

## TECNICA DE REDUCCION DE PLACAS EN DISCO PARA LA FIEBRE AFTOSA

Erby L. Massie\*

## INTRODUCCION

En la técnica de la prueba serológica que se describe se utiliza una forma modificada del principio de reducción de placas. Los materiales usados se encuentran disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos y pueden ser procesados por técnicos con experiencia limitada en las manipulaciones de otros procedimientos serológicos más complicados. Se emplea la modificación de la prueba de disco comunmente usada para evaluar antibióticos. Han sido efectuados numerosos ensayos en los cuales la sangre fue absorbida en un disco absorbente y enviada, ya sea seca como conservada en frío, a un laboratorio distante para ser procesada (1). El disco con la muestra puede ser usado tanto para aislar el virus como para determinar la presencia de anticuerpos. Las experiencias aquí presentadas se limitan al virus de la fiebre aftosa y circunscriptas a la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro de dicho virus. Por conveniencia se seleccionó este modelo inmunológico, pero la prueba puede realizarse lo mismo con otros tipos y cepas del virus aftoso. El único tejido de cultivo usado en estas experiencias fue el de BHK.

Todas las pruebas fueron realizadas en los laboratorios del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, pero, también pueden ser llevadas a cabo en cualquier otro laboratorio, aun aquellos con facilidades limitadas.

## MATERIALES Y METODOS

*Cepa de virus*

Se seleccionó la cepa Cruzeiro del virus aftoso tipo A Vallée, subtipo A<sub>24</sub> atenuada por 130 pasajes en embrión de pollo y tres pasajes en BHK\*\*.

*Cultivo de tejidos*

Fueron usadas solamente monocamadas de cultivo de tejidos BHK-21, C-13. Se utilizó medio Eagle modificado con suero para el desarrollo de las monocamadas hasta el punto en que aparecieron placas celulares completas (2) y antes de ser usadas, el medio fue retirado de las botellas a ser utilizadas en la prueba de reducción de placas. La camada fue recubierta con una mezcla de agar, consistente en 1% de agar (Difco) y una

\* Pertenece a la Fuerza Aérea de los Estados Unidos de Norteamérica.

\*\* El virus fue cortesmente suministrado por el Dr. Carlos Bernal López, del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

solución Earle que contenía 0,22%  $\text{NaHCO}_3$  y 0,25% de hidrolisado de lactalbúmina sin suero. Esta capa de agar "overlay" y la técnica fueron descriptas en trabajos anteriores (2). Todas las monocamadas a ser usadas en la prueba de reducción de placa en disco, desarrollaron en botellas de dilución de leche con una abertura de 2 cm de diámetro, cerradas herméticamente con tapones de goma. Fueron preparadas monocamadas celulares con "overlay" y almacenadas hasta un máximo de 8 horas antes de ser usadas.

Los cultivos de tejido BHK para pruebas de seroneutralización con virus constante-suero variable fueron desarrolladas en tubos de cultivo de tejido de 12,5 x 1,5 cm con tapón de goma. Antes de ser usado el medio de desarrollo fue retirado y reemplazado por medio de Eagle modificado sin suero.

#### *Producción de anticuerpos*

En esta experiencia fue necesario disponer de sueros específicos libres de anticuerpos residuales. Dichos sueros no podrían ser utilizados si procedieran de animales que hubieran padecido la enfermedad. En circunstancias normales el procedimiento debe funcionar también con sueros bovinos provenientes de casos clínicos. Para las investigaciones que describimos el conejo parecería ser el animal ideal para la producción de anticuerpos.

La cepa de virus aftoso  $A_{24}$  Cruzeiro se desarrolló en cultivo de tejido BHK y después de la aparición del efecto citopático (EC), el sobrenadante fue inculado, sin diluir, por vía intravenosa en 5 conejos adultos. El título del antígeno en tubos de cultivos BHK fue de  $10^{-5,2}$  por ml. Se efectuaron inoculaciones diarias durante cinco días en cantidades de 1, 2, 4, 8 y 10 ml, en este orden. Los animales fueron sangrados a los 20 días y los sueros fueron recogidos, congelados y almacenados para usarlos posteriormente en las experiencias. Ninguno de los conejos murió durante el período de producción de anticuerpos, pero todos los animales presentaron viremia, que en algunos casos duró hasta el momento de la sangría (20 días).

#### *Disco absorbente*

Los discos usados en estas experiencias son de papel altamente absorbente, con un diámetro de 12,7 mm. Son manufacturados por Schleicher and Schüll Company y se expenden con el nombre de fábrica de discos "SS" para ensayos de penicilina y otras sustancias antibacterianas. Estos discos son comunmente utilizados en laboratorios clínicos y han sido descriptos detalladamente en la literatura (3).

#### *Técnica de ensayo de anticuerpos*

La cepa del virus aftoso empleada en el ensayo de placas fue titulada inicialmente por dilución del virus con medio de Eagle para cultivo de tejido, en forma seriada de 1:10 hasta 1:160. Se colocó aproximadamente 1 ml de cada dilución de virus en cada caja de Petri y a la mezcla se adicionaron discos previamente esterilizados. En pocos segundos cada

disco absorbió 0,1 ml de líquido, en este caso mezcla de virus. A continuación, los discos fueron retirados de estas cajas con un ansa bacteriológica y puestos sobre la superficie de agar previamente descripta. Las botellas fueron cerradas con tapones de goma y los discos sobre las monocamadas permitieron que el virus absorbido pasara a las capas de células inferiores a través del agar. Las botellas fueron incubadas durante 48 horas a 37° C y después las monocamadas se fijaron con formalina al 10% durante 20 minutos. En seguida, los cultivos fueron teñidos con cristal violeta a 1% de la manera descripta por Crandell y Gomes (4). El virus produjo una única placa grande y clara poco mayor que el diámetro del disco. Las placas fueron definitivas y los puntos finales exactos y claros. En el caso de este virus la placa se produjo en una dilución no más elevada que 1:80. Se decidió usar la dilución de virus de 1:20 como dosis de prueba (DPV).

Los sueros empleados en este ensayo fueron retirados del congelador, descongelados e inactivados a 56° C durante 20 minutos. La inactivación por el calor es especialmente importante porque los sueros a menudo contienen virus procedentes de viremias que suelen aparecer asociadas, ya sea con la hiperinmunización de los conejos o con la ocurrencia de casos clínicos de enfermedad aftosa. Después de enfriados, los sueros son diluidos en diluciones dobles comenzando con 1:10 y continuando hasta que se desee.

En tubos esterilizados pequeños se colocó 0,5 ml de dilución de suero más 0,5 ml de DPV (en este caso una dilución 1:20) e incubados a 4° C durante 30 minutos. Cada dilución de suero y la DPV se colocaron en una caja de Petri, o cualquier otro recipiente adecuado, donde se adicionaron 3 discos estériles. Los discos son retirados y colocados sobre los "overlay" en la manera anteriormente descripta. La falta de producción de placa o la formación de placas de tamaño menor que la mitad de la placa de control fue considerada positiva para la presencia de anticuerpos.

Para cada prueba efectuada por la reducción de placa modificada se realizó un ensayo paralelo en tubos de cultivos celulares BHK. Se empleó el esquema serológico de virus constante (200 DICT<sub>50</sub>) con igual cantidad de suero diluido. La DPV más suero fueron incubados antes de la inoculación en los tubos de monocamadas de BHK, de la misma manera que fue descripto para la técnica de reducción de placas.

## RESULTADOS

La técnica de reducción de placas en disco ya ha sido empleada para el análisis antigénico para las cepas de poliovirus y demostró ser de gran utilidad práctica (1 y 5). Resultados igualmente promisorios se obtuvieron con el virus aftoso. Alícuotas de cada dilución de suero fueron probadas simultáneamente tanto con la técnica virus constante-suero variable y la técnica de placa en disco (Fig. 1). Los cinco conejos empleados en este estudio fueron hiperinmunizados en la forma anteriormente descripta. Este gráfico (Fig. 1) representa la media de las cinco reacciones. Se hicieron pruebas simultáneas con los sueros antes y después de la inoculación por las dos técnicas de neutralización mencionadas anteriormente. Con las dos técnicas los sueros de control indicaron

una actividad antiviral baja, en cambio hubo una diferencia significativa entre los títulos de los sueros hiperinmunes.

Se calcularon los puntos finales 50% seroneutralización (Método de Reed y Muench) y se demostró que la prueba de suero variable-virus constante tituló  $10^{-2,2}$  y que la técnica de reducción de placas en disco tituló  $10^{-2,8}$ . Esa es una diferencia de  $10^{-0,6}$ , o un aumento de sensibilidad de la técnica de placa de 4 veces sobre el método comunmente usado de virus constante. Se sabe que la técnica de virus constante-suero variable es más sensible que la de neutralización de suero constante-virus variable, lo que significa que la técnica de placa puede ser una de las pruebas de ensayo de neutralización más sensibles hechas en el laboratorio.

La figura 2 muestra el tipo de reacciones que pueden aparecer. Las placas de la botella **A** indican que el suero era negativo y en consecuencia no era un neutralizante efectivo: el virus penetró el "overlay" produciendo áreas claras en la monocamada, ligeramente mayores que un disco. Una neutralización completa se puede apreciar en la botella **B** por la ausencia de placas, con una dilución de virus de 1:20 y una concentración de suero de 1:40, hecho típico de una prueba positiva de reducción de placa. En la botella **C** se puede apreciar alguna evidencia de la interferencia con el virus, pero no hay neutralización completa. Este grado de reducción de placas sería considerado como positivo y en la realidad representa una dilución del suero de 1:320 con una concentración de virus de 1:20.

#### CONCLUSION

La prueba de reducción de placa en disco ofrece una técnica nueva para hacer un ensayo serológico. La prueba convencional de reducción de placa hace mucho tiempo que está aceptada como un procedimiento serológico sensible, pero con aplicación limitada, debido a las dificultades propias del recuento y registro de cada placa en el laboratorio y de la estandarización del recuento. Un técnico especializado demora pocos minutos en evaluar una única placa pero puede demorar horas para completar una prueba. Los resultados de la prueba de reducción de placa en disco pueden ser leídos en pocos segundos con muy poco esfuerzo, puesto que se trata de una única placa y no de muchas placas pequeñas. El equipo empleado en esta prueba es muy común, no siendo necesario equipos más especializados tales como incubadoras de  $CO_2$ , o contadores de placas, u otros aparatos. El equipo usual existente en la mayoría de los laboratorios clínicos será suficiente. Un técnico con alguna experiencia puede hacer esta prueba con un mínimo adiestramiento.

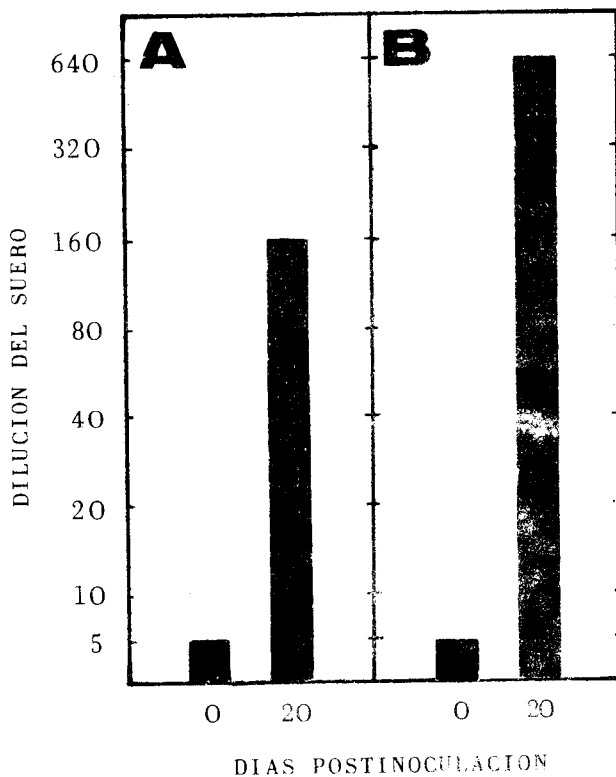
El propósito de este trabajo es presentar una técnica que pueda ser desarrollada y empleada como un instrumento en el estudio de la fiebre aftosa.

La cepa de virus aftoso  $A_{24}$  Cruzeiro fue seleccionada por ser conocida como la más pobre formadora de placas de todos los virus aftosos comunes en la América Latina. La prueba de reducción de placa funcionó bien con este virus y debe funcionar todavía mejor con otras cepas. Para evaluar la idea se hacía necesario un suero específico. Para estas pruebas los sueros empleados fueron provenientes de conejos y este animal

fue escogido solamente por conveniencia por cuanto los conejos estaban disponibles y pudieron ser mantenidos en un pequeño espacio en el laboratorio. Aun cuando en el CPFA este problema no es crítico, debe ser tomado en consideración. No hay ninguna razón para no hacer esta prueba con sueros bovinos.

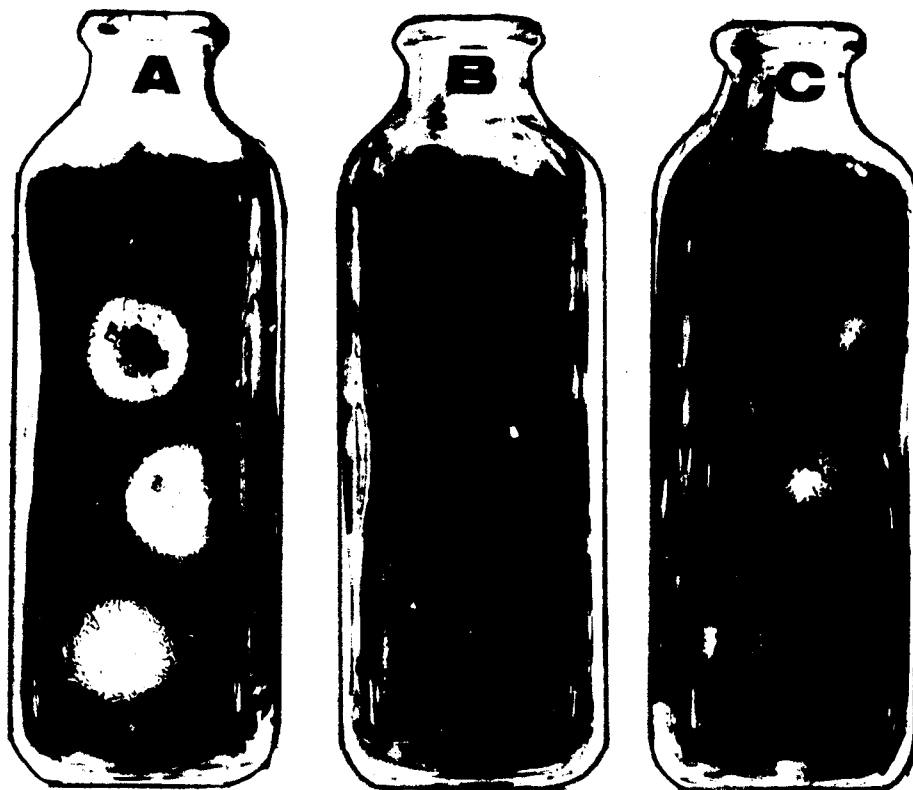
En la opinión del autor esta prueba es muy adecuada para ser empleada en la medicina veterinaria de bovinos. Puede ser un instrumento de valor e incluso ser utilizado en pruebas de campo más elaboradas. Tal vez alguien se interese en perfeccionar la técnica y posiblemente entre a formar parte de las pruebas de sueros utilizados corrientemente.

FIGURA 1



- A - Sueros de conejos inmunizados con virus aftoso cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro en los que se investigaron los anticuerpos usando la técnica de virus constante-sero variable.
- B - Los mismos sueros pero analizados por la técnica de reducción de placas en disco.

FIGURA 2



Tipo de reacciones de placa en disco del virus aftoso cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro en monocamadas de cultivo BHK.

Botella "A": reacción negativa; Botellas "B" y "C": reacción positiva.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) KALTER, S.S. A disc method for titration for neutralization of poliovirus. *Fed. Proc.* 16: 419, 1957.
- (2) BACHRACH, H.L. *et al.* A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction. *Virology* 4: 224-236, 1957.
- (3) VINCENT y VINCENT. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 55: 3, 1944.
- (4) CRANDELL, R.A., GOMES, I. Plaque morphology of some South American strains of foot-and-mouth disease virus and the effect of polyionic compounds on plaque formation. *Arch. ges. Virusforsch.* 30; 137-146, 1970.
- (5) MELNICK, J.L. Problems associated with the use of live poliovirus vaccine. *AJPH.* 50: 1013-1031, 1960.