

Mayor eficacia y sensibilidad en el diagnóstico de Rabdovirus

Sanz, F., y Coll, J.M.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, CIT-INIA
Embajadores 68, 28012 Madrid

Resumen

Hasta la fecha no existen diagnósticos inmunoenzimáticos suficientemente precisos en el campo de los Rabdovirus. Virus como el de la rabia, la estomatitis vesiculosa y otros muchos como la septicemia hemorrágica viral, que son altamente mortales y que originan procesos con numerosas pérdidas, no poseen un diagnóstico inmunoenzimático que pueda determinar rápida y seguramente sus procesos patológicos. Los diagnósticos rutinarios establecidos son poco sensibles en muchos casos y consumen mucho tiempo, retrasando el tiempo necesario para tomar las medidas epizootiológicas oportunas. Describimos aquí un ensayo enzimático altamente sensible, rápido y sencillo de ejecución, gracias a la disociación de las proteínas del rabdovirus. Con este nuevo ensayo se pueden detectar muestras de tejidos infectados con bajos niveles de rabdovirus, con gran precisión y en breve plazo. El método de la disociación de las proteínas virales durante su ensayo se está aplicando también a otros virus.

Importancia del diagnóstico de Rabdovirus

Los rabdovirus son agentes infecciosos que originan enfermedades en personas, animales y plantas. Algunos de estos rabdovirus causan enfermedades humanas tan graves como la rabia, y otros poseen una importancia económica muy alta, tanto en las producciones de animales de granja (vacuno, porcino, peces...) como salvajes (zorros, tejones, mapaches...), así como las numerosas especies de plantas que pueden ser afectadas (tomate, melón, fresa, vid,...)

Los rabdovirus tienen forma de proyectil, poseen una membrana lipídica que los envuelve, miden unos 80nm, tienen una cadena de ARN de

polaridad negativa y poseen cinco proteínas estructurales: una polimerasa L, la glicoproteína G relacionada con los procesos de neutralización y que se halla en las espículas víricas, las proteínas de la matriz M1 y M2, y la nucleoproteína N fosforilada (Basurco y col., 1989).

Para poder actuar a tiempo en el caso de encontrarse con una infección por rabdovirus, se hace fundamentalmente un diagnóstico que sea a la vez sensible (ya que si no fuese así, podríamos pasar por alto numerosos casos producidos por pequeñas cantidades de rabdovirus) y rápido (con el fin de poder tomar las medidas sanitarias oportunas con la mayor brevedad posible). En la actualidad los métodos de diagnóstico rutinario empleados son, o bien de interpretación complicada donde se

necesita una buena experiencia, como la inmunofluorescencia (técnica usada en el diagnóstico rutinario de la rabia), o bien métodos que necesitan mucho tiempo para poder establecer un diagnóstico exacto, como el cultivo del virus "in vitro" y su posterior confirmación por seroneutralización. En casi todos los casos los diagnósticos necesitan ser realizados en laboratorios altamente preparados y por personal especializado. Además existen otros problemas adicionales en los casos que haya que realizar un cultivo "in vitro"; los rabdovirus poco estables o con partículas defectivas (interferentes) que no funcionen sobre el tapiz celular, no producirían infección y pasaríamos por alto el diagnóstico (falso negativo), así como otros casos donde el efecto citotóxico de los extractos de tejidos enmascaren

el efecto citopático del virus (falsos positivos).

Hasta la fecha los enzoinmunoensayos (ELISA o inmunoblotting) tienen una aplicación limitada en el caso del rabdovirus debido a su baja sensibilidad. En la última década, la posibilidad de obtener anticuerpos monoclonales ha revolucionado las técnicas de enzoinmunodiagnóstico al hacer posible una mayor especificidad y sensibilidad, además de contribuir a una mejor estandarización de los reactivos. En muchos casos estos monoclonales han sustituido a los anticuerpos policlonales, pero en el caso de muchos de los rabdovirus, aunque existen anticuerpos monoclonales, no existen buenos resultados en ELISA, debido aún a problemas de sensibilidad.

En este trabajo describimos resumidamente los resultados de la aplicación de un método inmunoenzimático para la detección de rabdovirus, usando anticuerpos monoclonales frente a las nucleoproteínas disociadas de los rabdovirus. La nucleoproteína es la proteína mayoritaria y de síntesis mas temprana tras una infección (Sanz y col., 1990). El sistema es un ELISA de captura o sandwich, la disociación de las nucleocápsidas virales da a la prueba una mayor sensibilidad que el resto de las pruebas similares descritas anteriormente. Otras ventajas son la posibilidad de procesar rapidamente numerosas muestras con un equipamiento sencillo (Martinez y Coll, 1988), un facil y reproducible escalado (Coll, 1990) y una fácil interpretación.

Para la elaboración de este trabajo hemos escogido como modelo el virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (SHV), un rabdovirus que afecta a los salmónidos.

ELISA sandwich en condiciones disociadoras de nucleocápsidas

Se seleccionaron 3 monoclonales

frente a la proteína N viral de un total de 19 monoclonales. Estos monoclonales fueron producidos en ascitis, purificados y titulados. Los anticuerpos monoclonales anti-N estaban dirigidos contra diferentes epítomos de la proteína N según las pruebas de competición. Así mismo se estudió la combinación óptima para hacer posible la prueba.

La sensibilidad inicial era aproximadamente de unos 1.000 ng de virus/pocillo. Se probó la influencia de diferentes agentes disociantes en el buffer de dilución de muestras y el incremento de sensibilidad llegó a 20 ng/poc. La incubación simultánea de la muestra y el conjugado sobre el pocillo (ELISA de un paso) aumentó

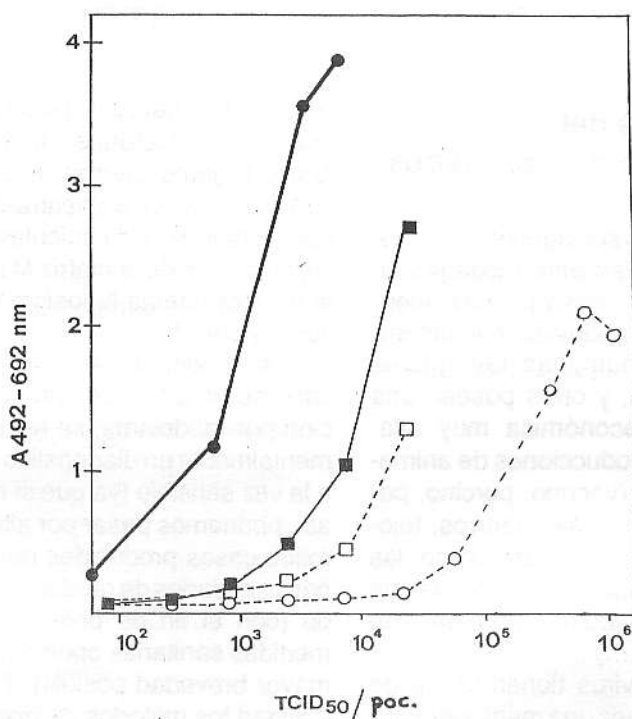
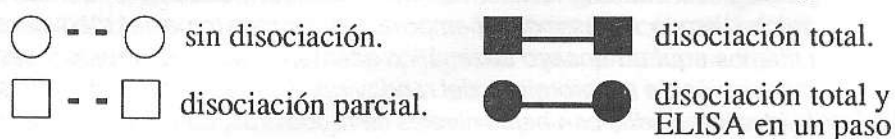
la sensibilidad a 0.2 ng/poc (figura 1).

De igual manera se probaron diferentes modelos de tapizado de placas y otras condiciones sin que ninguna de ellas produjeran un aumento o una disminución de sensibilidad respecto a los resultados iniciales obtenidos.

Las placas ELISA tapizadas pueden permanecer estables al menos dos meses guardadas en condiciones controladas.

El fondo o background de la prueba es bajo y la sensibilidad es de aproximadamente 0.2 ng/poc de virus purificado o de 10-50 TCID₅₀/pocillo. El coeficiente de variación interensayo es de 3-6% y el de intraensayo oscila entre un 3% y un 23% en la parte

Figura 1. Aumento de la sensibilidad usando distintos tratamientos de disociación de las nucleocápsidas



los extractos enmascara los efectos virales sobre el tapiz celular.

Conclusión

Este ELISA hace que no sean necesarios la precipitación, la aglutinación, o pruebas radiactivas para la identificación del virus, con las ventajas de poseer reactivos altamente estables (2 años), fácil automatización, buen rango lineal, alta reproducibilidad, bajos fondos, mayor sensibilidad que otros ensayos inmunoenzimáticos (inmuno-dot, ELISA mono- o policlonal), alta precisión y baja incidencia de falsos positivos o negativos. Todas estas características hacen a esta prueba específica para la determinación del virus. El diagnóstico para el resto de rabdovirus por ensayos inmunoenzimáticos basados en anticuerpos monoclonales anti-nucleocápsida podría ser mejorado con los principios aquí resumidos.

Agradecimiento

Agradecemos su colaboración a Frías, M.D., Basurco, B., Domínguez, J., Babin, M., y Hernández, C.

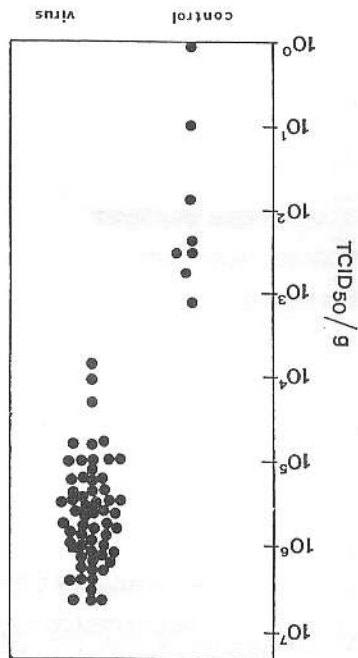
Bibliografía

- Basurco, B., and Coll, J.M. 1989. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 9, 92-95.
- Basurco, B., Sanz, F., Estepa, A., Barrera, J., y Coll, J.M. 1989. Biotecnología, 5, 8-11.
- Coll, J.M. 1987a. J. Immunol. Methods, 104, 219-222.
- Coll, J.M. 1987b. J. Immunol. Methods, 104, 259-263.
- Coll, J.M. 1990. Trends in Biotechnology (En prensa).
- Jimenez, J., Marcotegui, M.A., San Juan, M.L., and Basurco, B. 1988. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 27, 3-4.
- Martínez, J., and Coll, J.M. 1988. Clin. Chim. Acta, 176, 123-132.
- Sanz, F., Basurco, B., Babin, M., Domínguez, J., and Coll, J.M. 1990. J. Gen. Virol. (enviado).
- Sanz, F., and Coll, J.M. 1990. J. Virol. Methods (enviado).
- Basurco, B., Sanz, F., Marcotegui, M.A., and Coll, J.M. 1990. Arch. Virol. (aceptado).

solo paso, dió una mayor señal llegando a una sensibilidad de 0.2 ng/poc de virus. Teniendo en cuenta que las nucleoproteínas son alrededor del 40% de las proteínas totales del virus, la sensibilidad real es del orden de 0.1 ng/poc de proteína N, lo cual está en el límite de capacidad de la prueba ELISA.

La separación entre homogenados positivos y negativos fue de un 100% y hasta la fecha no se han obtenido falsos positivos ni falsos negativos. El ELISA detecta también antígeno viral en cultivos celulares usados para el aislamiento del virus y que dan resultados negativos por diferentes causas, o cuando la citotoxicidad de

Figura 2. Concentración aparente de virus en muestras control (animales sanos) y muestras de animales infectados por el virus



lineal de la prueba. Los anticuerpos monoclonales son específicos de virus SHV. Probados tanto en sistema indirecto como de captación, no reconocen ningún caso otros virus implicados en patologías similares, incluso otros rabdovirus.

Para estudiar el punto de corte entre los casos positivos y los negativos, se analizaron por ELISA tanto adultos como alevines, y los datos transformados en dosis infectivas aparentes por gramo de tejido (TCID₅₀/g) se exponen en la figura 2. También los animales infectados con el virus experimentalmente, que presentaron una mortalidad del 77.6% a los 20 días post-infección, fueron homogenizados y probados igualmente en el ELISA: los animales presentaron los valores aparentes TCID₅₀/g que se dan en la figura 2.

Las muestras pueden ser congeladas y descongeladas hasta seis veces sin pérdidas en la sensibilidad.

Ventajas del método

Se han seleccionado monoclonales anti-N para optimizar el ELISA porque la proteína N es la menos variable en rabdovirus (la prueba puede ser empleada para muchos aislados del mismo virus), los epítipos definidos por los monoclonales están altamente conservados en los tres serotipos existentes del virus modelo (Sanz y col., 1990), la proteína N del rabdovirus es el componente mayoritario tanto en virus completos como en células infectadas (Basurco y Coll, 1989), y la proteína N es además la primera proteína en ser sintetizada después de 1-2 horas de infección. El uso inicial de dos anticuerpos monoclonales anti-N en el ELISA de captación de virus presentaba una baja sensibilidad. Esta sensibilidad fue aumentada mediante la ruptura de la nucleocápsida viral con agentes disociantes. El uso de la prueba en un