

**COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD DE LAS PRUEBAS
DE SERONEUTRALIZACION CON DIFERENTES CEPAS
DE VIRUS DE LA RABIA**

I. Adaptación del virus CVS a cultivos celulares

C. CORZO CASTILLEJOS ¹
E. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN ²
G. BIJLENGA ³

Resumen

El virus estándar de confrontación (CVS), es un virus fijo de rabia mantenido por pase intracerebral en ratón. Con el fin de poder utilizar esta cepa de virus en pruebas comparativas de reducción de placas, se adaptó a cultivos celulares. Cuatro pases en células BHK-21 CL 13S fueron suficientes para adaptar el virus fijo CVS a cultivos celulares según lo evidenciaba la técnica de inmunofluorescencia. Después de adaptación a cultivos celulares, el virus formaba placas con regularidad y el título del virus fue de $10^{5.92}$ UFP/ml, con lo cual se dio por terminada esta fase del trabajo.

El comité de expertos en rabia (Kaplan y Koprowski, 1973), indicó que existe una "correlación completa" entre las pruebas de reducción de placa (Sedwick y Wiktor, 1967) y la prueba de seroneutralización en ratones (Johnson, 1973).

En virtud de que esto no concordaba con observaciones efectuadas en el Departamento de Investigación sobre Rabia Paralítica,* se decidió estudiar de nueva cuenta la relación existente entre las dos pruebas. En estudios previos (Bijlenga y Hernández, 1977a y b) se había observado una ligera discrepancia entre los títulos de reducción de placas (PRP) cuando se utilizaba un virus homólogo (V-319) y uno heterólogo (ERA). Partiendo de esta base es que se conjeturó que parte de la diferencia observada entre la prueba de seroneutralización en ratones (SNR) y la prueba de reducción de placas pudiera deberse más a que se están empleando dos cepas diferentes de virus, un virus fijo mantenido

por pases intracerebrales en ratón blanco contra un virus adaptado a cultivos celulares, que si bien puede tener algunas características de los virus fijos, tiene otras diferentes (Wright y Habel, 1948; Wiktor y Clark, 1975). Con base en esta hipótesis de trabajo se decidió adaptar el virus CVS a cultivos celulares con el fin de utilizarlo en trabajos posteriores (Corzo y Hernández, 1977; Hernández y Corzo, 1977) de comparación crítica entre las dos pruebas (SNR y PRP).

Material y métodos

Se empleó una línea celular en este trabajo:

13S Cl₃. Esta línea celular es una clona de la línea BHK-21 (Mac Pherson y Stoker, 1962) y fue adquirida del Instituto Wistar de Filadelfia, EUA por el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias y la clona 3 fue preparada en el Departamento de Investigaciones sobre Rabia Paralítica.

Las pruebas de reducción de placas y seroneutralización, se efectuaron de acuerdo con las técnicas descritas (Johnson, 1973 y Sedwick y Wiktor, 1967). Para verificar el crecimiento del virus rábico se empleó la técnica de inmunofluorescencia, según las técnicas publicadas (Dean, 1973).

La adaptación del virus "CVS" a células 13S Cl₃, se realizó con la técnica siguiente:

Recibido para su publicación el 15 de marzo de 1977.

¹ Central Sur 216, Arriaga, Chiapas.

² Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias-SARH, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, Distrito Federal.

³ Parc. St. Didier 77, Chemin des Esses 69370 St. Didier An Mont d'or Francia.

* E. Hernández Baumgarten y G. Bijlenga, observaciones no publicadas.

Se colocaron cuatro cubreobjetos estériles en cada una de cinco cajas de Petri de 50 mm de diámetro y se sembraron células 13SCl₃ pase 25 en cada una de las cajas. Una vez crecidas las células (monoestrato) se infectaron con virus CVS en diluciones 10⁻⁰ a 10⁻³ y en presencia de DEAE Dextran (100 mg/ml) (Kaplan *et al.*, 1967). Después de una hora de incubación a 37°C y 5% de CO₂ con las diferentes diluciones del virus, se procedió a poner medio de mantenimiento conteniendo medio BHK, 2% de suero fetal bovino y antibióticos a las células. Los cubreobjetos se tiñeron a las 30, 48 y 72 hs por la técnica de anticuerpos fluorescentes. A las 48 horas de infectadas las células, se cosechó el sobrenadante de las dos diluciones o sea de las cajas 10⁻⁰ y 10⁻². La caja de la dilución 10⁻¹ se mantuvo en congelación a 20°C durante 24 horas, después de las cuales se descongeló y se procedió a envasar, etiquetar y congelar nuevamente a -70°C. Este primer pase de CVS se identificó como CVS 1. Con el CVS-1 se infectaron botellas de leche y tubos de Leighton con células 13Cl₃ pase 27, tiñéndose los cubreobjetos de los tubos de Leighton 30 horas después de la infección, obteniendo así el segundo pase del virus a cultivos celulares. Este virus (CVS-2) fue titulado en prueba de microfocos fluorescentes con células 13SCl₃ (pase 30). Las diluciones fueron de 10⁻⁰ a 10⁻⁴ cajas por cada dilución y colocando cuatro cubreobjetos en cada caja, siguiendo la técnica descrita (Hernández y Bijlenga, 1973; Goldwasser y Kissling, 1958). A partir de esta botella infectada se obtuvieron tres muestras, la primera a las 48 horas después de la infección cosechando el medio y añadiendo nuevo medio de mantenimiento

al mismo monoestrato. La segunda cosecha fue a las 96 horas y la tercera a las 120 horas. En este último pase se realizaron algunas modificaciones en la técnica, ya que a esta muestra se le neutralizó el pH (aproximadamente a las 72 horas), se cosechó este medio a las 96 horas y se puso nuevo medio de mantenimiento, después se neutralizó el pH a las 110 horas y a las 120 horas se procedió a congelar la botella a -20 C durante 24 horas. Posteriormente se descongeló y centrifugó para sedimentar detritus celulares a 2,000 rpm durante cinco minutos, el sobrenadante se envasó en tubos de plástico de 2 ml poniendo en cada tubo 1.5 ml identificándolo como CVS-3 y se procedió a congelar a -70 C conservándose a esta temperatura. Este virus se tituló mediante la prueba de placas (Sedwick y Wiktor, 1967).

Resultados

Los resultados de la adaptación del virus CVS a cultivos celulares se resumen en el Cuadro 1. En el primer pase se observó un reducido número de células positivas a inmunofluorescencia de 48 horas en adelante. A las 48 horas se observó una buena infección en la caja infectada con CVS 10⁻¹ y se congeló a fin de liberar la mayor cantidad posible de virus de las células infectadas. Con el material de esta caja se efectuó el segundo pase, pero ahora en botellas de dilución de leche para contar con más material de cosecha. En tubos de Leighton se siguió en forma paralela la adaptación del virus a cultivos celulares. Como se ilustra en el Cuadro 1, la adaptación completa se efectuó en cuatro pases. Los pases intermedios (2, 3 y 4) arrojaron títulos de

CUADRO 1

Proceso de adaptación de CVS a cultivos celulares

Fase de adaptación	10 ⁻⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Tiempo
Primer pase	+ ¹	+	+	-	48 horas en adelante
Segundo pase	4+ ²	4+ ²	NH	NH	30 horas en adelante
Tercer pase	4+ ²	4+ ²	NH	NH	24 horas en adelante
Cuarto pase	4+ ²	NH	NH	NH	Título final de 10 ^{5.92} . UFP

¹ Se consideró positivo a inmunofluorescencia cuando una o varias células del monoestrato estaban inequívocamente infectadas.

² 4+ altamente positivo, 60% de las células o más contenían antígeno inmunofluorescente.
NH. No se hizo.

microfocos cada vez más altos y a partir del cuarto pase el virus empezó a formar placas en suspensión en agarosa, dando un título de $10^{5.92}$ UFP/ml.

Discusión

La adaptación del virus CVS a cultivos celulares se presenta engañosamente sencilla. Sólo se comunican los procedimientos que dieron buen resultado en el proceso de adaptación, independientemente de muchos trabajos que condujeron a callejones sin salida y se perdió el virus.

La parte más difícil probó ser el primer pase, que hubo que repetir hasta por seis veces antes de lograr que las células infectadas produjeran suficiente virus como para lograr infectar nuevas células con el sobrenadante. Una vez lograda la adaptación del CVS a cultivos celulares se preparó un buen lote de

CVS adaptado, para efectuar la comparación de títulos de reducción de placas con el virus homólogo y con virus heterólogos, así como entre PRP y SNR. (Corzo y Hernández, 1977; Hernández y Corzo, 1977.)

Summary

The challenge virus standard (CVS) is a fixed strain of rabies virus maintained by intracerebral passage in mice. In order to be able to use this strain in comparative plaque reduction tests it was decided to adapt it to tissue culture. Four passages in BHK-21, Cl 13S cells were sufficient to adapt the fixed CVS virus to tissue culture as seen by the immunofluorescence test. After adapting the virus to tissue culture, it formed plaques in agarose suspensions regularly, reaching a titer of $10^{5.92}$ PFU/ml. With these results this phase of the work was finished.

Literatura citada

- BIJLENGA, G. and E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, 1977a, Testing of the vaccine potential of the plaque purified rabies virus strain V-319, derived from a vampire bat (*Desmodus rotundus*), in: *Br. vet. J.* (in press).
- BIJLENGA, G. and E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, 1977b, Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies isolate V-319 from a vampire bat (*Desmodus rotundus*), *Br. vet. J.* (in press).
- CORZO CASTILLEJOS, D., y E.M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, 1977, Comparación de la sensibilidad de las pruebas de seroneutralización con diferentes cepas del virus de la rabia. II. Comparación de la prueba de reducción de placas utilizando tres cepas de virus rábico adaptado a cultivos celulares, *Téc. Pec. Méx.*, 32:69-75.
- DEAN, D., 1973, The fluorescent antibody test. chapt. 5 in laboratory techniques in rabies 3rd ed., *World Health Organization*, Geneva, Switzerland, monograph series N° 23, 59-68.
- GOLDWASSER, R.A. and R.E. KISSLING, 1958, Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98: 219-223.
- HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, E.M., y G. BIJLENGA, 1973, La prueba de microfocos fluorescentes: Una nueva técnica *In vitro* para titulación y seroneutralización del virus rábico, *Téc. Pec. Méx.*, 24:41-46.
- HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, E.M., y D. CORZO CASTILLEJOS, 1977, Comparación de la sensibilidad de las pruebas de seroneutralización con diferentes cepas del virus de la rabia. III. Comparación de la prueba de seroneutralización en ratones con la prueba de reducción de placas, *Téc. Pec. Méx.*, 32:76-80.
- JOHNSON, H.N., 1973, The virus neutralization index test in mice, chapter 8, in *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd ed., *World Health Organization*, Geneva, Switzerland, monograph series N° 23, 94-97.
- KAPLAN, M.M.; T.J. WIKTOR; R.P. MAES; J.B. CAMPBELL and H. KOPROWSKI, 1967, Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in tissue culture: Construction of a single cycle growth curve, *J. Virol.*, 1:145-151.
- KAPLAN, M.M. and H. KOPROWSKI, 1973, Sixth report on the expert committee on rabies, *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.
- MAC PHERSON, I. and M. STOKER, 1962, Polyoma transformation of hamster cell clones and investigation of genetic factors affecting cell competence, *Virology*, 16:147-151.
- SEDWICK, W.D. and T.S. WIKTOR, 1967, Reproducible plaquing system for rabies, lymphocytic choriomeningitis virus (LCM) and other RNA viruses in BHK-21, 13S Agarose suspensions, *J. Virol.*, 1:1224-1226.
- WIKTOR, T.J. and H.F. CLARK, 1975, Growth of rabies virus in cell culture. In: *The natural history of rabies*, G. Baer Ed. Academic Press Inc. Vol. 1, pp. 155-180.
- WRIGHT, J.T. and K. HABEL, 1948, A comparison of antigenicity and certain biological characteristics of 6 substrains of Pasteur fixed rabies virus, *J. Immunol.*, 60:503-515.