

IDENTIFICACION RAPIDA DEL VIRUS ENCEFALITICO TRANSMITIDO POR GARRAPATAS, MEDIANTE LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES ¹

P. Albrecht y O. Kožuch

Se ha utilizado una técnica de inmunofluorescencia, creada con el fin de facilitar un medio rápido de identificación de arbovirus del grupo B, para identificar el virus encefalítico transmitido por garrapatas. No fue posible la identificación en tejido de cerebro de ratón cuando se emplearon ratones con síntomas clínicos vagos. La identificación en cultivos de célula de embrión de pollo fue menos lenta y laboriosa que la efectuada en cerebro de ratón, pero requirió más cuidado, ya que sólo una reducida proporción de células indicó fluorescencia. La identificación puede realizarse en unas pocas horas si se emplean ratones agonizantes o cultivos celulares después de un período de tres a cinco días a partir de la inoculación.

A fin de facilitar un método rápido para identificar arbovirus del grupo B, se ha creado una técnica de inmunofluorescencia en cultivos tisulares y ratones (1). En experimentos anteriores se emplearon cepas de virus de reserva que se habían adaptado considerablemente al cerebro de ratón. Para confirmar los resultados experimentales previos, se ha intentado la rápida identificación inmunofluorescente del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, aislado de fuentes naturales.

Materiales y métodos

El estudio se efectuó en tres aislados, considerados positivos, procedentes de la sangre de erizos capturados en la región de Tribeč,² y en otros tres aislados, también considerados positivos, procedentes de grupos de garrapatas *Ixodes ricinus* recogidas en otra zona endémica (2). En los trabajos

referidos se ofrecen detalles de los métodos de aislamiento virológico. Con cada material se inocularon por vía intracerebral 10 ratones, de dos a cuatro días de edad, y cinco tubos que contenían cultivo de célula de embrión de pollo. Se sacrificaron los ratones con síntomas clínicos aparentes o manifiestos y, de sus cerebros, cuidadosamente extraídos, se tomaron rodajas de 2 mm de grosor y se fijaron en fluido de Carnoy e incluyeron en parafina (3). Dos de los cinco tubos, en los que no se efectuaron pruebas de interferencia, se emplearon para demostrar la existencia de antígeno de virus en frotis celulares o en células cultivadas en cubreobjetos insertos de 8 x 18 mm. A efectos de identificación se utilizaron: un suero antiarbovirus del grupo B (anti-EJB-ETG-EJB) y seis sueros de cobayo de tipo específico contra los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), encefalitis japonesa B (EJB), Nilo occidental (NO), encefalitis de San Luis (ESL), dengue del tipo 2 (D2) y fiebre amarilla (FA). El método de inmunización y las propiedades inmunológicas de los sueros, así como la preparación y propiedades de la globulina

¹ Una colaboración del Instituto de Virología de la Academia Checoslovaca de Ciencias, Bratislava, Checoslovaquia.

Este trabajo se publicó en inglés con el título "Rapid Identification of Tick-Borne Encephalitis Virus by the Fluorescent Antibody Technique" en *Bull WHO* 36 (Suplemento 1): 85-88, 1967.

² Véase el trabajo de Kožuch *et al.*, en *Bull WHO* 36 (Suppl. 1): 61-66, 1967.

de conejo anticobayo conjugada (1) ya han sido objeto de descripción en otro lugar.

Resultados

En el cuadro 1 figura un resumen de los resultados de la identificación inmunofluorescente de seis materiales, con indicación de cuatro aislamientos positivos. Los puntos de interés principal son los siguientes:

Al parecer, el contenido de virus fue elevado en las suspensiones procedentes de diversas series de garrapatas y produjo la agonía en los ratones a los 5 ó 6 días, con notable fluorescencia de células nerviosas en el tejido cerebral y encefalitis en las secciones teñidas de hematoxilina eritrosina (figuras 1A, 1B). Por lo visto, la sangre del erizo No. 13 contenía menos virus, ya que los síntomas clínicos manifiestos no aparecieron hasta 10 días después de la inoculación (figuras 1C, 1D). El material del segundo pase fue tomado, por error, demasiado pronto, antes de que se desarrollara la encefalitis histológica o suficiente antígeno identificable mediante anticuerpos fluorescentes (figuras 2A, 2B). Igualmente, en el ratón inoculado con sangre del erizo No.

20 no se descubrió encefalitis ni inmunofluorescencia positiva. A medida que se recogía el resto de los ratones, después de transcurrido un período idéntico para la preparación de antígeno de hemaglutinación, no fue posible ninguna nueva evaluación del material del primer pase. La identificación intentada en el cuarto pase, mediante anticuerpos fluorescentes, dio resultado positivo.

En vista de que los virus del complejo ETG recién aislados necesitan de cuatro a cinco pases, antes de adaptarse y alcanzar títulos altamente infecciosos en cerebro de ratón, se comparó la intensidad de fluorescencia en cada cerebro, a fin de obtener información acerca de las concentraciones de antígeno de los virus respectivos. La fluorimetría fue aplicada a secciones en condiciones normales (3) y se evaluó la fluorescencia de la zona talámica. Los resultados que aparecen en el cuadro 2 indican que, en el primer pase en cerebro de ratón, la cantidad de antígeno de virus (cepa no infecciosa) fue casi la misma que en el cuarto pase o en cerebros de ratón infectados con cepas bien adaptadas.

Dos de los aislados se comprobaron en

CUADRO 1—Identificación del virus ETG* en ratones y en cultivos de células de embrión de pollo (CEP).

Material	Identificación en ratones					Porcentaje de células positivas en cultivos CEP por inmunofluorescencia
	Número de pases	Día de recogida del ratón	Síntomas clínicos	Inmunofluorescencia	Encefalitis histológica	
Sangre del erizo						
No. 13.....	1	10	intensos	+	+	
	2	4	dudosos	—	—	
	3	5	manifiestos	+	+	
	4	5	agonía	+	+	
No. 17.....	1 ^a	3	muerte ^b	—	—	
No. 20... ..	1	6	dudosos	—	—	
	4	5	agonía	+	+	
Serie de <i>I. ricinus</i>						
No. 22.....	1	6	agonía	+	+	3
No. 24.....	1*	6	dudosos	—	—	0
No. 25.....	1	5	agonía	+	+	3

* Encefalitis transmitida por garrapatas.

^a Subpases ulteriores en ratones dieron resultado negativo.

^b La muerte sobrevino, probablemente, de hemorragia intracerebral causada por sangre heparinizada.

FIGURA 1—Fluorescencia en cortes de cerebro de ratón.

Ampliaciones: 60

A. Ratón en estado agónico, inoculado con sobrenadante de una serie de *I. ricinus* 22 recogido seis días después de la infección. Casi todas las células nerviosas de la corteza cerebral y cuernos de Ammón indican fluorescencia específica.

B. Igual que en 1A, después del tñido suplementario con hematoxilina y eritrosina. Muestra necrosis de neuronas de la corteza cerebral y cuernos de Ammón, así como lesiones inflamatorias.

C. Ratón inoculado con sangre del erizo No. 13, recogido 10 días después de la infección, cuando los síntomas clínicos eran manifestos. Todas las células nerviosas indican fluorescencia positiva.

D. Igual que en 1C, después del tñido con hematoxilina y eritrosina. Buena conservación de la estructura del sistema nervioso central.

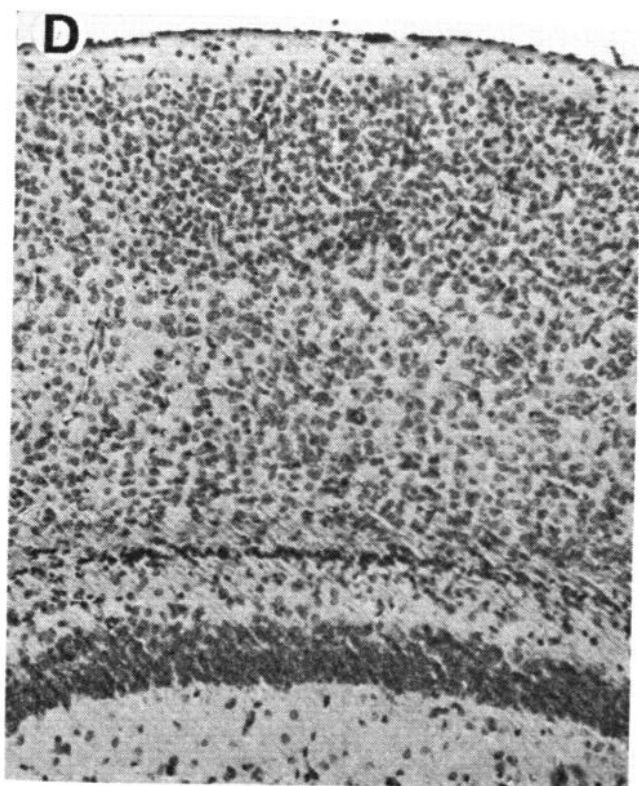
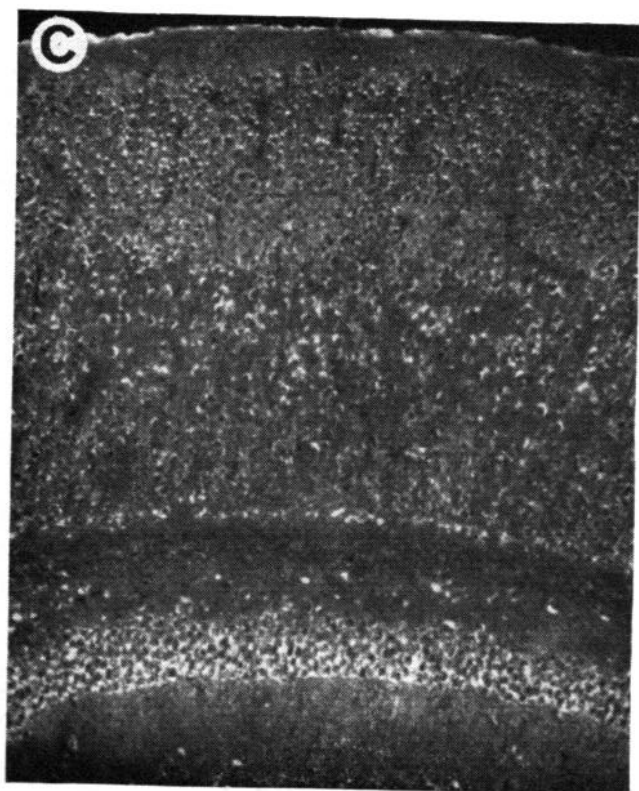
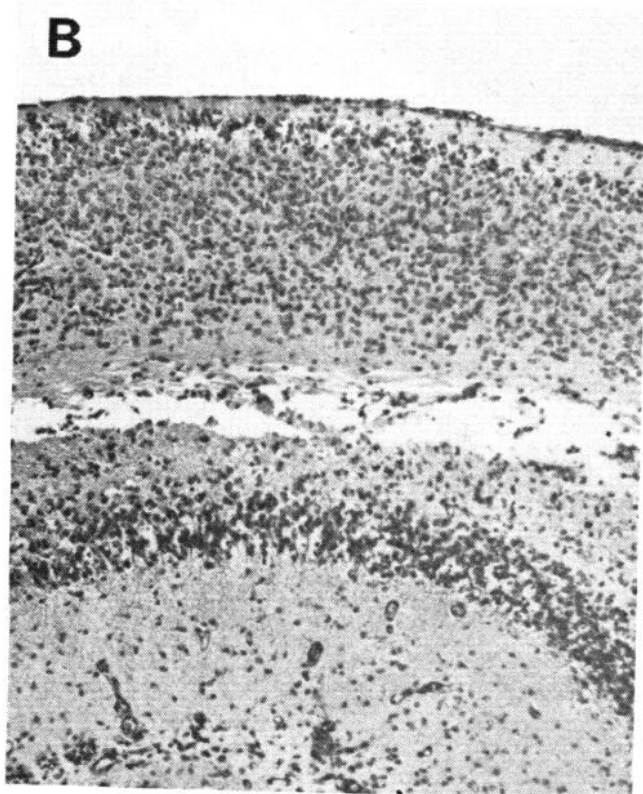
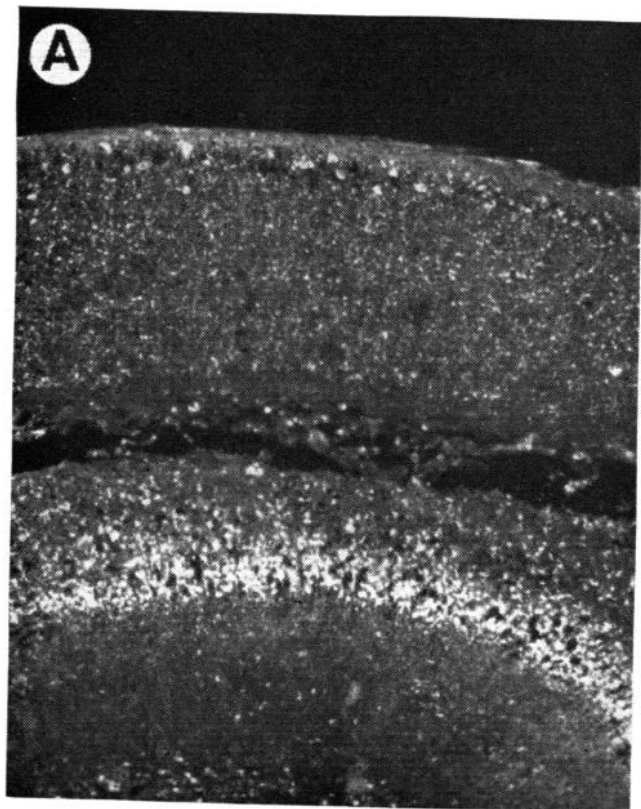
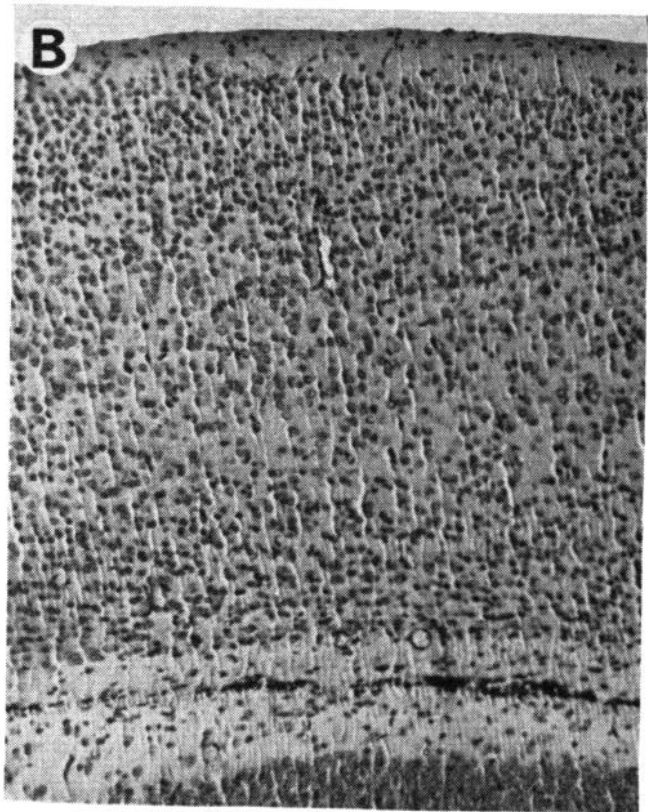
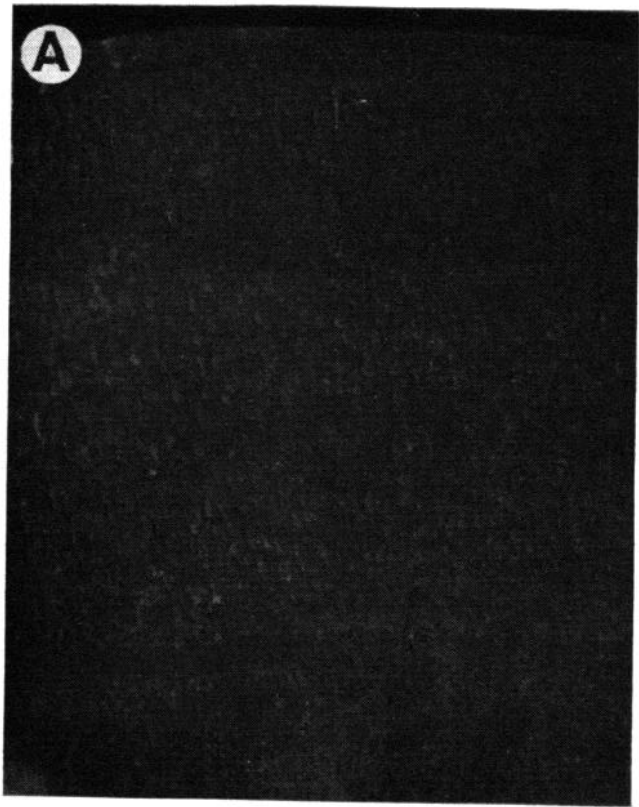


FIGURA 2—Fluorescencia en cortes de cerebro de ratón.

Ampliaciones: 60

A. Ratón inoculado con virus aislado del erizo No. 13. Segundo pase en cerebro de ratón. Ratón recogido sin síntomas clínicos manifestos cuatro días después de la infección. Sin fluorescencia específica de células nerviosas.
B. Igual que en 2A, después del teñido suplementario con hematoxilina y eritrosina. Sin alteración de la estructura del sistema nervioso central.



paralelo con otros arbovirus del grupo B frente a sueros de tipo específico conocido y un suero de grupo específico para confirmar los resultados obtenidos en investigaciones anteriores con cepas de laboratorio. Los

resultados que figuran en el cuadro 3 demuestran la seguridad de identificación con sueros que se conservaron liofilizados durante varios meses a 4°C.

La identificación de aislados de virus en cultivos de célula de embrión de pollo fue menos laboriosa y lenta que la efectuada en cerebros de ratón, pero requirió mayor atención porque sólo una proporción reducida de las células indicaron fluorescencia (cuadro 1, figura 3). Sin embargo, la fluorescencia de las células positivas fue lo bastante intensa para la identificación. Siempre y cuando el suero y el conjugado estuvieran debidamente absorbidos y se hubieran insertado frotis de control no infectado, los resultados fueron inequívocos.

Discusión

Debe observarse que el virus ETG aislado en el primer pase en cerebro de ratón produjo inmunofluorescencia de gran intensi-

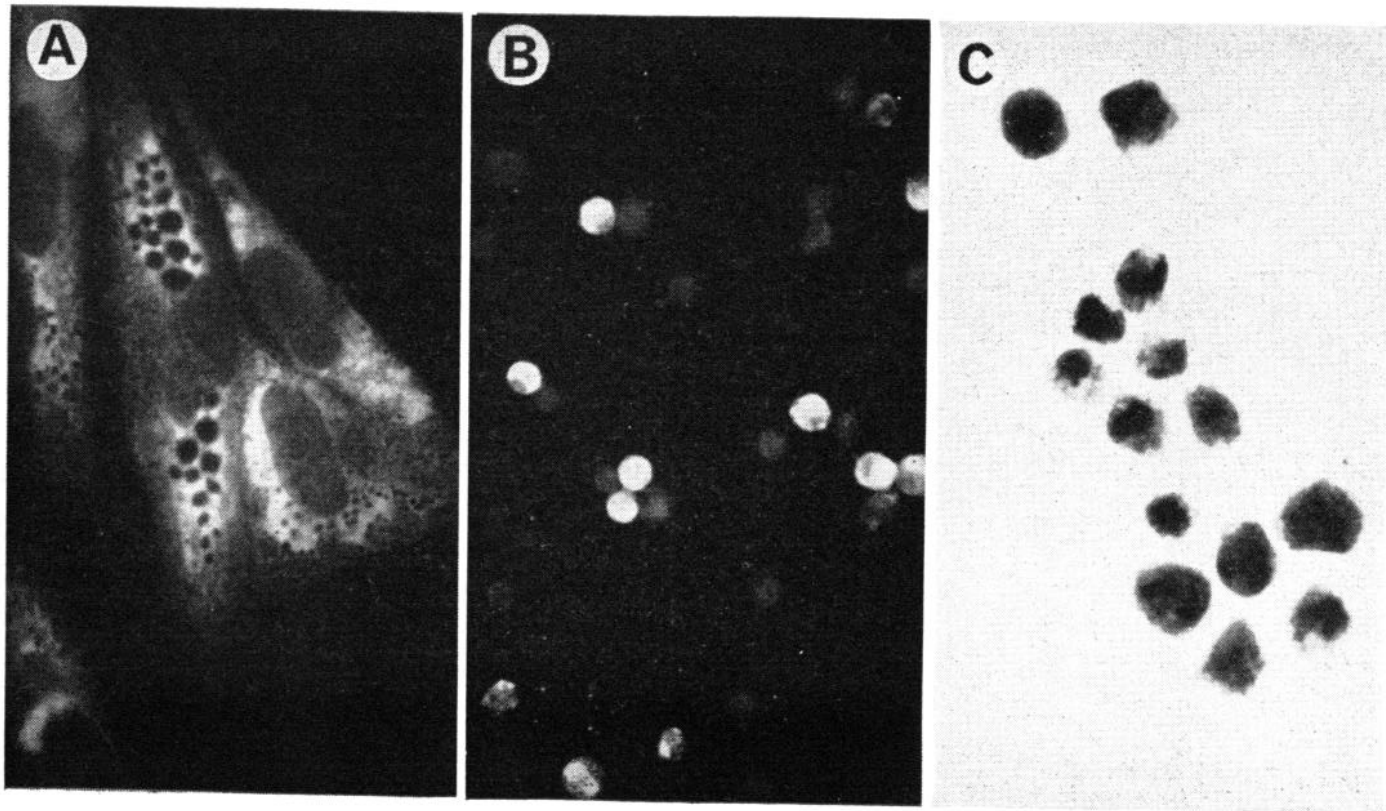
CUADRO 2—Intensidad de la fluorescencia en cortes de cerebro de ratón infectado con virus ETG en diversos pases.

Material	Intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias)
Primer pase	
Sangre del erizo No. 13.....	1.75
<i>I. ricinus</i> serie No. 22.....	1.4
<i>I. ricinus</i> serie No. 25.....	1.6
Segundo pase	
Sangre del erizo No. 13.....	1.4
Sangre del erizo No. 20.....	1.5
48° pase: virus de reserva.....	1.45
49° pase: virus de reserva.....	1.7

FIGURA 3—Fluorescencia en cultivos de célula de embrión de pollo.

Amplificaciones: 200

- A. Cultivo a los cinco días de la infección con sobrenadante de una mezcla de *I. ricinus* 22. Antígeno de virus ETG en gran parte del citoplasma.
- B. Frotis de células de embrión de pollo cultivadas, procedentes de un tubo inoculado cinco días antes con material extraído de *I. ricinus* 22. Algunas células indican intensa inmunofluorescencia.
- C. Igual que en 3B teñido con hematoxilina y eritrosina. Señala la estructura de células de embrión de pollo tripsinizadas.



dad, comparable a la obtenida después de la inyección de virus muy adaptados. Esta situación es parecida a la relacionada con el comportamiento del virus humano de influenza en el amnión del embrión de pollo.

A pesar de títulos reducidos de inhibición-hemaglutinación, el virus de influenza indicó, en el primer pase, intensa inmunofluorescencia, tanto como la manifestada por las cepas de influenza muy adaptadas (4).

CUADRO 3—Inmunofluorescencia cruzada de virus ETG recién aislados y antígenos de reserva con sueros de grupo o tipo específicos contra los arbovirus del grupo B.

Antígeno	Cerebro de ratón empapado en fluido de Carnoy—cloroformo—parafina e infectado de virus ^a								
Suero	E 13(1) ^b	E 13(4)	I 22(1)	ETG (48)	EJB	NO	ESL	D2	FA
Anti-EJB-ETG-EJB ^c ...	+	+	+	+	++	+	+±	+	+
Anti-ETG ^d IV/1.....	++	+±	+	+±	—	—	—	—	—
Anti-EJB IV/1.....	—	—	—	—	+±	—	—	—	—
Anti-NO IV/1.....	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Anti-ESL IV/1.....	—	—	—	—	—	—	+±	—	—
Anti-D2 IV/2.....	—	—	—	—	—	—	—	++	—
Anti-FA IV/3.....	—	—	—	—	—	—	—	—	+

^a ETG: Encefalitis transmitida por garrapatas; EJB: Encefalitis Japonesa B; NO: Nilo occidental; ESL: Encefalitis de San Luis; D2: Dengue tipo 2, y FA: Fiebre Amarilla. La intensidad de la fluorescencia se indica como sigue (en orden descendente de intensidad): +++, ++±, ++, +±, +, ±; el signo—indica que no hubo fluorescencia.

^b Virus aislado del erizo No. 13 en el primer pase en cerebro de ratón, etc.

^c Procedente del segundo ciclo de inmunización.

^d Procedente del cuarto ciclo de inmunización.

Cuando la inmunofluorescencia en cerebros de ratón se estaba comprobando dinámicamente (3), es decir, mediante el desarrollo de infección en pases sucesivos, la fluorescencia más intensa y el mayor contraste entre estructuras positivas y negativas se obtuvieron en animales con síntomas clínicos incipientes; el contraste disminuyó algo a medida que los síntomas aumentaron de gravedad al aproximarse la agonía. No obstante, en las presentes investigaciones de material del primer pase, los ratones que ofrecieron ligeros síntomas clínicos, con frecuencia no contrajeron encefalitis ni indicaron fluorescencia positiva. Por consiguiente, se decidió seleccionar para la identificación inmunofluorescente tan sólo animales que se encontraran manifiestamente enfermos, preferiblemente en la agonía.

En vista del reducido porcentaje de células positivas en los cultivos de célula de embrión de pollo inoculados con material de primer pase, quedan justificados nuevos pases en caso de que no se advierta inmunofluorescencia alguna. La incubación de cultivo celular del segundo pase durante tres días fue suficiente para producir considerable incremento del número de células positivas (1).

Cabe deducir, en conclusión, que la identificación de virus ETG en ratones o en cultivos de célula de embrión de pollo puede llevarse a cabo en unas horas, siempre y cuando se utilicen ratones agonizantes o cultivos celulares, de tres a cinco días a partir de la inoculación.

Resumen

Se consignan los resultados de la identificación rápida del virus de la encefalitis trans-

mitido por garrapatas mediante una técnica de inmunofluorescencia adaptada por uno de los autores para identificar los arbovirus del grupo B. Esta técnica, que ya se había ensayado en cepas de reserva, la aplicaron a virus aislados de fuentes naturales.

El material de estudio consistió en tres cultivos aislados supuestamente positivos procedentes de la sangre de erizos capturados en la región de Tribeč y tres cultivos aislados supuestamente positivos procedentes de lotes de *Ixodes ricinus* recogidos en otra región endémica. Cada cultivo aislado fue inoculado a diez ratones de dos a cuatro días de edad y en cinco tubos de cultivo celular de embrión de pollo. Las suspensiones procedentes de las garrapatas aparentemente eran ricas en virus; los ratones entraron en agonía en el curso de 5 a 6 días; la fluorescencia fue intensa en las células nerviosas del cerebro; la encefalitis se confirmó histológicamente. Desde el primer pase por cerebro de ratón, los virus produjeron una fluorescencia franca, comparable a la que se obtiene después de la infección por cepas altamente adaptadas. No fue posible la identificación en los ratones que no presentaron más que síntomas clínicos vagos y fue necesario utilizar ratones agonizantes. La identificación en cultivo celular es posible de tres a cinco días después de la siembra; es menos difícil y requiere menos tiempo que la técnica con ratones, pero exige un examen cuidadoso, pues sólo un escaso porcentaje de células muestra la fluorescencia.

Tanto la identificación en cerebro de ratón como en cultivo celular puede hacerse en unas cuantas horas. □

REFERENCIAS

- (1) Albrecht, P. *Acta Virol* 9: 338, 1965.
- (2) Kožuch, O., Nosek, J., Lichard, M. y Chmela, J. *Čs Epidem* 15: 24, 1966.
- (3) Albrecht, P., Mrenová, M. y Karellová, E. *Acta Virol* 10: 155, 1966.
- (4) Blaškovič, D., Albrecht, P., Lackovič, V., Leššo, J., Rathová, V. y Styk, B. *Acta Virol* 7: 192, 1963.

Rapid Identification of Tick-Borne Encephalitis Virus by the Fluorescent Antibody Technique (Summary)

In this article the authors report the results of the rapid identification of tick-borne encephalitis virus by an immunofluorescence technique developed by one of them to provide a means of identification of group B arboviruses. They used this technique, which has already been used for the identification of stock virus strains, for the identification of virus isolated from natural sources.

The study was carried out on three supposedly positive isolates from the blood of hedgehogs caught in the Tribec region and on three supposedly positive isolates from pools of *Ixodes ricinus* ticks collected in another endemic region. Each isolate was inoculated into ten mice that were two to four days old and into five tubes containing chick-embryo-cell cultures. The virus content was apparently high

in the suspensions from tick pools, causing agony in mice within 5-6 days with marked fluorescence of nerve cells in the brain tissue; encephalitis was confirmed histologically. Virus isolated in the first mouse-brain passage yielded high-intensity immunofluorescence, comparable to that obtained after infection with highly-adapted viruses. Mice that presented slight clinical symptoms did not develop positive fluorescence but animals in agony did. Identification in cell cultures can be accomplished three to five days after inoculation. Identification was less time-consuming and laborious than identification in mouse brain but more care was required since only a small percentage of cells showed fluorescence.

Identification in mouse brain can be accomplished in a few hours.

Identificação Rápida do Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapato, mediante a Técnica de Anticorpos Fluorescentes (Resumo)

Os autores relatam os resultados da identificação rápida do vírus da encefalite transmitida por carrapato, mediante uma técnica de imunofluorescência desenvolvida por um deles para identificar os arbovírus do grupo B. Aplicaram êles a virus isolados de fontes naturais a referida técnica, a qual já fôra experimentada em raças de reserva.

O material de estudo consistiu em três culturas isoladas presumidamente positivas, provenientes do sangue de ouriços capturados na região do Tribec, e em três culturas isoladas presumidamente positivas, provenientes de lotes de *Ixodes ricinus* colhidos em outra região de endemia. Cada cultura isolada foi inoculada em dez camundongos de dois a quatro dias de idade e em cinco tubos de cultura celular de embrião de galinha. As suspensões provenientes de carrapato eram aparentemente ricas em vírus; os camundongos entravam em agonia

em 5 a 6 dias; a fluorescência era intensa nas células nervosas do cérebro: a encefalite foi confirmada histologicamente. Desde a primeira passagem pelo cérebro dos camundongos, os vírus apresentaram uma fluorescência nítida, comparável à que se obtém depois de infecção por raças altamente adaptadas. Não foi possível a identificação nos camundongos que apresentavam apenas vagos sintomas clínicos, e é necessário utilizar camundongos em estado de agonia. A identificação em cultura celular é possível três a cinco dias após a inseminação: é menos difícil e exige menos tempo do que a técnica aplicada em camundongos, mas exige exame cuidadoso porque apenas uma pequena percentagem das células apresenta fluorescência.

A identificação em cérebro de camundongo ou em cultura celular pode ser feita em algumas horas.

Identification rapide du virus de l'encéphalite transmise par tiques au moyen de la technique d'anticorps fluorescents (Résumé)

Les auteurs rapportent les résultats de l'identification rapide du virus de l'encéphalite transmise par tiques au moyen d'une technique d'immunofluorescence mise au point par l'un d'eux pour identifier les arbovirus du groupe B. Ils ont appliqué à des virus isolés de sources naturelles cette technique qui avait déjà été essayée sur des souches de collection.

Le matériel d'étude consistait en trois isolats supposés positifs provenant du sang de hérissons capturés dans la région de Tribec et trois isolats supposés positifs provenant de lots d'*Ixodes ricinus* récoltés dans une autre région d'endémie. Chaque isolat a été inoculé à dix souris âgées de deux à quatre jours et commencé sur cinq tubes de culture cellulaire

d'embryon de poulet. Les suspensions provenant des tiques étaient apparemment riches en virus; les souris entraient en agonie en 5-6 jours; la fluorescence était intense dans les cellules nerveuses du cerveau: l'encéphalite a été confirmée histologiquement. Dès le 1^{er} passage sur cerveau de souris, les virus ont donné une fluorescence nette, comparable à celle obtenue après infection par des souches hautement adaptées. L'identification n'a pas été possible chez les souris qui ne présentent que de

vagues symptômes cliniques et il est nécessaire d'utiliser des souris en agonie. L'identification sur culture cellulaire est possible trois à cinq jours après l'ensemencement; elle est moins difficile et demande moins de temps que la technique sur souris, mais elle exige un examen soigneux car seul un faible pourcentage de cellules montre une fluorescence.

L'identification sur cerveau de souris ou sur culture cellulaire peut être faite en quelques heures.