ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS APLICADOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES FRENTE AL VIRUS MAEDI-VISNA

B. González,[1] S. Andrés,[1] M.C. Pacheco,[1] E. Monleón,[2] R. Varea,[2] J. Badiola,[2] L. Luján,[2] A. Vargas,[2] y B. Amorena[1]

[1] *CSIC-SIA (DGA), Unidad de Sanidad Animal. Car.Montañana, 177, 50016 Zaragoza*
[2] *Dpto. de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, M.Servet, 177 50013 Zaragoza*

INTRODUCCIÓN

Una de las vías de lucha antivírica utilizadas por el organismo consiste en la elaboración de anticuerpos que neutralizan al virus infectante. Estos anticuerpos bloquean los lugares críticos de fijación del virus a la célula diana. Con las pruebas de neutralización se estima la capacidad de los anticuerpos séricos para neutralizar la actividad biológica del antígeno (virus) in vitro. En este estudio, se ha llevado a cabo la comparación entre ocho métodos distintos de neutralización, aplicados al estudio serológico de la infección por el lentivirus ovino Maedi-visna (MV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Antes de llevar a cabo la prueba de neutralización, se tituló en primer lugar el virus, para conocer su infectividad. Ello se realizó midiendo la dosis infectiva que mata al 50% de las células en cultivos de tejidos ($TCID_{50}$). Para determinar el título de anticuerpos neutralizantes, se mantuvo constante la concentración del virus, utilizándose diluciones dobles de suero. Tras la incubación del virus con el suero (por un período y temperatura que variaba entre métodos), cada mezcla se utilizó para inocular un cultivo de fibroblastos (obtenidos a partir de explantes de piel de ovinos) en placas de 96 pocillos de fondo plano, siempre y cuando éstos hubieran alcanzado confluencia (monocapa) o subconfluencia, (grado de tapizado del pocillo= 80-90 %) según los métodos. Después de 7 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2, se observaron los efectos citopáticos al microscopio. Estos efectos consisten en la aparición de sincitios o agrupaciones celulares, característicos en el caso del virus MV. El título de anticuerpos neutralizantes por $TCID_{50}$ utilizada fue definido como la inversa de la dilución del antisuero a la cual el 50% de los cultivos mostraban signos de infección (Tizard, 1995).

Los métodos de neutralización comparados se resumen en la Tabla 1. Los cuatro primeros se encuentran descritos en la bibliografía y los cuatro restantes fueron puestos a punto en nuestro laboratorio. En todos ellos, los sueros a titular procedían de 8 ovejas de raza Rasa Aragonesa, que habían sido infectadas experimentalmente por MV, y en las que la verificación de la infección se realizó mediante seguimiento serológico. Para determinar el título de anticuerpos neutralizantes se utilizó virus a concentración constante dentro de cada prueba (sobrenadante del cultivo de fibroblastos infectados por la cepa EV1 del virus MV, recogido en el momento de máxima expresión de efecto citopático, generalmente, 5 días post-infección) sobre fibroblastos de piel como células diana, obtenidos mediante cultivos de explantes de piel (biopsias), provenientes de dos ovejas Rasa Aragonesa negativas a MV.

Tabla 1. Estudio comparativo de los distintos métodos de neutralización.

Nº	*Dosis Maedi visna: $TCID_{50}$*	*Medio de cultivo con suero (%)*	*Mezcla virus-suero*	*Fibro-blastos*	*Mezcla virus-suero con fibroblastos*	*Referencias*
1º	500	DMEM 2%	4ºC 18 h	Monocapa	2 horas a 37ºC, 5% CO_2. Tras retirar el inóculo viral con suero, dejar 7 días en incubación	Bird et al., (1993)
2º	100	DMEM 2%	4ºC 48 h	Monocapa	7 días en incubación (37ºC y 5% CO_2)	Lutley et al., (1983)
3º	500	DMEM 2%	4ºC 48 h	Monocapa	7 días en incubación (37ºC y 5% CO_2)	Lutley et al., (1983)
4º	100	DMEM 2%	37ºC 30´ en baño y agitación	Monocapa	7 días en incubación (37ºC y 5% CO_2)	Narayan et al., (1981)
5º	500	DMEM 2%	37ºC 30´ en baño y agitación	Subcon-fluentes	7 días en incubación (37ºC y 5% CO_2)	Este estudio
6º	100	M199 0,5%	4ºC 48 h	Subcon-fluentes	7 días en incubación (37ºC y 5% CO_2)	Este estudio
7º	100	M199 0,5%	37ºC 18 h	Subcon-fluentes	7 días en incubación (37ºC y 5% CO_2)	Este estudio
8º	500	M199 0,5%	37ºC 30´ en baño y agitación	Subcon-fluentes	7 días en incubación (37ºC y 5% CO_2)	Este estudio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los métodos estudiados (Tabla1), se constató la necesidad de que los fibroblastos de piel llegaran a una subconfluencia del 80-90% y no alcanzaran la monocapa, dado que ésta produce una conglomeración excesiva de células que conduce inevitablemente a su muerte. Por ello, se descartaron los cuatro primeros métodos especificados en la Tabla 1. Asimismo, se observó que en el medio de cultivo de elección debe minimizarse el contenido en suero (0,5 % de suero es suficiente cuando el número de células presentes en el pocillo al inicio del cultivo es elevado), ya que el suero, además de inhibir la replicación viral, puede ayudar a las células a crecer en exceso. Curiosamente, algunos autores defienden el uso de monocapas y el uso sistemático de mayor cantidad de suero (métodos 1º al 5º).

De los ocho métodos utilizados, solamente dos (el 5º y 6º de la Tabla 1) dieron resultados coherentes en todas las pruebas. La Tabla 2 muestra los resultados del método 6º de la Tabla 1 utilizando sueros de 8 ovejas de raza Rasa Aragonesa que habían sido infectadas experimentalmente por MV. Éste es el método de elección frente al 5º por dos razones fundamentales: I) ahorro de virus (100 frente a 500 $TCID_{50}$ por pocillo); y II) menor riesgo de contaminación al no utilizar baño con agitación. Sin embargo, el método 6º requiere más tiempo de espera que el 5º (48 horas frente a 30 minutos). Según se ilustra en la Tabla 2, a una mayor dilución del suero a titular corresponde un mayor porcentaje de mortalidad, ya que hay menos anticuerpos que puedan neutralizar al virus. En el caso de las primeras diluciones, y

cuando se utilizaron monocapas y/o mayor cantidad de suero en el medio de cultivo, se observaron algunos casos en los que el porcentaje de mortalidad era muy alto, lo cual se cree debido, precisamente, a que esa mayor cantidad de suero no diluido sirviera para que las células crecieran más fácilmente y murieran o a que existiera algún factor citotóxico o citolítico en el suero, cuya actividad desaparecía al diluirse.

Tabla 2. Resultados obtenidos en el test de neutralización por el método 6° de la Tabla 1, con sueros de 8 ovejas Rasa Aragonesa infectadas por Maedi-visna.

	Mortalidad (%) en fibroblastos originada por sueros de distintas ovejas							
Inóculo aplicado a los fibroblastos cultivados	**9012**	**9034**	**1049**	**1085**	**1063**	**1005**	**1059**	**8010**
Medio de cultivo (control)	0	0	0	0	0	0	0	0
Stock viral (control)	100	100	100	100	100	100	100	100
Mezcla virus-suero 1:1	16,6	0	16,6	41,6	16,6	16,6	16,6	8,3
Mezcla virus-suero 1:2	16,6	0	16,6	**41,6**	16,6	16,6	**16,6**	**16,6**
Mezcla virus-suero 1:4	16,6	0	16,6	**66,6**	16,6	16,6	**100**	**100**
Mezcla virus-suero 1:8	16,6	0	**16,6**	66,6	16,6	16,6	100	100
Mezcla virus-suero 1:16	16,6	**0**	**100**	66,6	16,6	16,6	100	100
Mezcla virus-suero 1:32	**16,6**	**100**	100	91,6	16,6	**16,6**	100	100
Mezcla virus-suero 1:64	**100**	100	100	100	41,6	**100**	100	100
Título exacto de cada suero *	**47,8**	**22,3**	**12,02**	**3,01**	**>64**	**47,8**	**3,01**	**3,01**

** Calculado por el método de Reed y Muench (1938)*

El suero de mayor título de anticuerpos neutralizantes fue el de la oveja 1063 (>64). En todos los casos, el título exacto de anticuerpos neutralizantes, determinado por el método de c, se hallaba situado entre los valores de las diluciones correspondientes a los dos porcentajes de mortalidad resaltados en la Tabla 2: 47,8 (oveja 9012); 22,3 (oveja 9034); 12,02 (oveja 1049); 3,01 (oveja 1085); 47,8 (oveja 1005); 3,01 (oveja 1059); 3,01 (oveja 8010).

Agradecimientos.- Financiado por INIA proyecto SC95-036 y Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA). Sincero agradecimiento a Enrique Morago, Miguel Ángel Tejero y Fidel Lahoz, por su ayuda incondicional en el manejo de los animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bird et al., 1993. Journal of Virology Sept. 1993, 5187-5197.
2. Lutley et al., 1983. Journal of general Virology 64, 1433-1440.
3. Narayan et al., 1981. Infection and Immunity, 1045-1050.
4. Reed y Muench, 1938. Citado en Microbiology, 2ª edición Davis et al., 1043-1044.
5. Tizard, 1995. Inmunología Veterinaria 4ª edición.