

EL USO DE DISCOS DE PAPEL IMPREGNADOS DE SUERO PARA LA IDENTIFICACION DE ENTEROVIRUS EN CULTIVOS DE TEJIDOS

Dr. Pedro Más Lago¹ y Srtas. Esther Olvido Díaz² y Rosa Palomera²

Se propone un método para identificar enterovirus por medio de discos de papel secante impregnados con suero para realizar la neutralización de placas. Este método puede ser más rápido, más económico, más seguro y de lectura más fácil que la prueba de neutralización del efecto citopatogénico.

Introducción

La identificación de enterovirus aislados en cultivos de tejidos se realiza por medio de la prueba de neutralización del efecto citopatogénico por los sueros específicos. Con el fin de reducir el número de pruebas que deben realizarse y facilitar el trabajo práctico, Lim Benyesh-Melnick (1) ha recomendado un esquema en el que se utilizan ocho conjuntos de sueros que contienen cada uno de 9 a 11 sueros tipos. En este método se usan 50 unidades neutralizantes de cada suero frente a 100 TCD₅₀ de la cepa a identificar. La lectura se efectúa por observación microscópica cuando el control de los 100 TCD₅₀ ha dado efecto citopatogénico de 75 a 100%, que se produce usualmente entre los cinco y siete días que siguen a la prueba. En la constitución de los conjuntos intervienen 42 sueros dis-

tintos mezclados en diferentes combinaciones; por consiguiente, con cada prueba, se puede identificar un tipo de enterovirus entre 42 tipos distintos.

Los discos de papel impregnados en sueros han sido utilizados por De Somer (2) y por Farrell (3) para la investigación de anticuerpos neutralizantes a poliovirus. Kalter (4) ha utilizado discos de papel con iguales fines, así como para titular virus y hacer identificaciones. Este autor colocó los virus que se iban a identificar y el suero en discos que dispuso uno encima de otro para observar si se producía halo de efecto citopatogénico al difundir el virus por el agar, en caso de no ser neutralizado por el suero. Con este método el mismo autor no obtuvo buenos resultados con los virus Echo y Adeno. Melnick (5) ha utilizado discos impregnados de virus poliomiélicos con el fin de determinar sus características genéticas midiendo el diámetro del halo que se produce cuando la capa de agar contiene el suero homólogo del tipo. Porterfield los ha utilizado para investigar anticuerpos contra la fiebre amarilla (6), así como para el estudio de interferón y sustancias de acción antivírica (7).

El objeto del presente estudio es dar a conocer el uso de discos de papel secante

¹ Vicedirector de Investigaciones, Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM), La Habana, Cuba.

² Técnicos, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM), La Habana, Cuba.

impregnados con suero para realizar neutralización de placas con el fin de identificar enterovirus.

Materiales y métodos

Discos de papel

Se utilizaron discos de papel secante de unos 5 mm de diámetro, gentilmente facilitados por el Dr. Antonio Palacín Aranda del Centro de Producción de Biológicos Carlos J. Finlay. Los discos tenían impresos que permitían reconocerlos fácilmente y eran del mismo tipo que los que se utilizan en la producción de discos de antibiogramas para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Después de esterilizarlos en autoclaves, se colocaron en bulbos estériles para liofilizar a los que se añadió una dilución 1:2 de los distintos tipos de sueros contra los enterovirus que se probaron. Se utilizó una cantidad de suero suficiente únicamente para mojar bien los discos, teniendo cuidado de que no quedara un exceso. Los bulbos así preparados se liofilizaron y se cerraron al vacío.

Sueros

Se utilizaron los mismos sueros que los que se producen en el Laboratorio de Enterovirus del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología para la identificación de enterovirus. Estos sueros se obtienen de conejos después de un esquema de inmunización intravenosa con antígenos de las distintas cepas de referencia de enterovirus. Los títulos obtenidos oscilan de 1:128 hasta 1:4096.

Cultivo de células

Se utilizaron cultivos de células de línea F1 (amnios humano normal), mantenidas en el laboratorio por pases seriados en

medio Parker 199 con 10% de suero de ternero y antibióticos en dosis y tipos usuales.

Cubierta de agar

Se utilizó la cubierta de agar recomendada por Melnick (1) para obtener placas de enterovirus.

Cepas de virus

Se probaron 24 cepas de referencia de enterovirus multiplicadas en células F1 mantenidas en medio Parker 199 con 2% de suero de ternero. De cada cepa de referencia se utilizó una dosis de 0.2 ml de una dilución de 10^{-3} para inocular la capa celular de frascos de cultivo rectangulares de 100 ml de capacidad. Además, se probaron en igual forma 43 cepas de enterovirus aisladas de heces fecales en el primer semestre de 1977.

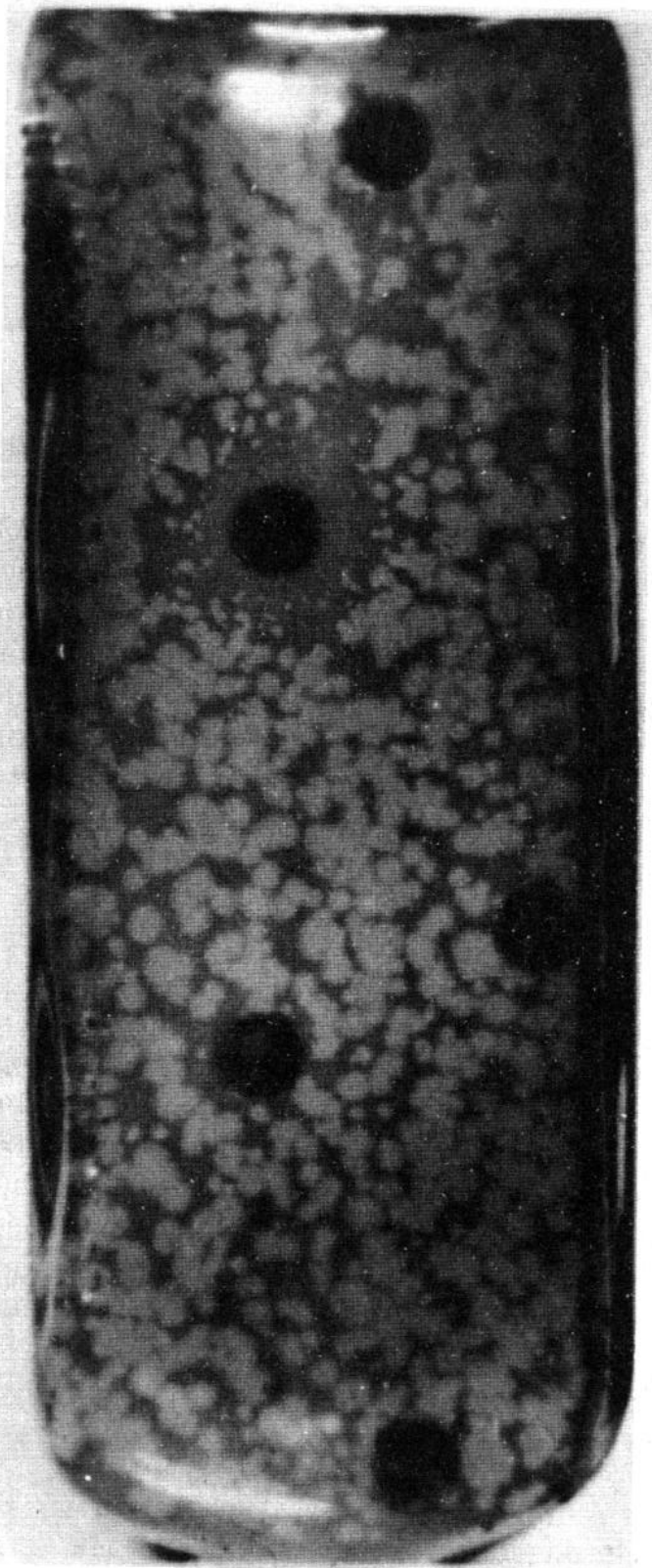
Metodología de los discos de papel

Se inocularon los frascos de cultivo con dosis de virus adecuadas para producir una confluencia de las placas en un plazo de 48 horas. Una vez endurecida la cubierta de agar, se colocaron en la superficie los discos de papel secante impregnados con los distintos tipos de suero. De esta manera el suero difunde en el agar y se evita la destrucción de las células por el virus que les sea homólogo.

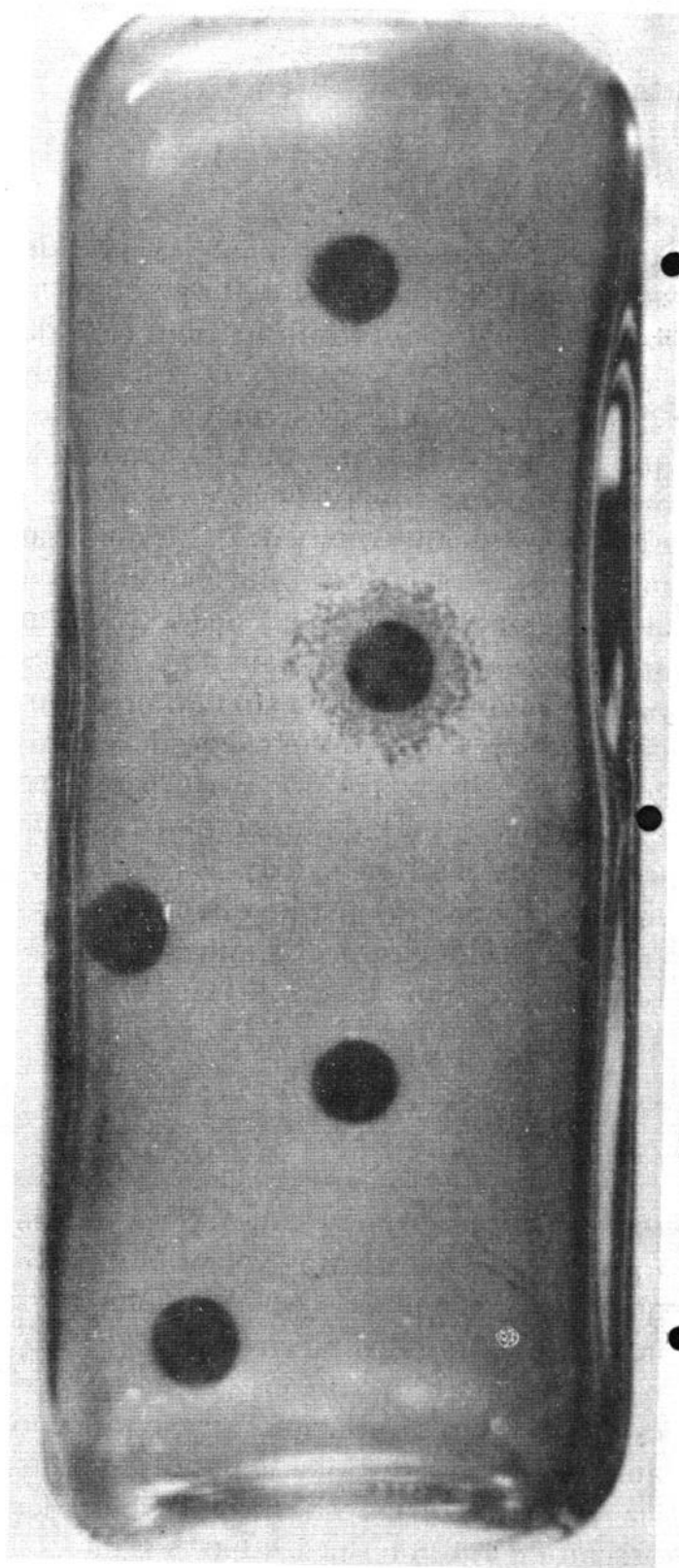
Resultados

Utilizando la metodología descrita se pudo observar un halo redondo (fotografías 1 y 2), formado por las células coloreadas con rojo neutro, por debajo del disco que contenía el suero homólogo al virus con que se había inoculado el frasco.

FOTOGRAFIA 1—Frasco inoculado con poliovirus tipo 1. Se observa un halo de protección alrededor del disco que contiene el suero homólogo.



FOTOGRAFIA 2—Frasco inoculado con Echo virus tipo 6. Se observa un halo de protección alrededor del disco que contiene el suero homólogo.



Prueba con las cepas de referencia

En el cuadro 1 se presentan los resultados de la prueba cruzada entre 24 discos

impregnados con distintos tipos de suero y las 21 cepas que produjeron placas. Tres cepas de virus no dieron placas en las condiciones de nuestro experimento.

CUADRO 1—Prueba de neutralización cruzada por el método de disco entre 24 cepas de enterovirus y sus sueros homólogos.

Suero	Cepas de virus																								
	Polio			Coxsackie				ECHO																	
	1	2	3	1	3	5	6	1	2 ^a	3	5 ^a	6	7	8	9	11	12	13	19	20	23	24	26 ^a	29	
Polio	1	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Polio	2	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Polio	3	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coxsackie B1	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coxsackie B3	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coxsackie B5	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coxsackie B6	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Echo	1	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	6	0	0	0	0	0	0	0	X	0	X	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
"	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0
"	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0
"	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0
"	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0
"	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
"	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X

^a No dio placas.

Todos los sueros utilizados neutralizaron en forma específica su cepa homóloga, con excepción del suero Echo 6 el cual dio neutralización cruzada con los virus Echo 1 y 8, aunque el halo que se produjo con estos virus fue más pequeño que el que se obtuvo con la cepa homóloga. Los sueros de Echo 1 y 8 no dieron halo de neutralización con el virus Echo 6.

Con el fin de conocer el gasto de suero que requería este método en relación al de neutralización del efecto citopatógeno, se titularon cuatro sueros frente a sus cepas homólogas por ambos métodos. Los resultados de estas titulaciones demostraron que pueden obtenerse halos de pro-

tección celular francamente visibles con cantidades de suero inferiores (0.015 ml por disco) a las necesarias para realizar el método de neutralización del efecto citopatógeno en el que se utilizaron 50 unidades neutralizantes para inocular dos tubos celulares con 0.2 ml de la mezcla virus-suero cada uno.

Prueba con las cepas aisladas

Se identificaron por el método de discos de papel 43 cepas de enterovirus aisladas de heces fecales en el primer semestre de 1977 (cuadro 2).

CUADRO 2—Aislamientos identificados por el método de disco.

Tipo de virus	No. de cepas
Polio 1	7
Polio 2	11
Polio 3	1
Coxsackie B5	1
Echo 6	11
Echo 19	7
Sin tipo	5
Total	43

Las cepas identificadas como Echo 19 dieron un halo más pequeño con el suero de Echo 6. Dicho halo fue también más pequeño que el que se observó entre los aislamientos identificados como Echo 6, los cuales no lo presentaron con el suero Echo 19. De las cinco cepas no identificadas, cuatro no produjeron placas y una no dio halo de neutralización con ninguno de los sueros que se probaron. La identificación de todas las cepas se confirmó por la neutralización del efecto citopatogénico por el suero homólogo.

Discusión

La neutralización por discos de papel para identificar enterovirus tiene una serie de ventajas sobre el método clásico, entre las que pueden señalarse las siguientes:

Rapidez en la obtención de los resultados. Tanto en las pruebas realizadas con las cepas de referencia, como en las que se efectuaron con los aislamientos, la lectura final se realizó a las 48 horas. Esto unido a que no se efectuó en ningún caso una titulación previa permitió obtener resultados entre 6 y 8 días antes que con el método clásico de neutralización.

Lectura más fácil. La lectura se hizo macroscópicamente sin dificultad ni confusión. En la neutralización del efecto cito-

patogénico, la identificación se basa en ocasiones en el retardo que existe para que se produzca dicho efecto. En varias oportunidades observamos que el halo producido por el disco no sufría modificaciones apreciables cuando los frascos se dejaban en incubación hasta cuatro días después de haberse efectuado la lectura.

Mayor economía. Ya se ha señalado en este sentido el consumo de suero diagnóstico. A ello pueden añadirse los aspectos económicos por concepto de uso de cristalería. En un frasco de 100 ml pueden colocarse hasta 20 discos, y para hacer la neutralización por el método clásico se necesitarían 40 tubos de cultivos celulares, más unos 24 tubos para realizar la titulación previa de la cepa.

Seguridad. En este sentido pueden señalarse varios aspectos tales como menores posibilidades de cometer errores, ya que los discos una vez impregnados son de seguro y fácil reconocimiento; menores posibilidades de contaminación en el trabajo, pues los discos son de más difícil contaminación y necesitan menos manipulación que los sueros en forma líquida; menores requerimientos en la conservación, pues en la presente investigación se mantuvieron los discos, después de abiertos los bulbos, por más de un mes a temperatura ambiente sin que se notara pérdida significativa de su efectividad.

* * *

Consideramos que sería de interés continuar investigando algunos aspectos de la neutralización por discos de papel impregnados con sueros, tales como el uso de mezclas de sueros, lo que facilitaría más el método; la relación entre el diámetro del halo de células protegidas y el título del suero, lo que podría aumentar la economía y facilitar el estudio de las variantes antigénicas de las cepas, así como el análisis del comportamiento de dichas variantes ante las cepas primas, que tantas dificultades

presentan para su identificación, y el estudio del fenómeno no menos frecuente de cepas que se neutralizan con un conjunto de sueros y no lo hacen con los sueros individuales que lo integran.

De igual modo consideramos que el método de neutralización por discos debería aplicarse también a otros virus que producen placas, como es el caso de los arbovirus.

Resumen

Se propone un método para la identificación de enterovirus basado en la inhibición de placas por discos de papel secante impregnados con suero colocados sobre la superficie de una cubierta de agar. Dicho

método presenta varias ventajas sobre el método de neutralización del efecto citopatogénico tales como:

- Permite realizar una identificación más rápida y tan segura como la neutralización del efecto citopatogénico.
- La lectura final de los resultados es más fácil y definida.
- Es más económico por consumir menor cantidad de tiempo, de suero y de cristalería.
- Brinda mayor seguridad en el trabajo por ser los discos más fácilmente reconocibles, tener menor manipulación al efectuar las pruebas con lo que se evitan los riesgos de contaminación.

Se señalan algunos aspectos interesantes para continuar ensayándolo y la posibilidad de que se aplique a otros virus productores de placas como es el caso de los arbovirus. □

REFERENCIAS

<p>(1) Melnick, J. L. y H. A. Wenner. <i>Enteroviruses. Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections</i>. 4ª edición. Nueva York: American Public Health Association, Inc., 1969.</p> <p>(2) De Somer, P. y A. Prinzie. Poliomielitis virus neutralizing antibodies determination by filter paper discs on solidified bottle culture. <i>Virology</i> 4:387, 1957.</p> <p>(3) Farrell, L. N. y D. B. W. Reid. Disc-plate assay of poliomyelitis antibodies. <i>Can J Public Health</i> 50:20, 1959.</p> <p>(4) Kalter, S. S. Disc method for identification and titration of cytopathic viruses and detection of antibodies resulting from their infection. <i>J Lab Clin Med</i> 62:525, 1963.</p>	<p>(5) Melnick, J. L. y M. Benyesh-Melnick. Problems Associated with Live Poliovirus Vaccine and its Progeny after Multiplication in Man. En: <i>Live Poliovirus Vaccines. Papers Presented and Discussions Held at the Second International Conference on Live Poliovirus Vaccines</i>. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica 50. Washington, D. C., 1960.</p> <p>(6) Porterfield, J. S. A simple tissue culture technique for detection of yellow fever antibodies. <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> 53:310, 1959.</p> <p>(7) Porterfield, J. S. A simple plaque inhibition test for antiviral agents: Application to assay for Interferon. <i>Lancet</i> 2:326, 1959.</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Use of serum-impregnated paper disks in the identification of enteroviruses in tissue cultures (Summary)

A method is proposed for identification of enteroviruses based on plaque inhibition by absorbent serum-impregnated paper disks placed on the surface of an agar coating. This method offers a number of advantages over the method based on neutralization of cytopathogenic effects, since it:

- Allows more rapid and precise identification than neutralization of cytopathogenic effect.
- Permits easier and better defined readings of the final results.
- Is more economical, because it consumes less time, serum and glass laboratory equipment.

• Offers safer working conditions, since the disks are easily recognized and therefore receive less handling during tests, thus reducing the risks of contamination.

A number of interesting possibilities are mentioned for continued testing of the method, and its possible use is suggested in tests for other plaque-producing viruses such as the different forms of arbovirus.

Uso de discos de papel impregnados de soro para a identificação de enterovírus nas culturas de tecidos (Resumo)

Propõe-se um método para a identificação de enterovírus baseado na inibição de placas por discos de papel mata-borrão impregnados com soro e colocados sobre a superfície de uma cobertura de agar. Esse método oferece várias vantagens ao compará-lo com o método de neutralização do efeito citopatogênico, tais como:

• É mais econômico porque consome uma menor quantidade de tempo, soro e utensílios de vidro.

• Dá mais segurança durante o trabalho porque os discos são reconhecidos com mais facilidade, exigem menos manipulação durante os testes evitando assim os riscos de contaminação.

• Permite fazer uma identificação mais rápida, e tão segura como a neutralização do efeito citopatogênico.

• Indicam-se alguns outros aspectos interessantes que nos animam a continuar experimentando o método com a possibilidade de que se aplique a outros vírus produtores de placas como, por exemplo, no caso dos arbovírus.

• A leitura final dos resultados é mais fácil e definida.

L'utilisation de disques de papier imprégnés de sérum pour l'identification des entérovirus en culture de tissus (Résumé)

Une méthode est proposée pour l'identification des entérovirus, basée sur l'inhibition de plaques par des disques de papier buvard imprégnés de sérum et posés sur la superficie d'une couche d'agar. Cette méthode présente plusieurs avantages sur la méthode de neutralisation de l'effet cytopathogénique:

• Elle est plus économique en raison d'une moins grande consommation de temps, de sérum et d'instruments de laboratoire.

• Elle donne plus de sûreté dans le travail parce que les disques sont plus facilement reconnaissables et les manipulations moins nombreuses lorsqu'on effectue les examens, ce qui évite les risques de contamination.

• Elle permet de réaliser une identification plus rapide et aussi sûre que la neutralisation de l'effet cytopathogénique.

On signale d'autres aspects intéressants pour continuer à l'essayer et la possibilité de l'appliquer à d'autres virus producteurs de plaques comme c'est le cas pour les arbovirus.

• La lecture finale des résultats est plus facile et définie.