



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

Evaluación de la permisividad de diferentes líneas celulares y un cultivo
primario al *Metapneumovirus aviar*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL.

PRESENTA:
KARINA GAVIÑA MORALES

TUTOR PRINCIPAL: LUIS PADILLA NORIEGA.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.

COMITÉ TUTOR:
HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RESUMEN

El *Metapneumovirus aviar* (MPVa) es un miembro de la familia *Paramyxoviridae* y se clasifica en cuatro subtipos denominados A, B, C y D. MPVa infecta principalmente el tracto respiratorio superior de aves comerciales y silvestres. En pollos causa rinotraqueítis, sin embargo la infección puede diseminarse al aparato reproductivo ocasionando una caída en la producción de huevo en gallinas, así como disminución de la fertilidad en gallos. Además, en presencia de agentes secundarios como *Escherichia coli* se puede producir el síndrome de cabeza hinchada que afecta a los pollos. La replicación de MPVa se realiza habitualmente en la línea Vero de células de riñón de mono verde, no obstante se sabe poco acerca de la permisividad de otras líneas celulares de mamífero a este virus. En este estudio determinamos la permisividad de 10 líneas celulares de mamífero, incluyendo a las células Vero, y un cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo a un aislado mexicano de MPVa de subtipo A (aMPV/A/chicken/Mx/Jal/2008). Para este fin se infectaron los distintos cultivos celulares con MPVa a una multiplicidad de infección de 0.5, se cosechó a las 72 horas post-infección y se determinó el rendimiento viral por unidades formadoras de focos (UFF). Se identificaron tres líneas altamente permisivas al MPVa: A-72, PK-15 y BGM cuyo rendimiento de UFF/ml es similar al obtenido en células Vero ($\sim 10^6$ UFF/ml), dos líneas celulares medianamente permisivas: RK-13 y MARC-145 (10^3 - 10^4 UFF/ml), así como cuatro líneas celulares (LLC-MK2, MDBK, MDCK, Hep-2) y el cultivo de fibroblastos de pollo que no fueron permisivos. Los hallazgos de este estudio son útiles para el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico y de aislamiento del MPVa.

Palabras clave: Virología, infecciones del tracto respiratorio, *Paramyxoviridae*, *Metapneumovirus*, crecimiento y desarrollo.

SUMMARY

Avian metapneumovirus (aMPV) is a member of the family *Paramyxoviridae* that is classified into four subtypes, designated A, B, C and D. aMPV primarily infects the upper respiratory tract of commercial poultry and wild birds. In chickens aMPV causes rhinotracheitis, however the infection can spread to the reproductive system causing decreased egg production in hens, and decreased fertility in roosters. Upon secondary infections with *Escherichia coli* swollen head syndrome may arise in chickens. aMPV is usually replicated in Vero a line of green monkey kidney cells, However little is known about the permissibility of other mammalian cell lines. In this study we determined the permissiveness of 10 mammalian cell lines, including Vero, and a primary culture of chicken embryo fibroblasts to a mexican isolate of aMPV subtype A (aMPV/A/chicken/Mx/Jal/2008). For this purpose, the cultured cells were infected with aMPV at a multiplicity of infection of 0.5, harvesting at 72 hours post-infection and titrating viral yields by focus forming units (FFU). Three highly permissive cell lines were identified to aMPV: A-72, PK-15 and BGM whose yield of FFU/ml is similar to that obtained in Vero cells ($\sim 10^6$ FFU /ml), two cell lines were moderately permissive: RK-13 and MARC-145 (10^3 - 10^4 FFU/ml), and four cell lines (LLC-MK2, MDBK, MDCK, Hep-2) and chicken fibroblast were not permissive. The findings of this study are useful for the development of improved diagnostic methods and for aMPV isolation.

Keywords: Virology, respiratory tract infections, *Paramyxoviridae*, *Metapneumovirus*, growth and development.

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Agente etiológico.	2
1.2 Clasificación taxonómica.	2
1.3 Proteínas virales.	3
1.3.1 Complejo polimerasa.	3
1.3.2 Proteína de matriz.	4
1.3.3 Proteínas de superficie.	4
1.4 Ciclo de replicación viral.	7
1.5 Clasificación y especies susceptibles.	10
1.6 Técnicas diagnósticas.	11
1.6.1 Técnicas de detección del antígeno.	11
1.6.2 Técnicas serológicas.	12
1.6.3 Técnicas moleculares.	12
1.6.4 Aislamiento viral.	13
1.6.5 Aislamiento primario.	13
1.6.6 Adaptación a líneas celulares continuas.	14
1.7 Antecedentes de las líneas celulares empleadas.	14
2. JUSTIFICACIÓN.	18
3. HIPÓTESIS.	19
4. OBJETIVOS.	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS	21

6. RESULTADOS.	34
7. DISCUSIÓN.	49
8. CONCLUSIÓN.	55
9. REFERENCIAS.	56
10.APÉNDICE.	67

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Representación esquemática de MPVa.	2
Figura 2. Ciclo replicativo de MPVa.	7
Figura 3. Curva de crecimiento (virus total) de MPVa.	34
Figura 4. ECP en células Vero, BGM y A-72 infectadas con MPVa.	37
Figura 5. ECP en células RK-13, PK-15 y MARC-145 infectadas con MPVa.	38
Figura 6. ECP en fibroblastos de embrión de pollo infectados con MPVa.	38
Figura 7. ECP en células Hep-2, LLC-MK2, MDBK y MDCK infectadas con MPVA.	39
Figura 8. SDS-PAGE, tinción nitrato de plata.	41
Figura 9. Densitometría de las bandas de interés para la determinación de proteína del MPVa purificado.	43
Figura 10. Detección por inmunoperoxidasa en células Vero infectadas con MPVa replicado a un pase previo en distintas líneas celulares.	47
Figura 11. Evaluación de la permisividad de diferentes cultivos celulares al MPVa mediante UFF y DICC ₅₀ .	48

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Nombre y origen de cada uno de los cultivos empleados en el estudio.	22
Cuadro 2. Infectividad de MPVa en diferentes cultivos celulares.	36
Cuadro 3. Determinación de los pesos moleculares de las bandas abundantes de MPVa purificado y comparación con los pesos moleculares reportados de proteínas de MPVa.	42
Cuadro 4. Determinación de la concentración de proteína tomando como referencia el testigo de albúmina de 100 ng.	44
Cuadro 5. Determinación de la concentración de proteína con ImageJ de las bandas de interés de MPVa.	44
Cuadro 6. Determinación de la permisividad de distintos cultivos primarios y un cultivo primario a MPVa replicado en cada cultivo celular y estableciendo el título viral en la línea de referencia Vero.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

BI	Bronquitis infecciosa aviar.
D-MEM	Medio esencial modificado por Dulbecco.
DICC₅₀	Dosis infectantes en cultivo celular al 50%.
ENC	Enfermedad de Newcastle.
ECP	Efecto citopático.
F	Proteína de fusión.
G	Glicoproteína G de unión al receptor.
HR	Región hepta-repetida.
IFN	Interferón.
IRF	Factor regulador de IFN.
L	Polimerasa larga (ARN polimerasa ARN dependiente).
LT	Laringotraqueítis aviar.
N	Nucleoproteína.
NF-κB	Factor nuclear kappa activador de células B.
M	Proteína de matriz.
M2	Segunda proteína de matriz.
MOI	Multiplicidad de infección.
MPVa	<i>Metapneumovirus aviar.</i>
MPVh	<i>Metapneumovirus humano.</i>
P	Fosfoproteína.
PBS	Solución buffer fosfatada.

RE	Retículo endoplásmico.
RIG-1	Gene 1 inducible por ácido retinoico.
rpm	Revoluciones por minuto.
SCH	Síndrome de cabeza hinchada.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
SFB	Suero fetal bovino.
SH	Proteína pequeña hidrofóbica.
TM	Dominio transmembranal.
UFF	Unidades formadoras de focos.
UFP	Unidades formadoras de placas.

1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades virales respiratorias constituyen una causa importante de pérdidas económicas en la industria avícola alrededor del mundo (Gough, 2008; Jones, 2010). Aquellas enfermedades que poseen el potencial de causar las pérdidas más severas en cuanto a mortalidad son la Enfermedad de Newcastle (ENC) y la Influenza Aviar (IA). Sin embargo, existen otras enfermedades virales de importancia como la Laringotraqueítis Infecciosa (LT) y Bronquitis Infecciosa (BI), algunas de éstas pueden coincidir con otras infecciones secundarias, cómo es el caso de la infección con *Metapneumovirus aviar* (MPVa), con lo cual se aumenta la gravedad de los signos clínicos, las lesiones y las pérdidas económicas (Gough, 2008; Jones, 2010),

El MPVa se reportó por primera vez en 1978 en Sudáfrica, es un virus que causa alteraciones en tracto respiratorio superior (rinotraqueítis aviar), pero también afecta el oviducto, lo que resulta en pérdidas en la producción de huevo y se afecta la calidad del mismo. Además, se ha detectado por PCR en muestras de testículos de gallos reproductores con problemas de orquitis y una subsecuente disminución en la fertilidad. Aparte de la presentación respiratoria y del daño reproductivo, se encuentra la presentación conocida como síndrome de la cabeza hinchada (SCH), la cual se ha descrito en pollo de engorda y se caracteriza por la inflamación de los senos infraorbitarios, tortícolis, desorientación y opistótonos

como resultado de infección secundaria por *E. coli*. (Cook, 2000; Gough, 2008; Jones, 2010; Villareal, 2007).

1.1 Agente etiológico.

El MPVa es un virus envuelto, pleomórfico, compuesto por una sola cadena de ARN en sentido negativo (ARN-), lineal y de aproximadamente 14 kb, el cual codifica para ocho proteínas: la nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), una segunda proteína de matriz (M2), proteína pequeña hidrofóbica (SH), glicoproteína de superficie (G) y la ARN polimerasa ARN-dependiente o polimerasa larga (L). La disposición de las proteínas en el virión se muestra en la Figura 1. (Gough, 2008; Cook, 2000).

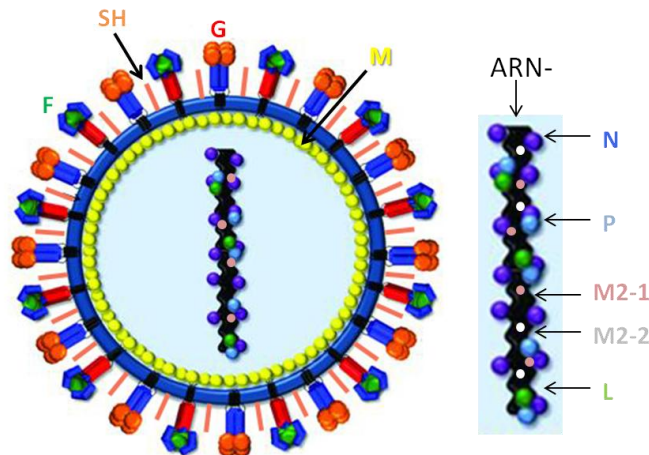


Figura 1. Representación esquemática de MPVa. Modificado de Smith, 2009.

1.2 Clasificación taxonómica:

El MPVa pertenece a la familia *Paramixoviridae*, junto con otros virus de importancia aviar como el *Avulavirus*, que es el agente etiológico de la ENC y los *Paramyxovirus* 2-9, que también afectan a las aves. Se encuentra dentro de la

subfamilia *Pneumovirinae* junto con otros virus de importancia humana y veterinaria, como lo son los virus respiratorio sincicial humano y bovino (Easton, 2004). Anteriormente se consideraba que el MPVa estaba altamente relacionado con el virus respiratorio sincicial, por eso compartían el género, pero después se demostró que el MPVa presenta un conjunto de características que lo separan del género *Pneumovirus*, como son la ausencia de los genes que codifican para las proteínas no estructurales NS1 y NS2 y el orden en que se localizan sus genes de proteínas estructurales en el genoma viral, todo esto dio lugar a que se creara un nuevo género denominado *Metapneumovirus*, dentro del cual originalmente sólo se encontraba el MPVa, hasta que años después se incluyó también al *Metapneumovirus humano* (MPVh), que fue aislado por primera vez en el año 2001 en Holanda, a partir de aspirados nasofaríngeos, aunque se ha demostrado seropositividad hacia este virus humano de al menos 20 años atrás (Easton, 2004; Njenga, 2003).

1.3 Proteínas virales.

1.3.1 Complejo polimerasa.

La nucleoproteína (N) se asocia con el genoma ARN- formando así la nucleocápside del virión. La fosfoproteína (P) es un componente importante de los complejos de replicación y transcripción. La proteína L es la ARN polimerasa viral, sin embargo, requiere de las proteínas N y P que funcionan como cofactores en el complejo polimerasa. El análisis de la interacción entre las proteínas P y N ha demostrado que la porción carboxilo-terminal de la proteína P contiene la mayoría

de los elementos necesarios para unirse a la proteína N. El conjunto del ARN-genómico viral y las proteínas L, N y P forman la ribonucleoproteína viral. Las proteínas de matriz (M2) están codificadas en 2 marcos de lectura abiertos superpuestos, que dan origen a las proteínas M2-1 (184-186 aminoácidos) y M2-2 (71-73 aminoácidos), éstas participan en la regulación de la replicación y transcripción, por lo que también se les conoce como factores de elongación transcripcional (Easton, 2004; de Graaf, 2008).

1.3.2 Proteína de matriz (M).

La proteína M rodea la estructura de la nucleocápside y sirve de unión entre ésta y la envoltura lipídica de la partícula viral. Se ha reportado que la proteína M del MPVh puede ser liberada en forma soluble y que es capaz de activar macrófagos y células dendríticas *in vitro*, por lo que ésta proteína posiblemente genera señales que influyen la respuesta inmune. Esto puede también observarse en el virus respiratorio sincicial humano, cuya proteína M puede de igual forma ser liberada en caso de muerte celular o por un proceso activo. También se ha propuesto que tiene una función en el ensamblaje de la partícula viral, al igual que en otros *Paramyxovirus*. (Easton, 2004; Bagnaud-Baule, 2011; Munir, 2003; Sabo, 2011).

1.3.3 Proteínas de superficie.

Glicoproteína de superficie (G).

Es una proteína de membrana tipo II que está altamente glicosilada, es la encargada de interactuar con el receptor sobre la superficie celular y es conocida

por ser la proteína más variable en los MPV. Esta proteína interacciona con el receptor celular, con lo que se desencadenan cambios estructurales en la proteína F, activando la fusión con la membrana celular. Además, en el MPVh se ha demostrado que la proteína G tiene una función como un importante factor inhibitorio de la respuesta inmune del hospedero al bloquear la producción de quimiocinas inducibles y de interferón (IFN) α y β . Anteriormente se consideraba que era la proteína de superficie más importante, sin embargo, se ha observado que algunos mutantes del MPVa subtipo C que carecen de esta glicoproteína son capaces de infectar células y replicarse eficazmente *in vitro*. Al ser inoculados en pavos, los mutantes que carecen de la glicoproteína G producen signos clínicos menos severos y títulos de anticuerpos más bajos en comparación con el virus silvestre, por lo que se ha determinado que la proteína G no es esencial para el crecimiento viral *in vitro*, ya que la proteína de fusión es suficiente para lograr la unión y la fusión (Bao, 2008; Govindarajan, 2010; de Graaf, 2009; Liu, 2007).

Proteína de fusión (F).

La proteína F es una glicoproteína homotrimérica de membrana que pertenece al tipo I, ya que es sintetizada como un precursor inactivo (F0), el cual es escindido por proteasas del hospedero para dar lugar a las subunidades funcionales F1 y F2. La proteína F escindida por proteasas celulares es capaz de plegarse a una conformación metaestable pre-fusión, la cual es activada para transformarse mediante varios rearrreglos conformacionales a un estado más bajo en energía y de esta manera completar la fusión. Como en el caso de otros virus, la fusión con la membrana celular es irreversible e independiente del uso de ATP. Además de

promover la fusión pH-independiente entre la membrana celular y la envoltura viral, esta proteína induce la formación de sincicios en células infectadas y determina el tropismo hacia hospederos específicos (de Graaf, 2009; Schowalter, 2006).

Proteína pequeña hidrofóbica (SH).

Hasta hace poco no se contaba con información acerca de la proteína SH, sin embargo, ahora se sabe que es una proteína integral de membrana tipo II. SH se sintetiza inicialmente en el retículo endoplásmico (RE) y de ahí se desplaza a la superficie celular, a través de la ruta secretora RE-aparato de Golgi, al igual que las otras dos proteínas de superficie. En el caso del MPVh la expresión de SH no es fundamental para la replicación viral, pero si interviene en la modulación de la respuesta inmune del hospedero, al afectar la transcripción de los genes dependientes de NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, por sus siglas en inglés), además de que se especula es la proteína que juega un papel importante en la persistencia que presenta este virus en modelos de ratón. Otra función inmunomoduladora que ha sido detectada para el MPVh es el bloqueo de la señalización de IFN α en células epiteliales del pulmón, a través de la inhibición de la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) (Alvarez, 2003; Alvarez, 2004; de Graaf; 2008 Dar, 2003; Deng, 2011; Dinwiddie, 2007; Liu, 2009).

1.4 Ciclo de replicación viral.

El ciclo de replicación del MPVa comienza cuando la glicoproteína G se une al

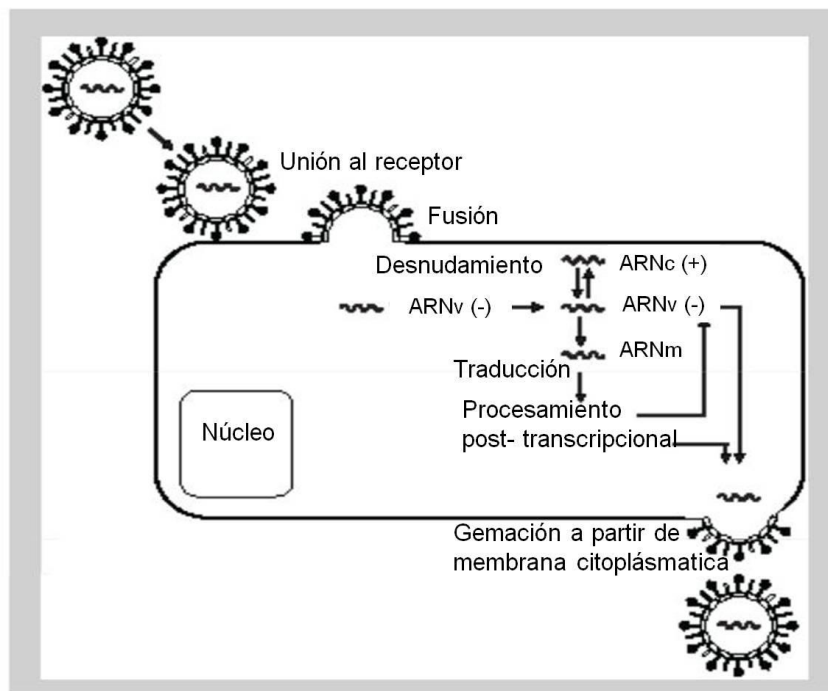


Figura 2. Ciclo replicativo de MPVa. Modificado de de Graaf, 2009.

receptor en la superficie de la célula, aunque en ausencia de G la proteína F puede suplirla, uniéndose efectivamente al receptor. El receptor para MPVh es heparán sulfato y la unión a este receptor se ve favorecida por la integrina $\alpha\beta 1$. Aún se desconoce la naturaleza del receptor del MPVa (Easton, 2004; Chang, 2012; Wei, 2012). De esta manera el virus logra entrar a través de la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular (Figura 2), en el caso del MPVa esta unión es pH-independiente, sin embargo, se ha determinado que para algunas cepas del MPVh un pH ácido favorece esta fusión. La proteína F es la encargada de llevar a cabo la fusión entre ambas membranas, luego de su escisión en las subunidades funcionales F1 y F2. La escisión tiene lugar en un sitio monobásico inmediatamente río arriba del péptido de fusión, generando 2 cadenas polipeptídicas que permanecen covalentemente unidas por al menos un puente disulfuro. Muchas de las proteínas F de los *Paramyxovirus* (incluyendo el MPVa)

son escindidas durante el transporte a través del canal trans-Golgi por las proteasas celulares ubicuas furina o cathepsina L. El ectodominio de la proteína F de los paramyxovirus también contiene dos regiones conservadas hepta repetidas (HRA y HRB) que están localizadas río abajo del péptido de fusión y río arriba del dominio transmembranal (TM) respectivamente. Los estudios sobre la proteína F sugieren que atraviesa una serie de cambios estructurales después de su escisión de una conformación metaestable (pre-fusión) a una estructura más baja en energía (post-fusión), durante la unión de la membrana y la envoltura celular. Después de un evento inicial de activación, la proteína pre-fusión comienza a replegarse a un intermediario temporal inestable, lo que incluye la formación de una estructura similar a una horquilla, en la cual el péptido de fusión es insertado en la membrana celular blanco. Los cambios conformacionales subsecuentes a esta horquilla involucran el ensamblaje de las regiones HRA y HRB en un haz de seis hélices (6 helix bundle, 6HB), que aproxima la envoltura viral y la membrana celular, terminando en la fusión de ambas membranas. Para llevar a cabo este proceso de fusión, el virus debe proveer la energía suficiente para deformar las bicapas opuestas, resultando en la formación del poro de fusión y en la liberación del genoma viral dentro de la célula. La promoción de este proceso energéticamente demandante se lleva a cabo por la proteína F que actúa como maquinaria molecular a través de sus cambios conformacionales, aparentemente la formación del 6HB provee parte de la energía necesaria. Después de la fusión, la nucleocápside viral se disocia de la proteína M por un mecanismo desconocido y es liberada al citoplasma. Una vez que se encuentra en el citoplasma el complejo polimerasa transcribe los genes virales. La transcripción comienza con la

síntesis de una secuencia líder de aproximadamente 50 nucleótidos, para continuar con los siguientes ARNm individuales, hasta llegar al extremo 5' de la cadena molde. Posteriormente el ARNm resultante es editado (el extremo 3' se poliadenila y el extremo 5' presenta su cap). Después de la traducción de los transcritos primarios y la acumulación de proteínas virales comienza la síntesis del antígenoma, el producto de esta síntesis es usado entonces por la misma polimerasa como molde para producir copias exactas y complementarias del genoma llamados intermediarios replicativos que sirven a su vez como molde para producir genomas virales *de novo*. Los genomas virales son ensamblados junto con el resto de los componentes virales (las proteínas M2 actúan como *switch* regulando el cambio entre replicación y transcripción), por lo que al ARN viral se le unen las proteínas N, P, L, M2-1 y M2-2 para dar lugar a la ribonucleoproteína (RNP). Las proteínas integrales de membrana (F, SH y G) se sintetizan en el retículo endoplásmico, pero son transportadas a la superficie celular a través de la ruta secretora, una vez que son sometidas a un proceso de maduración que incluye la glicosilación de las proteínas. Se ha sugerido un modelo para explicar el ensamblaje en el cual la proteína M actúa alineando la superficie interna de la membrana celular de la que se deriva la envoltura viral durante la gemación. Es importante destacar que las proteínas virales que intervienen en la gemación varían entre los *Paramyxovirus*, y para el caso específico del MPVa la proteína M es insuficiente para que se lleve a cabo este proceso, ya que se ha demostrado que ésta interactúa con las proteínas F y N para que el proceso de gemación sea eficiente (de Graaf, 2008; de Graaf, 2009; Lamb, 2007; Mas, 2011; Schowalter, 2006; Takimoto, 2004; Wen, 2012; Weng, 2011).

1.5 Clasificación y especies susceptibles.

Los estudios iniciales sobre el MPVa, sugerían la existencia de dos subtipos diferentes dentro del mismo serotipo, designados como A y B. Esta diferenciación se realizó inicialmente con base en pruebas de neutralización usando anticuerpos monoclonales específicos para los subtipos A y B que reconocían a la glicoproteína G y posteriormente por la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína G (deducida a partir de la secuencia nucleotídica). Estos subtipos fueron ubicados en muestras procedentes de Europa, Israel, Japón y Brasil (Juhasz, 1994; Njenga, 2003; Banet-Noach, 2005).

Posteriormente, se reportó la presencia de un tercer subtipo del MPVa en Estados Unidos en 1996, éste se denominó C y muestra una alta identidad en su secuencia de aminoácidos con el MPVh. Este subtipo originó un brote en pavos comerciales en Colorado en 1996 y poco después se presentó otro brote en Minnesota, que es el principal estado productor de pavo del país, por lo que representó un problema económico importante del año 1997 al 2002. En 2009 se realizó el aislamiento de este subtipo en Corea en pollo de engorda y gallina de postura (Cook, 2000; Choi, 2010; de Graaf, 2008, Njenga, 2003). Los brotes del MPVa subtipo C en Estados Unidos mostraron un patrón estacional, ya que el 80% ocurrieron en primavera (de abril a mayo) y en otoño (de octubre a diciembre), sugiriendo que algunos factores como las aves migratorias podrían estar involucrados, ya que se ha aislado el genoma del MPVa a partir de muestras de cornetes de gorriones, gansos, golondrinas y estorninos capturados en la región central de Estados Unidos. Estos aislamientos tienen una identidad de nucleótidos del 90-95% y una identidad en la

secuencia de aminoácidos del 97-99% con respecto a los aislamientos de pavos. (Njenga, 2003; Shin, 2000).

En un estudio retrospectivo, dos cepas del MPVa aisladas en Francia en el año 1985 mostraron una baja identidad de nucleótidos con respecto a los subtipos A, B y C por lo que fueron clasificados dentro de un cuarto subtipo que se denominó D, aunque ya no se aísla actualmente (Njenga, 2003).

Los subtipos A, B y D afectan a los pavos y pollos, aunque el subtipo A también se ha detectado en faisanes y gallina de guinea, el subtipo C se aisló por primera vez de pavos, pero existen aislamientos en pollos, patos, gorriones, gansos, golondrinas y gaviotas que se asemejan a este subtipo, sin que los datos sean concluyentes (Toquin, 2000; Cook, 2000; Gough, 2008).

1.6. Técnicas diagnósticas

1.6.1 Técnicas de detección del antígeno.

La primera técnica para la detección de MPVa fue la seroneutralización para identificar al virus empleando anticuerpos monoclonales. Además, anteriormente se realizaba inmunofluorescencia directa en tejidos fijados con acetona y seccionados en el criostato y también en tejidos fijados en solución de Bouin e incluidos en parafina. La inmunoperoxidasa directa se realiza en cultivos celulares y la inmunohistoquímica a partir de diferentes tejidos fijados en formol amortiguado. Con esta técnica la tinción específica de MPVa se localiza en el

epitelio ciliado (Cook, 2002).

1.6.2 Técnicas serológicas.

En los laboratorios se realiza de forma rutinaria la prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de MPVa que se encuentra disponible de manera comercial (Kit ELISA de anticuerpos contra Rinotraqueítis Infecciosa Aviar, BioChek, Scarborough, Maine, EU y Kit ELISA APV Ab, IDEXX, Westbrook, Maine, EU) y en la cual los pozos de las placas se encuentran revestidos con el antígeno inactivado para detectar y cuantificar anticuerpos contra MPVa subtipo A y B. Otra técnica que se realiza, sobre todo en Europa, es la seroneutralización, la cual se emplea con fines de diagnóstico en ese continente. Por otro lado, la inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirectas se realizaban a nivel de investigación en Europa (Cook, 2000; Cook, 2002; Gough, 2008).

1.6.3 Técnicas moleculares.

En el año 1999 se publicó un estudio detallado sobre la estandarización de una RT-PCR anidada para la detección del MPVa subtipos A y B, y desde entonces se ha incrementado el uso de esta técnica a nivel experimental y de diagnóstico en otros países (Cavanagh, 1999). El principal inconveniente es que algunas veces la RT-PCR de un sólo paso no es suficiente para la observación de la banda en los geles de agarosa, por ello se implementó la PCR anidada, pues además su especificidad es mayor. Otra técnica molecular es la hibridación *in situ* que se reportó durante el brote de MPVa subtipo C en Estados Unidos (Chary, 2002; Gough, 2008; Velayudhan, 2005).

1.6.4 Aislamiento viral.

Debido a que el MPVa se replica principalmente en las vías respiratorias altas, los órganos de elección para llevar a cabo el aislamiento son los cornetes nasales, senos, tráquea e hisopos traqueales, siendo poco probable aislarlo a partir del pulmón. Es importante tomar las muestras de animales en la fase aguda, ya que el virus se puede recuperar sólo en un periodo muy corto de tiempo (3 a 5 días máximo), pues cuando se empiezan a observar signos severos en las aves ya no es posible lograr el aislamiento (Cook, 2002; Gough, 2008).

1.6.5 Aislamiento primario.

El MPVa se caracteriza por su difícil aislamiento, por lo que se han establecido dos pasos, primero se realiza un aislamiento primario, que para los subtipos A y B se hace en cultivo de órganos traqueales o en embriones de pollo o pavo inoculados vía saco vitelino. Una vez que se adapta el MPVa a estos sistemas, puede replicarse en líneas celulares continuas (Cook, 2002; Gough, 2008). Por otro lado, el aislamiento primario del MPVa subtipo C se logró mediante pases ciegos de la muestra de campo en fibroblastos de embrión de pollo o embrión de pollo inoculado vía saco vitelino (Gough, 2008). También se ha investigado el uso de cultivos homólogos para replicar el subtipo C que se basa en cultivos primarios de pavo, por ejemplo, el cultivo de cornetes, riñón, fibroblastos, senos, tráquea, pulmón o piel. De estos cultivos, los de cornetes y riñón fueron los más permisivos, mientras que los de fibroblastos y senos fueron poco permisivos (Kong, 2006). Sin embargo, la elaboración de estos cultivos primarios es difícil y el

efecto citopático (ECP) no es evidente, por lo que es poco práctico para el diagnóstico (Treptow, 2010).

1.6.6 Adaptación en líneas celulares continuas.

Una vez que el MPVa se replica en diferentes tipos de cultivos primarios el siguiente paso es la adaptación a líneas continuas, de las cuales las células Vero, BHK-21, HEP-2, MDBK se han reportado previamente como permisivas para los subtipos A y B. Por otro lado, las líneas celulares BGMK, MA-104, RP-19 y QT-35 han demostrado ser permisivas para el subtipo C. Además, el aislamiento primario a partir de una línea continua homóloga se ha logrado utilizando las células Chicken Embryo Related (CER), pero no están disponibles comercialmente (Treptow, 2010; Tiwari, 2006).

1.7 Antecedentes de las líneas celulares empleadas.

Dentro de las líneas continuas empleadas en este estudio, las células Vero son las más comunes para la replicación viral, para la elaboración de vacunas y como sistema hospedador para la realización de técnicas de diagnóstico. Esta línea aneuploide se desarrolló en 1962 en Japón, a partir de células renales de mono verde africano adulto y desde entonces se ha empleado para la replicación de una gran variedad de virus, como SV-40, SV-5, sarampión, arbovirus, reovirus, poliovirus, influenza virus, vaccinia, rubéola y también el virus respiratorio sincicial (Rhim,1969). Cabe mencionar que éstas células presentan una importante característica: son defectivas en su producción de IFN α y β , aunque presentan los

receptores y son sensibles al IFN exógeno, esto debido a la ausencia de los genes estructurales de IFN β (Desmyter, 1968).

Las células A-72 se establecieron en Estados Unidos en 1979, a partir de un tumor extirpado de una perra Golden Retriever de 8 años, para incrementar el número de cultivos celulares disponibles para el aislamiento de virus de perro. Esta línea ha demostrado ser permisiva para virus caninos como hepatitis, adenovirus tipo II, herpesvirus, parainfluenza, parvovirus y coronavirus (Binn, 1980).

La línea diploide BGM se desarrolló en 1962 en Estados Unidos, a partir de un cultivo primario de riñón de mono verde hembra y es permisiva para enterovirus, mixovirus, herpes simple, morbilivirus, poliovirus, coxsackievirus A y B, reovirus, rinovirus, SV-40 y vaccinia. Esta línea se ha reportado como permisiva para el subtipo C del MPVa (Barron, 1970).

Las células MARC-145 se establecieron en 1993 en Estados Unidos y se derivan de la línea MA-104, la cual se obtuvo a partir de riñón fetal de mono, ésta subpoblación se estableció para optimizar la replicación del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de los cerdos (PRRS) (Kim, 1993).

La línea Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) se estableció en 1958 en Estados Unidos por la necesidad de contar con más cultivos de animales mamíferos adultos y se obtuvo a partir de riñón de bovino para el aislamiento de virus de esta

especie como estomatitis vesicular, respiratorio sincial y rinotraqueitis infecciosa (Madin, 1958).

La línea celular Madin-Darby canine kidney (MDCK) se estableció en 1966 en Estados Unidos, a partir de riñón de un perro cocker spaniel, inicialmente para el aislamiento de virus de esa especie y posteriormente comenzó a emplearse para el aislamiento de virus de otras especies (Rindler, 1979).

Las células PK-15 son una clona de la línea previamente establecida PK1 (de riñón de cerdo adulto) del tercer pase, las células PK-15 se establecieron en Estados Unidos en 1961 y se emplean principalmente para el aislamiento de virus de cerdo como el rubulavirus y circovirus porcino (Allan, 2000; Hernández-Jáuregui, 2001).

La sub-población celular denominada LLC-MK₂, se obtuvo en 1955 en Estados Unidos, a partir de una mezcla de células obtenidas por tripsinización de 6 pares de riñones de mono *Rhesus* (Hull, 1956).

Las células RK-13 establecieron en 1968 en Reino Unido, a partir de la tripsinización de riñones de conejos de entre 3 y 6 semanas y son susceptibles a una gran variedad de virus como el virus herpes simple, herpes de la rinotraqueítis infecciosa bovina, herpesvirus porcino 1 (Aujeszky), mixoma, morbilivirus, adenovirus del simio y vaccinia (Christofinis, 1968).

2. JUSTIFICACIÓN.

En México, para el diagnóstico del MPVa no se realiza el aislamiento viral, sólo se detectan anticuerpos específicos mediante la técnica de ELISA comercial. Esta situación representa una desventaja para implementar y estandarizar técnicas para el diagnóstico utilizando como antígeno cepas que circulan en nuestro país. Por esta razón, consideramos importante evaluar diferentes cultivos celulares para proporcionar información sobre la permisividad de nuevas líneas celulares de mamífero que no han sido probadas a nivel experimental para la multiplicación de este agente infeccioso. La información generada servirá para facilitar el aislamiento del virus y así contar eventualmente con una batería de cepas de MPVa locales que sirvan como plataforma para realizar avances en la investigación de las características biológicas de las cepas de MPVa que circulan en nuestro país.

3. HIPÓTESIS.

Algunas líneas celulares de mamífero diferentes de la línea de referencia Vero y cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo son permisivos a la replicación de MPVa.

4. OBJETIVO.

Evaluar la permisividad e infectividad de diferentes cultivos celulares continuos de mamífero y un cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo al MPVa.

Objetivos específicos

Cuantificar la replicación de MPVa en diferentes cultivos celulares mediante la titulación de cada uno de ellos por Unidades Formadoras de Placas (UFP) y Dosis Infectantes en Cultivo Celular del 50% (DICC₅₀).

Evaluar la permisividad de MPVa en diferentes cultivos celulares mediante la titulación de sobrenadantes del virus replicados en cada cultivo por Unidades Formadoras de Focos (UFF) en la línea de referencia (Vero), empleando la técnica de inmunoperoxidasa.

Evaluar la permisividad de MPVa en diferentes cultivos celulares mediante la titulación por DICC₅₀ en la línea Vero de sobrenadantes de virus replicados en cada cultivo, mediante la tinción del monoestrato con cristal violeta.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

a) Material:

Virus:

El MPVa empleado en este estudio se obtuvo a partir de muestras de campo del subtipo A, aislado previamente en 2008 en el estado de Jalisco. Este virus fue adaptado a partir de tráqueas de gallinas de postura comerciales infectadas, mediante seis pases en cultivo primario de tráquea y seis pases en línea Vero (aMPV/A/chicken/Mx/Jal/2008, con número de acceso al GenBank JN041207).

Cultivo celular primario:

Se emplearon fibroblastos de embriones de pollo de 9 días de edad. Este cultivo primario se obtuvo a partir de huevos fértiles SPF producidos por Alpes, Tehuacán, Puebla, México.

Líneas celulares:

En este estudio se usaron diez líneas celulares continuas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Nombre y origen de cada uno de los cultivos empleados en el estudio.

Nombre	Origen
VERO	Riñón de mono verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
LLC MK₂	Riñón de mono Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)
MDBK	Riñón de bovino (<i>Bos taurus</i>)
MDCK	Riñón de perro (<i>Canis familiaris</i>)
A-72	Carcinoma de perro (<i>Canis familiaris</i>)
MARC-145	Riñón de feto de mono Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)
Hep-2	Carcinoma de laringe de humano (<i>Homo sapiens</i>)
BGM (BGMK)	Riñón de mono verde (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
RK-13	Riñón de conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
PK-15	Riñón de cerdo (<i>Sus scrofa</i>)

Las líneas celulares se cultivaron en Medio Esencial Modificado por Dulbecco (D-MEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB).

b) Métodos:

Establecimiento del periodo óptimo de cosecha de MPVa en células Vero.

Antes de comenzar los experimentos propuestos se realizó una curva de crecimiento de MPVa para establecer el periodo durante el cual se producen virus infecciosos. Esto se llevó a cabo infectando células Vero que se sembraron en medio D-MEM con 10% de SFB en botellas de 25 cm². Cuando el monoestrato alcanzó el 80% de confluencia se infectó con el virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 permitiendo la adsorción por dos horas, después el virus se descartó y se reemplazó por medio de infección (D-MEM con 1% de SFB). Las células infectadas se mantuvieron a 37° C durante 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas respectivamente, el virus total de cada periodo de tiempo se clarificó por centrifugación a 5 000 rpm (3 500 X g) durante 20 minutos. Las distintas cosechas de virus se inocularon nuevamente en células Vero al 80% de confluencia sembradas en placas de 96 pozos, realizando diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁹ para titular por DICC₅₀ el rendimiento en cada intervalo de tiempo.

Cuantificación de la infectividad de MPVa en diferentes cultivos celulares y evaluación del ECP.

En este ensayo se evaluó el ECP y la infectividad por DICC₅₀ y UFP del MPVa subtipo A (que había sido previamente replicado durante seis pases en células Vero) en diferentes líneas continuas y un cultivo primario, como se describe en las secciones de titulación por DICC₅₀ y por UFP. Los fibroblastos se elaboraron como se indica a continuación.

Obtención de cultivos primarios de fibroblastos de embriones de pollo:

Se emplearon 5 embriones de pollo libres de patógenos específicos de 9 días de edad. Para comenzar se cortó el cascarón que se encuentra sobre la cámara de aire, se quitó la fáfara, se localizó rápidamente al embrión y se decapitó, una vez fuera del cascarón se le removieron las patas, las alas y la cabeza, después se les hizo un corte sobre la línea media para extraer las vísceras, las cuales también se eliminaron. Al tejido restante se le realizaron 3 lavados empleando PBS estéril y se trituró con tijeras hasta obtener una mezcla homogénea a la cual se le agregó tripsina y se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos, después de este periodo se eliminó la tripsina decantándola y se agregó tripsina nuevamente, para homogenizar el tejido durante 15 minutos más. Posteriormente se transfirió todo el tejido previamente tripsinizado a un matraz que contenía 10 ml de D-MEM con 10% de SFB. El medio con las células se centrifugaron a 2000 rpm (1 400 X g) durante 20 minutos para lavarlas, este último paso se repitió una vez más. Por último, las células se contaron con un hematocitómetro y se sembraron en una placa de 96 pozos utilizando 1×10^6 células/ml, depositando 100 μ l/pozo.

Cuantificación de la infectividad de MPVa en diferentes cultivos por UFP.

Se realizó la titulación del rendimiento viral por el método cuantitativo de referencia, basado en el conteo de placas. En este ensayo cada placa se deriva de un solo evento de infección celular, ya que no se permite la diseminación de dicha infección por el uso de uso de agarosa, por ello constituye el mejor método para cuantificar la infectividad del MPVa en los 11 cultivos celulares. Para este fin se sembraron placas de 6 pozos con 8×10^5 células por pozo de cada cultivo

celular con D-MEM al 10% de SFB, una vez que las células se encontraban confluentes (a las 24 horas) se inocularon por duplicado con 1 ml/pozo de cada dilución seriada de 10^{-3} hasta 10^{-7} del lote original de MPVa (sexto pase) y un pozo fungió como testigo negativo. Se permitió la adsorción durante 2 horas, después de este tiempo se retiró el contenido de cada pozo y se agregó una capa de 3 ml/pozo de agarosa estéril al 0.5% diluida en D-MEM con 4% de SFB y la placa se mantuvo en incubación durante 5 días a 37° C. Una vez finalizada la infección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Posteriormente se retiró el fijador, la capa de agarosa, las células se lavaron 3 veces con PBS, se tiñeron con cristal violeta, y por último se contaron las placas de cada pozo para obtener el título.

Evaluación del ECP de MPVa en diferentes cultivos celulares y estimación de la infectividad por $DICC_{50}$:

Este procedimiento es semi-cuantitativo pues depende de la formación de ECP por lo que no evalúa infecciones individuales, pero contribuyó a conocer y titular el ECP que ocasiona el virus en cada uno de los cultivos empleados. Para realizarlo cada cultivo celular se sembró en placas de 96 pozos (1×10^5 células/ml en el caso de las líneas y 1×10^6 células/ml en los fibroblastos) depositando 100 μ l de células resuspendidas en D-MEM con 10% de SFB, y cuando el monoestrato se encontraba al 90% de confluencia aproximadamente, se infectaron por cuadruplicado con 100 μ l por pozo del lote original de MPVa, previamente diluido en forma seriada comenzando de 10^{-1} hasta 10^{-9} . La adsorción fue de 2 horas y posteriormente el inoculo viral se reemplazó por D-MEM con 1% de SFB. Las

células se mantuvieron en incubación a 37° C durante tres días, evaluando diariamente el ECP (formación de sincicios, desprendimiento, redondeamiento y muerte celular). Al término de este periodo se realizaron 3 lavados con 300 µl de PBS por pozo, dejando al final de cada lavado 50 µl y se realizó la tinción depositando 250 µl por pozo de colorante cristal violeta. Después se retiró la mitad del contenido del pozo y se agregaron otros 125 µl, repitiendo esto tres veces. Al final las células se dejaron con el colorante durante 15 minutos, posteriormente se retiró enjuagando tres veces con agua destilada y se dejaron secar por lo menos dos horas. Las $DICC_{50}$ se contabilizaron de acuerdo al método de Reed y Muench (Reed, 1938).

Desarrollo de la metodología para titular la permisividad a MPVa por UFF.

Se consideró necesario el desarrollo de la metodología de inmunoperoxidasa para titular al MPVa debido a que ésta es más simple y rápida que la titulación por UFP, además de que también es un método cuantitativo. Para estandarizar la técnica de inmunoperoxidasa, el primer paso fue purificar el virus obtenido a partir de sobrenadante de células Vero con el fin de producir un suero hiperinmune anti-MPVa requerido para realizar ésta técnica. Una vez producido el suero hiperinmune anti-MPVa se probó su calidad para teñir células infectadas con MPVa por inmunoperoxidasa y finalmente se determinó la permisividad de los cultivos celulares con esta técnica.

Purificación de MPVa por gradientes discontinuos de sacarosa.

Se purificó el MPVa subtipo A en base a dos protocolos descritos previamente (Jirjis, 2001; Mbiguino, 1991), con algunas modificaciones, cómo se describe a continuación:

Se infectaron células Vero en 11 botellas de cultivo de 75 cm² con 500 µl del MPVa (MOI 0.1), el periodo de adsorción fue de 2 horas, después se eliminó el inóculo de cada botella y se reemplazó con D-MEM al 1% de SFB y se mantuvieron en incubación a 37° C durante 72 horas. Después de este periodo se detuvo la infección, las botellas se congelaron y descongelaron una vez, los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 5 000 rpm (5 000 X g) en rotor JA14 (Beckman, Palo Alto, California, EU) por 10 minutos, posteriormente los sobrenadantes clarificados se depositaron sobre colchones al 30%, 45% y 60% de sacarosa diluida en buffer NT (NaCl 0.15 M y Tris 0.05 M). Los colchones se depositaron en tubos SW28 (Beckman, Palo Alto, California, EU) y se ultracentrifugaron a 23 000 rpm (100 000 X g) en un rotor SW28 por 3 horas. La banda que contenía al virus se colectó de la interfase 30%-45% de sacarosa, posteriormente se mezcló y se diluyó con suficiente buffer NT para llenar los tubos donde se realizó la siguiente centrifugación. La concentración viral se realizó centrifugando el virus diluido a 20 000 rpm (75 000 X g) en rotor SW40 (Beckman, Palo Alto, California, EU) durante 60 minutos. Después de la centrifugación se decantó rápidamente el buffer que contenía restos de sacarosa de los tubos, manteniendo el botón de virus en el fondo de éste. Por último, el virus concentrado se resuspendió en 200 µl de buffer NT estéril y la alícuota se mantuvo a -70° C hasta su uso. Todo el procedimiento

se repitió 10 veces más para obtener un total de 11 alícuotas de virus purificado (2.2 ml en total).

Estimación de la pureza del MPVa por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Antes de comenzar a emplear el suero hiperinmune, se realizó la estimación de proteínas y pureza del MPVa concentrado mediante una tinción de nitrato de plata en gel de poliacrilamida (el protocolo para la elaboración del gel se muestra en el Apéndice 3). Se corrieron: el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein® Standards, Bio-Rad, California, EU), la muestra de virus purificado, testigos de células sin infectar y testigos de albúmina previamente mezcladas con un volumen de buffer de Laemmli. El gel se sometió a electroforesis durante 13 horas a 7 mA.

Una vez que se concluyó la electroforesis, el gel se fijó sumergiéndolo en una solución de etanol al 30% y ácido acético al 10% durante 24 horas, posteriormente se realizó la tinción de nitrato de plata, siguiendo el procedimiento previamente descrito por Chevallet, 2006. El protocolo detallado y la elaboración de reactivos se muestran en los Apéndices 1 y 4. De manera resumida, una vez que el gel fue fijado, se enjuagó dos veces con etanol al 20% por 10 minutos y luego 2 veces con agua destilada (10 minutos por cada lavado). El gel se sensibilizó, con lo cual se incrementa la captación del nitrato de plata y se favorece el contraste, esto se realizó sumergiéndolo por 1 minuto en tiosulfato de sodio 0.8 mM, luego se enjuagó otras 2 veces con agua durante 1 minuto por cada lavado y se impregnó con nitrato de plata 12 mM por 20 minutos. Una vez que las bandas fueron

visibles, el gel se transfirió a la solución de paro Tris durante 30 minutos, y por último, se sumergió en agua destilada durante 30 minutos, éste último paso se repitió una vez más.

De esta manera, se obtuvieron las bandas de interés que se analizaron mediante 2 programas, como se indica a continuación.

Análisis de la imagen

Determinación del peso molecular de las bandas de interés.

Para determinar el peso molecular de las bandas de interés de manera más exacta, se empleó un programa de Kodak (Imaging System®), el cual reconoce el número de carriles totales (al trazar líneas llamadas marcadores sobre todos los carriles) y las bandas totales presentes en la imagen, así que se le indica cuales son los carriles estándar y cuáles son los experimentales, al igual que con las bandas de interés.

Determinación de la concentración de proteína.

Para determinar la concentración de proteína por banda se empleó una banda del testigo de albúmina (de 100 ng) y mediante el programa ImageJ se obtuvo el área en pixeles de la banda de albúmina estándar y de las bandas de interés, ya que este programa proporciona una curva por banda (densitometría), eliminando manualmente el fondo de las curvas de cada banda, el resultado se obtuvo por regla de 3.

Determinación de la pureza del lote purificado.

Para determinar la pureza se empleó el programa ImageJ. Se obtuvo el área de las bandas totales en todo el carril y se sumaron (también por densitometría), después se sumó el área de las bandas de interés, el resultado se obtuvo por regla de 3.

Producción del suero hiperinmune.

Para la producción del suero se inocularon 2 conejos Nueva Zelanda, el esquema fue el siguiente:

El antígeno viral concentrado en 200 μ l se resuspendió agregando 200 μ l de buffer NT estéril, se mezcló con un volumen de adyuvante de Freund (completo la primera inmunización e incompleto a partir de la segunda inmunización), se emulsificó y por último se realizó la inoculación con 0.8 ml por dosis de la mezcla virus-adyuvante vía subcutánea, la cual se repitió cada 15 días hasta alcanzar la quinta inmunización. Después de la quinta inmunización se obtuvo aproximadamente 12 ml de sangre de cada conejo.

Estandarización de la técnica de inmunoperoxidasa para el MPVa en monoestrato de células Vero.

Para estandarizar este ensayo se comenzó titulando el suero hiperinmune policlonal en células Vero, cómo se describe a continuación:

Se dejó crecer en una placa de 96 pozos 1×10^4 células Vero/ml (250 μ l por pozo) durante 4 días, después se realizó la infección con diluciones del lote original de MPVa permitiendo la adsorción durante 2 horas, después se agregó D-MEM con

1% de SFB. Se realizó una cinética para poder establecer el periodo de infección, la dilución de antígeno y anticuerpo óptimos para obtener el marcaje adecuado. El protocolo detallado y la preparación de reactivos para la inmunoperoxidasa se encuentran en los Apéndices 2 y 5.

Después de la infección las células se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS frío, en el último lavado las células permanecieron con 150 μ l de PBS por pozo y se agregaron otros 150 μ l metanol absoluto frío, este procedimiento se repitió 3 veces y en el último paso las células se dejaron con 300 μ l por pozo de metanol, posteriormente, la placa se mantuvo en congelación (-20° C) durante al menos un día. Una vez concluida la fijación, se decantó el metanol de los pozos y se dejó secar la placa a temperatura ambiente por 20 minutos, después se realizaron 2 lavados con PBS, se agregó el suero hiperinmune de conejo diluido 1:300 y se dejó incubar la placa a 4° C durante 24 horas. Una vez que concluyó la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con PBS, se bloqueó utilizando suero normal de cabra al 2% incubando durante 30 minutos a 37° C. Después se realizaron 2 lavados y se agregaron 75 μ l por pozo de anti-IgG de conejo biotinilada 1:1000 (Vectastain®, Vector, Burlingame, California, EU), la cual se incubó a 37° C por 30 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se agregaron 75 μ l por pozo del complejo avidina/biotina-peroxidasa (Vectastain®, Vector, Burlingame, California, EU), incubando a 37° C durante 30 minutos. El revelado se realizó con una solución de aminoetil-carbazole, durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se hicieron los últimos tres lavados con agua destilada.

Por último, se contaron las células con tinción específica (focos infecciosos) por pozo al microscopio, para obtener el título.

Infección de diferentes cultivos celulares con MPVa para la evaluación de permisividad.

Una vez estandarizada la técnica se realizó la evaluación de la permisividad al MPVa infectando cada cultivo confluyente en botellas de 25 cm² con el MPVa a una MOI de 0.5. Se permitió un periodo de adsorción de 2 horas con D-MEM sin suero, posteriormente el inoculo se reemplazó con D-MEM con 1% de SFB y las botellas se mantuvieron en incubación durante 72 horas, periodo en el cual se cosechó el sobrenadante de cada cultivo y se mantuvo en congelación a -70° C hasta su uso.

Evaluación de la permisividad de diferentes cultivos celulares al MPVa por UFF.

Para llevar a cabo la evaluación de la permisividad al MPVa por UFF, se sembraron células Vero en placas de 96 pozos (1×10^4 células Vero/ml) y después se infectaron con diluciones decuples seriadas (1:2 a 1:200) del sobrenadante del MPVa de cada cultivo durante 16 horas. Posteriormente las células se fijaron con metanol durante 24 horas para después realizar la tinción por inmunoperoxidasa cómo se describió anteriormente.

Evaluación de la permisividad de diferentes cultivos celulares al MPVa por DICC₅₀.

Adicionalmente a la titulación por UFF también se realizaron titulaciones por DICC₅₀, que es un método semi-cuantitativo, pues presenta cierto margen de error, pero permitió conocer el ECP en células Vero luego de ser infectadas con cada uno de los sobrenadantes que también se emplearon en la inmunoperoxidasa. Para ello se infectaron por cuadruplicado células Vero al 80% de confluencia previamente sembradas (1×10^5 células/ml) en placas de 96 pozos, con 100 μ l por pozo de diluciones seriadas de cada sobrenadante (de 10^{-1} hasta 10^{-9}). Se permitió un periodo de adsorción de 2 horas, para posteriormente eliminar el inóculo y sustituir con 200 μ l por pozo de D-MEM con 1% de SFB. Las células permanecieron en incubación durante tres días y después se les realizaron tres lavados con PBS y fueron teñidas con cristal violeta como se menciona en el ensayo de infectividad.

6. RESULTADOS:

Para realizar el presente estudio se utilizó la cepa de MPVa del subtipo A (aMPV/A/chicken/Mx/Jal/2008) aislado en México para evaluar su infectividad en diferentes cultivos, así como para cuantificar la permisividad de los diferentes cultivos a este virus.

Establecimiento del periodo óptimo de cosecha de células Vero infectadas con MPVa.

Inicialmente se realizó una curva de crecimiento en células Vero infectadas a una MOI de 0.1 con MPVa por DICC₅₀ y se obtuvo un título máximo de $10^{6.4}$ DICC₅₀/ml a las 72 horas (Figura 3). Como las células Vero funcionan como referencia para la infección de las demás líneas se decidió cosechar las células a las 72 horas en los siguientes experimentos para la titulación viral.

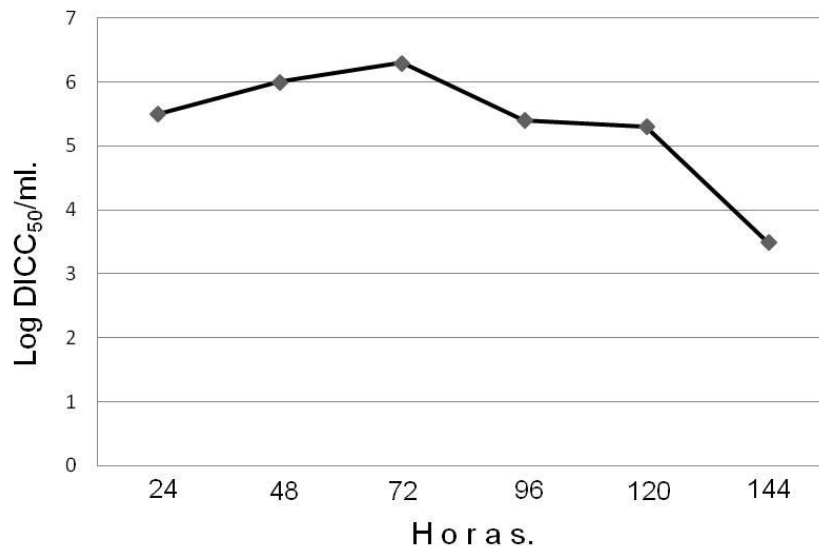


Figura 3. Curva de crecimiento (virus total) de MPVa en células Vero.

Cuantificación de la replicación (infectividad) de MPVa en diferentes cultivos celulares y evaluación del efecto citopático.

La infectividad del lote original de MPVa se cuantificó por UFP en cada cultivo celular, pues es el método de referencia. En este ensayo se obtuvieron títulos altos en las líneas Vero, A-72 y BGM entre 3.35×10^7 a 6.75×10^7 UFP y en las células PK-15, MARC-145 y RK-13 títulos menores, entre 5.95×10^4 y 5.55×10^6 UFP. En las cuatro líneas celulares restantes LLC-MK₂, MDBK, MDCK y Hep-2 no se detectó infectividad, así como en el cultivo de fibroblastos de embrión de pollo.

Después de la infección de cada cultivo celular se evaluó simultáneamente el ECP en cada una de ellas. De manera similar a lo descrito en estudios previos, el ECP más evidente en las células Vero consiste en la formación de sincicios muy grandes (de más de 60 núcleos contados al microscopio). Por su parte, las células BGM junto con las células A72 mostraron un ECP considerable que consistió en sincicios moderados (de 20 a 60 núcleos) (Figura 4). En cambio, las células PK-15, MARC 145 y RK-13, mostraron redondeamiento, desprendimiento y aparente muerte celular (Figura 5). Por último, hubo cultivos donde no se observó ningún ECP, en particular en las células LLC MK₂, MDBK, MDCK, Hep-2 y en los fibroblastos de embrión de pollo (Figuras 6 y 7). Por otro lado, en la titulación por DICC₅₀ se obtuvieron títulos numéricamente menores que los obtenidos por UFP en todos los casos. Aunque éstos no coinciden totalmente, si presentan el mismo orden en comparación con la titulación por UFP y en los casos donde no hay producción de virus infecciosos hay coincidencia total entre ambas técnicas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Infectividad de MPVa en diferentes cultivos celulares.

Línea	UFP/ml	Título DICC₅₀
Vero	6.75×10^7	2.51×10^6
A-72	5.75×10^7	1.99×10^6
BGM	3.35×10^7	1×10^5
PK-15	5.55×10^6	6.3×10^4
MARC-145	7.75×10^4	3.6×10^4
RK-13	5.95×10^4	3.16×10^3
LLC-MK2	Negativo	Negativo
MDBK	Negativo	Negativo
MDCK	Negativo	Negativo
HEP-2	Negativo	Negativo
Fibroblastos	Negativo	Negativo

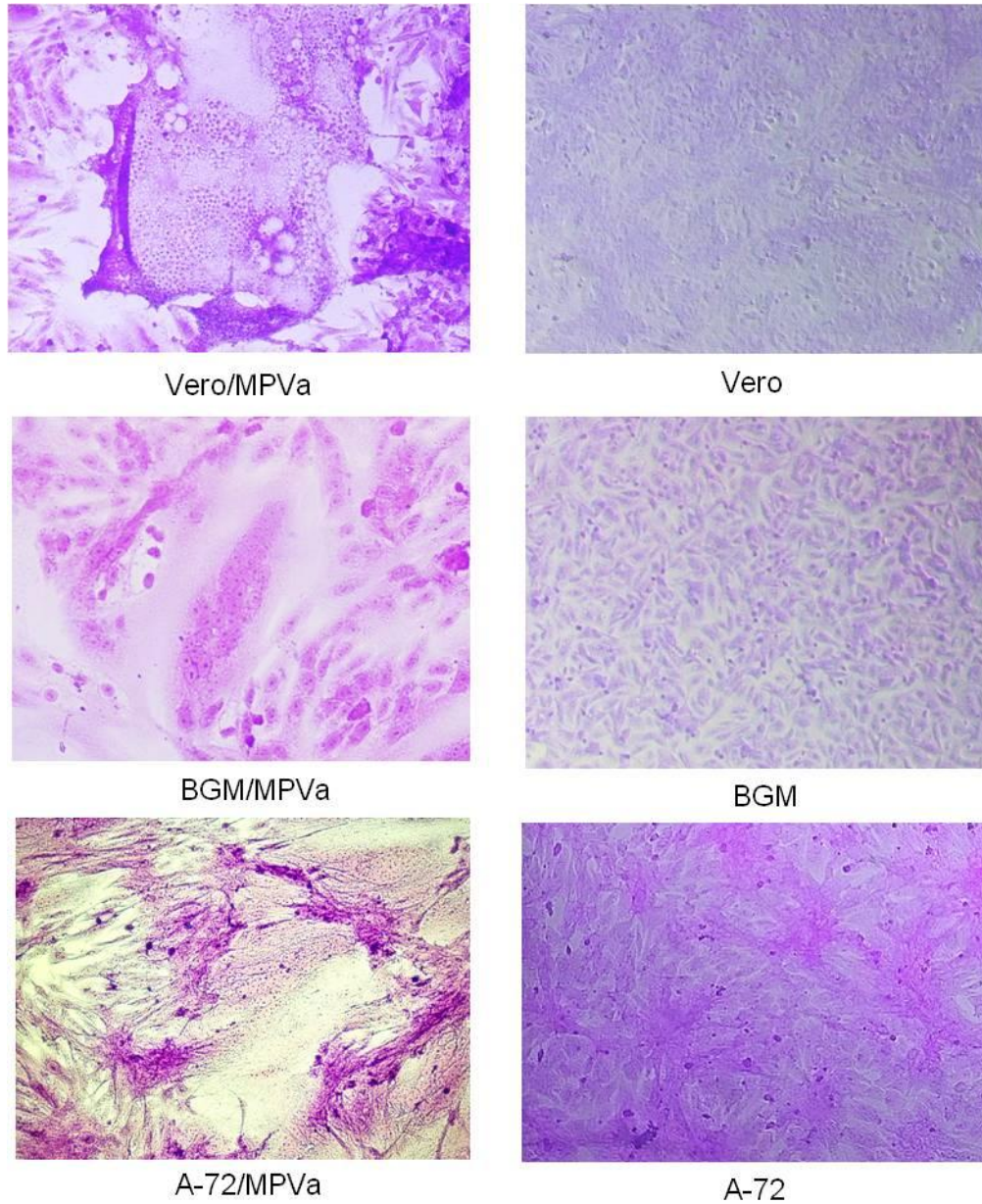


Figura 4. ECP en células Vero, BGM y A-72 infectadas con MPVa. Tinción cristal violeta. Izquierda: Sincicios en las células Vero, BGM y A-72 infectadas con MPVa. Derecha: Testigos de células no infectadas.

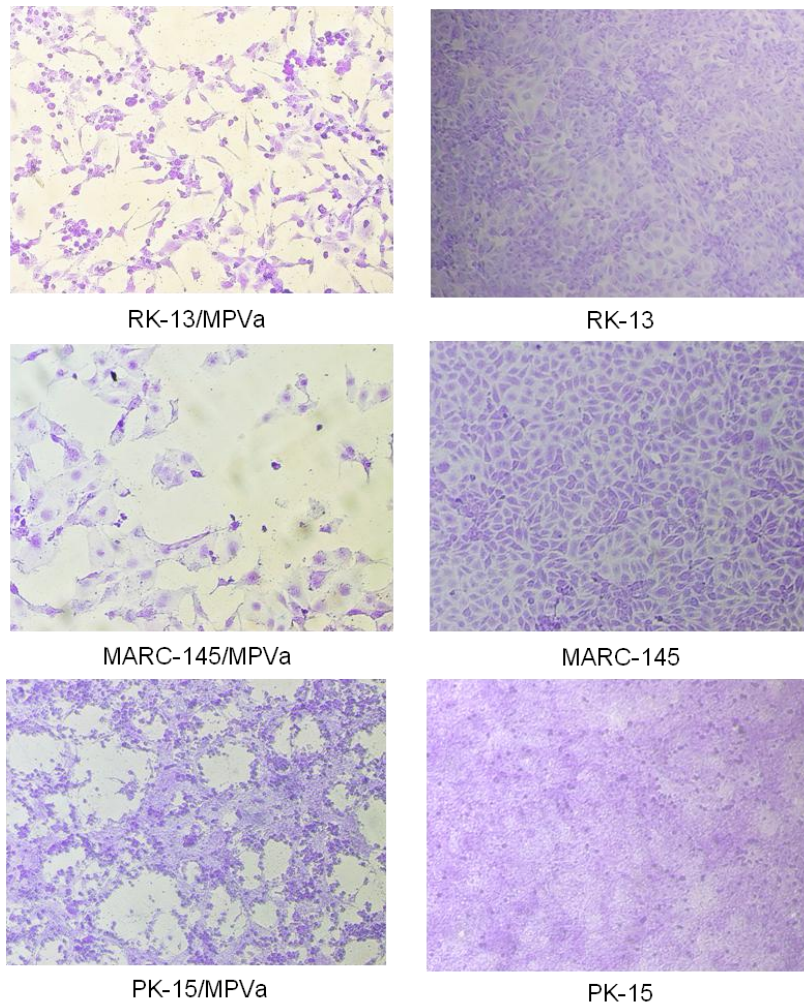


Figura 5. ECP en células RK-13, PK-15 y MARC-145 infectadas con MPVa. Tinción cristal violeta. Izquierda: Desprendimiento y redondeamiento celular en las líneas RK-13, PK-15 y MARC-145 infectadas con MPVa. Derecha: Testigos no infectados.

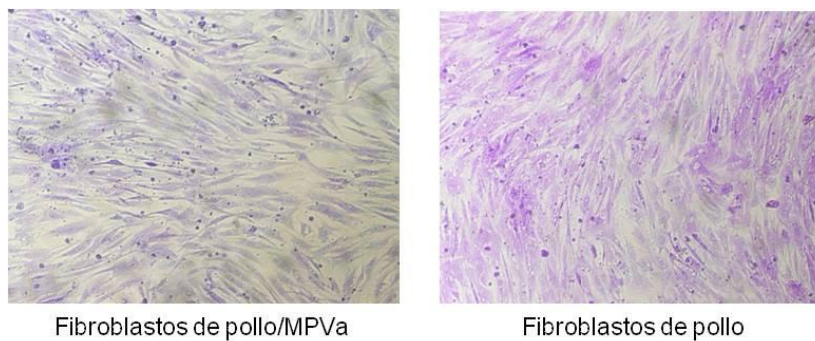


Figura 6. ECP en fibroblastos de embrión de pollo infectados con MPVa. Tinción cristal violeta. Izquierda: Cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo infectados con MPVa sin ECP. Derecha: Testigo no infectado.

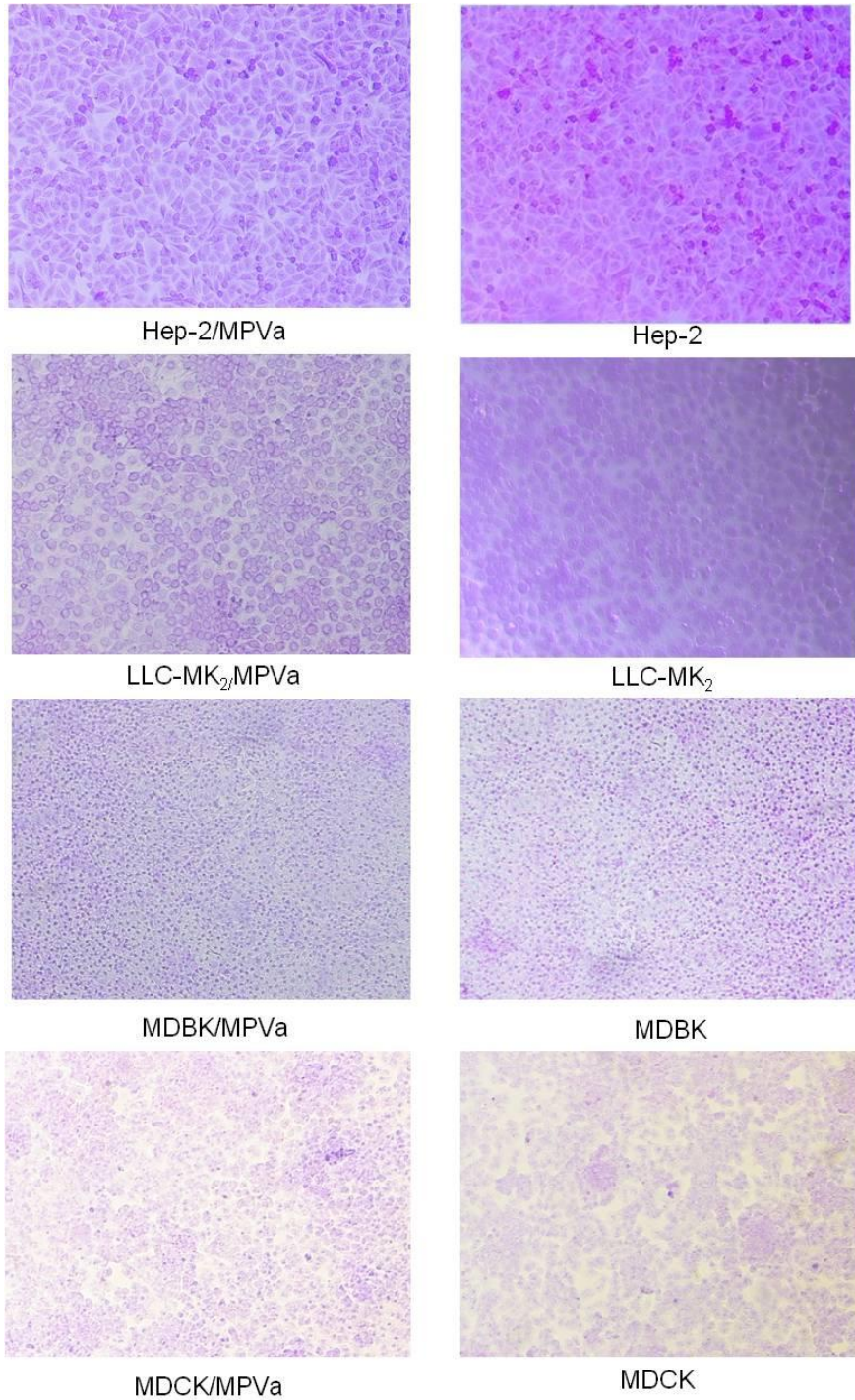


Figura 7. ECP en células Hep-2, LLC-MK2, MDBK y MDCK infectadas con MPVA. Tinción cristal violeta. Izquierda: Células Hep-2, LLC-MK₂, MDBK y MDCK infectadas con MPVa sin ECP. Derecha: Testigos no infectados.

Producción y purificación de MPVa.

Para realizar la tinción de inmunoperoxidasa se elaboró un suero hiperinmune contra MPVa. Para este fin se purificó inicialmente al MPVa partiendo de un lote de total de 360 ml de sobrenadante de células Vero infectadas. Después de realizar la ultracentrifugación en colchón de sacarosa se colectó la banda opalescente del virus y se concentró por ultracentrifugación resuspendiendo en 1.2 ml divididos en 6 alícuotas (200 μ l/alícuota). Consideramos que sólo un virus con alto nivel de pureza sería adecuado para producir un suero hiperinmune de alta calidad, así que se decidió determinar la pureza del MPVa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción con nitrato de plata (Figura 8).

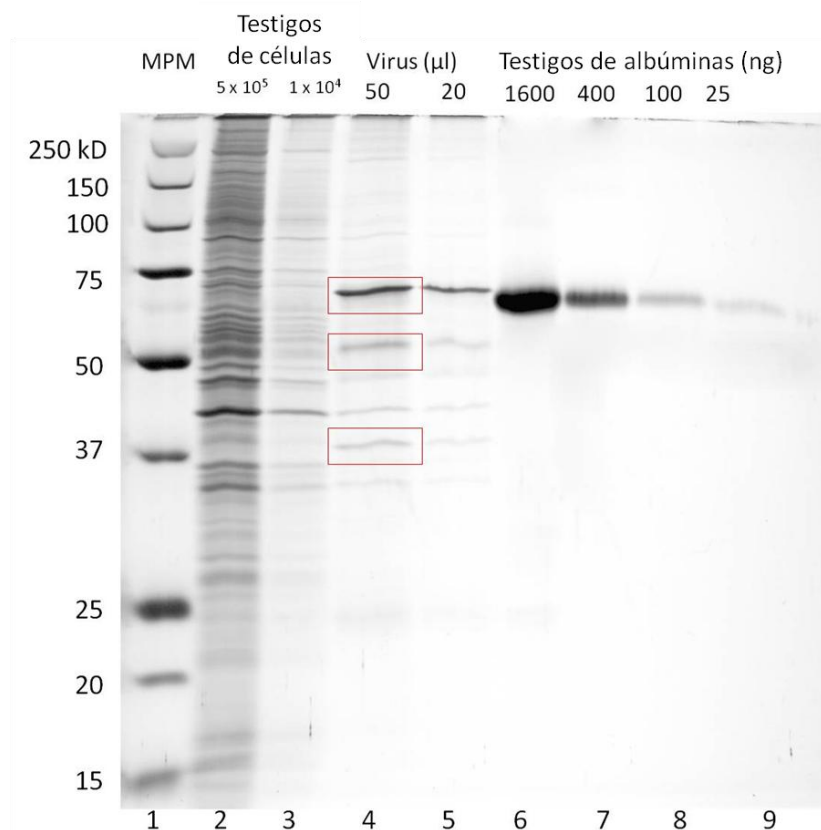


Figura 8. SDS-PAGE, tinción nitrato de plata del MPVa purificado. Carril 1: Marcador de peso molecular de proteínas (MPM). Carriles 2 y 3: Testigos de células Vero con inhibidores de proteasas. Carriles 4 y 5: Muestras de virus.

Carriles 6-9: Albúmina bovina. Las bandas que corresponden a pesos moleculares del MPVa están en recuadros.

Se logró identificar 3 bandas de interés, que corresponden aproximadamente con los pesos moleculares de 3 proteínas abundantes de MPVa, dichos pesos moleculares se indican en el Cuadro 3. Una vez observadas las bandas se llevó a cabo el análisis de la imagen con dos programas. La imagen se analizó primero con el programa Kodak Imaging® para determinar los pesos moleculares más exactos de cada banda indicados en el Cuadro 3.

PM del MPVh y MPVa C reportados (kDa)	Proteína	Bandas en MPVa purificado (kDa).	Identidad basada en PM y abundancia.
200	L		
50-53 82-84	G	70.54	G
45-54	F1	54.05	F1
42-45	N	39.07	N
35-39	P		
27	M		
22	M2		
14-15	F2		

Cuadro 3. Determinación de los pesos moleculares de las bandas abundantes de MPVa purificado y comparación con los pesos moleculares reportados de proteínas de MPVa.

Así se identificaron en el MPVa purificado las proteínas G (70.54 kDa), F1 (54.05 kDa) y N (39.07 kDa). A pesar de que el peso molecular que encontramos para N

difiere del reportado para MPVh (42-45 kDa), consideramos que esto se debe a diferencias entre virus aviares y de humano, ya que la otra proteína posible (P) se descartó por ser poco abundante en el virión. Por otro lado, el peso molecular de la glicoproteína G varía de acuerdo a su grado de glicosilación, por ello se considera que la banda de 70.54 kDa corresponde al peso molecular de esta proteína de MPVa subtipo A usada en este estudio, la cual difiere de la del MPVh que se usó como referencia del peso molecular esperado.

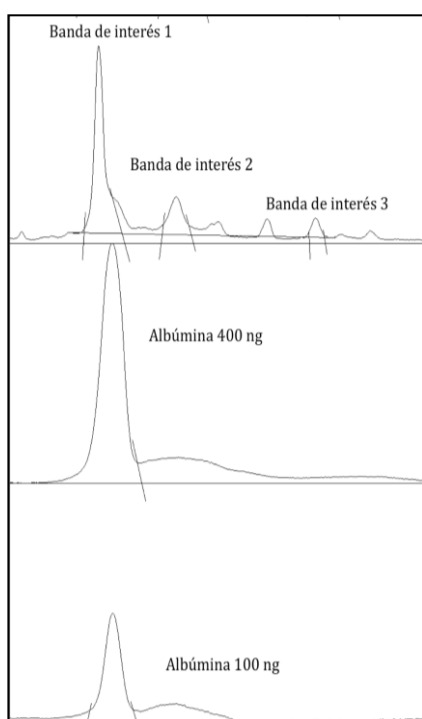


Figura 9. Densitometría de las bandas de interés para la determinación de proteína del MPVa purificado.

Una vez determinados los pesos moleculares, se empleó el programa ImageJ para obtener la concentración de proteína en las bandas de interés utilizando como referencia la banda testigo de albúmina (de 100 ng), como se muestra en el Cuadro 4. El programa proporciona curvas que permiten conocer la cantidad en

pixeles (Figura 9) y este valor se correlaciona para conocer la concentración de proteína (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 4. Determinación de la concentración de proteína tomando como referencia el testigo de albúmina de 100 ng.

Carril 10	Área en pixeles	ng
Albumina	6885.64	100

Cuadro 5. Determinación de la concentración de proteína con ImageJ de las bandas de interés de MPVa (carril 4).

Carril 4	Área pixeles	ng
Banda 1	10247.933	148.83
Banda 2	4714.619	68.47
Banda 3	1836.82	26.67

Se obtuvo un total de 243.97 ng de la proteína de interés por cada 50 µl y 975.88 ng por 200 µl contenidos en 1 vial.

Determinación de la pureza del lote viral:

Para determinar la pureza se empleó el programa ImageJ, como se indica en el apartado de Métodos, el resultado obtenido fue de 56.14%, por lo que la pureza del MPVa purificado es superior al 50%. Este alto grado de pureza se consideró suficiente para usar este virus como antígeno en la producción de un suero hiperinmune.

Estandarización de la técnica de inmunoperoxidasa para MPVa en células Vero.

Para estandarizar esta técnica, se ensayaron varias diluciones del suero hiperinmune anti-MPVa y distintos tiempos post-infección hasta encontrar el marcaje con la intensidad adecuada de células infectadas con MPVa. Al realizar estos ensayos se eligió como un periodo óptimo de infección 16 horas y una dilución del suero hiperinmune de 1:300. Con estas condiciones se logró realizar la titulación en células Vero del lote de MPVa usado a lo largo de este estudio que fue de 2×10^6 UFF/ml. En la Figura 10 se muestra que la intensidad y especificidad de la técnica nos permitió identificar y contar con facilidad las células Vero infectadas.

Ensayo de permisividad de diferentes cultivos celulares al MPVa por UFF y DICC₅₀.

Luego de infectar cada línea celular, cosechar y titular el sobrenadante en células Vero, el valor de permisividad basado en el título por UFF/ml y DICC₅₀/ml obtenido para cada una de ellas se muestra en el Cuadro 6:

Cuadro 6. Determinación de la permisividad a MPVa de distintas líneas y un cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, determinando el rendimiento (título) viral obtenido en cada línea celular utilizando la línea de referencia Vero.

Línea	Título UFF/ml	Título DICC ₅₀ /ml
Vero	8.6 x 10 ⁶	3.1 x 10 ⁹
BGM	6.6 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁶
A-72	1.1 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁹
PK-15	5.4x 10 ⁶	5.0 x 10 ⁶
RK-13	1.9x 10 ⁴	5.0 x 10 ³
MARC-145	4.3 x 10 ³	Negativo
LLC	Negativo	Negativo
MDBK	Negativo	Negativo
MDCK	Negativo	Negativo
HEP-2	Negativo	Negativo
FEP	Negativo	Negativo

En el ensayo de formación de focos se observó alta permisividad en las líneas celulares Vero, BGM, PK-15 y A-72 obteniéndose títulos entre 1.1 x 10⁶ y 8.6 x 10⁶ UFF/ml y menor permisividad en las líneas celulares RK-13 y MARC-145 entre 4.3 x 10³ y 1.9 x 10⁴ UFF/ml. En las cuatro líneas celulares restantes LLC-MK₂, MDBK, MDCK y Hep-2 no se detectó producción de virus infeccioso ni en el cultivo primario de fibroblastos (Figura 10).

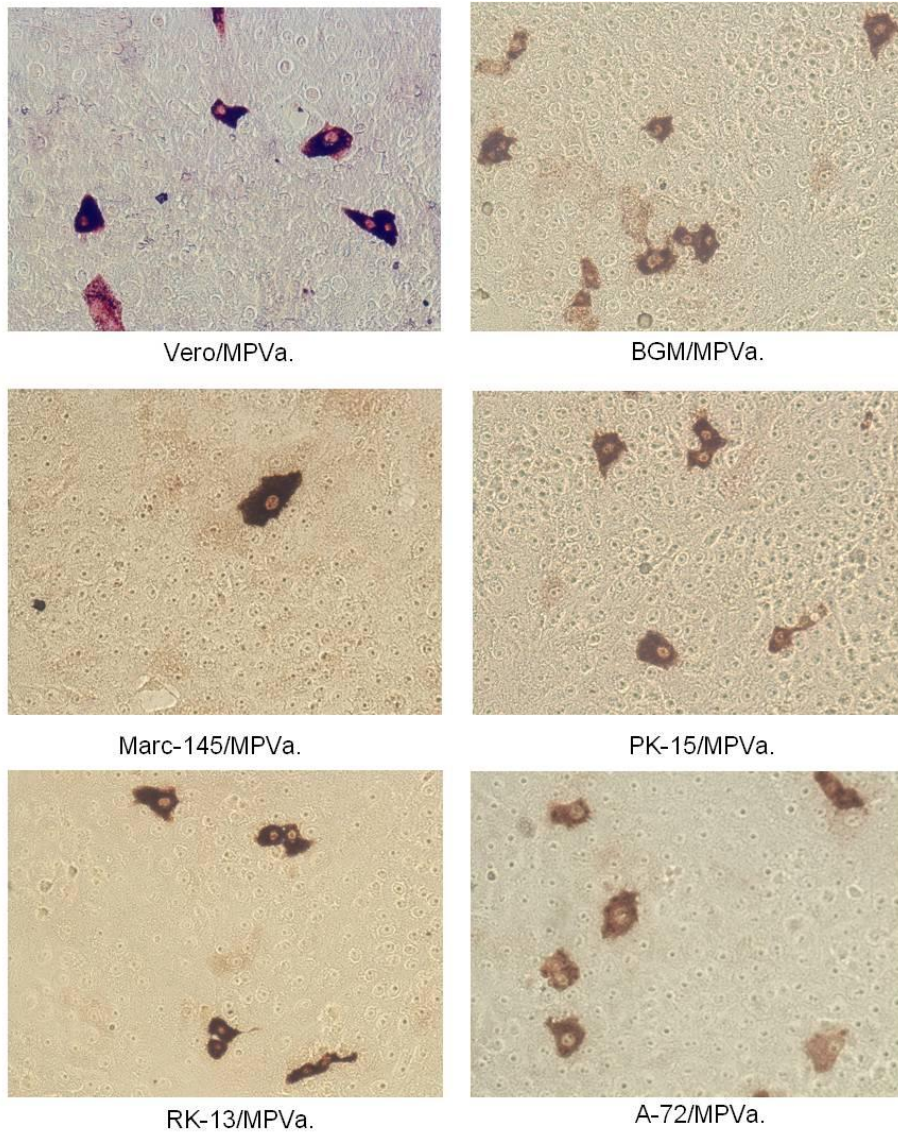


Figura 10. Detección por inmunoperoxidasa de células Vero infectadas con MPVa replicado a un pase previo en distintas líneas celulares.

También se realizó la determinación semi-cuantitativa de permisividad por $DICC_{50}$, para evaluar y titular el ECP de los sobrenadantes de cada cultivo en las células Vero de referencia (Cuadro 6). En este ensayo las células Vero fueron las más permisivas, pero a diferencia de la titulación por inmunoperoxidasa, la línea A-72 también presentó un alto rendimiento, seguidas por las células PK-15, BGM y RK-

13. Usando $DICC_{50}$ para determinar la permisividad de varios cultivos celulares a MPVa subtipo A los resultados correlacionan bien con la determinación por UFF, excepto por diferencias entre ambas técnicas en las líneas celulares Vero, A-72 y MARC-145 (Figura 11). Sorprendentemente, el título por $DICC_{50}$ parece ser muy superior que por UFF en estas tres últimas líneas, entre 453 y 909 veces. Esta diferencia no es creíble porque implicaría que una fracción de UFF pudiera corresponder a cientos de $DICC_{50}$. Es posible que la $DICC_{50}$ detecte el ECP resultante de detritos celulares que ocasione ruido en ésta técnica, además de que ésta es menos sensible que la inmunoperoxidasa. Otro resultado importante es la ausencia de título por $DICC_{50}$ en MARC-145, a pesar de que por UFF se demostró la presencia de virus infecciosos. Se requieren más estudios para identificar la causa de esta diferencia. Por otro lado, el ECP observado en las células Vero infectadas con cada uno de los sobrenadantes fueron sincicios en todas las líneas positivas.

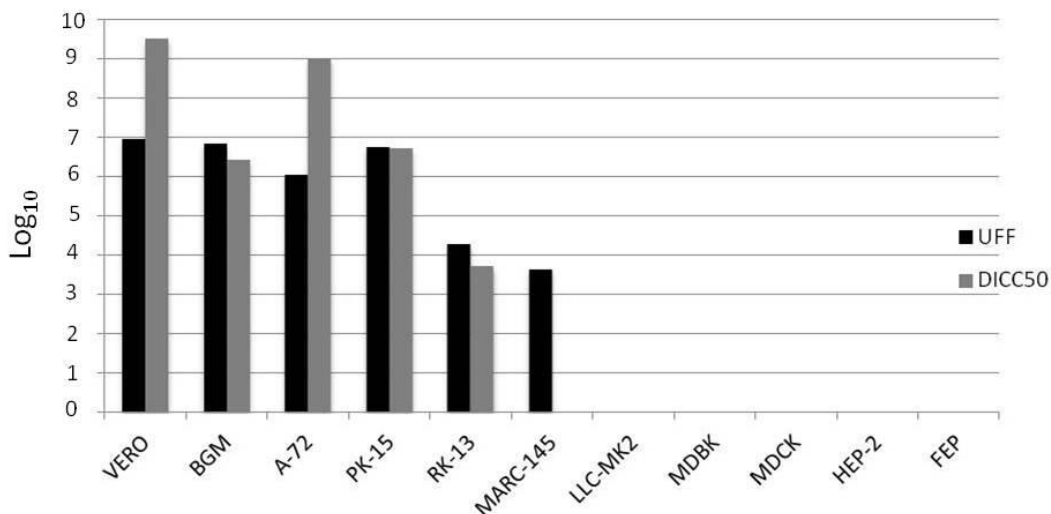


Figura 11. Evaluación de la permisividad de diferentes cultivos celulares al MPVa mediante UFF y $DICC_{50}$.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se identificaron varias líneas celulares que son medianamente o altamente permisivas a MPVa subtipo A. De esta manera, el estudio contribuye para facilitar la obtención de un antígeno de referencia que pueda ser empleado como testigo para posteriormente lograr la estandarización de técnicas de diagnóstico. Además, las líneas celulares identificadas como permisivas son candidatas a sustituir cultivos primarios para el aislamiento del virus, aunque este uso requerirá de estudios adicionales.

Para estudiar la permisividad de MPVa se utilizó como referencia las células Vero. En general, se considera a estas células como las de elección para lograr observar un ECP importante, que para el caso de este virus consiste en la formación de pequeños sincicios observables a partir de las 20 horas, pero que comienzan a crecer hasta volverse gigantes a las 72 horas, después de este periodo de tiempo, las células comienzan a lisarse. Las células Vero son las que se emplean para lograr el aislamiento de este y otros virus que normalmente muestran un reducido rango de hospederos, debido a que fallan al inducir un estado antiviral. Las células Vero presentan dos deficiencias en la respuesta de IFN, ya que por un lado tienen un daño genético en el locus de IFN β , lo cual se observó previamente durante el estudio de la replicación del virus de rubéola, donde se determinó que este virus se replicaba alcanzando títulos altos particularmente en estas células, en comparación con otras líneas cuya producción de IFN era eficiente (Desmyter, 1968; Emeny, 1979; Mosca, 1986;

Stanwick, 1974). Por otro lado, se ha demostrado que las células Vero también fallan en inducir un estado antiviral debido a una expresión muy baja del factor regulador de IFN 3 (IRF3). IRF3 participa en la respuesta antiviral ya que al ser fosforilado dimeriza y es translocado al núcleo donde estimula la producción de ARNm de IFN β y α (Juang, 1998).

El MPVa es un ejemplo de virus difícil de aislar ya que la adaptación previa en cultivos primarios hasta el momento es inevitable, pero una vez que el virus se modifica en estos pasos previos en cultivos primarios, la replicación en las células Vero es altamente eficiente debido a sus características de respuesta inmune innata previamente mencionadas. Estos defectos en la respuesta innata de un cultivo celular son características que facilitan la replicación de virus difíciles de aislar *in vitro*. Por ejemplo, el virus de hepatitis C (HCV), requirió de un gran esfuerzo para encontrar una línea celular permisiva. La línea celular Huh 7.5 en la que se logró replicar finalmente al HCV tiene un defecto en la vía RIG-I (gene 1 inducible por ácido retinoico). La proteína RIG-I es un sensor de ARN intracelular de cadena doble, generado durante la replicación de algunos virus. RIG-I activado desencadena una vía de fosforilación que resulta en la activación de IRF-3, IRF-7 y NF $\kappa\beta$, genes que participan en la respuesta antiviral de IFN (Bartenschlager, 2005; Chew, 2009; Juang, 1998; Pietschmann, 2003).

Además del empleo de las células Vero en el diagnóstico, a nivel experimental se han estado buscando nuevas alternativas para lograr la replicación eficiente del MPVa con títulos altos utilizando nuevas líneas continuas, y en este estudio se

identificó un alto título de replicación en el ensayo de infectividad del MPVa en las líneas continuas A-72, PK-15 y BGM con los títulos más altos y un ECP notable que consistió en la formación de sincicios, aunque de un tamaño moderado a partir de las 48 horas, sin embargo, cabe mencionar que el virus stock empleado tenía seis pases previos en las células Vero y sólo uno en el resto de las células, así que el título se incrementaría con pases subsecuentes, por lo que se podrían considerar a estas líneas como excelentes candidatas para la obtención de máximos títulos virales, excelentes ECP y que además no habían sido previamente reportadas.

Se identificó también un título moderado en las líneas MARC-145 y RK-13. Aunque estas líneas celulares no son buenas candidatas para el aislamiento de MPVa, pero podrían ser interesantes para el estudio de restricción de hospedero a este virus. En estas líneas se observó en cambio redondeamiento, desprendimiento y muerte celular. La aparente muerte celular podría estar relacionada con la inducción de apoptosis que a su vez es un factor capaz de restringir la replicación viral. Es interesante notar que en este estudio como en otros previos, las células de riñón de mamífero son de elección para adaptar virus a replicación en cultivos celulares (Kong, 2006).

Cómo se pudo observar en las dos titulaciones mediante $DICC_{50}$ e inmunoperoxidasa, no hubo correlación entre los títulos en el ensayo de permisividad entre los métodos de inmunoperoxidasa y la semi-cuantificación por $DICC_{50}$, ya que por un lado la inmunoperoxidasa cuantifica la formación de focos,

es decir, el número de células infectadas evidenciadas mediante la tinción específica y por otro lado, en el método de $DICC_{50}$ se evalúa la formación de ECP evidenciada mediante la tinción del monoestrato con un colorante vital, sin embargo, en las células Vero y A-72 la diferencia entre los títulos por estos dos métodos sugieren la presencia de factores ajenos al virus que están ocasionando ECP (detritos celulares) y la susceptibilidad a estos factores varía entre líneas celulares. Teóricamente la técnica de $DICC_{50}$ es menos sensible, sin embargo, cuando el virus ingresa a la célula y completa su ciclo viral, la infección se amplifica y de esta manera es posible evidenciar el ECP inclusive a simple vista por la tinción del monoestrato con el colorante vital, por lo que es difícil su comparación en cuanto a sensibilidad con la inmunoperoxidasa, pues ésta detecta proteínas virales dentro de células individuales en tiempos más tempranos de la infección. Las células BGM y PK-15 demostraron ser también altamente permisivas, presentando ECP en la titulación por $DICC_{50}$ y las células RK-13 fueron medianamente permisivas y a su vez presentaron ECP. Por último, la línea MARC-145 no mostró título por $DICC_{50}$ pues no se observó ECP, pero si se demostró la presencia de proteínas virales dentro de las células infectadas por inmunoperoxidasa, indicando sólo el ingreso del virus a célula, pero no se completó el ciclo viral. Cabe mencionar que el cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo no mostró ECP cuantificable por $DICC_{50}$ ni marcaje específico evidenciado por inmunoperoxidasa, en estudios previos no existen reportes de permisividad de estas células hacia el subtipo A o B de MPVa, sólo hacia el subtipo C, resultando ser poco permisivas y sin ningún ECP, por ello sólo se

utilizan para realizar los pases iniciales y después es necesario aún la adaptación a células Vero.

Por otro lado, en el desarrollo de esta investigación se elaboró un suero hiperinmune anti-MPVa, esto implicó la purificación del virus por sedimentación en colchón de sacarosa. Inicialmente pensamos en una técnica más sofisticada para purificar al MPVa por centrifugación en gradientes continuos de sacarosa, sin embargo, los rendimientos en los ensayos preliminares fueron muy bajos, por lo que optamos por la purificación de este virus utilizando gradientes discontinuos (colchones) de sacarosa. La pureza que se logró con este sistema fue sorprendentemente alta (56%) para un método relativamente simple, lo que permitió confiar en que el suero hiperinmune que se produjo fuese de buena calidad. Al final, este suero mostró buenas cualidades pues resultó ser altamente específico en ensayos de inmunoperoxidasa.

Por lo que en este trabajo se proporciona información acerca de un rango más amplio de líneas celulares permisivas para lograr un aislamiento con títulos comparables a las células Vero, y de esta manera, ampliar la batería de líneas celulares para replicar al MPVa, a partir del que se encuentra previamente adaptado a diferentes tipos de cultivos primarios o embrión de pollo. También proponemos el uso de estas líneas celulares altamente permisivas para intentar aislamientos primarios, si bien la adaptación inicial en cultivos primarios es la forma tradicional en la cual se lleva a cabo el aislamiento, los datos obtenidos en éste y otros estudios indican un nivel de permisividad mínimo en cultivos

homólogos primarios, además de que no existen reportes del aislamiento directo de MPVa en líneas continuas. Además se logró producir un suero hiperinmune de calidad que puede también ser utilizado para la estandarización de técnicas directas para la detección del antígeno.

8. CONCLUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la existencia de líneas celulares continuas heterólogas altamente permisivas para la replicación del MPVa subtipo A, pues sus títulos son comparables al obtenido en las células Vero que se emplearon como referencia, además de que algunas de ellas son más fáciles de mantener que la línea Vero. Por otro lado, el cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo no logró un nivel mínimo de permisividad que pudiera ser detectado por inmunoperoxidasa.

9. REFERENCIAS:

Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2000; 12: 3–14.

Alvarez R, Lwamba HM, Kapczynski DR, Njenga KM, Seal BS. Nucleotide and Predicted Amino Acid Sequence-Based Analysis of the Avian Metapneumovirus Type C Cell Attachment. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41: 1730-1735.

Alvarez R, Harrod KS, Shieh WJ, Zaki S, Tripp RA. Human Metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *Journal of Virology*. 2004; 78 (24): 14003–14011.

Bagnaud-Baule A, Reynard, Perret, Berland JL, Maache M, Peyrefitte C, Vernet G, Volchkov, Paranhos-Bacala G. The human metapneumovirus matrix protein stimulates the inflammatory immune response in vitro. *Plos One*. 2011; 6: 1-9.

Banet-Noach C, Simanov, Lubov, Perk, Shimon. Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains in turkeys and chickens, *Avian Pathology*. 2005; 34: 220 – 226.

Bao X, Liu T, Shan Y, Li K, Garofalo RP, Casola A. Human Metapneumovirus Glycoprotein G Inhibits Innate Immune Responses. *Plos One*. 2008; 4 (5): 1-12.

Barron AL, Olshevsky, Cohen MM. Characteristics of the BGM line of cells from african green monkey kidney. Arch Gesamte Virusforsch. 1970; 32(4): 389-92.

Bartenschlager R, Pietschmann T. Efficient hepatitis C virus cell culture system: What a difference the host cell makes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005. 102 (28). 9739- 9740.

Binn LN, Marchwicki RH, Stephenson EH. Establishment of a canine cell line: Derivation, characterization, and viral spectrum. American Journal of Veterinary Research. 1980;41(6): 855-60.

Chang A, Masante C, Buchholz UJ, Dutch RE. Human Metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. Journal of Virology. 2012; 86 (6); 3230-3243.

Chary P, Rautenschlein S, Njenga MK, Sharma JM. Pathogenic and immunosuppressive effects of avian pneumovirus in turkeys. Avian Disease. 2002; 46: 153-161.

Chevallet M, Luche S, Rabilloud. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Nature protocols. 2006; 1 (4): 1852-1858.

Chew T, Noyce R, Collins SE, Hancock MH, Mossman L. Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line

deficient for IFN production. *Molecular Immunology*. 2009; 46. 393–399.

Choi K, Lee EK, Jeon WJ, Park MJ, Yoo YN, Kwon JH. Diagnostic utility of egg yolk for the detection of avian metapneumovirus antibodies in Laying hens. *Avian disease*. 2010, 54: 1230-1236.

Christofinis GJ, Beale AJ. Some biological Characters of cell lines derived from normal rabbit kidney. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1968; 95(2): 377-81.

Cavanagh D, Mawditt K, Britton P y Naylor CJ. Longitudinal field studies of infectious bronchitis and avian pneumovirus in broiler using type specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*. 1999; 28: 593-605.

Cook JKA. Review: Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. *The Veterinary Journal*. 2000; 160: 118-125.

Cook JKA, Cavanagh D. Review: Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). 2002; 31: 117-132.

Dar AM, Munir S, Goyal SM, Kapur V. Sequence Analysis of the Matrix (M2) Protein Gene of Avian Pneumovirus Recovered from Turkey Flocks in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41:2748–2751.

Deng Q, Wen Y, Lu W, Demers A, Song M, Wang D, Yu Q Li F. Topology and

cellular localization of the small hydrophobic protein of avian metapneumovirus. *Virus Research*. 2011; 160: 102-107.

De Graaf M, Herfst S, Schrauwen EJA, Choi Y, Van den Hoogen BG, Osterhaus A, Fouchier RAM. Specificity and Functional interaction of the Polymerase Complex Proteins of Human and Avian Metapneumoviruses. *Journal of General Virology*. 2008; 89: 975–983.

De Graaf M, Schrauwen EJA, Herfst S, Amerongen, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Fusion protein is the main determinant of metapneumovirus host tropism. *Journal of General Virology*. 2009; 90: 1408-1416.

Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. Defectiveness of interferon production and of Rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *Journal of Virology*. 1968; 2 (10): 955-961.

Dinwiddie DL, Harrod KS. Human Metapneumovirus inhibits IFN- α signalling through inhibition of STAT1 phosphorylation. *American Journal of Cellular Molecular Biology*. 2007; 38: 661-670.

Easton AJ, Domachowske, Rosenberg HF. Animal Pneumoviruses: Molecular genetics and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004; 12: 390-412.

Emeny JM, Morgan MJ. Regulation of interferon system. Evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *Journal of General Virology*. 1979; 43: 247-252.

Gough RE, Jones RC. Avian Metapneumovirus. En: Saif YM, editor. *Diseases of Poultry*. Texas: Creative Printing Company, 2008: 100-107.

Govindarajan D, Kim SH, Samal SK. Contribution of the Attachment G Glycoprotein to Pathogenicity and Immunogenicity of Avian Metapneumovirus Subgroup C. *Avian Diseases* 54(1); 59-66: 2010.

Hernández-Jáuregui P, Yacoub A, Kenedy S, Curran B, Téllez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-López J. Uptake of porcine rubulavirus (LPMV) by PK-15 cells. *Archives of Medical Research*. 2001; 32(5): 400-409.

Hull RN, Cherry WR, Tritch OJ. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK₁, LLC-MK₂, LLC-MK₂(NCTC-3196) and their utility in virus research. *Journal of Experimental Medicine*. 1962; 115(5): 903–918.

Jirjis FE, Noll SL, Halvorson DA, NAgaraja KV, Shaw DP. Immunohistolchemical detection of avian penumovirus in formalin-fixed tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic investigation*. 2001; 13 (1): 13-16.

Jones RC. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): Are they ever under control? *British Poultry Science*. 2010; 51: 1-11.

Juang YT, Lowther W, Kellum M, Au WC, Lin R, Hiscott J, Pitha M. Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95: 9837-9842.

Juhasz K, Easton AJ. Extensive sequence variation in the attachment (G) proteina gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *Journal of General Virology*. 1994; 75: 2873-2880.

Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of Virology*. 1993; 133: 477-483.

Kong BW, Foster LK, Foster DN. Species-specific deletion of the viral attachment glycoprotein of avian metapneumovirus. *Virus Research*. 2008; 132:114-121.

Lamb RA, Jardetzky TS. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Current Opinion in Structural Biology*. 2007; 17(4): 227-436.

Liu L, Bastien N, Li Y. Intracellular processing, glycosylation, and cell surface expression of Human Metapneumovirus attachment glycoprotein. *Journal of Virology*. 2007; 81 (4): 13435-13443.

Liu Y, Haas DL, Poore S, Isakovic S, Gahan M, Mahalingam S, Fu ZF, Tripp RA. Human Metapneumovirus establishes persistent infection in the lungs of mice and is reactivated by glucocorticoid treatment. *Journal of Virology*. 2009; 83 (13): 6837–6848.

Madin SH, Darby NB. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1958; 98(3): 574-576.

Mas V, Herfst S, Osterhaus AD, Fouchier RA, Melero JA. Residues of the Human Metapneumovirus Fusion (F) Protein Critical for Its Strain-Related Fusion Phenotype: Implications for the Virus Replication Cycle. *Journal of Virology*. 2011; 85: 12650–12661.

Mbiguino A, Menezes J. Purification of human respiratory syncytial virus: superiority of sucrose gradient over percoll, renografin and metrizamide gradients. *Journal of Virological Methods*. 1991; 31: 161-170.

Mosca JD, Pitha PM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis. *Molecular and Cellular Biology*. 1986; 6 (6): 2279-2283

Munir S, Kapur V. Regulation of host cell transcriptional physiology by the avian Pneumovirus provides insights into host-pathogen interactions. *Journal of Virology*. 2003; 77 (8); 4899-4910.

Njenga MK, Lwamba HM, Seal BS. Metapneumovirus in birds and humans. *Virus Research*. 2003; 91: 163-169.

Pietschmann T, Bartenschlager R. Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clinics in Liver Disease*. 2003; 7: 23-43.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 1938; 27 (3): 493-497.

Rhim JS, Schell K, Creasy B, Case W. Biological Characteristics and viral susceptibility of an african green monkey kidney cell line (Vero). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1969; 132(2): 670-678.

Rindler MJ, Chuman LM, Shaffer L, Saier MH. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *Journal of Cellular Biology*. 1979; 81: 635-648.

Sabo Y, Ehrlich M, Bacharach E. The conserved YAGL motif in human Metapneumovirus is required for higher-order cellular assemblies of matrix protein and for virion production. *Journal of Virology*. 2011; 85 (13): 6594–6609.

Shin HJ, Njenga MK, McComb B, Halvorson Da, Nagaraja KV. Avian Pneumovirus (APV) RNA wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38 (11): 4282-4284.

Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of human metapneumovirus F protein promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *Journal of Virology*. 2006; 80: 10931-10941.

Smith EC, Popa A, Chang A, Masante C, Dutch RE. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *The FEBS journal*. 2009; 276 (24): 7217-7227.

Stanwick TL, Hallum JV. Role of interferon in six cell lines persistently infected with rubella virus. *Infection and Immunity*. 1974; 10 (4): 810-815.

Takimoto T, Portner A. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Research*. 2004; 106: 133–145.

Tiwari A, Patnayak DP, Chander Y, Goyal SM. Permissibility of different cell

types for the growth of avian metapneumovirus. *Journal of Virological Methods*. 2006; 138: 80-84.

Toquin D, Bayon-Auboyer MH, Senne DA, Eterradossi N. Lack of antigenic relationship between french and recent north american non-A/non-B turkey rhinotracheitis viruses. *Avian diseases*. 2000; 44: 977-982.

Treptow CA, Bianchi SM, Mohamed HH, Lage FH, Weis AC. Propagation of avian metapneumovirus subtypes A y B using chicken embryo related and other cell systems. *Journal of Virological Methods*. 2010; 167: 1-4.

Velayudhan BT, McComb B, Bennet RS, Lopes VC, Shaw D, Halvorson DA, Nagaraja KV. Emergence of a virulent type C avian Metapneumovirus in turkeys in Minnesota. *Avian Disease*. 2005; 49: 520-526.

Villareal LYB, Brandao PE, Chacón JL, Assayag MS, Maiorka PC, Raffi P, Saidenberg ABS, Jones RC, Ferreira AJP. Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Metapneumovirus Infections. *Avian Diseases*. 2007; 51: 900-9004.

Wei Y, Feng K, Yao X, Cai H, Li J, Mirza AM, Lorio RM, Li J. Localization of a región in the fusión protein of avian Metapneumovirus that modulates cell-cell fusión. *Journal of virology*. *Journal of Virology* 2012; 86 (21): 11800-11814.

Wen X, Krause JC, Leser GP, Cox RG, Lamb RA, John V Williams JV, Crowe JE, Jardetzky TS. Structure of the human metapneumovirus fusion protein with neutralizing antibody identifies a pneumovirus antigenic site. *Nature Molecular and Structural Biology*. 2012; 19 (4): 461-463.

Weng Y, Lu W, Harmon A, Xiang X, Deng Q, Song M, Wang D, Yu Q, Li F. The cellular endosomal sorting complex required for transport pathway is not involved in avian metapneumovirus budding in a virus-like-particle expression system. *Journal of General Virology*. 2011; 92: 1205–1213.

10.APÉNDICE.

1. Preparación de reactivos para la tinción de plata

Solución fijadora	120 ml de etanol + 40 ml de ácido acético + 240 ml de agua destilada
-------------------	--

Etanol 20%	80 ml de etanol al 96% + 320 ml de agua
Solución sensibilizadora (Tiosulfato de sodio al 0.02%)	0.04 g de tiosulfato + 200 ml de agua
Nitrato de plata 10x	4.077 g de nitrato de plata + 200 ml de agua, diluir antes de usar
Revelador	6 gr de carbonato de potasio + 200 ml de agua, añadir justo antes de usar 50 μ l de formaldehído al 36% y 25 μ l de tiosulfato de sodio al 10%
Solución de paro	8 g de trizma base + 196 ml de agua + 4 ml de ácido acético.

2. Preparación de reactivos para la inmunoperoxidasa.

PBS A, 1 litro	NaCl 8 g + KCl 0.2 g + Na ₂ HPO ₄ 1.44 g + 1.44 g + 0.24 g, ajustar a pH 7.4
Suero de cabra al 2%	180 μ l de suero de cabra + 9 ml de PBS A
Anti-IgG biotinilado con suero de cabra	8 μ l de anti-IgG de conejo biotinilado + 8 ml de PBS A + 80 μ l de suero normal de cabra
Tween 20 al 0.1%	100 ml de PBS A + 100 μ l de tween 20
Complejo Avidina-biotina-peroxidasa	90 μ l del Reactivo A (kit comercial)+ 8.8 ml PBS A + 0.1% de tween 20, mezclar muy bien y agregar 90 μ l del reactivo B del kit. Dejar reposar la mezcla durante 30 min a 4°C antes de usar
Acetato de sodio 0.2 M	1.64 g de acetato de sodio + 100 ml de agua
Ácido acético 0.2 M	98.8 ml de agua + 1.2 ml de ácido acético glacial
Buffer de acetatos 0.05 M, pH 5	75 ml de agua + 17.8 ml de acetato de sodio 0.2 M y 7.2 ml ácido acético 0.2 M, el pH se debe ajustar a 5
Solución de aminoetilcarbazole	4 mg/ml de aminoetilcarbazole diluido

	en dimetilformamida
Sustrato de la peroxidasa	9 ml de buffer de acetatos 0.05 M, pH 5 + 1 ml AEC + 10 μ l de peróxido de hidrógeno

3. Protocolo para la elaboración del gel de poliacrilamida.

El gel se prepara en 2 fases: el gel inferior y el gel superior, con los siguientes reactivos:

Preparación del gel inferior.

Acrilamida bis	5 ml
Tris 1.5 M	3.75 ml
H ₂ O (milli Q)	5.99 ml
SDS 10%	150 μ l
APS 10%	87.5 μ l
TEMED	8.75 μ l

Antes de agregar el TEMED se degasifican los reactivos en un matraz pequeño, una vez que se agrega el TEMED, el gel se deposita cuidadosamente sobre los cristales de la cámara de electroforesis.

Gel superior.

Acrilamida bis	1 ml
Tris 1 M	2.5 ml
H ₂ O	6.29 ml
SDS 10%	100 μ l
APS 10%	100 μ l

TEMED	10 μ l
-------	------------

4. Protocolo para la tinción de gel de poliacrilamida empleando nitrato de plata.

PASO	DURACIÓN
Enjuagar gel 2 veces con etanol 20%	10 minutos por enjuague
Enjuagar 2 veces con agua destilada	10 minutos por enjuague
Sensibilizar gel con tiosulfato de sodio 0.02%	1 minuto
Enjuagar 2 veces con agua destilada	1 minuto por lavado
Impregnar al gel con nitrato de plata 12mM	20 minutos
Enjuagar con agua destilada 2 veces	10 segundos
Revelar	8 minutos
Detener reacción con solución de paro	30 minutos
Lavar 2 veces con agua destilada	30 inutos por lavado

5. Protocolo para la tinción de inmunoperoxidasa en placa de 96 pozos.

PASO	INCUBACIÓN
Enjuagar 3 veces los pozos fijados con PBS	
Bloquear con suero de cabra al 2%, 75 μ l/pozo	30 minutos a 37° C
Lavar 1 vez con PBS	
Añadir anti-IgG, 75 μ l/pozo	30 minutos a 37° C
Lavar 3 veces con PBS	
Agregar el complejo avidina-biotina-peroxidasa, 75 μ l/pozo.	30 minutos a 37 ° C
Lavar 3 veces con PBS	
Revelar con el sustrato de peroxidasa (aminoetil-carbazole), 75 μ l/pozo	15 minutos a temperatura ambiente
Lavar 2 veces con agua destilada y dejar secar	