

PRUEBA DE MICRONEUTRALIZACION PARA ESTUDIOS DE ANTICUERPOS DE LA FIEBRE AFTOSA

Maria Elma V. Ferreira*

COMUNICACION BREVE

La prueba de microneutralización (MN) para el virus de la fiebre aftosa fue descrita por Wagner y McVicar (4). Los autores utilizaron las líneas celulares PK15, IB-RS-2 y BHK-21 Clon 13, además de cultivos primarios de tiroides y de riñón de bovino. En el sistema propuesto, después de incubación previa, se mezcló el suero-virus con la suspensión celular y se distribuyó en placas que de inmediato se incubaron a 37° C en estufa de ambiente húmedo, con 5% de CO₂. Los resultados se basaron en la observación microscópica del efecto citopático a las 48 horas de incubación. Las células BHK-21 demostraron ser las más adecuadas para este sistema.

En los laboratorios de América del Sur donde se trabaja con virus de la fiebre aftosa, incluyendo el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA), se utiliza la prueba de seroneutralización con cultivos de células en tubos. En este trabajo se proponen algunas modificaciones en la prueba de MN que posibilitan sustituir ventajosamente la prueba de seroneutralización en tubos, principalmente por la economía de material, de tiempo y de mano de obra y además por que permite analizar un número considerablemente mayor de sueros. Tiene las mismas ventajas operativas sobre la prueba de seroprotección en ratón lactante.

Tanto las células BHK-21 Clon 13 (3) como IB-RS-2 (1) cultivadas en monocamadas en botellas de Roux, se trataron con 1% de tripsina a pH 7,7 y después se suspendieron en medio Eagle modificado (3) con 10% de suero bovino. Las suspensiones con 300.000 células por ml se colocaron en las cavidades de las placas** a razón de 0,1 ml y, una vez cubiertas con una tapa de vidrio o de plástico que permite la circulación de aire, se incubaron a 37° C en estufa de CO₂. Transcurridas 24 horas, las monocamadas de células estaban aptas para ser utilizadas.

Se usaron las cepas de virus de la fiebre aftosa O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C₃ Resende. Las suspensiones virulentas correspondientes al 4º pasaje en células BHK-21, después de ser clarificadas por centrifugación y tituladas, se diluyeron en medio Eagle modificado. En seguida se distribuyeron en ampollas con 2 ml y se conservaron a -70° C hasta el momento del uso. Cada ml de suspensión contenía suficiente cantidad de virus para que, con apenas una dilución, se pudiesen realizar todas las pruebas de un día de trabajo.

** Placa de microprueba FALCON 3040.

* Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589-ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Los experimentos se realizaron con sueros de bovinos vacunados, no vacunados o convalecientes de fiebre aftosa, conservados a -20°C e inactivados a 56°C durante 30 minutos.

Las pruebas MN se realizaron mezclando 0,5 ml de suero en diluciones al doble con 0,5 ml de una suspensión virulenta que contenía aproximadamente 1.000 DICC₅₀. Como diluyente se utilizó medio Eagle modificado con 250 U de penicilina, 25 mg de estreptomina y 25 mg de Fungizona* por ml. El pH 7,2 del medio (2) con una solución 28 mM de tampón HEPES**. La mezcla suero-virus se incubó a 37°C durante 1 hora.

El medio de crecimiento de las células se eliminó invirtiendo las placas y secándolas con papel absorbente. A continuación, en cada cavidad se colocó 0,1 ml de la mezcla suero-virus que contenía aproximadamente 100 DICC₅₀ y después de tapadas se mantuvieron en la estufa de CO_2 . Transcurridas 48 horas, las placas se sumergieron durante 15 minutos en una solución acuosa con 5% de formalina y 0,1% de cristal violeta para fijar y teñir las células (Fig. 1).

La lectura se realizó por observación directa de las placas, después de enjuagadas con agua corriente. La dilución del suero que protegió 50% de las monocamadas, se calculó por el método de Spearman-Kärber.

No se observaron diferencias de títulos del virus entre las dos líneas de células estudiadas. Sin embargo, la lectura de la prueba fue más fácil cuando se utilizaron células IB-RS-2, por presentar mayor desprendimiento de la monocamada celular cuando hubo replicación del virus (Fig. 1). Por este motivo, se seleccionaron las células IB-RS-2 para pruebas de rutina. Además, estas células pueden ser cultivadas en medio Earle que es de bajo costo y que está al alcance de laboratorios con pocos recursos.

* Squibb.

** N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'2-Ethanesulfonic Acid.

El uso de monocamadas de células pre-formadas permitió reproducir con mayor fidelidad los resultados que con el método propuesto por Wagner y McVicar. Probablemente esto se debe a que las monocamadas pre-formadas presentan más uniformidad y se eliminan variaciones que pueden ocurrir en las primeras horas de formación de la monocamada celular. El empleo del tampón HEPES se considera importante para lograr resultados reproducibles ya que estabiliza el pH durante el período crítico de las primeras horas cuando se pegan las células y se forman las monocamadas.

También influye favorablemente la utilización de un virus que se conserva a -70°C y del cual, partiendo de una ampolla en una sola operación se prepara la dilución que se necesita para una jornada de trabajo.

La posibilidad que ofrece esta prueba de reproducir los resultados se estudió a través de un experimento con 14 sueros bovinos en los que para cada suero se repitió 5 veces la determinación del título de anticuerpos. En cada titulación se utilizaron 6 orificios por dilución. En estas condiciones se tiene una probabilidad de 95% de que una determinación cualquiera varíe alrededor del valor real en $\pm 0,22$ para los virus O₁ y C₃ y en $\pm 0,35$ para el virus A₂₄.

No se observaron diferencias significativas en los títulos de los sueros examinados con dosis de virus que variaron de 50 a 200 DICC₅₀. También se comprobó que la media para una confianza de 95% del número de DICC₅₀ durante 6 meses fue de 118 ± 22 , 100 ± 18 y 135 ± 22 para los tipos O, A y C respectivamente.

Sin embargo, se demostró que los títulos de los virus eran por lo menos dos veces más bajos cuando se utilizaron células recién retiradas de nitrógeno líquido y con pocos pasajes. Para tal motivo, las células nuevas fueron pasadas 5 ó 6 veces antes de realizar la prueba para lograr que el virus alcance al título previsto.

La formación de pequeñas placas producidas por algunas cepas del virus de la fiebre aftosa no interfirió en las lecturas (Fig. 1 b).

La prueba MN descrita en este trabajo no necesita de equipo especial, con excepción de una estufa de CO₂ y de placas de microprueba. A pesar de que las placas son descartables, pueden ser usadas varias veces, lo que compensa su precio elevado. No obstante, su lavado debe hacerse con mucho cuidado, teniendo la precaución de no rayar el

fondo de las cavidades.

Aún son necesarios mayores estudios para comprobar la sensibilidad y especificidad de esta prueba en relación con el estado inmunitario de los bovinos. Sin embargo, con el conocimiento adquirido en nuestros ensayos es posible obtener rápida información sobre el comportamiento de la vacuna antiaftosa a nivel de campo y realizar muestreos con centenas de sueros para vigilancia epidemiológica.

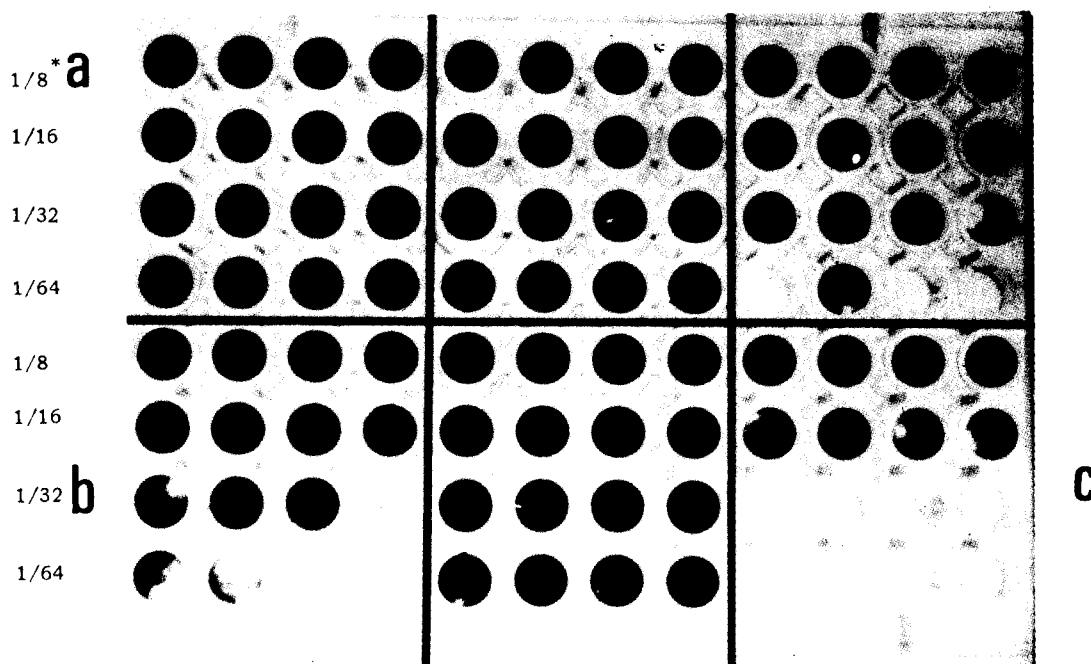


FIGURA 1. Prueba de microneutralización con células IB-RS-2. La utilización de 4 diluciones por suero y 4 orificios por dilución permite el estudio de 6 sueros. a) La presencia de monocamadas totalmente coloreadas indica la existencia de suficientes anticuerpos para neutralizar 100 DICC₅₀; b) formación de placas visibles, y c) el desprendimiento total de células indica la ausencia de anticuerpos.

* Dilución del suero.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Dr. Paul Suttmöller por su estímulo para que llevara a cabo este trabajo y al Dr. Vicente Astudillo por haber realizado el análisis estadístico.

REFERENCIAS

1. CASTRO, Maria Pereira de.
Clonal variation in the swine kidney cell line, IB-RS-2 in relation to morphology, karyotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 37 (2): 103-127, 1970.
2. HALLIBURTON, B.S.; BECKER, M.E.
The use of HEPES buffer in micro-tissue culture plates for routine enterovirus diagnosis. *Health Lab. Science* 8 (3): 155-159, 1971.
3. MACPHERSON, I.; STOKER, M.
Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16 (2): 147-151, 1962.
4. WAGNER, G.G.; McVICAR, J.W.
Foot-and-mouth disease virus antibodies. Comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice. *Appl. Microbiol.* 20 (6): 995-997, 1970.