

# FORMACION DE PLACAS POR EL ENTEROVIRUS 70 Y SU APLICACION EN LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION PARA DETECTAR ANTICUERPOS\*

Dr. Gustavo Justines\*\*, Lic. Gladys Oro\*\*\*, Lic. Paula Fábrega\*\*\*\*

---

\* Presentado para publicación en febrero de 1984.

\*\* Profesor Agregado de Microbiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá.

\*\*\* Científico del Laboratorio Conmemorativo Gorgas.

\*\*\*\* Tecnóloga del Laboratorio Conmemorativo Gorgas.

## FORMACION DE PLACAS POR EL ENTEROVIRUS 70 Y SU APLICACION EN LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION PARA DETECTAR ANTICUERPOS\*

Dr. Gustavo Justines\*\*, Lic. Gladys Oro\*\*\*, Lic. Paula Fábrega\*\*\*\*

El aumento en los títulos de anticuerpos encontrados en los individuos infectados con conjuntivitis hemorrágica aguda (CHA) y la presencia de los anticuerpos hasta 13 meses después de la infección demuestran que la prueba de neutralización por reducción de placas es un método excelente para la detección de anticuerpos en el suero de aquellos individuos infectados con CHA. El número reducido de muestras analizadas es una gran limitación al presente trabajo, considerando la magnitud de la epidemia, pero lamentablemente fue imposible obtener mayor número de muestras. Sin embargo, los resultados sugieren que el enterovirus 70 fue el agente que causó la epidemia de CHA en el Istmo de Panamá.

Las epidemias de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda (CHA) han sido reconocidas en diferentes partes del mundo (1,2). En el mes de agosto de 1981 una epi-

demia de CHA se inició en la ciudad de Colón; y para septiembre, los primeros casos empezaron a observarse en la ciudad de Panamá. La epidemia en Panamá nunca alcanzó las proporciones observadas en Colón, en donde se estimó que ocurrieron más de 25.000 casos (3).

Resultaron inútiles los esfuerzos realizados para aislar el agente causal, en docenas de muestras tomadas de pacientes con CHA. Las pruebas de neutralización se realizaron en tubos de cultivo sembrados con células de amígdala fetal humana (FT). Se empleó en las pruebas la cepa de referencia J-670-71 de enterovirus 70 (EV-70).

Los resultados mostraron que los títulos de anticuerpos en los sueros convalecientes eran muy bajos y en ocasiones erráticos. Por estas razones se trató de que el EV-70 formara placas bajo agar en presencia del rojo neutro.

\* Presentado para publicación en febrero de 1984.

\*\* Profesor Agregado de Microbiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá.

\*\*\* Científico del Laboratorio Conmemorativo Gorgas.

\*\*\*\* Tecnóloga del Laboratorio Conmemorativo Gorgas.

El presente trabajo describe el éxito alcanzado al obtener placas y al realizar las pruebas de neutralización por reducción de placas.

### Material y método

**Sueros:** Las muestras fueron tomadas de individuos enfermos con CHA, en el período agudo y en el período de convalecencia de la enfermedad. Los sueros se guardaron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Cultivos celulares:** Las células FT se sembraron en platos plásticos de 6 hoyos (25 x 10mm de diámetro en el fondo del hoyo), con medio esencial mínimo de Eagle's (EMEM), balanceado con sales de Hank's y suplementado con 10% de suero fetal bovino y con antibióticos. Se sembraron aproximadamente 300.000 células FT por hoyo, y se incubaron los platos a  $37^{\circ}\text{C}$  con 3 a 4% de  $\text{CO}_2$ . Se obtuvieron monocapas completas de células después de 2 o de 3 días de incubación.

**Medio nutritivo para la formación de placas:** El medio nutritivo con agar tragacanto (No. 1) y el medio nutritivo con agar Noble y rojo neutro (No. 2) son los mismos medios descritos anteriormente y que usamos para la formación de placas de los virus de fiebre amarilla y de rubéola (4, 5).

**Lotes de virus:** La cepa de referencia de enterovirus 70 se obtuvo por cortesía del Centro de

Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, E.E.U.U. La cepa viral de referencia tenía tres pases en células de riñón de un embrión humano y cuatro pases en células de riñón de mono africano (*Cynomolgus sp.*). Las células FT desarrolladas en tubos de cultivo se inocularon con el EV-70, observándose un efecto citopático (ECP) después de 5 a 6 días. Después de varios pases en células FT se logró producir ECP en un día y para el tercer día se obtuvo un ECP total.

Los lotes de virus se prepararon en células FT y los tubos que mostraron el mayor ECP se cosecharon, se congelaron y luego se descongelaron para romper las células; el medio se recogió y se centrifugó a 2000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se recogió y se mezcló con un volumen igual de medio estabilizador (salina tamponada con 15% de sacarosa y 4% de gelatina hidrolizada). La mezcla de virus se dispensó en cantidades de 1.0 ml, en ampollas y se congeló a  $-60^{\circ}\text{C}$ .

**Titulación del virus:** La titulación de los lotes de virus se realizó en platos plásticos de 6 hoyos sembrados con células FT. Diluciones logarítmicas de virus preparadas en salina fosfatada tamponada a un pH 7.2 y con 0,5% de gelatina (PBS/gel) se inocularon en volúmenes de 0,1 ml por hoyo. Después de una hora de adsorción a  $37^{\circ}\text{C}$  (en presencia

o ausencia de CO<sub>2</sub>) se removió el inóculo y se agregó el primer medio nutritivo con agar traga-canto. Los platos se incubaron a 34°C sin CO<sub>2</sub>; al quinto día después de la inoculación se removió el medio y se agregó el segundo medio nutritivo, con agar Noble y rojo neutro (1:40, 000). Las placas pudieron contarse dos horas después de agregado el segundo medio.

**Pruebas de Neutralización:** Entre 50 y 60 unidades formadoras de placas (UFP) de EV-70 se probaron contra diferentes diluciones de los sueros humanos. Las diluciones de los sueros se realizaron en platos de 96 hoyos, con PBS/gel como diluyente. A un volumen de suero (0.075 ml) se le agregó un volumen igual de la dosis viral usada en la prueba, para alcanzar un volumen final de 0.15 ml por hoyo. La mezcla de virus y de suero se incubó a 4°C, por aproximadamente 18 horas; luego, 0.1 ml de la mezcla se inoculó en cada hoyo de los platos de 6 hoyos. La adsorción y la adición de los medios nutritivos siguieron el mismo patrón de la prueba de titulación. Se consideraron positivos (con anticuerpos) los sueros que mostraron la capacidad de reducir el 50% o más de la dosis viral usada en la prueba.

## Resultados

Las placas de EV-70 se presentaron claras, con bordes irregula-

res y con un diámetro de 2 a 4 mm (Fig. No. 1).

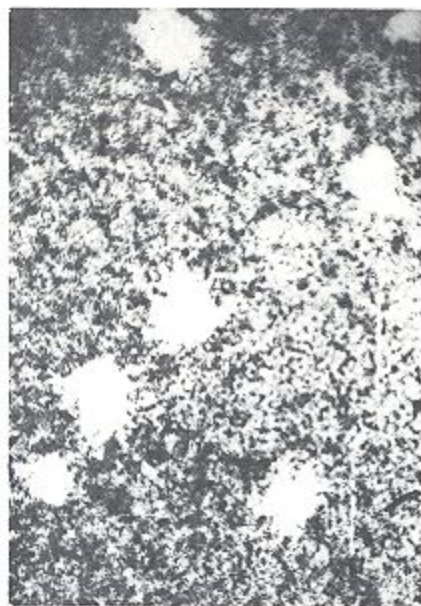


Figura No. 1

Formación de placas por el Enterovirus 70 en células FT.

Se analizaron los sueros de tres individuos, cuya sangre había sido tomada antes y después de la infección con CHA, para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes (Cuadro No. 1). En los sueros de la sangre tomada en el período de convalecencia se observó que los títulos de anticuerpos aumentaron en más de cuatro veces y que el mismo título se mantuvo hasta por trece meses después de la infección. En los sueros de dos individuos (MS y AM) se encontraron niveles bajos de anticuerpos, 10 (MS) y 20 (AM) años antes de la infección.

Se analizaron los sueros de 22 pacientes, que fueron tomados

TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA EV-70 EN LA PRUEBA DE REDUCCIÓN DE PLACAS ANTES Y DESPUÉS DE HABER TENIDO CONJUNTIVITIS HEMORRÁGICA AGUDA

NOMBRE DEL CASO	ANTES DE LA INFECCIÓN	MESES DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		
		2-4	10	13
A.T.	4	120*	64	64
A.M.	8	32	32	32
M.S.	8	128	256	256

\* RECÍPROCO DE LA MÁS ALTA DILUCIÓN DE SUERO QUE INHIBE EL 50% DE LA DOSIS VIRAL.

durante el período agudo y de convalecencia de CHA, para determinar los títulos de anticuerpos específicos. En 21 de los 22 sueros se encontró que los títulos de anticuerpos iban de 1:8 a 1:1024 (Cuadro No. 2), en el período de convalecencia de la enfermedad. En 18 sueros no se encontró evidencia de anticuerpos en el período agudo de CHA, mientras que tres presentaron niveles bajos (1:4, 1:8 y 1:32).

Se probó otro grupo de 22 sueros controles, obtenidos antes de la epidemia de CHA y de individuos que no habían tenido síntomas clínicos. Solamente tres sueros mostraron niveles bajos de anticuerpos (1:4 a 1:8); los otros 19 sueros fueron negativos.

### Comentarios

Los altos niveles de anticuerpos detectados en la mayoría de

TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA EV-70 EN SUEROS DE PACIENTES QUE HABÍAN TENIDO CONJUNTIVITIS HEMORRÁGICA AGUDA\*

NUMERO DE CASOS	DESPUES DE LA INFECCION
1	1024*
6	256
5	128
5	64
2	32
1	16
1	8
1	4
22	TOTAL DE CASOS

\* RECÍPROCO DE LA MÁS ALTA DILUCIÓN DE SUERO QUE INHIBE AL 50% DE LA DOSIS VIRAL.

las personas estudiadas indican que la infección producida por el EV-70 da origen a una buena respuesta inmune, con producción de altos niveles de anticuerpos. A pesar de que se detectaron bajos niveles de anticuerpos contra el EV-70 en individuos antes de la infección se observó que esos anticuerpos no dieron ninguna protección contra la infección de CHA. Posiblemente esos anticuerpos fueron el resultado de exposiciones a enterovirus que tenían cierta similitud antigénica con el EV-70.

La aplicación de la técnica de producción de placas para la neutralización del EV-70 dió la oportunidad para realizar determina-

ciones cuantitativas de los niveles de anticuerpos en los sueros de individuos que sufrían de CHA. Además, el método de producción de placas permite el procesamiento de un número mayor de muestras porque se utiliza volúmenes más pequeños de material, cuando se compara con la técnica de cultivo de tejidos en tubos. Considerando los resultados podemos informar que la técnica de producción de placas presenta una mayor ventaja sobre el cultivo de tejidos en tubos, que usa el desarrollo de efecto citopático para la determinación de anticuerpos.

Lamentamos no haber podido analizar más muestras, tanto en la fase aguda como en la de convalecencia; pero este informe preliminar sugiere que el EV-70 fue

el causante de la epidemia de CHA en Panamá.

## SUMMARY

The increase in antibody titer detected in individuals infected with acute haemorrhagic conjunctivitis (AHC) and the persistence of antibody for at least 13 months after infection demonstrate that the application of the neutralization test by plaque reduction is an excellent tool for the processing and detection of antibody in the serum of individuals suspected of having AHC. We recognize the limitation of the present study; it is unfortunate that we were not able to obtain more sera to test but nevertheless the results clearly suggest that the EV-70 was the agent responsible for the epidemic of AHC in the Isthmus of Panama.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Dra. Evelia Quirós por el suministro de muestras.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kono R, Sasagawa A, Miyamura K, Tajiri E: Serologic characterization and sero-epidemiological studies on acute haemorrhagic conjunctivitis (AHC) virus. *Am J Epidemiol* 101: 444-457, 1975
2. Kono R, Sasagawa A, Ishii K, Sugiura S, Ochi M, Matsumiya H, Uchida Y, Kameyama K, Kaneko M, Sakurai N: Pandemic of new type of conjunctivitis. *Lancet* 2: 1191-1194, 1972
3. Quiroz E, Reeves WC Jr: Comunicación Personal, 1982
4. Justines G, Peralta PH, Fábrega P: Métodos para la detección de placas o áreas de crecimiento del virus selvático de la fiebre amarilla y para distinguir entre los anticuerpos inducidos por la vacuna de los individuos y por infección natural. *Rev Med Panamá* 4: 287-294, 1979
5. Justines G, Oro G, Fábrega P, Mans RA, Wong N: Presencia de anticuerpos contra la rubéola en comunidades urbanas y rurales de Panamá y evaluación de los resultados de pruebas de neutralización e inhibición de la hemaglutinación. *Rev Med Panamá* 6: 176-182, 1981