

Efectos del pH y la concentración iónica sobre la infecciosidad del virus de la Encefalitis equina Venezolana.

Emelina Teruel-López y Hugo Hernández.

Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina,
Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo 4001-A, Venezuela.

Resumen. El virus de la EEV a una temperatura de 37°C sufre alteraciones en su nivel de infecciosidad, que varían según la concentración de la solución empleada. En buffer citrato 100 mM a pH 3, 4 y 5, hay pérdida notable de la infecciosidad viral; cuando se usan concentraciones de 5 y 10 mM, a los mismos pH, no se observa ninguna variación en su nivel de infecciosidad. En presencia de soluciones diluidas de cloruro de magnesio pH 4 y a 37°C, el virus es estable en su nivel de infecciosidad; lo que no se observa en las soluciones de elevada concentración (1 ó 2 M). Cuando se emplea una solución de MgSO₄, no ocurre ninguna variación del nivel de infecciosidad del virus tratado en las mismas condiciones.

Effects of pH and ionic concentration on VEE virus infection.

Invest Clin 16(3): 114-120, 1975.

Abstract. VEE virus suffers alterations in its infectious level at a temperature of 37°C, that varies according to the solution used. In citrate buffer 100 mM, pH 3, 4 and 5, there is a great loss in viral infectivity; when concentrations of 5 and 10 mM are used, with the same pH, no variation is observed in its infectious level. In the presence of diluted solutions of magnesium chloride pH 4 and at 37°C, the virus is stable in its infectious level; something which is not observed in solutions of high concentration (1 or 2 M). When a solution of MgSO₄ is used, no variation occurs in the level of infection of the treated virus in the same conditions.

INTRODUCCION

El estudio del efecto del pH y la concentración iónica sobre la actividad viral, ha servido de parámetro

de importancia para el mejor conocimiento del comportamiento de los virus. La necesidad de establecer las condiciones óptimas para la purificación del virus, su almacenamien-

to, preparación de vacuna, etc., han llevado a realizar estudios detenidos sobre el papel desempeñado por los diversos agentes físicos y químicos. Schatz y Plager(8) y Speir(9,10, 11) han estudiado la acción de la concentración de sales y pH sobre el virus Mengo, resultando en la inactivación de éste. Por otra parte, Wallis y col. (14), reportan la estabilización catiónica para los enterovirus. Así mismo, en otros trabajos(13) se demostró el efecto activante de cationes divalentes a altas temperaturas, sobre los Reovirus, y su inactivación al someterse a temperaturas por debajo de 0°C.

Con los arbovirus se ha conocido durante mucho tiempo la relación existente entre su inactivación y la acidez del medio en que se halla suspendido. Speir y col. (12) reportan la estabilización de virus de Semliki, en presencia de proteínas, a ciertos pH. La escasa información sobre estos fenómenos y sus causas, nos ha llevado a profundizar los estudios de las posibles relaciones entre los varios factores nombrados y el virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), y su comportamiento ante concentraciones variadas de iones y diferentes pH.

MATERIAL Y METODO

Virus: Se utilizó virus purificado obtenido a partir de huevos embrionados de ave inoculados con la cepa Guajira de la EEV; siguiendo la técnica descrita por Mussgay (7) para su purificación. Su título infeccioso

fue de $1,45 \times 10^{13}$ DICT₅₀/ml en fibroblastos de embrión de pollo.

Cultivos celulares: Se utilizaron fibroblastos de embrión de pollo cultivados en medio 199 adicionado con 10% de suero de ternera fetal y penicilina, estreptomycin, gentamicina y amfotericina, como inhibidores de crecimiento bacteriano y antimicótico.

Soluciones amortiguadoras: Se emplearon soluciones amortiguadoras de citrato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio, maleato de sodio, borato salino y MES [ácido 2 (N-morfolino) etanol sulfónico] (1). A partir de las soluciones madres 1 M se prepararon las diferentes concentraciones a usarse por dilución con agua destilada. El pH final de estas diluciones, varió muy poco en relación al pH inicial ($\pm 0,1$ unidades).

Pruebas de infecciosidad viral: El virus purificado de la EEV fue diluido 1:10 en las diferentes soluciones amortiguadoras y se incubó una hora a 37°C. Su infecciosidad residual se midió por titulación del efecto citopatogénico en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo.

RESULTADOS

Efecto de la concentración iónica: El virus de la EEV diluido en buffer citrato de sodio pH 3 a las concentraciones de 5, 10, 20, 40, 80 y 100 mM sufre una disminución de su infecciosidad a medida que se aumenta la concentración iónica. Entre 10 y 100 mM el virus presenta una disminución de 4 a 5 logs en su título infeccioso (Fig. 1).

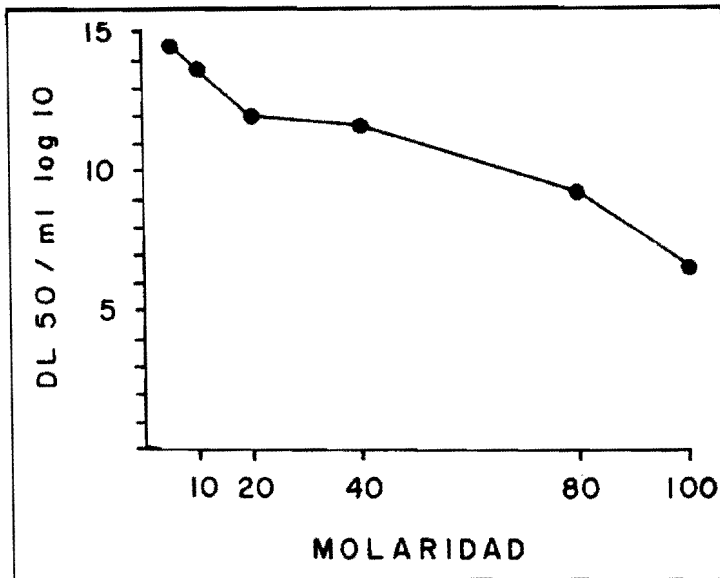


Fig. 1 Inficiencia residual del virus EEV en concentraciones crecientes del buffer citrato Na pH 3.

Efecto del pH: Para verificar si estos resultados se cumplían de una manera similar a diferentes pH, se usaron soluciones amortiguadoras a las concentraciones de 5, 10 y 100 mM. Para los pH de 3, 4 y 5 se utilizó citrato; para pH 6, maleato; para pH 7 y 8, fosfato; y para pH 9, borato salino. Se observó el título infeccioso del virus luego de incubarlo por una hora a 37°C con cada una de las variables arriba mencionadas. Se obtuvo una disminución notable de la inficiencia del virus tan sólo a pH debajo de 6 en aquellas soluciones de elevada concentración iónica (100 mM), sin observarse efecto deletéreo a ningún pH de las soluciones de menor concentración (Fig. 2).

Efecto de buffer no quelantes:

Con buffer acetato y MES considerados como buffer sin capacidad quelante, a las concentraciones de 10 y 100 mM y a pH 4 y 5, los resultados son iguales a los obtenidos con el buffer citrato a los mismos pH (Tabla I).

Efecto de sales y cationes divalentes:

Con la finalidad de bloquear el posible efecto quelante por parte del buffer citrato se incubó el virus con este mismo a las concentraciones de 100 mM pH 3, en presencia de cationes divalentes (Cl_2Mg), a concentraciones crecientes; observándose el mismo daño que experimentó cuando se usó citrato solamente. El virus incubado únicamente en presencia de cationes, no experimenta ningún daño

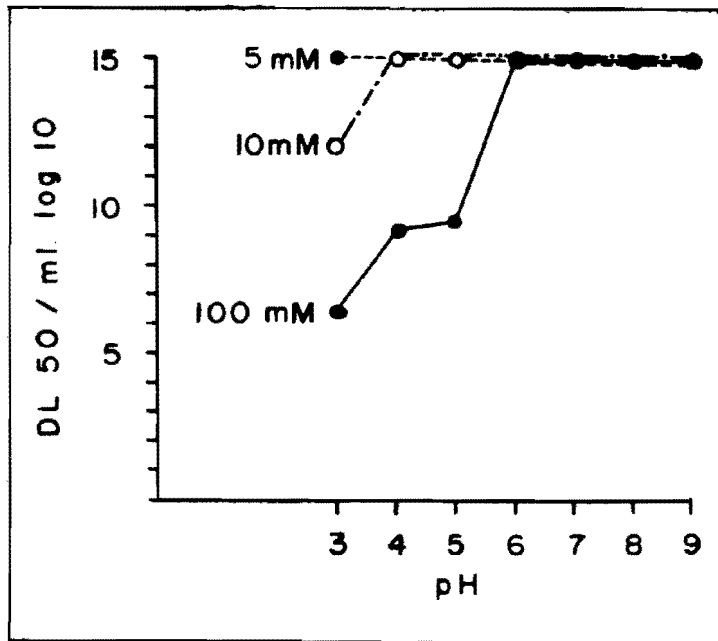


Fig. 2 Infecciosidad residual del virus EEV en diferentes soluciones amortiguadoras con diferentes pH.

TABLA I
EFECTO DE BUFFERS NO QUELANTES SOBRE LA INFECCIOSIDAD DEL VIRUS DE LA EEV

		DICT ₅₀ /ML
Virus + Acetato	(10 mM pH 4)	10 ^{-8.0}
"	(100 mM pH 4)	10 ^{-6.0}
"	(10 mM pH 5)	10 ^{-8.0}
"	(100 mM pH 5)	10 ^{-6.0}
Virus + MES	(10 mM pH 5.5)	10 ^{-8.0}
"	(100 mM pH 5.5)	10 ^{-7.0}

MES: (2 [N-Morfolino] ethane Sulfonic Acid)
Virus en borato salino pH 9 Tiene 10^{-9.0} DICT₅₀/ml

TABLA II
EFFECTO DE SALES Y CATIONES DIVALENTES SOBRE LA
INFECCIOSIDAD DEL VIRUS DE LA EEV

		DICT ₅₀ /ml
Virus + Citrato 100 mM pH 3 + Cl ₂ Mg	0.01 M	10 ^{-4.0}
	0.6 M	10 ^{-3.0}
	1.0 M	10 ^{-3.0}
	1.4 M	10 ^{-3.0}
	2.0 M	10 ^{-3.0}
Virus + Cl ₂ Mg	0.01 M	10 ^{-9.0}
	0.1 M	10 ^{-8.0}
	1.0 M	10 ^{-5.0}
	0.5 M	10 ^{-4.5}
	2.0 M	10 ^{-4.5}
Virus + MgSO ₄	0.01 M	10 ^{-8.0}
	1.0 M	10 ^{-8.0}

Virus en borato salino pH 9 tiene 10^{-9.0} DICT₅₀/ml.

hasta una concentración de 100 mM; pero a partir de 1 M, su título infeccioso comienza a disminuir. El hecho de que la solución de cloruro de magnesio a altas concentraciones es por sí misma dañina para la capacidad infecciosa viral, nos llevó a realizar otro experimento para determinar cuál de los iones (Cl⁻ ó Mg²⁺) presente, era el causante de tal daño. Se utilizó para ello una solución de sulfato de magnesio a alta concentración, cuyos resultados, expresados en la Tabla II, revelan que esta sal no ejerce efecto dañino sobre el virus a las dos concentraciones (0,1 y 1,0 M), empleados en el experimento.

DISCUSION

Los trabajos realizados con varios arbovirus del grupo A y B coinciden en la pérdida de infecciosidad a pH por debajo de 6(2, 3, 4, 5, 6). Sin embargo, nuestros resultados, obtenidos con la curva de molaridad, hablan a favor de un efecto de fuerza iónica independiente del valor del pH de la solución empleada. La diferencia en los efectos observados en la curva de molaridad con el buffer citrato a pH 3, nos hizo sospechar un posible efecto quelante, por parte del citrato, sobre algunos componentes de la envoltura lipoproteica viral. Esto fué descartado por los efectos producidos por los dos buffer no quelantes, acetato y MES a

pH 4 y 5, los cuales coincidían con los resultados para el buffer citrato a esas concentraciones y pH. Esto se hizo aún más evidente con la solución Cl_2Mg cuyo pH ácido, 4, exhibe el mismo efecto dañino sobre el virus, por variación de concentración, tanto al emplearse solo, como combinado con el buffer citrato a 0,1 M, independientemente del valor del pH; lo que nos demuestra la acción ejercida por la concentración de la solución. El uso de la sal de SO_4Mg indica que el efecto causante del daño viral pudiera residir en la concentración del ión Cl^- .

Todos estos hallazgos pueden ser interpretados como una posible interacción a nivel de los distintos elementos estructurales de la membrana lipoproteica viral, y el grado de concentración o fuerza iónica prevalente en el medio que la rodea.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- DAWSON R.M., ELLIOT D.C., ELLIOT W.H., JONES K.M.: Data for Biochemical Research, Oxford University Press. Amen House, London, 1959.
- 2- DUFFY C.E.: pH Stability of St. Louis Encephalitis Virus. Proc Soc Exptl Biol Med 63:333, 1934.
- 3- DUFFY C.E., STANLEY W.M.: Studies on the biochemical, biophysical and immunogenic properties of Japanese B type Encephalitis Virus and vaccines. J Exp Med 82:385, 1945.
- 4- FINKESTEIN H., MARX W., BEARD D.: pH Stability of the virus of Equine Encephalomyelitis (Easter Strain) under various conditions. J Inf Dis 66:117, 1940.
- 5- HOWITT B.F.: Certain properties of the virus of equine encephalomyelitis. J Inf Dis 55:138, 1934.
- 6- MCLIMANS W.F.: The inactivation of equine encephalitis virus by mechanical agitation. J Immunol 56:385, 1947.
- 7- MUSSGAY M., WEIBEL J.: Electron microscopic demonstration of the purified VEE virus. Virology 19:109, 1963.
- 8- SCHATZ A., PLAGER H.: Effect of pH on Mengo Virus. Proc Soc Exp Biol Med 67:452-456, 1948.
- 9- SPEIR R.W.: Effect of several inorganic salts on infectivity of Mengo Virus. Proc Soc Exp Biol Med 106:402-404, 1961.
- 10- SPEIR R.W.: Thermal stability of Mengo and Poliovirus in hypertonic salt. Virology 14:382-383, 1961.
- 11- SPEIR R.W.: pH and thermal stability of Mengo virus. Virology 17:588-592, 1962.
- 12- SPEIR R.W., ALIMINOSA K.V.: pH, protein and Semliki virus infectivity. Proc Soc Exp Biol Mol 114:168, 1963.
- 13- WALLIS C., MELNICK J.: Reovirus activation by heating and inactivation by cooling in MgCl_2 solution. Virology 22:608, 1964.
- 14- WALLIS C., MELNICK J.: Cationic stabilization - a new property of enteroviruses. Virology 16:504-506, 1962.