

4.4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE CEPAS

4.4.1. Aislamiento de Placas.

Las pruebas de aislamiento y caracterización de placas utilizadas como marcadores en el estudio de estabilidad de las cepas A6000, A6304, A7510, A8046, A8381 y A8460, permitieron establecer diferencias significativas en el tamaño de las placas y las características antigénicas de los virus de epitelio de campo y los respectivos pasajes 1, 5 y 10 en cultivo celular.

En el estudio de placas, se consideraron dos tamaños: grandes, mayores de 3 mm y pequeñas, menores de 3 mm.

La Figura 15 muestra las placas producidas por el primer pasaje en cultivo celular del virus A6000. En su totalidad se trata de placas grandes sin variaciones significativas de tamaño y observándose además la presencia de placas turbias. En contraste, los pasajes 5 y 10 muestran un cambio hacia el predominio de placas pequeñas. En el clonaje aplicado al primer pasaje, se obtuvieron 3 clones grandes que

FIGURA 15 Placas producidas en células BHK-21 por los pasajes 1o, 5o y 10o del virus de la Fiebre Aftosa A24-6000 después de 60 horas de incubación a 37°C.

fueron replicados en monocapas para la obtención de una mayor concentración de antígeno que permitiera realizar satisfactoriamente las pruebas de subtipificación. Los clones 1 y 2 presentaron un mayor grado de fijación del complemento frente al suero A24 y altas relaciones antigénicas con los sueros A26 y A Sab/74. El virus obtenido en el clon 3 mostró diferencias significativas de baja fijación del complemento ante el suero A26. Dicha característica se reconfirmó con la subtipificación de tres nuevos clones obtenidos por el plaqueo del clon 3 original (Tabla 21).

Las poblaciones virales obtenidas del clonaje del 5 pasaje correspondientes a tres clones grandes y tres clones pequeños, mostraron características serológicas similares a las obtenidas con el virus original (Tabla 21).

En el clonaje del décimo pasaje de cultivo celular se obtuvieron igualmente tres clones grandes y tres pequeños, cuyas características serológicas concuerdan de manera similar a las del virus original, con la excepción del clón 2 grande que mostró un bajo porcentaje de fijación del complemento ante el suero A26. Esta diferencia igualmente se reconfirmó

TABLA 21 Subtipificación de las poblaciones virales obtenidas por clonaje de los pasajes 1 y 5 de cultivo celular BHK del virus A24-6000

Pase	Material replicado en BHK	Porcentaje de F. del C.							
		Antisueños							
		A18	A24	A26	A27	A31	A32	ASab	
1	Clón 1 Grande	11	100	91	44	11	37	69	
	Clón 2 Grande	15	100	88	32	14	33	65	
	Clón 3 Grande	26	100	15	28	19	64	69	
	Clón 3-1 Grande	15	100	19	21	19	43	84	
	Clón 3-2 Grande	15	100	13	23	20	33	74	
	Clón 3-3 Grande	12	100	17	22	17	37	72	
5	Clón 1 Grande	9	100	92	12	17	39	74	
	Clón 2 Grande	22	100	94	37	22	52	40	
	Clón 3 Grande	12	100	94	16	20	37	69	
	Clón 1 Pequeño	15	100	91	15	20	35	70	
	Clón 2 Pequeño	10	100	91	20	24	33	53	
	Clón 3 Pequeño	9	100	93	13	16	37	75	

con un nuevo clonaje y la obtención de tres clones grandes que mostraron características similares (Tabla 22).

Las pruebas de clonaje realizadas con los virus de epitelio de campo y pasajes 1, 5 y 10 de cultivo celular del virus A6304 permitieron observar la presencia de placas grandes, homogéneas y turbias para el material de campo y 1er. pasaje de cultivo celular. Los resultados obtenidos para el 5 y 10 pasaje mostraron diferencias significativas de tamaño por la presencia de una alta proporción de placas pequeñas (Figura 16). Las características antigénicas establecidas por la prueba de fijación del complemento fueron estables sin mayores cambios en todos los clones estudiados de los tres pasajes (Tabla 23).

En el 1° y 5° pasajes de cultivo celular del virus A Sabana/74 se observó la presencia de placas grandes, sin variaciones considerables de tamaño con tendencia a ser uniformes. En contraste el 10° pasaje presentó placas pequeñas en mayor cantidad junto a un reducido número de placas grandes (Figura 17). Las poblaciones virales tomadas de las placas grandes y pequeñas de los tres pasajes sometidos a la prueba

TABLA 22 Subtipificación de las poblaciones virales obtenidas por clonaje del pasaje 10 de cultivo celular BHK del virus A24-6000

Pase	Material replicado en BHK	Porcentaje de F. del C.						
		Antisueros						
		A18	A24	A26	A27	A31	A32	ASab
	Clón 1 Grande	13	100	94	35	18	41	74
	Clón 2 Grande	16	100	32	26	7	27	62
	Clón 3 Grande	17	100	91	28	22	40	62
	Clón 1 Pequeño	6	100	93	14	11	38	76
10	Clón 2 Pequeño	10	100	94	10	17	27	74
	Clón 3 Pequeño	9	100	92	11	15	32	70
	Clón 2-1 Grande	14	100	19	25	16	37	66
	Clón 2-2 Grande	9	100	15	18	5	31	63
	Clón 2-3 Grande	8	100	14	23	6	31	58

FIGURA 16 Placas producidas en células BHK-21 por el material original de epitelio bovino y los pases 1o, 5o y 10o del virus de la Fiebre Aftosa A27-6304 después de 60 horas de incubación a 37°C.

TABLA 23 Subtipificación de las poblaciones virales obtenidas por clonaje de los pasajes 1, 5 y 10 de cultivo celular BHK del virus A27-6304

Pase	Material replicado en BHK		Porcentaje de F. del C.							
			Antisueros							
			A18	A24	A26	A27	A31	A32	ASab	
1	Clón 1	Grande	43	90	31	100	28	20	57	
	Clón 2	Grande	18	80	12	100	52	42	68	
	Clón 3	Grande	20	88	17	100	17	21	64	
5	Clón 1	Grande	12	85	20	100	35	10	10	
	Clón 2	Grande	13	87	13	100	29	9	9	
	Clón 3	Grande	19	49	25	100	34	16	37	
	Clón 1	Pequeño	11	61	19	100	31	10	61	
	Clón 2	Pequeño	22	46	20	100	31	10	61	
	Clón 3	Pequeño	13	40	16	100	28	5	33	
10	Clón 1	Grande	18	86	15	100	15	19	40	
	Clón 2	Grande	33	93	25	100	34	18	22	
	Clón 3	Grande	27	89	32	100	48	24	26	
	Clón 1	Pequeño	19	72	12	100	34	27	60	
	Clón 2	Pequeño	15	77	13	100	33	22	60	
	Clón 3	Pequeño	18	83	7	100	30	25	63	

FIGURA 17 Placas producidas en células BHK-21 por los pasajes 1o, 5o y 10o del virus de la Fiebre Aftosa A Sabana/74 después de 60 horas de incubación a 37°C.

serológica, mostraron entre sí características antigénicas similares con una alta especificidad frente al suero homólogo y un considerable grado de fijación con el suero del subtipo A24 (Tabla 24).

El material viral de epitelio bovino y los pasajes 1° y 5° de cultivo celular de la cepa viral A27-8046 presentaron un alto porcentaje de placas grandes y de tamaño uniforme, algunas de ellas de aspecto turbio. En el 5° pasaje se observaron escasas placas pequeñas. En contraste, el 10° pasaje presentó un alto porcentaje de placas pequeñas de tamaños diferentes y placas grandes en menor número, en tamaños igualmente variables (Figura 18). El estudio serológico respectivo mostró que las poblaciones obtenidas de los clones de los pasajes 1°, 5° y 10° de cultivos celulares se identifican en alto grado con el suero hiperinmune del subtipo A27. También se observó en la totalidad de las pruebas, buena relación antigénica con el suero del subtipo A24 (Tabla 25). Sin embargo, al realizar un nuevo clonaje con el material viral obtenido de dos de los clones pequeños (clon 1p y clon 2p) seleccionados por plaqueo del 10° pasaje, se observa la formación de placas grandes y pequeñas por partes del clon 1 p (Figura 19),