Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus Populations, *Jour. of Virol.*, 4:454-546.
- HEARN, H. J., H. R. TRIBBLE, S. NAGLE, C. J. R. BOWRSOXO, 1971, Replication of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus in vitro. II Viral Growth Response To selected Nutritional Additives in Suspension cultures: *Apl. micr.*, 2/2:324-345.
- KLEIN, F., W. MAHLANDT, R. LINCOLN, 1971, Growth of Patogenic Virus in a large Scale Tissue Culture System, *Apl. Micr.*, 21, 2:265-271.
- REED, L. J. and H. A. MUENCH, 1938, A simple Method of Estimating fifty Per Cent and Points, *Am. Jour. of Hyg.*, 27:493-497.
- STIM, T. and J. HANDERSON, 1969, Arbovirus Plaque in a Clonal Line (PSY-15) of Porcine Kidney, *Apl. Micr.*, 17-2:246-249.
- THOMAS, W., 1966, Effect of Sodium Bicarbonate on Plaque formation by two Strains of Venezuelan Equine Encephalomyelitis (Virus), *Can. Jour Mier.*, 12:872-873.
- TRIBBLE, H. R., H. J. HEARN and S. C. NAGLE, 1971, Replication of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus in suspension cell Cultures, Grown in Serum and Defined Media, *Gen. Virol.* 10:231 -236.