

PRUEBA DE NEUTRALIZACION POR REDUCCION DE PLACAS
PARA LA EVALUACION DE ANTICUERPOS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

P. Augé de Mello*

COMUNICACION BREVE

[La prueba de neutralización por reducción de placas (NRP) para estudios en fiebre aftosa fue descrita por McVicar *et al.* (4). Utilizaron cultivos secundarios de células de riñón bovino, con 6 días de incubación, cultivados en placas plásticas descartables y, como "overlay", 0,6% de goma Tragacanth (5). Veinte horas después de la inoculación de la mezcla muestra-virus, conteniendo 40-50 unidades formadoras de placas (UFP) del virus de la fiebre aftosa, las células fueron fijadas y teñidas y el resultado expresado como el log de la recíproca de la dilución de la muestra que neutralizaba 73% de las UFP.

[Las células BHK-21 Clon 13 e IB-RS-2 con "overlay" de agar han sido utilizadas durante varios años en los trabajos de rutina del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA). Con el inicio de los estudios epidemiológicos, que incluyen grandes cantidades de muestras, fue necesario introducir técnicas más prácticas y que permitiesen resultados más rápidos.]

La NRP fue adaptada a las facilidades de nuestros laboratorios para alcanzar ese objetivo. La utilización de las células IB-RS-2 cultivadas en placas de vidrio montadas en cajas de aluminio y el uso de gomas disponibles en el mercado local tornó posible su aplicación en forma de rutina para estudios epidemiológicos de acuerdo con nuestras condiciones.

Células IB-RS-2 Clon 17 (1) fueron cultivadas en placas de Petri 15 x 60 mm. Cada placa fue sembrada con $1,2 \times 10^6$ células con 6 ml de medio Eagle modificado (2) conteniendo 10% de suero bovino inactivado. Las placas fueron montadas en cajas de aluminio especialmente confeccionadas para contener 6 fondos o 4 tapas (Figs. 1 y 2). La incubación se hizo en atmósfera humidificada y con 5% de CO₂, a 37° C durante 48 horas.

Las muestras en estudio, previamente inactivadas a 56° C por 30 min (suero bovino o material esofágico-faríngeo) fueron diluidas, en serie, en medio Eagle modificado conteniendo 28 mM de ácido N-2 hydroxyethyl-piperazine-N'2 ethane-sulfonic (HEPES). Para cada dilución de la muestra se adicionó igual cantidad de suspensión de virus de tal forma que la mezcla muestra-virus contenía 50-60 UFP por 0,1 ml. La mezcla muestra-virus se incubó en bañomaría durante 30 min a 37° C.

Retirado el medio de cultivo de las células, la dilución correspondiente muestra-virus fue inoculada en cantidad de 0,1 ml por placa de Petri y el contacto virus-célula se mantuvo durante 30 min en estufa CO₂ a 37° C con movimiento ocasional para redistribución del inóculo.

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

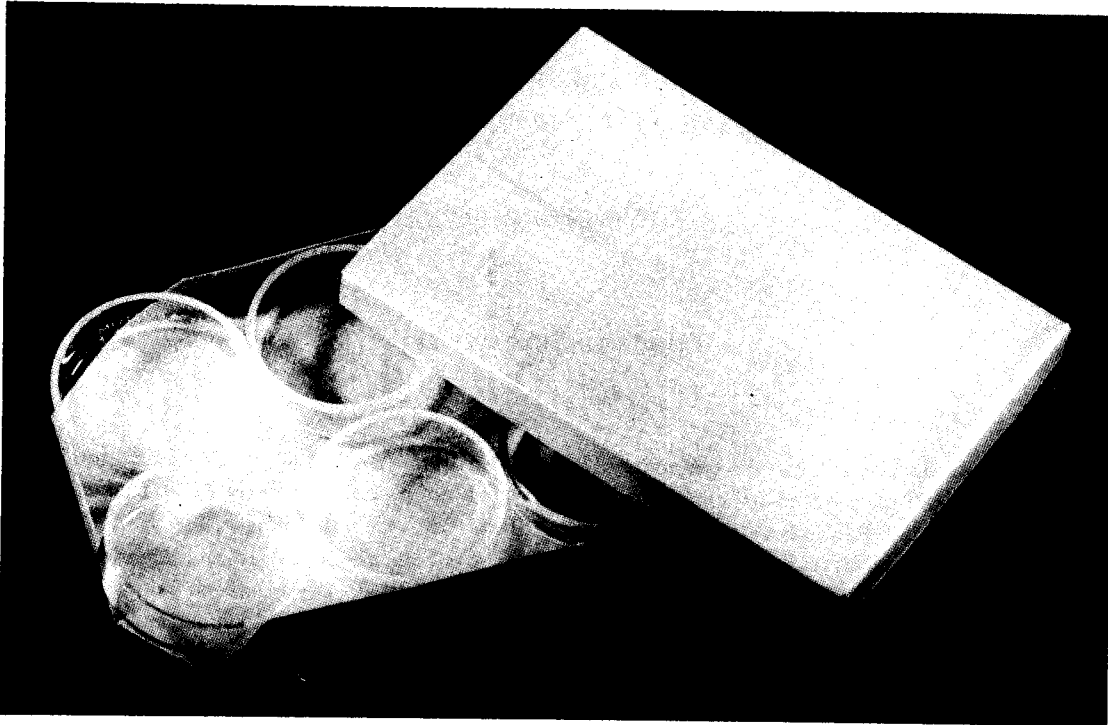


FIGURA 1. Caja de aluminio confeccionada para contener 6 fondos.

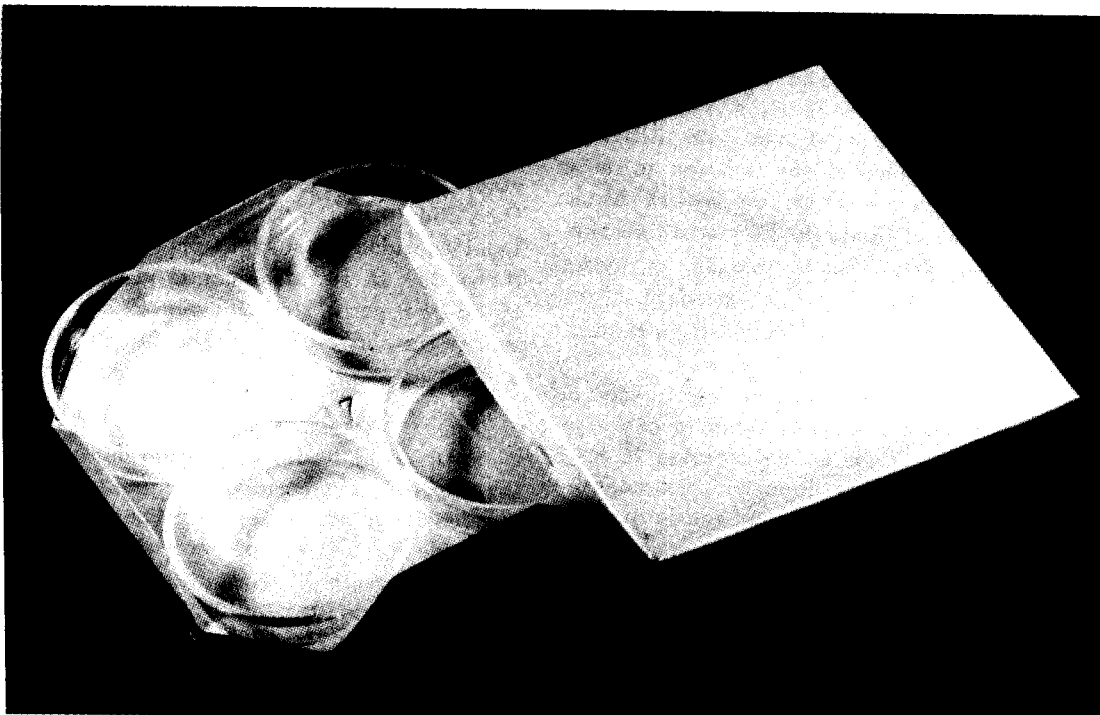


FIGURA 2. Caja de aluminio confeccionada para contener 4 tapas.

Fueron utilizados dos tipos de goma encontrados en el mercado local con los nombres de Adragante* y Karaya** (3). La preparación de las gomas para ser usadas como "overlay" se hizo de la siguiente forma:

Goma Adragante

La goma adragante se preparó a la concentración de 2,5% (p/v) disolviendo el polvo, con fuerte agitación, en agua desmineralizada previamente calentada a 50° C. Una vez formada una solución coloidal de aspecto homogéneo, se adicionaron 2,5 ml de rojo de fenol a 1% (p/v) por litro de solución y enseguida se llevó al autoclave a 120° C durante 20 min. Después de la esterilización la solución fue conservada a 4° C. En el momento de uso la goma fue pre-calentada a 37° C, agregándose igual cantidad de medio Earle 2 x concentrado conteniendo 500 U.I. de penicilina, 1 mg de estreptomycin y 5,0 mg de Fungizona por ml.

Goma Karaya

La goma karaya se preparó al 2% (p/v) en agua desmineralizada de la misma forma descrita para la goma adragante. En el momento de uso y después de haberle adicionado igual cantidad de medio Earle 2 x concentrado conteniendo antibióticos, el pH de la solución fue ajustado a 7,4-7,6 por medio de NaHCO_3 a 7,5%, necesitando agregar aproximadamente 10% de NaHCO_3 para alcanzar el pH deseado.

La goma (adragante o karaya) se depositó en cantidad de 3 ml por placa y enseguida incubada en estufa durante 24 horas a 37° C en atmósfera humidificada y con 5% de CO_2 . Durante ese período se tuvo la precaución de no mover las placas de Petri para evitar la

formación de placas "cometas" como se puede ver en la Fig. 4 arriba y a la derecha.

Transcurrido el período de incubación, las células fueron fijadas por 30 min con una solución de formol a 20%, lavadas en agua corriente y teñidas durante 10 min con cristal violeta a 0,5% en una solución de alcohol etílico a 20% en agua destilada. El colorante fue recuperado y las células lavadas en agua corriente.

Después de la lectura de las placas los resultados se expresaron en porcentaje de neutralización de las UFP calculado según fue descrito por McVicar *et al.* (4): 1) cálculo del % de reducción del número de las UFP en cada dilución de la muestra; 2) transformación de los porcentajes en probits; 3) cálculo de la línea de regresión de los probits; 4) cálculo del título de la muestra sobre la base del 73% de reducción de las UFP. En nuestro caso optamos por 70%.

Los resultados obtenidos con las gomas adragante y karaya en las concentraciones de 1,25% y 1% respectivamente fueron similares. No se observaron señales de toxicidad para las células IB-RS-2 las que siempre presentaron buen aspecto y sobrevivieron más tiempo cuando fueron comparadas con las de "overlay" estándar de agar. Por otro lado, la utilización de estas células con "overlay" de goma permitió que el virus de la fiebre aftosa formara placas bien definidas en solamente 24 horas (Figs. 3 y 4), lo que no ocurre con las células BHK-21 Clon 13. Además, los títulos obtenidos, comparados con los de agar, fueron siempre iguales o superiores y por esa razón pasamos a utilizarla para las titulaciones de virus de la fiebre aftosa en forma rutinaria.

El uso de bandejas de aluminio para montaje de las placas de Petri aumentó el rendimiento de las placas, simplificó el trabajo y permitió un mejor aprovechamiento de la capacidad útil de las estufas de CO_2 .

* Adragante es lo mismo que Tragacanth - goma derivada de varias especies de la planta *Astragalus*.

** Karaya - goma derivada de varias especies de la planta *Sterculia*.

Con las modificaciones introducidas fue posible adaptar la prueba de NRP para uso en rutina como también utilizarla en titulaciones de virus de la fiebre aftosa de modo práctico y económico, con lectura en sólo 24 horas.

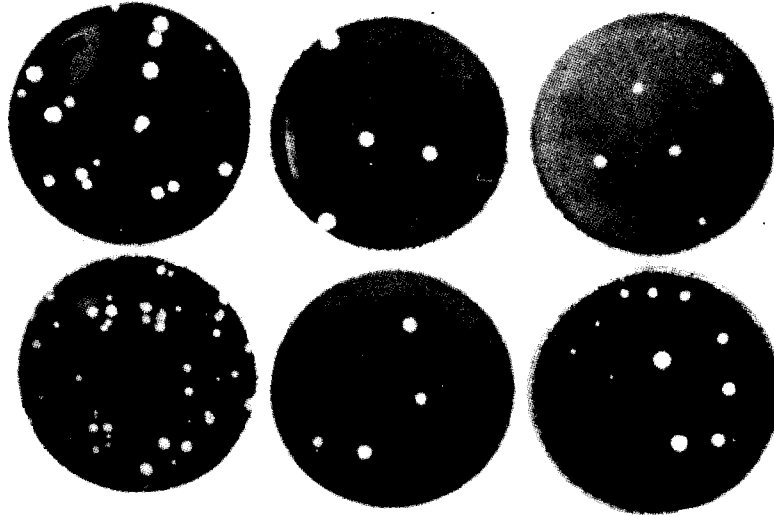


FIGURA 3. Placas producidas por el virus de la fiebre aftosa tipo O en las células IB-RS-2 con "overlay" de goma en 24 horas de incubación.

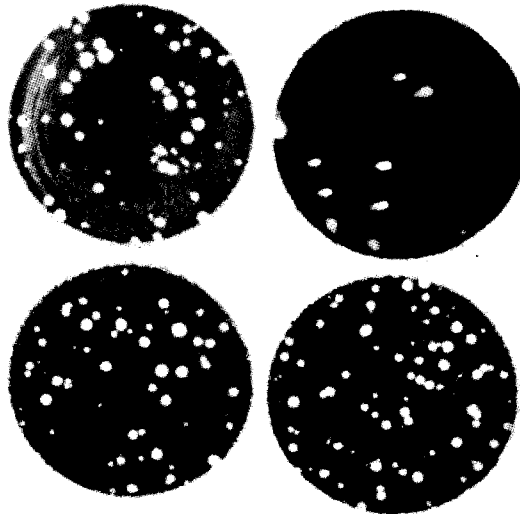


FIGURA 4. Placas producidas por el virus de la fiebre aftosa tipo O en las células IB-RS-2 con "overlay" de goma en 24 horas de incubación; en la placa superior derecha se observa el desarrollo de "cometas".

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Dr. Paul Sutmoller por sugerir el presente trabajo y al Sr. Pedro J. Vieira por la asistencia técnica prestada.

BIBLIOGRAFIA

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. MACPHERSON, I.; STOCKER, M.
Polyoma transformation of hamster cell clones - An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16: 147-151, 1962.
3. MANTEL, C.L.
"The water soluble gum". Reinhold, New York, 1947.
4. McVICAR, J.W.; SUTMOLLER, P.; ANDERSEN, A.A.
Foot-and-mouth disease virus: plaque reduction neutralization test. *Arch. ges. Virusforsch.* 44 (2): 163-172, 1974.
5. MIRCHAMSY, H.; RAPP, F.
A new overlay for plaquing animal virus. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. York 29 (1): 13-17, 1968.