

## CARACTERISTICAS DEL CRECIMIENTO DEL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EN CULTIVO DE FIBROBLASTO DE EMBRION DE POLLO (1)

Por ZULEMA MARTINEZ SEGOVIA (2)

En el presente trabajo se estudia el crecimiento del virus de encefalitis equina venezolana (EEV) en cultivo de fibroblasto de pollo en capa monocelular. La elección del fibroblasto se debe a que ofrece dos ventajas: facilidad de obtención y propagación rápida del virus con efectos citopatogénicos netos antes de las 40 horas.

El estudio se aplicó al desarrollo del virus extra e intracelular y el crecimiento del mismo fué seguido a través del efecto citopatogénico producido en los cultivos.

### MATERIAL Y METODOS

**Virus.** — Se utilizó la cepa de virus (EEV) aislada en este Instituto. Se partió de una suspensión al 20 por ciento de cerebro de ratón blanco infectado y se efectuaron tres pasajes en fibroblastos. El sobrenadante del último pasaje se recogió 40 horas después del inóculo para conservarlo a 70 grados bajo cero. Previamente se lo tituló en cultivos de fibroblasto por inoculación en diluciones decimales de 1 en 5 con respecto al medio usándose 0,2 miligramos de la suspensión y 0,8 ml de medio de cultivo, utilizando 4 tubos por dilución. El título de este inóculo original fué de  $10^{-5}$ . El título se expresó como log. LD<sub>50</sub> C. T. calculado por el método de Reed y Muench.

**Cultivos de tejido.** — Los fibroblastos proceden de embriones enteros que fueron preparados según la técnica de Dulbecco, con la sola variante que la trituración de los embriones se realizó en presencia de tripsina, eliminándose la incubación a 37° C, modificación que acorta la duración del procedimiento.

**Medio nutritivo.** — Las curvas de crecimiento se llevan a cabo en un medio constituido por: solución de Hanks 97 ml, suero de ovino 2 ml, hidrolizado de lacto albúmina al 5 por ciento 10 ml, extracto embrionario 10 ml, bicarbonato de sodio al 1,5 por ciento 3 ml, glucosa al 10 por ciento 1 ml, penicilina 25.000 U por ml, estreptomycin 0,5 mg, por ml y micostatin 1 mg por ml.

Se estudiaron dos tipos de curvas: a) con pequeño inóculo y b) con inóculo masivo.

#### a) *Desarrollo viral por pequeño inóculo.*

Se dispuso de 80 tubos de fibroblastos de 24 horas. Los tubos, previo reemplazo del líquido de cultivo por medio fresco fueron inoculados con la

(1) Resumen de un trabajo cuyo texto completo e ilustraciones se publicará en los *Anales del Instituto Nacional de Microbiología*; trabajo que fué iniciado en calidad de Becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. El tema fué sugerido por la doctora Eugenia Sacerdote de Lustig.

(2) Departamento de Virología del Instituto Nacional de Microbiología.

suspensión antes mencionada de virus diluída  $10^{-5}$  en Hanks. El virus se mantuvo en contacto con las células, no cambiándose el medio en el curso de esta primera experiencia. La cantidad de virus en el medio es fácilmente estimada en distintos tiempos por repetidos muestreos en el fluido extracelular. Para ello se dispuso de 4 tubos para cada muestra, recogién dose los fluidos por una parte y por otra se lavó dos veces las células con P.B.S. (solución salina de fosfato buffer), se añadió 1 ml de medio fresco y se guardó a  $70^{\circ}$  C bajo cero hasta el momento de titularlos. La ruptura de las células se efectuó por congelamiento y descongelamiento sucesivo, repetidos 4 veces.

#### b) *Desarrollo viral por inóculo masivo.*

Los cultivos de fibroblastos (90 tubos) se infectaron con la misma suspensión de virus diluídos  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en dos experiencias sucesivas. Después de una hora a  $37^{\circ}$  C en estufa se quitó el líquido infectante, se lavó dos veces con Hanks y se agregó el inóculo. El muestreo se realizó a partir de las 4 horas de inoculación, destinándose 4 tubos para cada muestra. Se realizó un "pool" con esos líquidos conservándolos a  $70^{\circ}$  C bajo cero. Las células, después de lavadas dos veces con P.B.S. se les agregó 1 ml de medio conservándolas también a  $70^{\circ}$  C bajo cero hasta el momento de su utilización. En este caso la ruptura de la célula se realizó por vibración ultrasónica <sup>(1)</sup>. Se trabajó a 9.000 kilociclos por minuto durante 10' para cada muestra, separando por centrifugación los sobrenadantes destinados a las titulaciones del virus celular.

Las vibraciones ultrasónicas producen una fragmentación de las células suspendidas, sin reducir la infectividad.

## RESULTADOS

Hemos observado que cuando se trabajó con inoculaciones pequeñas de virus, al cabo de una hora todo el virus fué absorbido por las células, no detectándose virus infeccioso ni en las células ni en el fluido. Después de esta fase eclipse comienza a aumentar en el fluido el virus liberado en una forma exponencial más bien que lineal. La primera aparición de virus comienza a las 6 horas 30 minutos y continúa aumentando hasta las 26 horas, tiempo en que se alcanza un valor máximo, estacionario durante 5 horas. La experiencia no continúa, pues entonces comienza a producirse la destrucción de las células, pudiendo confundirse en estas condiciones el virus liberado espontáneamente por maduración con el liberado por la ruptura mecánica. No se encontró virus intracelular en ningún momento de esta experiencia.

Se descartó la posibilidad de una inactivación por sucesivos congelamientos y descongelamientos, ya que la misma técnica se aplicó al virus extracelular, no observándose en este último caso ninguna diferencia significativa en el título.

En cuanto a las inoculaciones masivas se observó: que el virus intracelular no pudo detectarse en las 5 primeras horas que siguieron a la infección a pesar del gran inóculo utilizado en las dos experiencias realizadas. Si observamos las figuras 2 y 3 notaremos en ambos un aumento exponencial en los líquidos de cultivo a partir de las 5 horas de infección, alcanzando a las 30 horas valores máximos de  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$  respectivamente. En las células la fase eclipse dura de 6 a 8 horas, apareciendo entonces la primera progenie viral, que aumenta también en forma exponencial, pero con títulos mucho menores que los del virus extracelular.

(1) Agradecemos al doctor Bachman, de la Academia Nacional de Medicina, su gentileza por haber facilitado el aparato de vibración ultrasónico.