

LA PRUEBA DE MICROFOCOS FLUORESCENTES: UNA NUEVA TÉCNICA IN VITRO PARA TITULACIÓN Y SERONEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS RÁBICO

M.V.Z., M.S. ELÍSEO M. HERNÁNDEZ B.¹
D.V.M., Ph. D. GOSSE BIJLENGA.²

Resumen

Se desarrolló una nueva técnica para titular cepas de virus adaptadas a cultivos celulares y se modificó esta técnica para efectuar pruebas de reducción de microfocos fluorescentes con el fin de titular niveles de anticuerpos en sueros de animales vacunados. Ambas pruebas son sencillas de efectuar y de evaluar. Las técnicas descritas tienen una sensibilidad superior a las pruebas convencionales en ratones y además se pueden efectuar en un corto plazo (30 horas).

Introducción

El virus de la rabia ha sido adaptado a cultivos de origen no nervioso desde hace algún tiempo (Kissling, 1958). A partir de entonces, algunos investigadores han desarrollado vacunas de origen de cultivo de tejidos (Kissling y Reese 1963, y Abelseth 1964), así como pruebas para la titulación de cepas de virus rábico, adaptadas a cultivos de tejidos (King, Groghan y Shaw, 1965; Sedwick y Wiktor, 1967). La técnica de King, Groghan y Shaw (1965) no es adecuada para titulación de virus, pues tiene una sensibilidad muy baja: en seroneutralización, usan una cantidad de virus muy alta, lo cual afecta la sensibilidad de la prueba, llevando a cabo una adsorción muy prolongada (dos horas) y empleando tres días antes de hacer la lectura. Este periodo es demasiado largo. La técnica descrita por Sedwick y Wiktor (1967) da buenos resultados, pero es compleja y por lo tanto, resulta poco accesible a laboratorios que no cuentan con el equipo adecuado y personal adiestrado para efectuarla e interpretarla.

La técnica de microfocos fluorescentes aquí descrita, tiene la ventaja de requerir menos tiempo, menos equipo y por lo tanto, ser un poco más accesible a laboratorios poco equipados.

Las técnicas *in vitro* tienen ventajas sobre las técnicas de titulación y seroneutralización

Recibido para su publicación el 13 de diciembre de 1972.

¹ Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, km 15.5 Carretera México-Toluca. Secretaría de Agricultura y Ganadería.

² Investigador del Proyecto de Investigación sobre Rabia Paralítica FAO/INIP por parte de las Naciones Unidas.

en ratones, recomendadas por Atanasiu (1966) en las cuales se requieren cuartos separados del laboratorio principal, un gran número de ratones y un período de 14-21 días de observación. No siempre es posible hacer el diagnóstico de rabia en los ratones muertos durante la prueba, de modo que a veces se incluyen en los resultados las muertes no específicas. Las pruebas son poco confiables por el reducido número de unidades experimentales incluidas en cada dilución (generalmente cinco ratones por dilución). Por otra parte, las pruebas *in vitro* son más accesibles a la estandarización, el número de unidades experimentales incluidas en cada prueba (número de células) es mayor, y por lo tanto son pruebas más confiables, y de mayor sensibilidad. El uso de las pruebas *in vitro* está restringido, en el caso de virus de rabia, a cepas adaptadas a cultivos celulares.

Material y métodos

Línea celular: Se usó una línea celular de fibroblastos embrionarios de murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*). Esta es una línea celular desarrollada en nuestro laboratorio. También se utilizó la línea celular BHK-21 de origen de riñón de hamster lactante (Stoker y MacPherson, 1964).

Cepas de virus: para las titulaciones se emplearon dos cepas principalmente, la V319 de origen de murciélago vampiro y la cepa Mazatán de origen de cerebro bovino, muerto de derriengue. Ambas cepas fueron aisladas y adaptadas a cultivos celulares en nuestro laboratorio.

Para las pruebas de reducción de placas, se usaron una clona de la cepa ERA (Abelseth, 1964) y nuestra cepa V319.

Técnica de titulación: Las células formando un monoestrato se tripsinizaron. se determinó el número de células presentes, haciendo una dilución apropiada, contándolas en una cámara cuentaglóbulos de Neubauer modificada. Se ajustó la concentración de células a 300.000 por ml en medio de crecimiento, que consistía de medio de Eagle (Eagle. 1959) con sales de Earle, adicionado de 10% de suero fetal inactivado de bovino y antibióticos. Las células se cultivaron en tubos de Leighton, conteniendo un cubreobjetos de 11 x 22 mm cada uno. Los cubreobjetos habían sido previamente lavados con acetona y alcohol etílico para permitir el crecimiento de las células. Se sembró cada tubo con 1.5 ml de la suspensión de células antes descrita.

Los tubos se revisaron diariamente en un microscopio invertido. Cuando el monoestrato completo se había formado (aproximadamente en tres días) se procedió a la infección.

Para infectar los tubos, se desechó el medio de crecimiento, se lavaron dos veces las células con solución salina fosfatada (SSF) y se infectaron los tubos, usando dos tubos por dilución decimal de la cepa de virus por titular. Los monoestratos fueron infectados con 0.1 ml de la dilución correspondiente. El medio con que se efectuaron las diluciones, consistió de medio Eagle con sales de Earle, suplementado con 2% de suero fetal inactivado de bovino, 50 microgramos de DEAE dextrán^a por ml y antibióticos (Kaplan *et al*, 1967). Se efectuaron series de titulaciones repetidas con y sin DEAE dextrán y se efectuaron pruebas de toxicidad del producto para los monoestratos.

Los tubos infectados se incubaron a 36° C durante una hora, a fin de permitir la adsorción del virus a las células. Al terminar este período de una hora, se desechó el medio de infección, conteniendo el virus residual no adsorbido y se lavaron nuevamente los monoestratos con dos cambios de SSF, cubriéndose por último con 1.5 ml de medio de mantenimiento, conteniendo medio Eagle con 2% de suero fetal de bovino y antibióticos. Cuando se usaron monoestratos de células BHK-21, todos los medios empleados contenían la concentración de suero expuesta, pero consistían de medio BHK-21, enriquecido con 10% de caldo triptosa fosfatado (MacPherson y Stoker, 1962).

El tiempo óptimo para hacer la lectura se determinó en pruebas seriadas de titulación, sacando las laminillas a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas. No se hicieron pruebas a tiempos mayores de 60 horas, debido a que los monoestratos se hacían grumosos y mostraban tendencia a desprenderse como una película completa. En vista de que el tiempo óptimo para la tinción se encontraba en el período comprendido entre las 24 y las 36 horas, se hizo una serie de experimentos para determinar el tiempo más apropiado.

Cuando hubo transcurrido el tiempo apropiado después de la infección, los monoestratos infectados fueron lavados dos veces con SSF, retirando los cubreobjetos conteniendo monoestratos de células en su superficie, dejándose secar al aire y cortándolos en tres partes de 11 x 7 mm cada una. Una parte de cada cubreobjeto era teñida con la técnica de anticuerpos fluorescentes (Coons y Kaplan, 1950; Dean. 1966) y eran montados en Elvanol en posición invertida (con la cara conteniendo las células hacia abajo, en contacto con el Elvanol y sobre el portaobjetos).

La lectura de las laminillas se efectuó en un microscopio de fluorescencia, contándose el número de microfocos fluorescentes que se encontraban en un área de 77 mm². Un microfoco fluorescente se consideró desde una célula claramente infectada hasta un grupo de cuatro o más células, en tanto que cada área fluorescente se encontraba aislada de las demás. En las diluciones bajas ocurría con frecuencia que la mayor parte del monoestrato se encontraba infectado. En este caso, se anotaba como "confluyente".

El título de virus se expresó en unidades formadoras de microfocos fluorescentes por mililitro de la suspensión concentrada (UFM/ml).

También fue posible usar cajas de petri de plástico desechables, para cultivos de células de 60 mm de diámetro en esta prueba. En este caso se usaban 5 ml de medio de cultivo por caja y los cubreobjetos se cortaban desde un principio de 11 x 7 mm, colocándose tres o cuatro en cada caja de petri. En este caso, se usaron dos cajas por dilución. Las cajas de petri se mantuvieron en estufa con flujo continuo de aire con 5% de CO².

^a DEAE dextrán, Pharmacia, Upsala, Suecia. Con peso molecular aproximado de 2 x 10⁶.

La prueba en caja de petri tuvo la ventaja de que se pudieran extraer laminillas mantenidas bajo las mismas condiciones, a diferentes tiempos después de la infección.

Las partes de cada laminilla que no se teñieron, se guardaban secas en congelación para el caso de que fuera necesario hacer otra tinción, por haber salido mal la primera o bien para el caso de que fuera necesario rectificar o confirmar una prueba.

Para las pruebas de seroneutralización, (prueba de reducción de microfocos) se utilizó una dilución constante de virus, capaz de producir aproximadamente 100 microfocos por laminilla en las condiciones de la prueba. Esta dilución constante de virus se mezcló

con la dilución apropiada de los sueros inactivados por titular, se incubó la mezcla a 36° C durante una hora y se procedió a manejar los monoestratos en la forma antes descrita.

El título de seroneutralización se calculó de acuerdo con el método de Reed y Muench (1938) y los límites de confianza al 90% fueron calculados de acuerdo con la técnica de Pizzi (1950).

Resultados

Se determinó que el tiempo óptimo para sacar las laminillas para teñir, era de 30 horas (Cuadro 1), debido a que antes de este período, los microfocos no se habían desarro-

CUADRO 1

Determinación del tiempo óptimo para hacer la lectura de la prueba.

Tiempo después de la infección (horas)	Abundancia de fluorescencia	Formación de focos secundarios
12	±	-
24	++	-
36	+++	+
48	++++	++
60	++++	++++

- Ausente
± Dudosa
+ Escasa
++ Moderada
+++ Abundante
++++ Muy abundante

CUADRO 2

Comparación del número de microfocos observados con y sin DEAE dextrán en el medio de infección

Dilución de virus	Medio de infección	
	Sin dextrán	Con dextrán
10 — 1	200+	400
10 — 2	22	50
10 — 3	1	10
10 — 4	0	5
10 — 5	0	1

+ No. de Microfocos

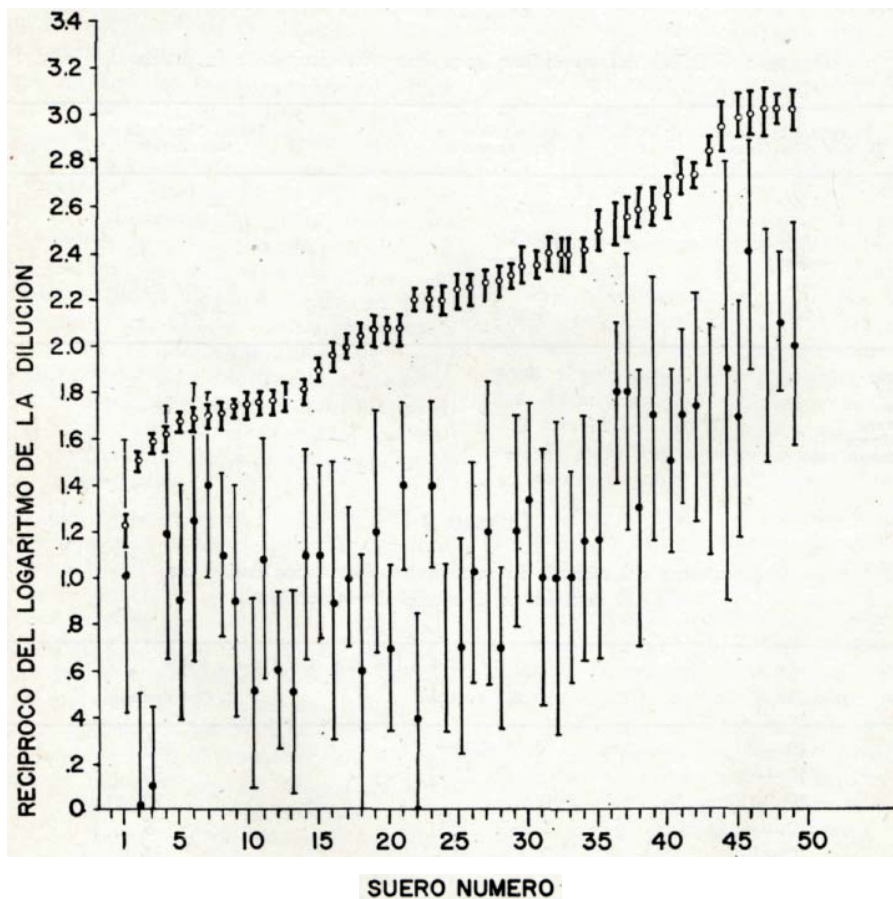
llado lo suficiente y en un período superior a las 30 horas, empezaba la formación de focos secundarios que arrojaban un dato falso.

El uso del DEAE dextrán, produjo un aumento considerable en el número de microfocos fluorescentes observados en cada dilución (Cuadro 2). En vista de estos resultados, se decidió continuar usando el DEAE dextrán en las titulaciones subsecuentes y en forma rutinaria.

Una de las características de las titulaciones de virus puede observarse en el Cuadro 2, en el sentido de que el número de microfocos no es predecible de una dilución a otra. Por ejemplo, en la dilución 10^{-3} con dextrán, se observaron 10 microfocos y cabría, en toda lógica, esperar un solo microfoco en la dilución 10^{-4} y sin embargo, se observaron cinco. Esta respuesta sigmoide hace difícil la determinación exacta del título y es por esta

FIGURA 1

GRAFICA DE LOS VALORES DE SERONEUTRALIZACION OBTENIDOS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION EN RATONES Y PRUEBA DE REDUCCION DE MICROFOCOS. LOS TITULOS ESTAN EXPRESADOS COMO UN VALOR MEDIO (OBSERVADO) Y LOS LIMITES DE CONFIANZA AL 90% DE CADA TITULACION (CALCULADOS).



razón que métodos estadísticos como el de Pizzi (1950) se hacen necesarios.

En la gráfica núm. 1, se hace la comparación de la prueba de seroneutralización en ratones con la prueba de reducción de microfocos. El título de cada suero está expresado como valor observado y los límites superior e inferior de confianza, al 90%. Puede notarse que los límites de confianza en la prueba de seroneutralización son muy amplios, en comparación con valores más reducidos para la prueba de reducción de microfocos. En ambos casos, los límites de confianza se hacen más amplios a medida que los títulos de anticuerpos en los sueros son mayores. Existe una relación estrecha entre ambas pruebas en todos los sueros probados en este experimento.

Discusión

Según los resultados expuestos en el Cuadro 1, el tiempo óptimo para hacer la tinción de las laminillas, fue entre las 24 y las 36 horas. Los microfocos no estaban suficientemente desarrollados a las 24 horas y a las 36 horas se presentaban principios de formación de microfocos secundarios (es decir, infectados con el virus producido por las células que se habían infectado primero). En una segunda serie de experimentos se estudió este período de 12 horas, que se consideró crítico para una buena prueba y se determinó que el período óptimo para colectar y teñir las laminillas fue de 30 horas.

El uso del DEAE dextrán se ha notificado en la literatura (Kaplan *et al.*, 1967) como una sustancia que aumenta la adherencia del virus de la rabia a las células y por lo tanto, su susceptibilidad. En el trabajo que aquí se presenta, se hicieron pruebas con diferentes concentraciones de DEAE dextrán, con la finalidad de determinar el grado de toxicidad para las células. El DEAE dextrán es tóxico para las células en niveles de 100 microgramos/ml, en caso de permanecer en el medio de mantenimiento por mucho tiempo. Si se deja esta sustancia en contacto con las células, durante un período de una a dos horas y después se elimina, los niveles de tolerancia son de hasta 500 microgramos. Sin embargo, el nivel de 50 microgramos es suficiente para aumentar la susceptibilidad de las células al

virus de rabia y este nivel de DEAE dextrán no fue tóxico. Por estas razones, se decidió incluir el producto para pruebas subsecuentes. Esta es una de las diferencias con la técnica notificada por King, Groghan y Shaw (1965), quienes no usaban el DEAE dextrán y teñían sus laminillas a las 72 horas después de la infección.

La titulación de cepas de virus de rabia, adaptadas a cultivos celulares por medio de la técnica descrita, es tan sensible como la prueba de inoculación intracerebral en ratones de 21 días, la prueba de reducción de microfocos es cinco veces más sensible que la prueba de seroneutralización en ratones (figura 1). La técnica tiene la enorme ventaja sobre otras técnicas *in vitro* e *in vivo* de ahorrar tiempo y obtener los resultados a muy corto plazo.

Summary

A new *in vitro* technique was developed to titrate tissue culture adapted strains of rabies virus. The technique was modified to a microfoci reduction test in order to conduct serum neutralization test of sera from vaccinated animals. Both techniques are simple to conduct and to interpret and are also more sensitive than the conventional tests in mice. Another advantage is the short time (30 hours) required to run the tests.

Literatura citada

- ABELSETH, M. K., 1964, An attenuated rabies vaccines for domestic animals produced in tissue culture, *Can. Vet. Jour.*, 5-11-411.
- ATANASIU, P., 1966, The serum-virus neutralization test. Chapter 7 in Laboratory techniques in Rabies WHO. Monograph series No. 23 2nd. ed., pág. 167, Editado por la Organización Mundial de la Salud.
- COONS, A. H. and M. H. KAPLAN. 1950, Localization of Antigen in tissue cells. II Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody, *J. Exper. Med.* 91-1.
- DEAN, D., 1966, The fluorescent antibody test, chapter 5 in Laboratory techniques in Rabies, WHO monograph series No. 23. 2nd. ed. pag. 59, Editado por la Organización Mundial de la Salud.
- EAGLE, H., 1959, Amino acid metabolism in mammalian cell cultures, *Science*, 130-432.

- KAFLAN, M. H., T. J. WIKTOR, R. F. MAES, J. B. CAMPBELL and H. KOPROWSKY, 1967, Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in tissue culture: Construction of a single cycle growth curve, *J. Virol.*, 1:145.
- KISSLING, R. E., 1958, Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 98:223.
- KING, D. A., D. L. GROGHAN and E. L. SHAW, 1965, A rapid quantitative *in vitro* serum neutralization test for rabies antibody, *Can. Vet. Jour.*, 6 No. 8: 187.
- KISSLING, R. E. and D. R. REESE, 1963, Antirabies vaccine of tissue culture origin, *J. Immunol.*, 91:362.
- MACPHERSON, I. and M. STOKER, 1962, Polyoma transformation of hamster cellclones in investigation of genetic factors affecting cell competence, *Virology*, 16:147.
- PIZZI, M., 1950, Sampling variation of the fifty per cent end-point, determined by the Reed and Muench (Behrens) method, *Hum. Biol.*, 22 No. 3:151.
- REED L. J. and H. MUENCH, 1938, A simple method of estimating fifty per cent end-points, *Am. J. Hyg.*, 493:497.
- SEDWICK, W. D. and T. J. WIKTOR, 1967, Reproducible plaquing system for rabies, lymphocitic chriomeningitis and other ribonucleic acid viruses in BHK-21/13S agarose suspension, *J. Virol*, 1 No. 6: 1224.
- STOKER, M., and I. MACPHERSON, 1964, Syrian hamster fibroblast cell line BHR-21 and its derivatives, *Nature*, 203:1355.