

SUSCEPTIBILIDAD DE CINCO LÍNEAS CELULARES ESTABLES AL VIRUS DE SEUDORRABIA

Susceptibility of five stable lines cells to pseudorabies virus

Ivonne Cedeño*

Morella Rolo**

Luisa Palencia**

Nancy López**

* Práctica privada.

** Instituto de Investigaciones Veterinarias-CENIAP-FONAIAP
Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

RESUMEN

Para aislar el virus de seudorrabia, son requeridas monocapas celulares sensibles. En el presente trabajo se utilizaron 5 líneas celulares estables PK-15 (riñón porcino), MDBK (riñón bovino Madin Darb), BT (cornete bovino), RK (riñón de conejo) y VERO (riñón de mono verde africano), para evaluar su susceptibilidad al virus de seudorrabia, inoculados con diferentes cepas de campo. En todas las líneas celulares hubo replicación viral; sin embargo, las líneas PK-15 y VERO demostraron mayor susceptibilidad al virus, apareciendo el efecto citopatogénico (ECP) en un tiempo más corto en las células VERO entre 24 y 48 horas post-inoculación. Siendo esta línea menos exigente para su mantenimiento en el laboratorio y presentándose un buen ECP, se sugiere su uso para la multiplicación del virus de la seudorrabia.

Palabras clave: Seudorrabia, líneas celulares estables, efecto citopatogénico.

ABSTRACT

Susceptible cell monolayers are required to isolate the pseudorabies virus (PRV). In the present work, five stable cellular monolayers such as PK-15 (Porcine Kidney), MDBK (Madin Darb Bovine Kidney), BT (Bovine Turbinate), RK (Rabbit Kidney) and Vero (African Green Monkey Kidney) were utilized in order to evaluate their susceptibility to the several pseudorabies virus (PRV) strains from the field. In all monolayers there was viral growth; however, PK-15 and Vero lines demonstrated higher susceptibility to the virus, appearing

the pathogenic effect at a short time in Vero between 24-48 hours post-inoculation, being this line (Vero) with less demanding for its maintenance in the laboratory and showing a good pathogenic effect, their use for the multiplication of the PRV is suggested.

Key words: Pseudorabies, stable lines cells, citopathogenic effect.

INTRODUCCIÓN

La seudorrabia es una enfermedad infecciosa del cerdo cuyo agente causal es el *Herpesvirus suis* I, que afecta actualmente al rebaño nacional, por las características de la misma se hace necesario profundizar los estudios de las cepas actuantes en el país. El virus de seudorrabia (VSR) o *Herpes virus suis* I, se ha logrado multiplicar en cultivos primarios y en líneas celulares estables, lo cual ha permitido incrementar el conocimiento sobre este virus. El ciclo replicativo del mismo en líneas celulares es corto (6-9 horas) y causa una destrucción masiva de las células susceptibles [19], produciendo un ECP caracterizado por un redondeamiento celular y formación de sincitio. Dependiendo de la cepa viral y del estado de infección se pueden producir los llamados cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos [7].

Se han utilizado diversas líneas celulares para la multiplicación del VSR, entre ellas tenemos PK-15 (riñón porcino pase 15) [2] MDBK (riñón bovino Madin Darb) [14,18] RK (riñón de conejo) [3] BLC (células pulmonares bovinas) [15] y recientemente la línea KSEK6 (corteza de riñón de embrión suíno) [5].

En el presente trabajo se evaluó la susceptibilidad de 5 líneas celulares estables inoculadas con *Herpesvirus suis* I obtenido de diferentes cepas de campo.

MATERIALES Y MÉTODO

Líneas celulares

Se utilizaron 5 líneas celulares estables BT (cornete bovino) cedida por el Departamento de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Nebraska, USA; MDBK (riñón bovino Madin Darb) y Vero (riñón de mono verde africano) cedidas por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Brasil; PK-15 (riñón porcino) donada por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina y RK (riñón de conejo) donada por Laboratorios CALA de Venezuela.

Para la multiplicación y crecimiento de las mismas se utilizó la metodología descrita por Hsiung [4] con algunas modificaciones. El medio de crecimiento utilizado fue Medio Mínimo Esencial (MEM) Gibco suplementado con 10% de suero fetal bovino (Difco), 100 µg/ml de Penicilina, 40 µg/ml de Streptomina y 2.5 µg/ml de Anfotericina B. Como medio de mantenimiento de las células se utilizó el mismo MEM sin adición de suero fetal bovino.

Muestras

Las muestras utilizadas correspondieron a 10 cerebros de cerdos procedentes de granjas organizadas de diversos estados (Zulia, Aragua, Cojedes, Yaracuy y Carabobo) donde se presentaron cuadros clínicos compatibles con Pseudorrabia y con diagnóstico positivo por Inmunofluorescencia Directa (IFD) en frotis por aposición de tonsilas, realizado en el Instituto de Investigaciones Veterinarias.

Inóculos

Se prepararon suspensiones de cerebro al 10% en medio MEM empleándose un omni-mixer (Dupont Instrument Sorval) durante 5 minutos, luego fueron centrifugados a 1050g durante 15 minutos a 4°C, en una centrífuga Beckman Modelo J2-21 usando un rotor JA-20. El sobrenadante fue recogido y se le adicionó una mezcla de penicilina/streptomina diluida a 8000 UI/ml en bufer fosfato salina (Phosphate - Buffered Saline) (PBS) pH 7.2 y 50 µg/ml de anfotericina B dejando actuar los antibióticos por 1 hora a temperatura ambiente. Los inóculos se conservaron a -70°C en un congelador Forma Bio-Freezer (Form Scientific, Marietta, Ohio) hasta su uso.

Inoculación de monocapas celulares

A las 24 ó 48 horas después de sembradas las células y con una confluencia del 80 al 90%, se procedió a descartar el sobrenadante. Las monocapas fueron lavadas dos veces con PBS pH 7.2. Seguidamente se inocularon con las suspensiones de virus, a razón de 1 ml por cada frasco de 500 ml; 0,5 ml

en cada frasco de 250 ml y 0,2 ml en los de 50 ml de capacidad. Las células inoculadas se incubaron a 37°C por 1 hora y pasado este tiempo, se lavaron dos (2) veces con PBS pH 7.2, finalmente se les adicionó MEM con 3% de suero fetal bovino, llevándolas a estufa a 37°C hasta observar ECP entre 24 y 72 horas después de la inoculación.

Coloración de monocapas y observación de ECP

A fin de visualizar detalles sobre las características de los ECP producidos por los diferentes aislados en las distintas líneas celulares, se inocularon frascos de 50 y 250 ml de capacidad y una vez producido el ECP, se retiró el sobrenadante y las células fueron teñidas con una solución de cristal violeta (0,5 g cristal violeta, 20 ml alcohol absoluto, 80 ml agua destilada) dejándola actuar por cinco minutos. Luego se lavaron los frascos con abundante agua, se secaron a temperatura ambiente y se fotografiaron con una cámara adaptada a un microscopio Leitz Dialux-20, con objetivo 10 x, 25x y 40x.

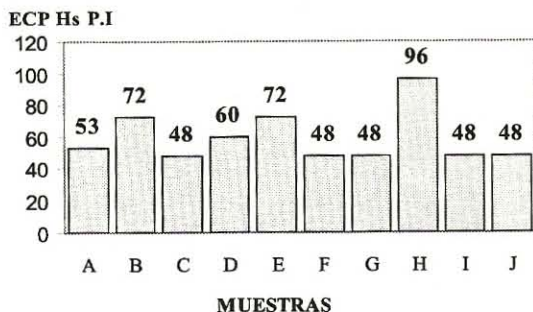
Preparación de células inoculadas con VSR para microscopía electrónica

Se infectaron monocapas confluentes de células Vero, sembradas en tubos Leighton con suspensiones de cerebro de cerdo al 10% en MEM. Las células inoculadas se incubaron a 37°C por 1 hora y luego se lavaron con PBS pH 7.2, posteriormente se agregó medio MEM con 2% de suero fetal y se dejaron a 37°C por 20 horas. Cumplido este período las células fueron fijadas con glutaraldehído al 2% (p/v) en buffer PBS pH 7.2 y mantenidas durante una noche a 4°C. Seguidamente, las células fueron recogidas utilizando "policía de goma" (Rubber Policeman) y lavadas 3 veces por centrifugación a 3000 g, por 3 minutos, en buffer cacodilato. Se post-fijaron con tetróxido de osmio al 2% (p/v) en agua durante 3 horas a 4°C, se lavaron 2 veces mediante centrifugación con agua destilada, dejando el agua 10 minutos cada vez. El sedimento celular, bien seco, fue resuspendido en agar al 2% (p/v) en agua y concentrado nuevamente por centrifugación a 6000 g por cinco minutos. Luego que el agar estaba sólido, se retiró de los tubitos de centrífuga y la zona donde estaban incluidas las células se cortó en trocitos de 1 mm³. La deshidratación de los trocitos y su inclusión en Medcast Kit (Pelco) se llevó a cabo según los procedimientos estándares [9]. Los cortes finos se tiñeron con acetato de uranilo [10] al 2% (p/v) durante 4 minutos a 60°C y con citrato de plomo durante 4 minutos a temperatura ambiente [13]. Los cortes se observaron al microscopio electrónico, Philips, Modelo CM10 (Philips Analytical International Business Center-Electron optics-Eindhoven-Holanda).

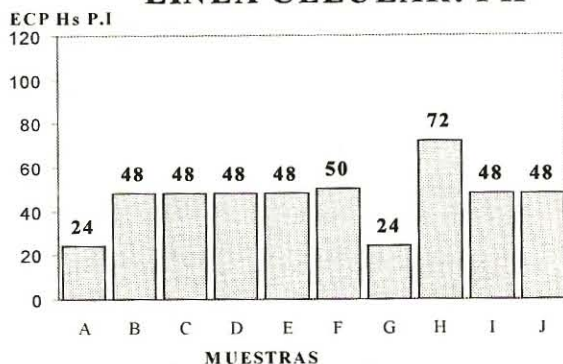
Microscopía electrónica a partir de concentraciones de virus

Se obtuvieron suspensiones concentradas de virus, clarificadas a 1090 g el sobrenadante del cultivo, que se ultracentrifugó sobre un colchón de sucrosa al 40%, a 10.000 g por 4 horas a 5°C. El pellet se resuspendió en PBS pH 7.2 y man-

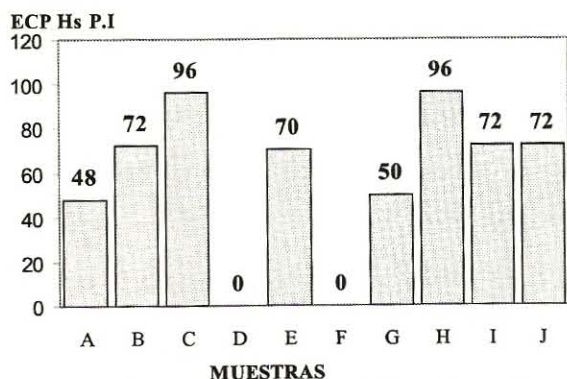
LINEA CELULAR: BT



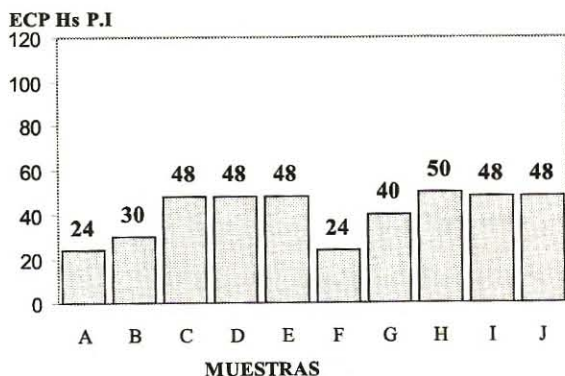
LINEA CELULAR: PK



LINEA CELULAR:MDBK



LINEA CELULAR:VERO



LINEA CELULAR:RK

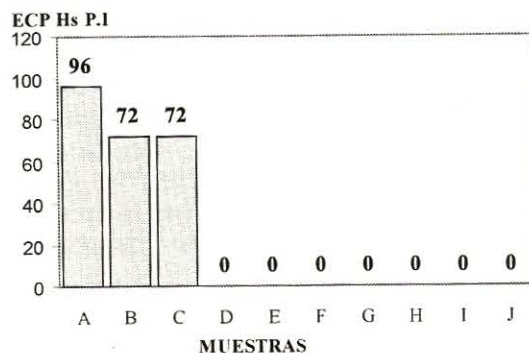


FIGURA 1. EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LÍNEAS CELULARES INOCULADAS CON VIRUS *Herpes suis 1*.

tenido a 4°C durante una noche. Se tomaron 2 UI de cada muestra y se colocaron sobre papel parafilm. Cada gota de muestra se colocó en una rejilla de 1 mm. de diámetro, compuesta de cobre con una película de Colodión y un baño de carbón y se dejó durante 5 minutos. Pasado este tiempo las rejillas fueron retiradas, secadas sobre papel filtro y colocadas en la misma dirección sobre una gota de agua bidestilada, re-

pitando este paso dos veces más, a fin de eliminar los restos de sucrosa que podrían interferir en la visualización a través del microscopio electrónico (ME). Posteriormente, fueron teñidas negativamente colocándolas sobre una gota de ácido fosfotúngstico (AFT) (Merck) al 2% (p/v) en agua, durante exactamente un minuto. Al cabo de este tiempo se retiraron y secaron, inclinándolas sobre papel filtro y fueron observadas al ME.

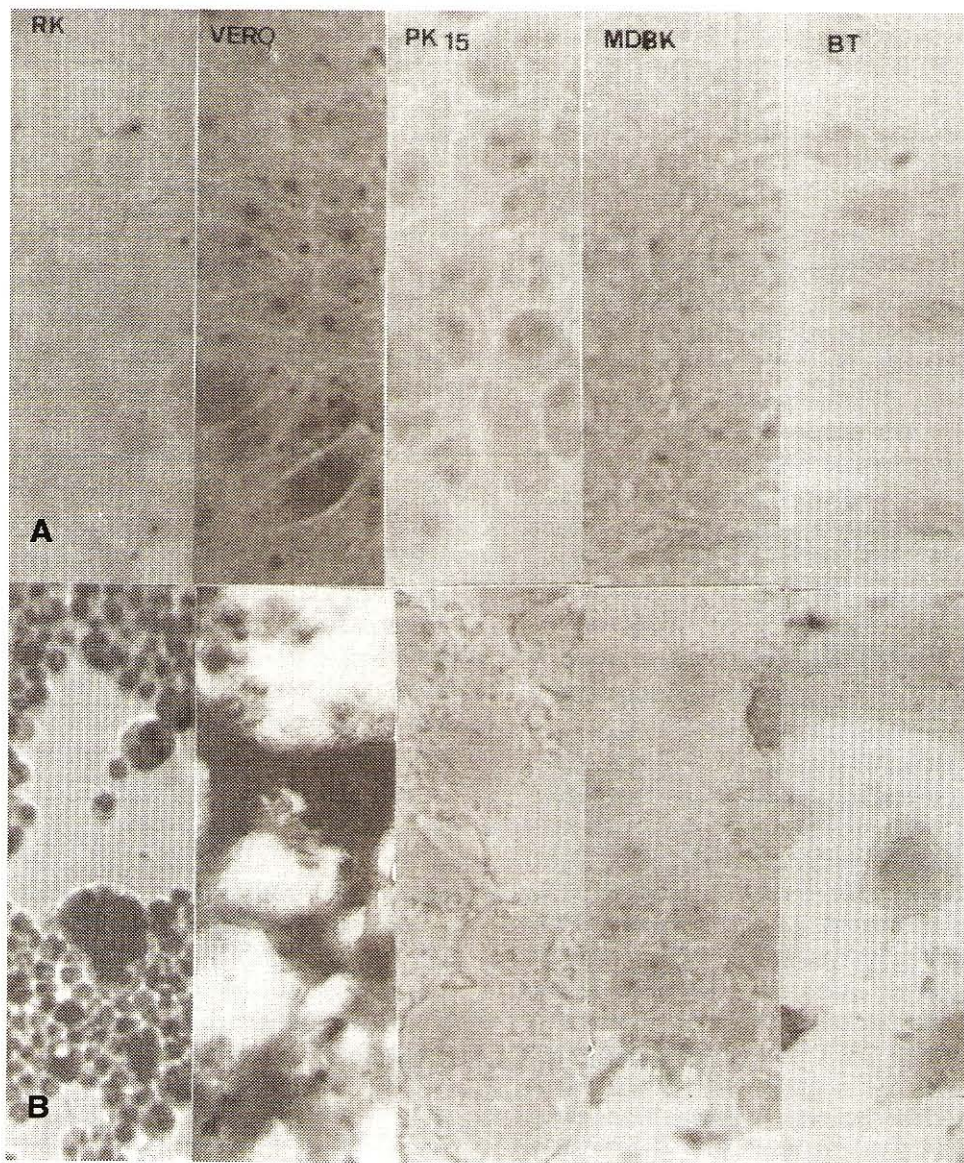


FIGURA 2. LÍNEAS CELULARES RK, VERO, PK-15, MDBK Y BT. (A) EN CONDICIONES NORMALES. (B) CON EFECTO CITOPATÓGÉNICO (ECP) PRODUCIDO POR EL VIRUS DE SEUDORRABIA.

RESULTADOS

El virus de seudorrabia se multiplicó en todas las líneas celulares utilizadas e indujo una degeneración celular, pudiendo ser masiva o parcial, FIG. 2.

El efecto citopatogénico (ECP) producido por cada aislado viral varió según la línea celular. Las líneas epiteliales Vero y PK-15 demostraron una mayor susceptibilidad viral, produciendo intensos ECP en un período de 48 horas post-inoculación, ambas líneas se comportaron de manera similar, observándose en un principio un redondeamiento celular que culminó con una lisis masiva, aunque en el caso de las células Vero, siempre fue más acentuada.

Una de las características más frecuentes en PK-15 fue, la aparición de células gigantes que no fue común en el caso

de las Vero infectadas, FIG. 2. La diferencia observada con ambas líneas celulares estuvo en el tiempo de producir la máxima degeneración celular con los diferentes inóculos, FIG. 1.

La línea RK, se probó para tres aislados virales, produciendo en todos los casos los mismos efectos, con formación de sincitio característico de algunas cepas virales y que no se observó con las líneas Vero y PK-15, FIG. 2. El efecto degenerativo de las células RK fue parcial y nunca antes de 96 horas post-inoculación.

La línea estable BT es una de las más susceptibles al VSR produciendo una masiva lisis celular, usualmente en las primeras 48 horas post-inoculación; sin embargo, no se observó el redondeamiento presente en las líneas mencionadas anteriormente. El efecto del virus estuvo relacionado a un desprendimiento extenso de la monocapa sin dar oportunidad a



FIGURA 3. CÉLULAS PK-15 INFECTADAS CON VIRUS *Herpes suis* I. (A) PARTE DEL NÚCLEO Y CITOPLASMA CELULAR CONTENIENDO NUCLEOCÁPSIDES EN VARIAS ETAPAS DE FORMACIÓN. BARRA: 50 nm. (B) MAYOR MAGNIFICACIÓN DE LA ZONA CENTRAL DEL NÚCLEO MOSTRADO EN (A). BARRA: 500 nm.

detallar el proceso degenerativo como tal, FIG. 2. Estas células fusiformes desarrollaron una multiplicación lenta, permitiendo la no acidificación del medio de cultivo rápidamente, condición que favorece el crecimiento y multiplicación del virus.

Los cultivos celulares de MDBK son los menos indicados para la multiplicación del VSR. Aún después de 96 horas post inoculación, el ECP fue parcial y con ninguno de los aislados se logró un desprendimiento de la monocapa, como en los casos anteriores. La observación de policariocitos fue común en estas células infectadas, FIG. 2.

Microscopía electrónica

Se confirmó la presencia de partículas virales herpes en todas las muestras, mediante cortes de células infectadas con VSR mediante microscopía electrónica. Se observaron grandes cantidades de nucleocápsides en forma de agregados o dispersos en el núcleo celular, en diferentes estados de desarrollo, FIGS. 3 y 4, con un diámetro de 100 a 150 nm aproximadamente. Esta acumulación es una característica típica de los herpesvirus donde el ensamblaje de nuevas cápsides toma lugar en el núcleo de las células infectadas.

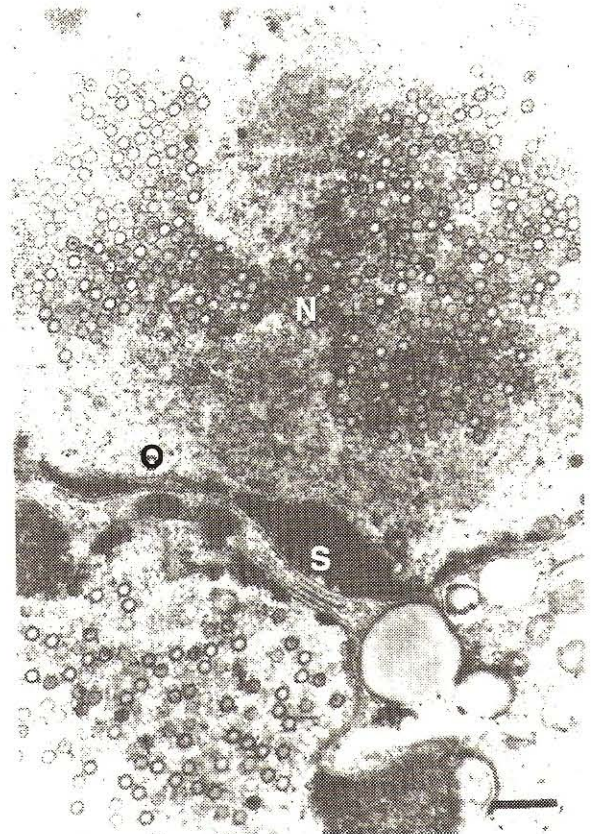


FIGURA 4. CÉLULAS VERO INFECTADAS CON VIRUS *Herpes suis* I. (N) PORCIÓN DEL NÚCLEO CONTENIENDO AGREGADOS DE NUCLEOCÁPSIDES. (O) REDUPLICACIÓN DE LA MEMBRANA NUCLEAR. (S) ACUMULACIÓN DE CROMATINA. BARRA: 500 nm.

Se observó próximo a la membrana nuclear (MN), acumulación de cromatina y formación de "patches" (parches) que coalescen y doblan dando la impresión de membranas reduplicadas, FIG. 4. Las partículas virales observadas en el espacio extracelular indican la presencia de cápsides simples y en la mayoría de los casos se pudo observar la envoltura, FIG. 5-A.

Mediante la técnica de tinción negativa a partir de partículas *Herpes suis* concentradas por centrifugación, se visualizaron los capsómeros dentro de los cápsides. Los mismos presentan un diámetro aproximado de 12 nm, FIGS. 5-B, 5-C y 6. En la Figura 5-D se muestra un virus con envoltura, donde se captó el aspecto asimétrico del tegumento, que también es característico de los virus herpes. En ninguna muestra se observaron partículas de tipo bacteriano.

DISCUSIÓN

Los cambios celulares producidos en cultivo "in vitro" y los patrones citopatogénicos inducidos por el virus, se han convertido en la base para la utilización de varias líneas celu-

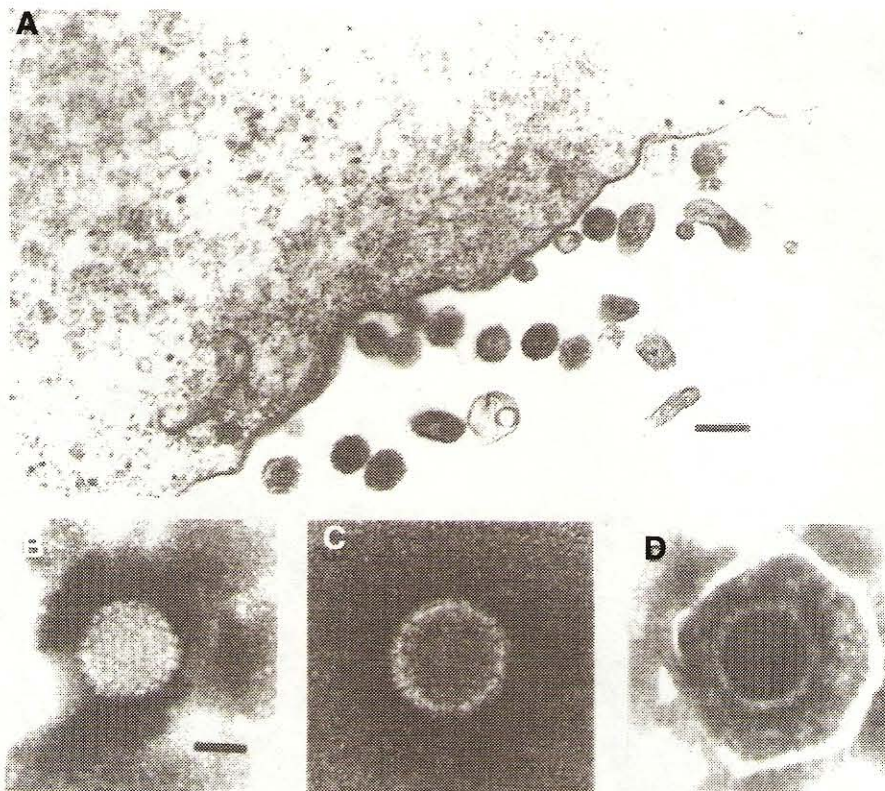


FIGURA 5. (A) PARTÍCULAS VIRALES MADURAS EN EL ESPACIO EXTRACELULAR. BARRA: 216 nm. (B), (C) Y (D) TINCIÓN NEGATIVA DE PARTÍCULAS DE VIRUS *Herpes suis* I CONCENTRADAS POR CENTRIFUGACIÓN. (B) Y (C) NUCLEOCÁPSIDES VSR. (D) PARTÍCULA VIRAL CON ENVOLTURA. BARRA (B), (C) Y (D): 50 nm.

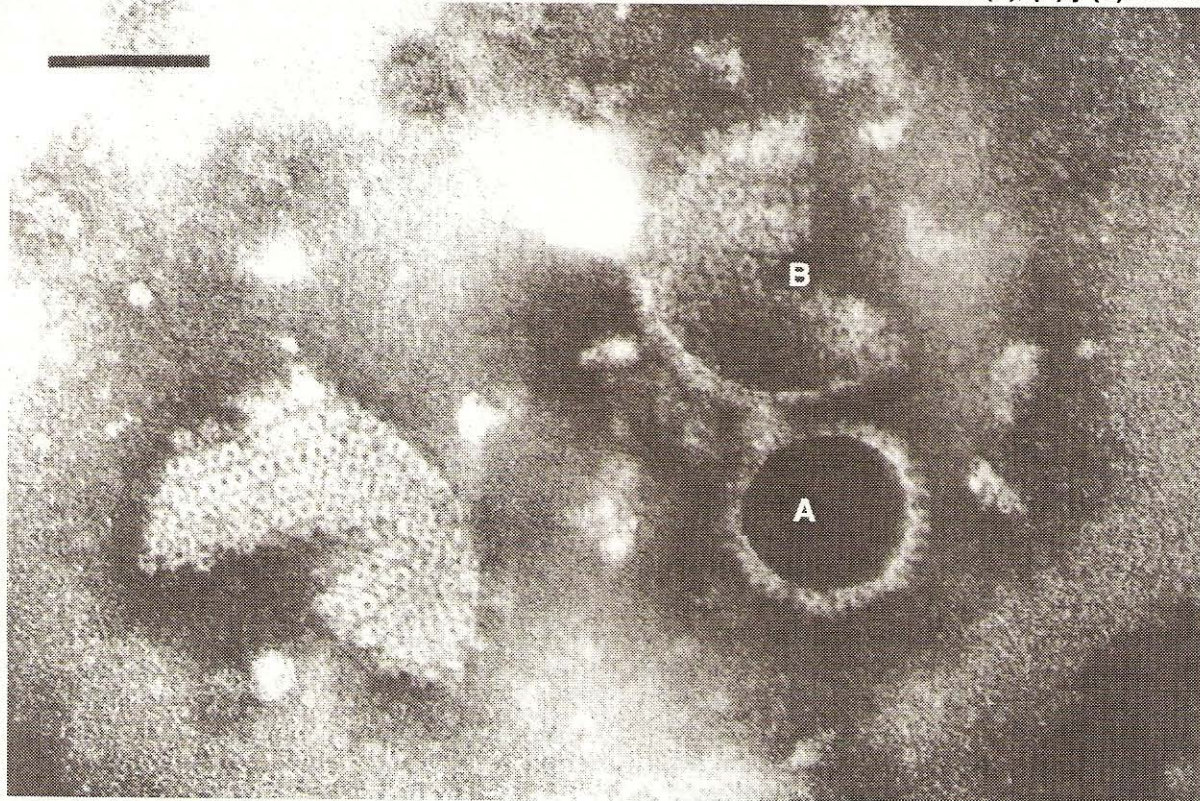


FIGURA 6. TINCIÓN NEGATIVA DE PARTÍCULAS VIRALES A PARTIR DE VIRUS CONCENTRADO. (A) NUCLEOCÁPSIDE DE VSR PURIFICADO Y TEÑIDO CON ÁCIDO FOSFOFÚNGSTICO (PTA). (B) CAPSÓMEROS DE CÁPSIDES ROTAS. BARRA: 80 nm.

lares. En el presente caso se trabajó con 5 líneas celulares diferentes.

La línea estable RK presentó cambios degenerativos que coinciden con lo reportado por Kaplan y Vatteren [6], esta línea ha sido utilizada recientemente por algunos investigadores [12]. Los aislados multiplicados en esta línea presentaron 2 tipos de ECP, el redondeamiento y la formación de sincitio, que según Tokumaru [17] puede deberse a la heterogeneidad genética de la población viral.

Las líneas BT y MDBK sufren ECP masivos, iniciándose con redondeamiento celular seguido de una destrucción completa de la monocapa, tal como fue reportado por Schreurs y col. [16].

El ECP producido en células Vero y observadas en este estudio, también ha sido descrito por Mukamoto y col. [11] como una degeneración muy característica del virus herpes.

Igualmente la degeneración de las células PK-15 infectadas fue similar a la de células Vero, corroborando lo reportado por Lomniczi y col. [8].

Christensen y col. [1] lograron demostrar que entre cepas virulentas podía estar presente la característica sincitial observada en RK; no obstante, esto no se presentó en ninguno de los aislados analizados incluyéndolos como cepas de campo no formadoras de sincitio.

CONCLUSIÓN

El VSR puede multiplicarse en todas las líneas celulares utilizadas e inducir degeneración celular. El ECP producido por cada aislado viral varía según la línea celular. De las 5 líneas celulares estables evaluadas para la multiplicación de virus de pseudorrabia, tanto en Vero como PK-15, se produjo un ECP visible a las 48 horas post inoculación similar a lo reportado en la literatura, lo cual permite recomendar el uso de estas líneas, en la multiplicación de VSR, particularmente la Vero, que es una línea celular menos exigente y más accesible que la PK-15.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHRISTENSEN, L.S.; SOERENSEN K.J.; LEI J.C. Restriction fragment pattern (RFP) analysis of genomes from Danish isolates of suis herpes virus I (Aujeszky's disease virus). **Arch. Virol.** 97: 215-224. 1987.
2. ESPUNA, E.; KOVACS, F.; HEJJA, I.; RIERA, P.; LOMNICZI, B. Variantes genéticas del virus de la enfermedad de Aujeszky en España. **Med. Vet.** 7 (1): 27-33. 1991.
3. FELDMAN, L., RIXON, F.; HOJEAN, J.; BEN-PORAT, T.; KAPLAN A. Transcription of the genome of pseudorabies virus (A. herpesvirus) is strictly controlled. **Virology** 97: 316-327. 1979.

4. HSIUNG, G.D. 1982. **Diagnostic virology**. 3ra. Edition Yale University Press, New Haven and London. 276 pp. 1982.
5. KADOI K. Viral susceptibility of an established cell line of swine embryo kidney. **Microbiológica** 15 (3): 313-317. 1992.
6. KAPLAN, A.S.; VATTER, A.E. A comparison of herpes simplex and pseudorabies viruses. **Virology** 7: 394-404. 1959
7. KLUGE, J.; MARE C. Pseudorabies porcine, aborto, enfermedad clínica y lesiones en cerdas preñadas infectadas con pseudorrabia. **Am. J. Vet. Res.** 35 (7): 911-915. 1974
8. LOMNICZI, B.; KAPLAN, A.S.; BEN-PORAT, T. Multiple defects in the genome of pseudorabies virus can affect virulence without detectably affecting replication in cell culture. **Virology** 161: 181-189. 1987
9. LUFT, J. Improvements in epoxy resin embedding methods **Journal of Biophysical and Biochemistry Cytology** 9: 409-414. 1981
10. MERCER, E.H.; BUBECK, M.S.C. **Manual de Microscopía electrónica para Biólogos**. Editorial Blume Madrid-España. 188 pp. 1974
11. MUKAMOTO, M.; WATANABE, I.; KOBAYASHI, Y.; ICATLO, F.C.; ISHII, H.; KODAMA, Y. Immunogenicity in Aujeszky's disease virus structural glycoprotein g VI (gp 50) in Swine. **Veterinary Microbiology** 29: 109-121. 1991.
12. RALL, G.F.; LU, Z.; SUGG, N.; NEACH, R.A.; BEN-PORAT, T. Acquisition of an additional internal cleavage site differentially affects the ability of pseudorabies virus to multiply in different hosts cells. **Journal of Virology** 65 (12): 6604-6611. 1991.
13. REYNOLDS. Citado por: Mercer, E.H. and Bubeck M.S.C. En **Manual de Microscopía electrónica para Biólogos**. Editorial Blume. Madrid-España, 118 pp. 1963.
14. RHIZA, H.J.; METTENLEITER, T.C.; OHLINGER, V.; WITTMAN, G. Herpes virus (pseudorabies virus) latency in swine occurrence and physical state of viral DNA in neural time. **Virology** 155: 600-613. 1986.
15. ROCK, D.L.; HAGEMOSER, W.A.; OSORIO, F.A.; McALLISTER, H.A. Transcription from the pseudorabies virus genome during latent infection. **Arch. Virol.** 98: 99-106. 1988.
16. SCHREURS, C.; METTENLEITER T.C.; ZUCKERMANN, F.; SUGG, N. Glycoprotein gIII of pseudorabies virus is multifunctional. **Journal of Virology** 62 (7) 2251-2257. 1988.

17. TOKUMARU, T. Pseudorabies virus in tissue culture, differentiation of two distinct strains of virus by citopathogenic pattern induced. **Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.** 96:55.1957.
18. TSUDA, T.; YAMADA, S.; MURAKAMI, Y.; SUGIMURA, T. Characterization of complement independent neutralizing epitopes on pseudorabies virus glycoprotein gp 50. **J. Vet. Med. Sci.** 53 (3): 533-535.1991.
19. WATHEN, M.W.; WATHEN, LMK. Isolation characterization and physical mapping of a pseudorabies virus mutant containing antigenically altered gp 50. **J. Virol.** 51(1): 57-62.1984.