

Evaluación de la cinética de inactivación del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (*Baculoviridae*) por exposición al ozono

Materiales

a) Cámara de ozonización

Se utilizó una cámara de ozonización FDC Advanced, modelo B-Logic.

b) Virus

Se utilizó un stock del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (familia: *Baculoviridae*; género: *Alphabaculovirus*). El virus fue originalmente aislado en la localidad de Oliveros, provincia de Santa Fe, a partir de una larva infectada del insecto lepidóptero *Anticarsia gemmatalis* (Claus et al, 1993).

c) Cultivos celulares

Se empleó la línea celular saUFL-AG-286 (Sieburth y Maruniak, 1988; Gioria et al., 2007) Los cultivos se efectuaron en el medio de cultivo UNL-8 (Micheloud et al., 2009), suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Metodología

Se preparó una dilución 1:10 de stock viral (título infectivo original: $7,5 \times 10^8$ TCID₅₀.ml⁻¹) en medio UNL-8 libre de suero fetal bovino. Se dispensó 1 ml de la dilución de stock viral en sendas placas de cultivo de 35 mm de diámetro (Cellstar, Greiner BioOne, Austria). Cada una de las placas conteniendo dilución de stock viral fue introducida, en forma individual, dentro de la cámara de ozonización, la cual, a su vez, fue colocada en el interior de una campana de flujo laminar (Filtrar, Argentina). Con la placa de cultivo destapada se activó el modo esterilización de la cámara de ozonización, exponiéndose durante distintos períodos de tiempo: 0, 5, 15, 30 y 60 minutos (la ozonización fue permanente durante cada tiempo de ozonización, sin períodos de recirculación intermedios). Cada tiempo de exposición fue evaluado por duplicado, en experimentos independientes. Las experiencias de exposición al ozono fueron efectuadas a temperatura ambiente (entre 24 y 25°C).

Al cabo de cada tiempo de exposición, se interrumpió el programa de ozonización, se tapó la placa y se retiró de la cámara, procediéndose de inmediato a la determinación del título infectivo, empleándose para ello el método de dilución límite y punto final, de acuerdo al procedimiento de Reed y Muench (1938), adaptado a la titulación de baculovirus por Claus et al. (1993), utilizando cultivos de la línea celular saUFL-AG-286. Cada muestra fue titulada por duplicado.

Resultados

En la tabla N° 1 se presentan los resultados de las titulaciones de las muestras de virus obtenidas al cabo de los distintos tiempos de exposición. Como se puede observar, se verificó una caída sostenida del título infectivo a medida que se incrementó el tiempo de ozonización.

Tabla 1: Título Viral obtenido luego de someter las muestras a diferentes tiempos de ozonización. Resultados representados como promedio \pm desvío estándar.

Tiempo de ozonización (min)	Título Viral (TCID ₅₀ .mL ⁻¹)	Título Viral Medio (10 ⁶ TCID ₅₀ .mL ⁻¹)
0	7,97E+07 6,32E+07	71,47 \pm 11,63
5	5,24E+07 7,18E+07	62,10 \pm 13,68
15	5,24E+07 4,16E+07	47,03 \pm 7,64
30	2,15E+07 3,05E+07	26,01 \pm 6,39
60	2,15E+06 4,74E+06	3,45 \pm 1,83

En la figura N° 1 se puede apreciar que se alcanzó un porcentaje de inactivación del 95% luego de una hora de exposición al ozono.

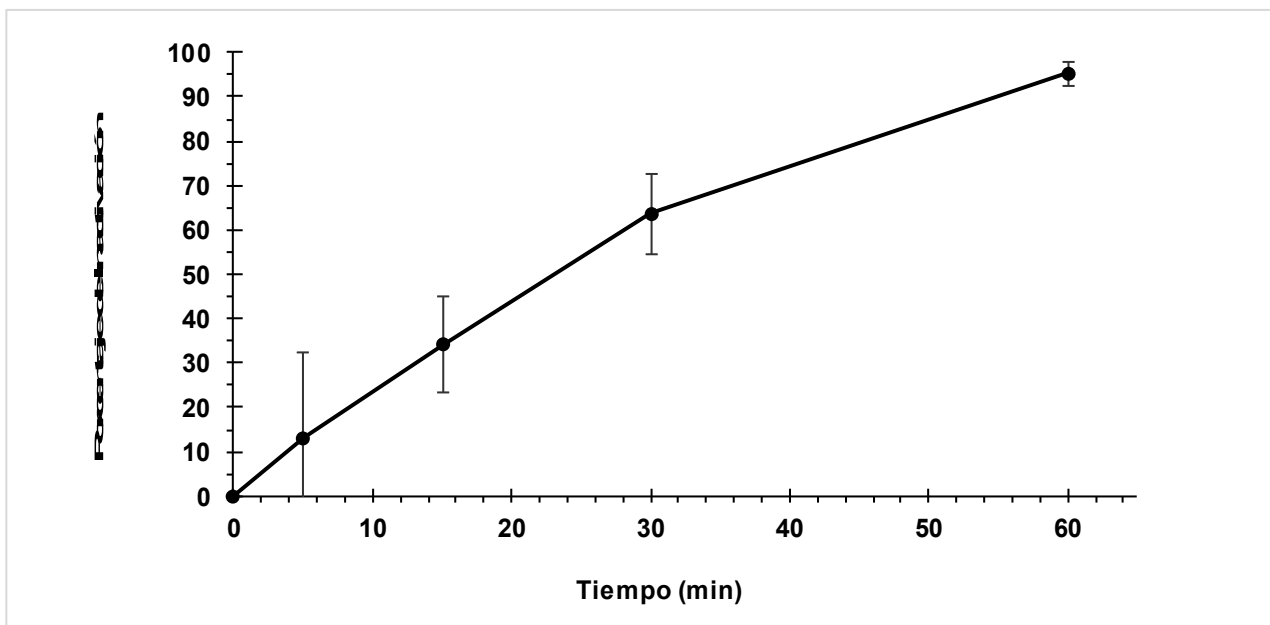


Figura 1. Porcentajes de inactivación viral luego de la exposición de stock de baculovirus a diferentes tiempos de ozonización. Resultados representados como promedio \pm desvío estándar.

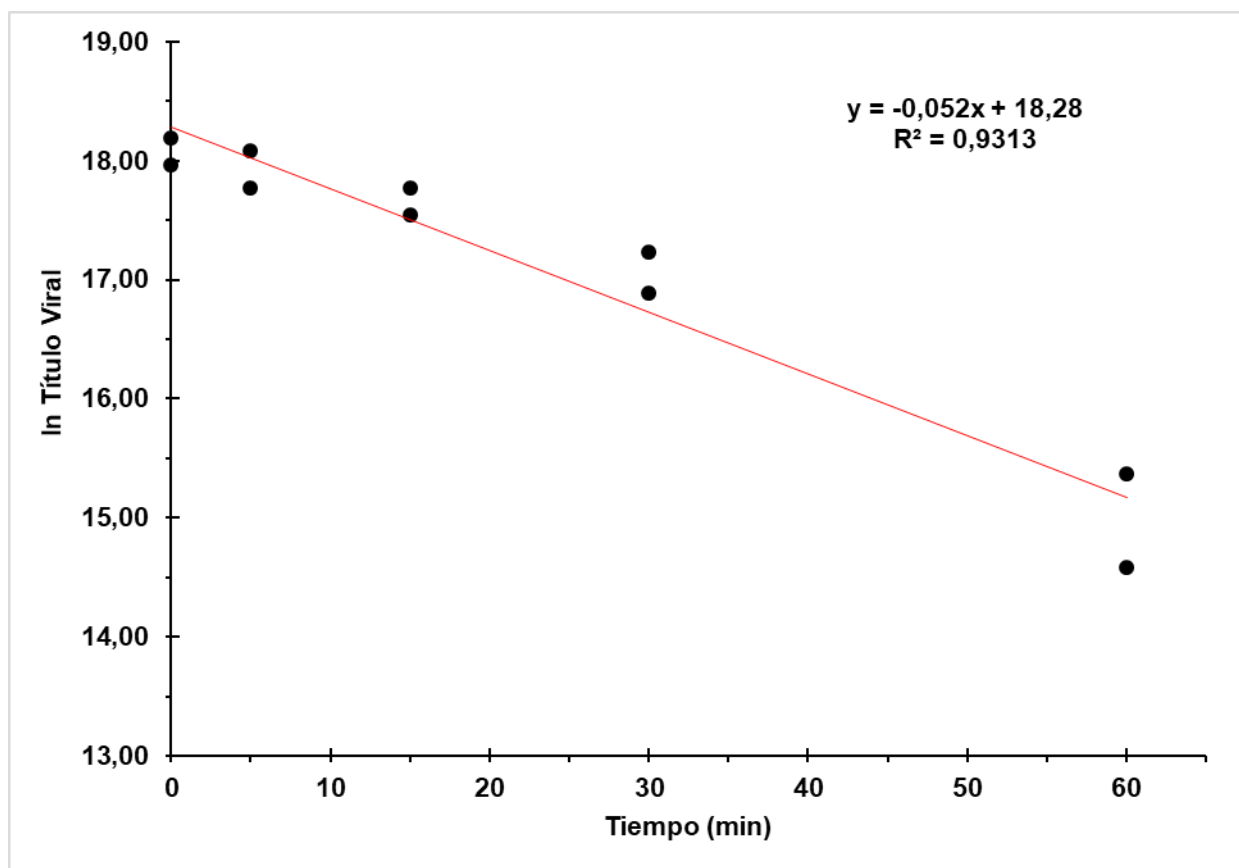


Figura 2. Logaritmo natural (ln) del Título viral vs Tiempo de ozonización. Para un modelo de decaimiento exponencial en el tiempo (t) del tipo $T(t)=T_0e^{-kt}$; donde T:Título Viral, T_0 : Título viral inicial y k:constante de decaimiento exponencial, a través de la representación gráfica de ln Titulo viral vs Tiempo se obtuvo, de la pendiente de la curva, el valor de k.

Por otro lado, como se puede apreciar en la figura N° 2, la caída de la infectividad viral asociada a la ozonización se puede representar mediante un modelo de decaimiento exponencial ($R^2 = 0,9313$), a partir del cual se determinó la constante de inactivación, que resultó igual a $0,052 \text{ min}^{-1}$. Esta constante de inactivación determina que el tiempo de vida media de la infectividad viral resultó igual a 13,33 minutos.

Conclusión

La exposición al ozono en una cámara B-Logic (FDC Advanced) produce la inactivación progresiva de la infectividad de un virus provisto de envoltura, con genoma de DNA de doble cadena, perteneciente a la familia *Baculoviridae*. El efecto de la ozonización sobre la infectividad de este baculovirus, en las condiciones experimentales evaluadas en este ensayo y a la concentración de ozono generada por el equipo, puede representarse por un modelo de decaimiento exponencial, a partir del cual se determina que la magnitud de

la infectividad de la muestra se reduce a la mitad cada 13,33 minutos de exposición.

Referencias

- Claus, J.D.; Remondetto, G.; Guerrero, S.; Demonte, A.M.; Murguía, M.; Mancipar, A.J. (1993) *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus replication in serum-free and serum reduced insect cell cultures. *Journal of Biotechnology*, 31: 1-15.
- Gioria, V.V., Jäger, V. and Claus, J.D. (2007) Growth, metabolism and baculovirus production in suspension cultures of an *Anticarsia gemmatalis* cell line. *Cytotechnology*, 52 (2): 113-124.
- Micheloud, G.; Gioria, V.; Pérez, G.; Claus, J.D. (2009) Production of occlusion bodies of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line: influence of infection parameters and statistical optimization. *Journal of Virological Methods*, 162: 258-266.
- Reed L, Muench H (1938) A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27: 493–497.