

MÉTODOS PARA LA DETENCIÓN DE PLACAS O ÁREAS DE CRECIMIENTO DEL VIRUS SELVÁTICO DE LA FIEBRE AMARILLA Y PARA DISTINGUIR ENTRE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS POR LA VACUNACIÓN DE LOS INDIVIDUOS Y POR LA INFECCIÓN NATURAL

DR. GUSTAVO JUSTINES*
DR. PAULINE H. PERALTA*
LIC. PAULA FABREGA**

Se obtuvieron placas o áreas de crecimiento bajo agar en células de Vero de cepas selváticas de fiebre amarilla aisladas en Panamá. El método es tan sensible para detectar el virus de las muestras del campo, como los cultivos de Vero en tubos o la inoculación en ratones lactantes. También se encontró, empleando la técnica de formación de placas bajo agar, que un alto porcentaje de individuos vacunados contra la fiebre amarilla no presentaban anticuerpos neutralizantes contra las cepas selváticas de la fiebre amarilla, pero sí contra las cepas 17D o neurotrópica francesa. Esto brinda una gran posibilidad para el estudio de la fiebre amarilla, ya que será posible conocer cuales individuos han estado expuestos a infecciones naturales o a vacunaciones en las zonas de actividad periódica del virus de la fiebre amarilla.

Los estudios realizados en los laboratorios M.A.R.U. y Conmemorativo Gorgas, durante la onda cíclica de fiebre amarilla que azotó las regiones del Darién y del Bayano en 1974 (1), demostraron la necesidad de emplear métodos que produjeran el aislamiento más rápido del virus amarílico en las muestras obtenidas del campo. Era de suma importancia saber cuáles muestras poseían virus, porque de esta manera se podía conocer el movimiento de la onda viral y se podía establecer las medidas necesarias de control.

A causa de que con las técnicas empleadas en el laboratorio para determinar la presencia del virus amarílico en el material de campo se tomaba de dos a cuatro semanas, a partir del día de la inoculación, y como las

* Virólogos del Laboratorio Conmemorativo Gorgas

** Técnica del Laboratorio Conmemorativo Gorgas

cepas selváticas del virus de la fiebre amarilla no producían placas o áreas de crecimiento bajo agar en células Vero, no se podía usar ese método para aislar el virus amarílico de las muestras del campo, ni tampoco para la determinación de los anticuerpos en los sueros humanos y en los de otros mamíferos, en las pruebas de neutralización. Por estas razones se inició el presente estudio con el propósito de mejorar los medios para el desarrollo de placas o áreas de crecimiento de las cepas selváticas de la fiebre amarilla.

Material y método

Cultivos celulares: células Vero (células del riñón del mono africano verde, *Cercopithecus aethiops*) fueron sembradas para formar monocapas de tejido, en platos plásticos y en tubos, de acuerdo con las técnicas descritas (2). Se realizaron pruebas de titulación y de neutralización del virus, siguiendo los patrones empleados en el laboratorio y descritos anteriormente (3, 4, 5).

El medio nutritivo para la formación de placas bajo agar en células Vero por las cepas naturales del virus de la fiebre amarilla tenía la siguiente composición: medio Eagle's MEM (2X), 4% de suero bovino fetal, 0.25% de bicarbonato de sodio, y antibióticos; a 95 ml de este medio se le agregó 2 ml de 2.5

M de hepes, 2 ml de 50mM de tricina, 0.8 ml de IN de NaOH, 1.0 ml de 10^{-4} M de $MgCl_2$ y 0.8 ml de 10 mg/ml de DEAE dextran. El medio nutritivo se mezcló en la siguiente proporción: 65 ml de medio con 35 ml de 1.6% de agar tragacanto; esta mezcla se dispensó en 1.0 ml por hoyo de los platos plásticos. Al sexto día se le removió el medio anterior y se le agregó una mezcla de 50% de medio nutritivo (sin agar tragacanto) con 50% de 2% de agar Noble y 0.5% de rojo neutral 1:100. Esta segunda mezcla de medio nutritivo con rojo neutral se agregó en volúmenes de 0.5 ml por hoyo.

Después de 6 horas de agregada la segunda mezcla de medio, las placas o áreas de crecimiento de las cepas selváticas o naturales de la fiebre amarilla empiezan a aparecer y 24 horas después están claras y definidas, listas para ser contadas.

Virus: Las cepas modificadas del virus amarílico, 17D (Vacuna) y neurotrópica francesa fueron propagadas en cultivos Vero para preparar los lotes de virus. La cepa natural o selvática del virus de la fiebre amarilla se recuperó de mosquitos *Haemagogus* sp. y luego se inoculó en monos "nocturnos" (*Aotus trivirgatus*) los cuales se sacrificaron durante el período de mayor viremia; el plasma o el suero

se diluyó 1:1 en un medio estabilizador y se dispensó en viales que se guardaron congelados a -70°C .

Resultados

En el Cuadro No.1 podemos observar que la técnica de formación de placas en los platos es igualmente sensitiva, para la detección del virus amarílico de las cepas naturales, que lo observado en los tubos de cultivos Vero. Los títulos del virus en el material de mosquitos se obtienen a los 7 días en los platos plásticos mientras que en los tubos de Vero es necesario esperar

de 10 a 18 días para obtener títulos similares. Los lotes de mosquitos que fueron negativos para el virus al probarse en los tubos fueron también negativos en los platos.

Se determinaron los títulos de anticuerpos en los sueros de los monos "brazil-largos" (*Ateles fusciceps*) y en los sueros de los monos "auilladores" (*Alouatta villosa*) que fueron obtenidos en la parte oriental del Istmo de Panamá, durante el período de 1970 a 1974. Se observa en el Cuadro No.2 que de un total de 45 sueros de monos examina-

CUADRO No. 1

TITULACION DE LOTES DE MOSQUITOS
INFECTADOS CON VIRUS AMARILICO

NUMERO LOTE DE MOSQUITOS +	TITULO DEL VIRUS EN DEX POR ml. *	
	PLATOS	TUBOS
1	4.4	5.0
2	3.6	4.0
3	2.4	2.5
4	3.6	3.5
5	4.0	3.5
6	2.8	2.5
7	1.7	2.0
8**	6.9	7.0

+ OTROS 10 LOTES FUERON NEGATIVOS
TANTO EN TUBOS COMO EN PLATOS.

* DEX, EXPONENTE DECIMAL DEL NUMERO
DE UNIDADES INFECCIOSAS POR ml.

** LOTE DE VIRUS DE REFERENCIA.

PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN LOS SUEROS
DE MONOS SILVESTRES CON LA CEPA SELVÁTICA Y 17D
DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA

NUMERO SUEROS ESTUDIADOS	TITULOS DE LOS ANTICUERPOS EN EL SUERO VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA	
	CEPA SELVÁTICA	CEPA 17D
18	< 4	< 4
6	8-16*	16-32
13	32-64	64-256
8	128-256	256-512
TOTAL 45		

* TITULOS EXPRESADOS COMO LA MAS ALTA DILUCION DEL SUERO QUE NEUTRALIZA 90% DE LA DOSES VIRAL.

dos, 18 no mostraron tener anticuerpos para la fiebre amarilla, empleando las cepas selváticas y las cepas 17D del virus amarílico. De los sueros restantes, 6 presentaron títulos bajos de 1:8 a 1:16, 13 tenían títulos medios 1:32 a 1:64 y 8 poseían títulos altos de 1:128 a 1:256, usando la cepa selvática del virus amarílico. Estos mismos sueros presentaron títulos de 2 a 4 veces más altos empleando la cepa 17D.

También se analizaron muestras de sueros humanos provenientes de la región del Bayano, para determinar la presencia de anticuerpos contra la fiebre amarilla. No se tenía información sobre la exposición de

estos individuos a la fiebre amarilla, ya sea por vacuna o por infección natural. En el Cuadro No.3 podemos observar que de un total de 111 sueros analizados, 63 no presentaron anticuerpos (título $>$ 1:4) usando la cepa natural del virus amarílico; mientras que con la cepa neurotrópica francesa los mismos sueros alcanzaron títulos de 1:8 a 1:64. Se observa también que 36 sueros presentaron títulos bajos, que 10 sueros tenían títulos medios y que 2 sueros mostraron títulos muy altos con la cepa del virus selvático.

Los mismos sueros presentaron títulos de 2 a 8 veces más altos con la cepa neurotrópica francesa, exceptuando dos que

poseían títulos muy altos, con ambas cepas del virus.

También se observó que el suero de un caso probado de fiebre amarilla tenía anticuerpos en títulos altos para ambas cepas.

Al encontrar 63 sueros de personas que no poseían anticuerpos para la cepa natural, pero que sí reaccionaban usando la cepa neurotrópica francesa, se decidió probar los sueros de las

de la vacunación mostraron anticuerpos con la cepa 17D y no con la cepa selvática; mientras que 6 sueros obtenidos después de la vacunación tenían anticuerpos de ambas cepas.

Recientemente se probaron sueros obtenidos de niños (de 1 a 15 años de edad) del área de Chilibre, en la Provincia de Panamá. Un total de 19 sueros presentaron anticuerpos contra

CUADRO No. 3

PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN LOS SUEROS HUMANOS CON LAS CEPAS SELVATICAS Y NEUROTROPICA FRANCESA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA

NUMERO SUEROS ESTUDIADOS	TITULOS DE LOS ANTICUERPOS EN EL SUERO CEPA SELVATICA	CEPA NEUROTROPICA FRANCESA*
63	< 4	8-64**
36	4-16	8-256
10	32-128	64-1024
2	1024-2048	1024-2048
TOTAL 111		

* TITULOS SIMILARES SE OBTIENEN CON LA CEPA 17D.

** TITULOS EXPRESADOS COMO LA MAS ALTA DILUCION DE SUERO QUE NEUTRALIZA 90% EN LA DOSIS VIRAL.

personas que tenían un mes de haber sido vacunadas para la fiebre amarilla. Se probaron 42 sueros de personas, antes y después de la vacunación. Los resultados se muestran en el Cuadro No.4. Se observa que 36 de los sueros obtenidos después

de la cepa 17D, indicando que fueron vacunados ya que no había existido fiebre amarilla en el área en los últimos 20 años. Solamente en 3 sueros, de los 19 sueros positivos antes mencionados, se hallaron anticuerpos contra la cepa selvática.

RESPUESTA DE LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES, EMPLEANDO LAS CEPAS SELVÁTICAS Y 17D DE FIEBRE AMARILLA, EN SUEROS HUMANOS VACUNADOS, DE LA REGIÓN DEL BAYANO

SUEROS DE 42		TÍTULOS DE LOS ANTICUERPOS EN EL SUERO	
VACUNADOS		CEPA 17D	CEPA SELVÁTICA
36	ANTES	< 4	< 4
	DESPUES	32-256	> 4
6	ANTES	< 4	< 4
	DESPUES	128-256	8-32

* - TÍTULOS EXPRESADOS COMO LA MÁS ALTA DILUCIÓN DEL SUERO QUE NEUTRALIZA EL 90% DE LA DOSIS VIRAL.

Por cortesía del Dr. León Rosen (del Instituto de Enfermedades Infecciosas y Alérgicas de los Estados Unidos de América), obtuvimos sueros de 4 monos "brazil-largos" y de 2 monos titíes (*Saguinus* sp.) originarios de Panamá, que habían sido inoculados con la cepa 17D. En todos los sueros que se consiguieron, de 22 a 130 días después de la vacunación, se hallaron anticuerpos para la cepa 17D; mientras que 5 de los 6 monos no mostraron anticuerpos para la cepa selvática, aislada en Panamá.

Comentarios

Al lograr que la cepa selvática de la fiebre amarilla formara placas o áreas de crecimientos

bajo agar, se presenta la oportunidad para trabajar un número mayor de muestras sin sacrificar la sensibilidad para detectar pequeñas cantidades de virus. Este hecho es de mucha importancia para el estudio del material de campo.

La presencia de anticuerpos neutralizantes para la cepa selvática y para la cepa de la vacuna, en los sueros de monos silvestres, indica claramente que los anticuerpos son el producto de una infección natural y que no logran distinguir entre la cepa natural y la cepa de la vacuna.

Por el contrario, los sueros humanos del Bayano revelaron que un número de individuos no presentaban anticuerpos contra

la cepa selvática pero sí contra la cepa 17D y la cepa neurotrópica francesa, indicando este hecho la posibilidad de que estos individuos hubieran sido vacunados, como parece ocurrir en el caso de los niños de Chilibre.

El estudio de los sueros de los individuos vacunados indica que la mayoría no presentó anticuerpos contra la cepa selvática, mientras que todos los individuos mostraron anticuerpos contra la cepa 17D. Un resultado similar se observó con los monos vacunados, cuando se empleó la cepa selvática para detectar los anticuerpos. Esto indica que tanto el hombre como los monos responden de una manera similar a la vacuna contra la fiebre amarilla. La reacción de los anticuerpos contra las cepas 17D y la cepa neurotrópica francesa indican claramente la estrecha relación antigénica que existe entre ambas cepas.

Pareciera que la respuesta inmune inducida por la vacuna es diferente a la producida por la infección natural. Se ha informado que la vacunación contra la fiebre amarilla estimula la producción de inmunoglobulina M, la cual alcanza altos niveles que se mantienen hasta 18 meses después; y que en los casos de 2 ó más vacunaciones con 17D se estimula la producción temprana de inmunoglobulina

G, sobrepasando los niveles de inmunoglobulina M (6).

Es importante señalar que la vacuna confiere una completa protección contra la fiebre amarilla, aunque en la mayoría de los casos los anticuerpos no son detectados al emplear la cepa natural con el método descrito. Por el momento, no podemos explicar la razón de que algunas personas vacunadas posean anticuerpos que reaccionan con la cepa selvática, aunque en algunos casos puede ser el resultado de 2 ó más vacunaciones. En otros casos puede ser que algunos individuos respondan inicialmente con mayores niveles de inmunoglobulina G, alcanzando niveles iguales o superiores a la inmunoglobulina M.

El fenómeno por el cual la cepa selvática del virus amarílico puede distinguir, en un alto porcentaje, los anticuerpos que son inducidos por la vacuna de aquellos que son el producto de una infección natural, tiene una gran importancia en los estudios sobre la epidemiología de la fiebre amarilla en las zonas tropicales donde es pobre o nula, en la mayoría de los casos, la información sobre previas vacunaciones o previas infecciones.

SUMMARY

Plaques under agar were obtained with wild strains of yellow fever virus isolated in Pa-

nama. This technique proved as sensitive for the detection of the virus in field specimens as the use of Vero cell cultures in tubes or the inoculation of suckling mice. A high percentage of individuals vaccinated against yellow fever who had neutralizing antibodies to the 17D or French neurotropic

vaccine strains did not have antibodies to the wild virus, using the plaque technique. This method promises to be extremely useful in determining which individuals have had natural infections and which have been vaccinated, in geographical areas where yellow fever is active periodically.

BIBLIOGRAFIA

1. Gorgas Memorial Institute 47th annual report, U.S. Government Printing Office, Washinton, 1976
2. Schmidt NJ: Tissue culture technic for diagnostic virology, en *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*, ed por Lennette EH, Schmidt NJ, 4ed, New York, Am Public Health Assoc, 1969, pp 79-178
3. Earley E, Peralta P, Johnson KM: A plaque neutralization method for arboviruses. *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 741-747, 1967
4. Webb PA, Johnson KM, Mackenzie RB: The measurement of specific antibodies in Bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques. *Proc Soc Exp Biol Med* 130: 1013-1019, 1969
5. Mirchamsy H, Rapp F: A new method for plaquing animal viruses. *Proc Soc Exp Biol Med* 129: 13-17, 1968
6. Monath TPC: Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. *Am J Epid* 93: 122-129, 1971