



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE LOS TITULOS VIRALES DE LA CEPA TC-83
DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EN TRES CULTIVOS
CELULARES

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

Médico Veterinario Zootecnista

p r e s e n t a

SERGIO ROSENDO GODINEZ VAZQUEZ



Asesor: Laura Patricia Noe Martínez

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COMPARACION DE LOS TITULO . VIRALES DE LA CEPA TC-83
DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EN TRES CULTIVOS
CELULARES.

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico veterinario y Zootecnista

por

Sergio Rosendo Godínez Vázquez
Asesor: Laura Patricia Noé Martínez

México, D.F.

1986.

"i"

A MI MADRE:

Por su inagotable entusiasmo en mi realización,
ejemplo de trabajo y superación.

Con amor. Gracias.

A MI ASESOR:

M.V.Z. Laura Patricia Noé Martínez

Sus conocimientos y experiencias están
presentes en éste trabajo gracias.

Con afecto y agradecimiento al:

M.V.Z. Luis A. Fernández Zorrilla

Al Sr. Francisco Javier Camara Reyes
en agradecimiento a la ayuda para la
realización de éste trabajo.

A MIS AMIGOS:

Porque siempre tienen tiempo para conversar
con la naturaleza.

Para LUPITA que comparte
el mismo sueño conmigo.

"iv"

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS.....	9
DISCUSION.....	12
LITERATURA CITADA.....	14

RESUMEN

GODINEZ VAZQUEZ, SERGIO ROSENDO. Comparación de los títulos virales de la cepa TC-83 de Encefalitis Equina Venezolana en tres cultivos celulares (bajo la dirección de: Laura Patricia Noé Martínez).

Este trabajo se realizó en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). Con la finalidad de obtener títulos virales iguales o superiores de la cepa vacunal TC-83 de Encefalitis Equina Venezolana (E.E.V.), aprovechando las ventajas que ofrecen los cultivos de línea en comparación con los cultivos primarios. Se utilizaron tres tipos de cultivos celulares: el cultivo primario de células de corazón de cuye fetal (que se utiliza para producir la vacuna contra E.E.V.), células de riñón de hamster lactante (BHK-21) y riñón de cerdo (PK-15). Se obtuvieron dos cosechas de cada cultivo celular y mediante el método de Reed y Muench se calculó la Dosis Letal Ratón Lactante por mililitro (DLRL 50%/ml). El título viral mayor del promedio final fue de $10^{8.2}$ DLRL/ml y correspondió a las células BHK-21, lo que sugiere realizar pruebas de inmunogenicidad en animales para elaborar la vacuna contra la E.E.V. cepa TC-83 en este cultivo.

INTRODUCCION

La Encefalitis Equina Venezolana (E.E.V. es una enfermedad viral, afecta principalmente a equinos, a los cuales les provoca incapacidad zootécnica y muerte (80% al 90%) (7,22).

Los primeros brotes se reconocieron en Colombia en 1935, de ahí se difundió a Venezuela donde provocó una epizootia grave en caballos y mulas, posteriormente se presentó en otras regiones de Sudamérica (Brasil, Ecuador y la isla de la Trinidad), Centroamérica (Panamá, Costa Rica, Nicaragua, El Salvador y Guatemala), México y Estados Unidos de Norteamérica, produciendo brotes severos (1,11,15,21,22). En México se conoce la presencia del virus de la E.E.V. desde 1962, cuando se encontraron anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en sueros de humanos de la región de Champotón, Campeche (22).

El virus de la E.E.V. pertenece a la familia Togaviridae, género Alfavirus (grupo "A" de los Arbovirus) (7,13,17,19,-21), mide de 60 a 80 nanómetros (nm) de diámetro, esta constituido por una cápside de simetría icosaédrica rodeada de una envoltura lípida, el genoma es una molécula de ácido ribonucleico de filamento único, se replica en el citoplasma de las células y adquiere su envoltura al salir de las mismas atravesando la membrana citoplasmática, produce efecto citopático en cultivos celulares (aunque en células de mosquitos no se ha presentado efecto citonatógeno) se inactiva con calor y solventes de lípidos. La hemaglutinina es un componente inmunológico en la superficie del virus (6).

"In vitro" el virus de la E.E.V. se replica en cultivos celulares primarios como las células de corazón de cuye fetal (C.C.F.) (6) y en cultivos continuos o de línea, tales como células de riñón de hamster lactante BHK-21 (12,13,16,20,-22,24), células de riñón de cerdo PK-15 (15), células de riñón de mono verde VERO (12,13,19,27), células de carcinoma de cervix humano HeLa (20,22) y células de macrófagos de ratón BW-J-M (14).

Infecta a vertebrados y artrópodos (1,9,13,18,22). Se reconocen dos ciclos biológicos en la naturaleza, el ciclo en zoodémico entre pequeños mamíferos y mosquitos, afectando ocasionalmente al hombre y a los equinos; y el ciclo epizootémico que se manifiesta con brotes severos, tanto en humanos como en equinos (13,22). Los principales transmisores biológicos son los mosquitos de los géneros Aedes, Culex y Anopheles (1,7,18,24,26), se sospecha de moscas hematófagas de los géneros Tabanus, Chryseps y Entomoxys, que actúan como vectores mecánicos en epizootias (22).

Los roedores y aves migratorias juegan un papel importante en el ciclo del virus de la E.E.V. como reservorios (26). Como el virus se encuentra en nariz, ojos, boca, orina y leche en animales infectados no se descarta la transmisión por contacto directo (1,15).

10) Para el control de la Encefalitis Equina Venezolana se tiene que combatir a los transmisores biológicos o prevenir la enfermedad por medio de vacunas (3). La vacuna más conocida es la elaborada con la cepa "TC-83" aislada del cerebro de un burro infectado durante un brote en la isla de la Trinidad en 1943 (22,25); esta cepa ofrece un extenso margen de

seguridad (4) pues la viremia que provoca en el animal es incapaz de infectar a los mosquitos y a la fecha no se ha demostrado reversión a la patogenicidad (22).

Para el aislamiento del virus de la E.E.V. es conveniente utilizar embriones de pollo y animales altamente susceptibles (cuyos, hamster, ratón suizo, pollos de un día de nacidos), así como las líneas celulares continuas en las cuales los efectos citopáticos son con frecuencia incompletos y bastante insatisfactorios (13,22).

En México para la elaboración de la vacuna contra la E.E.V., con la cepa TC-83, se utiliza el cultivo primario de corazón de cuye fetal, la vacuna así elaborada ha brindado una inmunidad sólida y duradera (1). Sin embargo, desde el punto de vista del productor de biológicos se sabe que un cultivo primario tiene un crecimiento además de difícil limitado "in vitro" (de cinco a diez divisiones). En cambio los cultivos celulares de línea son capaces de propagarse "in vitro" indefinidamente por medio de subcultivos de las células a intervalos regulares (13,23). También conservan su viabilidad por muchos años si se almacenan a bajas temperaturas (12).

El virus de la E.E.V. se replica en cultivos celulares de línea y la producción de la vacuna se realiza en cultivo celular primario de corazón de cuye fetal con la cepa TC-83, utilizando las ventajas que ofrecen los cultivos de línea en comparación con el cultivo primario de corazón de cuye fetal, se infectaran con la misma cepa vacunal los cultivos

- 5 -

BHK-21 y PK-15 esperando cosechar fluidos con títulos virales iguales o superiores que en el cultivo primario.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron cinco cuyes hembras (albinos raza Hartley) en el último tercio de la gestación, se sacrificaron para extraer estérilmente los corazones de los fetos; posteriormente se realizó el cultivo primario de las células de corazón de cuye fetal utilizando el medio de crecimiento Eagle con un 10% de suero fetal de ternera. Al formarse el monoestrato se procedió a realizar tres pases de las células y se infectaron con la semilla de la cepa TC-83 de E.E.V., de acuerdo al protocolo de producción, propiedad de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE).

Paralelamente, se sembraron botellas con células BHK-21 con medio de crecimiento BHK con 10% de suero fetal de ternera y células PK-15 con medio de crecimiento Eagle (10% de suero fetal de ternera). Cuando se formó el monoestrato celular de los cultivos celulares continuos también se inocularon con la cepa TC-83.

Los tres tipos de cultivos celulares se incubaron a 37°C durante una hora y media, después se desechó el inóculo y se agregó medio de mantenimiento Eagle (con 0.5% de solución de albumina bovina B.S.A. al 12.5%) a las células de corazón de cuye fetal y PK-15 y medio de mantenimiento BHK (0.5% B.S.A. al 12.5%) a las células BHK-21; añadiendo antibiótico (penicilina, estreptomycin y kanamicina) y fungicida (anfotericina B) e incubándolos a 34°C hasta la cosecha.

La primera cosecha del virus se realizó al observar en los cultivos celulares el efecto citopático (formación de célu-

las gigantes multinucleadas y desprendimiento celular) aproximadamente a las 30 horas posinoculación. Se agregó nuevamente medio de mantenimiento para obtener la segunda cosecha que se realizó 18 horas después.

Los líquidos que se cosecharon se ajustaron a un pH de 7.6 a 7.8, se centrifugaron en refrigeración y se tomaron tres alícuotas de cada uno para las pruebas de titulación, pureza e inocuidad. Finalmente las muestras se congelaron a -70°C .

Para la titulación de virus se realizaron diluciones logarítmicas seriadas, inoculando a camadas de ratones lactantes (8 ratones por camada) cepa C.F.W. de no más de tres días de edad por vía intracerebral y con una dosis de 0.02-ml. Se observaron durante 14 días descartando los que murieron las primeras 24 horas posteriores a la inoculación (2,-10).

El cálculo del título del virus se realizó por el método de Reed y Muench, expresándolo como Dosis Letal Ratón Lactante 50% por mililitro (DLRL 50%/ml) (5,8).

La determinación de inocuidad se desarrolló en ratones de la cepa C.F.W. de 18 a 22 g de peso a los cuales se les inoculó 0.5 ml de la muestra por vía intraperitoneal (10 ratones por cada muestra) y se observaron durante 14 días.

Para la prueba de pureza se sembró 1 ml de la muestra en cada uno de los medios sólidos como Mc. Conkey, Vogel y Johnson, verde brillante, tripticasa de soya, dextrosa Sa -

bouraud y en medios líquidos como caldos de tioglicolato y dextrosa Sabouraud. Sólo los medios de dextrosa Sabouraud se mantuvieron a temperatura ambiente (22°C a 25°C) durante 14 días y los demás se incubaron 10 días a 37°C observándose diariamente.

RESULTADOS

A) Los títulos virales obtenidos en los tres tipos de cultivos celulares, infectados con la cepa TC-83 del virus de la Encefalitis Equina Venezolana, se expresan en el Cuadro 1.

CUADRO 1

TITULOS VIRALES⁺

CULTIVO CELULAR	P R I M E R A C O S E C H A				S E G U N D A C O S E C H A			
	MUESTRA			PROMEDIO	MUESTRA			PROMEDIO
	1	2	3		1	2	3	
C.C.F.	8.2	7.9	8.3	8.1	7.3	7.7	7.3	7.4
BHK-21	8.5	8.3	8.1	8.3	8.0	8.4	8.2	8.2
FK-15	5.0	4.1	4.2	4.4	6.2	5.8	5.9	5.9

+ La expresión está dada en exponencial de base 10 e indica la dosis letal ratón lactante 50% por mililitro (DL₅₀/-ml).

C.C.F.= corazón de cuye fetal

BHK-21= riñón de hamster lactante, clona 21

FK-15= riñón de cerdo, clona 15

B) Las diferencias de los promedios, de la primera y segunda cosecha de los títulos virales obtenidos en los cultivos celulares, infectados con la cepa TC-83 del virus de la E.E.V. se expresan en el Cuadro 2.

CUADRO 2

PROMEDIOS DE LOS
TITULOS VIRALES⁺

CULTIVO CELULAR	PROMEDIO PRIMERA COSECHA	PROMEDIO SEGUNDA COSECHA	PROMEDIO FINAL
C. C. F.	8.1	7.4	7.7
BHK-21	8.3	8.2	8.2
PK-15	4.4	5.9	5.1

+ La expresión está dada en exponencial de base 10 e indica la dosis letal ratón lactante 50% por mililitro (DLRL 50%/-ml).

C.C.F.= corazón de cuye fetal

BHK-21= riñón de hamster lactante, clona 21

PK-15= riñón de cerdo, clona 15

C) Los animales utilizados para determinar la inocuidad de las cosechas virales, no mostraron signos adversos locales ni sistémicos durante el tiempo de observación. Por lo que se consideró satisfactoria.

D) En los medios bacteriológicos empleados para la detección de contaminantes aerobios y anaerobios no se observó crecimiento alguno durante el período de prueba.

DISCUSION

Los promedios de los títulos virales de la primera cosecha de C.C.F. y BHK-21 son muy semejantes (8.1 y 8.3 respectivamente) mientras que el de células PK-15 es menor (4.4).

Los promedios de las segundas cosechas varían de los promedios de las primeras en los cultivos de C.C.F. (de 8.1 a 7.4) y en PK-15 (de 4.4 a 5.9) pero no en BHK-21 (de 8.3 a 8.2), porque las células BHK-21 mostraron mayor viabilidad por el menor efecto citopático, lo que favoreció la replicación del virus (16); la segunda cosecha del cultivo BHK-21 muestra títulos virales que se mantienen similares con su primera cosecha.

En los promedios de las dos cosechas del cultivo primario de células de corazón de cuye fetal el valor más alto está en la primera cosecha. Esto probablemente se deba a que el efecto citopatogénico impide en cosechas subsecuentes títulos virales superiores (estas células mostraron el mayor efecto citopatogénico en comparación con los otros dos cultivos celulares).

En los promedios de las células PK-15 se observa una diferencia significativa: el valor promedio de la primera cosecha (4.4) es menor en relación al valor promedio de la segunda cosecha (5.9). Es factible que estas células el tiempo óptimo para realizar las dos cosechas sea diferente al marcado por el protocolo empleado. A diferencia, los dos cultivos (C.C.F. y BHK-21) obtuvieron mejores resultados en su primera cosecha.

Cuando se comparan los resultados del "promedio final" se infiere que en BHK-21 el valor es el más alto 8.2, mientras que en C.C.F. es de 7.7 y en PK-15 es 5.1; además muestra diferencias significativas de -0.5 para C.C.F. y de -3.1 para PK-15, considerando la expresión logarítmica de base diez; importante cuando se habla de productividad en la elaboración de un biológico.

Se sugiere realizar pruebas de inmunogenicidad en animales para recomendar la elaboración de la vacuna contra la Encefalitis Equina Venezolana cepa TC-83 en el cultivo de línea BHK-21, aprovechando las ventajas relacionadas con la mayor productividad que esto ofrece.

El virus vacunal cepa TC-83 inoculado en los cultivos continuos (BHK-21 y PK-15) conservó su inocuidad y puede utilizarse sin ningún riesgo.

LITERATURA CITADA

1. Andrewes, C., Pereira, H. G. and Wildy, P.: Viruses of vertebrates. 4th ed. Bailliere Tindall, London, 1978.
2. Batalla, C. D., Díaz, A. A. y Muñoz, E.: Métodos "in vitro" para la titulación del virus de la encefalitis equina venezolana. Téc. Pec. Méx., 23: 25-28 (1972).
3. Batalla, C. D., Landeros, Ma. A. y Mancisidor, N.: Viabilidad de la vacuna contra la encefalitis equina venezolana (TC-83) utilizando diferentes diluyentes. Téc. Pec. Méx., 27: 46-50 (1974).
4. Batalla, C. D.: Modificación en la fórmula del estabilizador de la vacuna contra encefalitis equina venezolana (cepa TC-83). Téc. Pec. Méx., 28: 34-37 (1975).
5. Batalla, C. D., Soto, N. F. y Gonzáles, T. A.: Determinación de la inmunogenicidad de una cepa de encefalitis equina venezolana en tercer pase. Rev. Lat. Microbiol., 21: 96 (1979).
6. Berge, T. O., Banks, L. S. and Tiggertt, W. D.: Attenuation of venezuelan equine encephalomyelitis virus by and "in vitro" cultivation guinea pig heart cell. Am. J. Hyg., 73: 209-218 (1961).
7. Jarter, G. R. and Wayne, R. A.: Outline of Veterinary virology. 2nd ed. Columbia, Los Angeles, Cal., 1973.

8. Cole, E. F., JR. May, W. S. and Eddy, A. G.: Inactivated venezuelan equine encephalomyelitis vaccine prepared from attenuated (TC-83) virus. Appl. Microbiol., 27: 150-153 (1974).
9. Colter, J. S. and Paranchych, W.: The Molecular Biology of Viruses. Academic Press, New York, 1967.
10. De paz, O., Martell, M., Medina, J. and García, J.: Elaboración de un antígeno a virus vivo modificado para la técnica de inhibición de la hemaglutinación de la Encefalitis Equina Venezolana. Rev. Lat. Microbiol., 21: 96 (1979).
11. Dickerman, W. R. y Scherer, F. W.: Manada de caballos como centinelas para detectar la actividad del virus de la encefalitis equina venezolana en Nicaragua, 1977. Bol. Of. Sanit. Panam., 94: 150-156 (1983).
12. Fenner, F., McAuslan, B. R., Mims, C. A., Sambrook, J. and White, D. O.: The Biology of Animal Viruses. 2nd ed. Academic Press, New York, 1974.
13. Fenner, F. and White, D. O.: Medical Virology. 2nd ed. Academic Press, New York, 1976.
14. Huggins, J. W., Jahrling, P. B. and Linden, C. D.: Characterization of the binding of the TC-83 strain of venezuelan equine encephalomyelitis virus to BW-J-M a mouse macrophage like cell line. J. Gen. Virol., 64: 149-158 (1983).

15. Hull, T. G.: Diseases Transmitted from Animals to Men. 5th ed. Thomas Books, Springfield, Ill., 1963.
16. Johnson, A. D., Eddy, G. A., Gangemi, J. D., Rensburg, H. H. and Metzger, J. F.: Production of venezuelan equine encephalitis virus in cell grow on artificial capillaries. Eviron Microbiol., 35: 431-434 (1978).
17. Lunger, P. D. and Clark, F. H.: Reptilia-Related viruses in: Advances in virus research. Edited by: Lauffer, M. A., Bang, F. B., Maramorosch, K. and Smith, K. M., 159-200, Academic Press, New York, 1978.
18. Maramorosch, K. and Kurstak, E.: Comparative Virology. Academic Press, New York, 1971.
19. Mecham, J. O. and Trent, D. W.: Abiochemical comparison of the "in vitro" replication of virulent and an avirulent strain of venezuelan encephalitis virus. Gen. Virol., 4: 1111-1120 (1983).
20. Mercado, M. S.: Respuesta inmunológica en caballos inoculados con pases seriados de virus vivo modificado de encefalitis equina venezolana, Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 1973.
21. Mohanty, S. B. and Dutta, S. K.: Veterinary Virology. Lea and Febiger, Philadelphia, 1981.

22. Morrilla, A. G. and Batalla, C. D.: Encefalitis equina venezolana. Ciencia Veterinaria. 1: 163-218 (1976).
23. Prier, E. J.: Laboratory Cultivation of Viruses in: Basic Medical Virology. Edited by: James E. Prier., 38-77, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1966
24. Rhodes, A. J. and Rooyen, C. E.: Tratado de Virología. To - ray, Barcelona, España, 1972.
25. Rosales, J. O.: Respuesta serológica de algunos animales de laboratorio a la vacuna contra encefalitis equina venezolana TC-95, Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1973.
26. Theiler, M. and Dawns, W. G.: The Arthropod Borne Virus of Vertebrate, Yale University Press, New Haven, Conn., 1973.
27. Walder, R. and Liprandi, F.: Kinetics of heat inactivation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. Arch. Virol., 51: 307-317 (1976).