



Resumen #234

Evidencias de Metapneumovirus humano autóctono en cultivo celular

¹Rodríguez PE, ¹Gil PI, ¹Cámara JA, ¹Paglini MG, ¹Cámara A
¹Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". FCM. UNC

Área:

Básica

Resumen:

Metapneumovirus humano (MPVh) virus Paramyxoviridae respiratorio, tuvo en 2011 una prevalencia del 4% en población infantil de ciudad de Córdoba. Es necesario indagar sobre las características del ciclo de replicación y desarrollar posibles terapias. El desafío es implementar una metodología de replicación en cultivos celulares reproducible.

Es difícilmente replicable, con aparición de efectos citopáticos (ECP) entre 13-17 días post-infección. Van den Hoogen (2001) describe lo como formación de sincicios, Boivin (2002) como cambios en la morfología celular tornándose pequeñas, redondas y refringentes.

Objetivo: caracterizar el efecto celular que provoca MPVh autóctono a partir de muestras nasofaríngeas de niños menores de 5 años de la Ciudad de Córdoba.

Se utilizaron tres muestras positivas para MPVhA2 por secuenciación. Alícuotas de 200µl de cada muestra (con antibiótico y antimicótico) se mantuvieron a 4°C/1h pre-infección.

Monocapas de células LLC-MK2 fueron incubadas durante 48h con MEM EGLE y Suero Fetal (10%) alcanzando un 70% de confluencia. El medio de mantenimiento (MEMm) fue suplementado: albumina (1%), glucosa (100X) y tripsina (1%). Se inoculó 100µl de muestra, en placa de 12 pocillos con medio de inoculación (MEMi) sin suplementos. La placa fue agitada a 37°C/1h. Luego se agregó 900µl de MEMi incubándose a 37°C en estufa con 5% de CO₂. A las 24h, el MEMi fue reemplazado por 1ml de MEMm, cambiado cada 3 días (cortesía, Dra. Videla. Centro de Educación Médica e Investigación Clínica). La presencia/ausencia de ECP fue monitoreada hasta los 7 días post-infección. En caso de no observarse, se repite el procedimiento con 2 pasajes ciegos (21 días post-infección).

Se observaron células redondeadas, agrupadas y refringentes en cultivos infectados con 2 muestras, ARGCBA/2899/11 y ARGCBA/2732/11 a los 11 y 14 días post-infección respectivamente, luego del primer pasaje ciego. La muestra ARGCBA/2590/11 no mostró efecto. Los 3 sobrenadantes fueron negativos para MPVh por RT-PCR en esta instancia preliminar.

Es necesario ajustar los protocolos por el comportamiento alterno (virulencia/atenuación) que ocurren en algunas infecciones. Son importantes estos primeros experimentos de infección con una cepa viral de MPVh autóctono en cultivos celulares en Córdoba. Conforman las bases para la futura caracterización del ciclo de replicación de MPVh.

Palabras Clave:

Metapneumovirus humano, aislamiento, efecto citopático, autóctono

Evidence of human metapneumovirus native in cell culture

¹Rodríguez PE, ¹Gil PI, ¹Cámara JA, ¹Paglini MG, ¹Cámara A
¹Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". FCM. UNC

Abstract:

Respiratory virus Paramyxoviridae, human metapneumovirus (hMPV), had a prevalence of 4% in the child population of Córdoba in 2011. It is necessary to research the characteristics of the replication cycle and develop potential therapies. The challenge is to implement a methodology of replication in cell culture that is reproducible.

A replication is difficult to achieve, with the appearance of cytopathic effects (CPE) between 13-17 days post-infection. Van den Hoogen (2001) describes this as syncytia formation and Boivin (2002) describes it as changes in cell morphology, in which the cells become small, round and refractile.

Objective: characterize the cellular effect caused by hMPV native from nasopharyngeal specimens from children under 5 years of the City of Córdoba.

Three hMPVA2 positive samples were sequenced. Aliquots of 200 µl of each sample (with antibiotic and antifungal) were kept at 4°C/1h pre-infection.

Monolayers of LLC-MK2 cells were incubated for 48h with MEM EGLE and Fetal Serum (10%), reaching 70% confluence. Maintenance medium (mMEM) was supplemented: albumin (1%), glucose (100X) and trypsin (1%). 100 µl of sample were inoculated in 12 well plate with inoculation medium (iMEM) without supplements. The plate was shaken at 37°C/1h. Then 900 µl iMEM were added and incubated at 37°C in an oven with 5% CO₂. After 24h, iMEM was replaced by 1ml mMEM, changed every 3 days (courtesy, Dr. Videla. Centre for Medical Education and Clinical Research). The presence/absence of CPE was monitored for 7 days post-infection. If not followed, the procedure with 2 blind passages (21 days post-infection) is repeated.

Rounded, grouped and refractile cells were observed in the culture infected with 2 samples, ARGCBA/2899/11 and ARGCBA/2732/11 at 11 and 14 days post-infection; respectively, after the first blind passage. The sample ARGCBA/2590/11 showed no effect. The three supernatants were negative for hMPV by RT-PCR in this preliminary instance.

It is necessary to adjust the protocols (virulence/attenuation) due to the alternative behavior that occurs in some infections. These early experiments of infection with a viral strain of native hMPV in cell cultures in Córdoba are very important as they form the basis for future characterization of hMPV replication cycle.

Keywords:

human metapneumovirus, isolation, cytopathic effect, native