

Uso de una técnica de inmunoperoxidasa para la detección de virus de rabia en cortes gruesos de cerebro

Jaime E. Castellanos, Olga L. Guayacán, David R. Castañeda, Hernán Hurtado

Resumen

Con el propósito de evaluar una técnica de avidina-peroxidasa biotinilada, se utilizó el conjugado antirrábico producido en el INS para la detección del virus de rabia en cortes gruesos de cerebros de ratón tratados con varios tipos de fijadores y con varias diluciones del conjugado. Los animales infectados experimentalmente fueron perfundidos vía intracardiaca con varios fijadores; los cerebros se recuperaron, se les hicieron cortes gruesos de 60 μm y se sometieron a la inmunodetección. Se encontró que en las diluciones normalmente usadas en fluorescencia se presentó un fuerte marcaje inespecífico sin mejorar la detección. En este trabajo, se presenta un protocolo fácil y rápido que pudiera ser útil para la observación de muestras sospechosas.

The use of an immunoperoxidase technique for the detection of rabies virus in thick brain slices

With the intention of evaluating an avidine-peroxidase biotinilated technique, the anti-rabies' sera, produced in the INS, was used for the detection of the rabies' virus in mouse brain tissue, treated with various types of fixers and various antisera dilutions. The experimentally infected animals were killed by intra-aortic perfusion with various fixers; their brains were recovered, cut into 60 μm slices and submitted to immunodetection. It was found that the normally used fluorescent dilutions presented strong non-specific marking without improving detection. In this work a protocol which is fast and easy is presented, which could be useful for the observation of suspect samples.

El diagnóstico histopatológico de la rabia se ha basado por años en la detección de inclusiones típicas en el citoplasma de las neuronas infectadas (cuerpos de Negri), que también pueden ser evidenciadas en las preparaciones para inmunofluorescencia (2). En los casos en los que se evidencian las inclusiones, se encuentran preferencialmente en las neuronas del hipocampo (cuerno de Ammon), corteza cere-

bral y células de Purkinje en el cerebelo (3). En los especímenes en los que no es posible identificar los corpúsculos de Negri, se hacen pruebas adicionales como la inoculación en ratón o la prueba de inmunofluorescencia, que son confirmatorias de la presencia del virus (3).

La reacción con sueros antirrábicos acoplados a fluoresceína se usa normalmente para hacer el diagnóstico en especímenes sospechosos y se

Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, Colombia.

Recibido para su publicación: 22 de abril de 1998. - Aprobado para su publicación: 29 de abril de 1998.

ha mantenido como una técnica con la que se obtienen resultados rápidos y reproducibles; sin embargo, solamente se puede realizar la prueba en especímenes frescos, usando un microscopio de fluorescencia y por personal calificado (4).

Como parte de los trabajos con el virus de rabia en el Laboratorio de Neurociencias y con el fin de obviar las dificultades de la fluorescencia, se ha estandarizado una técnica de inmunoperoxidasa indirecta en la que se usó el anticuerpo producido en el INS, un anticuerpo secundario biotinilado y un complejo de avidina-peroxidasa biotinilada, para hacer la detección en cortes gruesos de 60 μm de cerebros de ratones infectados experimentalmente; este trabajo describe dicha técnica.

Materiales y métodos

Inoculación y obtención de las muestras

Los ratones se infectaron por vía intracerebral con un inóculo de 30 μL de una dilución 1:10 del virus cepa CVS-BHK con un título de $10^{2.43}$ DL₅₀ (dosis letal 50, ratón). Los procedimientos fueron realizados en el Bioterio de Seguridad del Instituto Nacional de Salud. Se esperó hasta que los animales estuvieran atáxicos o moribundos y se perfundieron.

Los ratones infectados y los controles no infectados se anestesiaron con ketamina (90 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg); se hizo la apertura del tórax y, a través del ventrículo derecho, usando una bomba peristáltica, se perfundieron primero, con una solución de lavado y, luego, el fijador. La solución vasodilatadora de lavado (glucosa 0,1%, procaína 0,1%, NaCl 0,8%) se pasa hasta lograr el blanqueamiento del hígado. Posteriormente, se pasaron 50 mL de cada uno de los cinco fijadores usados, que fueron: paraformaldehído 4%; paraformaldehído 2%+glutaraldehído 0,5%; paraformaldehído 2%+glutaraldehído 1%; paraformaldehído 2%+glutaraldehído 2% y paraformaldehído 2%+glutaraldehído 2,5%, todos diluidos en solución salina tamponada de fosfatos (SSTF).

Los cerebros se cortaron coronalmente en dos partes (una anterior y una posterior) y se separó

el cerebelo. Cada una de las piezas se posfijó por 48 horas adicionales a 4 °C en el correspondiente fijador. Los especímenes se pegaron con cianoacrilato al vaso de un vibrátomo; se realizaron cortes de 60 μm de espesor y se pusieron en cajas de 24 pozos para hacer la inmunodetección en los cortes flotantes.

Inmunoperoxidasa

Los cortes se permeabilizaron con tritón X-100 0,1% durante 60 minutos y se lavaron. Se inactivó la peroxidasa endógena por 60 minutos usando H_2O_2 0,3% preparado en metanol al 10% en SSTF. Se bloquearon los sitios inespecíficos incubando 60 minutos con suero de caballo al 10% en SSTF. Se usaron las siguientes diluciones de anticuerpo antirrábico para evaluar con cuál de ellas se obtenía mejor inmunodetección: 1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480, 1:960 y 1:1920.

Se adicionó la correspondiente dilución del anticuerpo antirrábico en tampón para anticuerpo (tris-HCl 0,005 M + NaCl 0,5 M + tritón X-100 0,5%, pH: 8.6) y se incubó por una hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los cortes con el mismo amortiguador y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario (antiinmunoglobulina de hámster biotinilada) a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; los cortes se lavaron tres veces con tampón para anticuerpo. Se incubó con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó. El revelado se hizo por cuatro minutos, utilizando como sustrato H_2O_2 al 0,02%, diluido en agua destilada y como cromógeno, la diaminobenzidina (DAB) al 0,1% en tris-HCl, pH 7,2.

Los cortes se deshidrataron pasándolos por concentraciones crecientes de etanol, seguido de xilol y montándolos en *Poly-mount*®. Los controles que se utilizaron fueron los siguientes: cerebro sin infectar con anticuerpo primario y cerebros sin infectar e infectados sin anticuerpo primario.

Inmunofluorescencia

Los cortes se permeabilizaron con etanol al 50% por 1 hora, se bloquearon los sitios

inespecíficos y se incubó 1 hora con una dilución 1:30 del conjugado antirrábico en tampón para anticuerpo. Se lavó 2 veces con SSTF y, luego, con agua destilada.

Resultados

Se hizo una estandarización de la dilución de anticuerpo antirrábico óptima para la inmunodetección. En cortes provenientes de un mismo ratón y fijados con paraformaldehído al 4%, se encontró en las cinco pruebas que se realizaron, que la dilución en la que se producía mejor detección de las células infectadas fue la de 1:480. En las diluciones más concentradas (1:30, 1:60, 1:120, 1:240), se presenta marcaje inespecífico que gradualmente desaparece al disminuir la concentración del anticuerpo

antirrábico (figura 1). En las diluciones mayores, el marcaje específico se va perdiendo hasta desaparecer (diluciones 1:960 y 1:1920).

En los experimentos siguientes, se utilizó una dilución 1:480 de anticuerpo primario y se valoró el efecto de diferentes fijadores sobre la reactividad en la inmunoperoxidasa. Tanto animales infectados como no infectados fueron perfundidos con los 5 fijadores descritos en la sección de materiales y métodos.

En los cortes de animales infectados y fijados con paraformaldehído al 4%, se detectan zonas positivas muy marcadas en algunas partes del cerebro, especialmente a nivel de la capa de neuronas piramidales de hipocampo (figura 2A) y un marcaje menor en la capa granular exterior

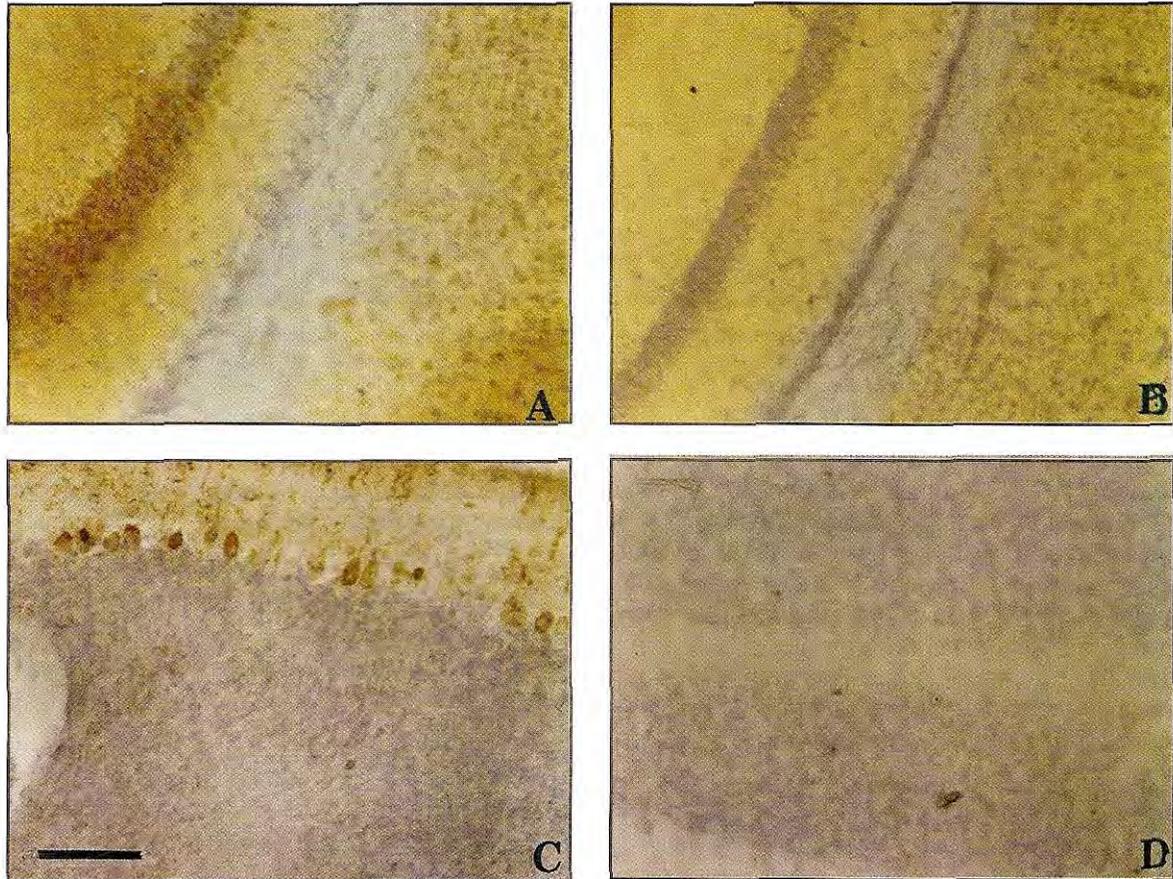


Figura 1. Inmunodetección por peroxidasa indirecta, de virus de rabia en cortes gruesos de 60 μm de cerebros; cerebro infectado (A) y sin infectar (B) usando una dilución 1:30 del anticuerpo antirrábico; cerebro infectado (C) y sin infectar (D) usando una dilución 1:480 del anticuerpo primario. La barra corresponde a 100 μm .

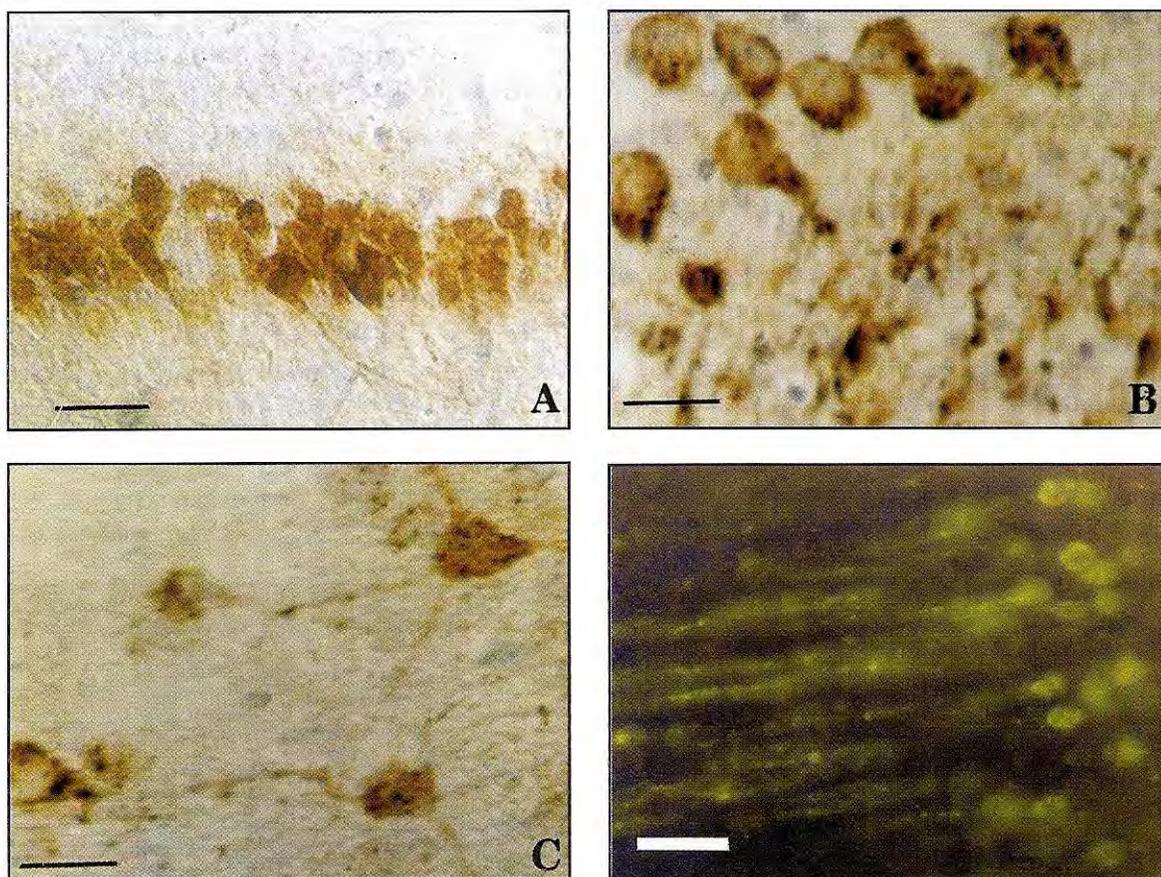


Figura 2. Inmunoperoxidasa indirecta para virus de rabia en cortes gruesos de cerebros infectados. A: hipocampo, B: cerebelo, C: corteza. La barra corresponde a 20 μ m, D: control de cerebelo infectado y procesado para inmunofluorescencia. La barra corresponde a 100 μ m.

y la capa piramidal exterior de la corteza cerebral (figura 2C). El marcaje es específico y con poco ruido de fondo. En el cerebelo se observa un fuerte inmunomarcaje sobre la capa media en las células y dendritas de células de Purkinje; no se observa marcaje en la capa granular (figura 2B) (5). Los cortes de animales infectados a los que no se les coloca anticuerpo primario no muestran inmunomarcaje; algo semejante ocurre en los cortes de animales no infectados, incubados con el anticuerpo primario.

Usando paraformaldehído 2%+glutaraldehído 0,5% para las fijaciones, la inmunoperoxidasa también mostró alta especificidad en el marcaje de la infección y una adecuada conservación de la antigenicidad tanto en la corteza como en el cerebelo e hipocampo. Además, este fijador preserva mejor la morfología del tejido que el

paraformaldehído solo. Es importante anotar que aunque hay buen nivel de detección de material viral, no se llega a los niveles encontrados con el paraformaldehído solo (figura 3A).

En las perfusiones en las que se usó tanto paraformaldehído 2%+glutaraldehído 1% y paraformaldehído 2%+glutaraldehído 2%, el inmunomarcaje en las zonas infectadas es menor que el anterior en cuanto a cantidad e intensidad (figura 3B-C).

Con el fijador modificado de Karnowsky (paraformaldehído 2%+glutaraldehído 2,5%) hubo muy buena conservación morfológica pero el marcaje de las células infectadas disminuyó notablemente (figura 3D). Para todos los controles de cerebros sin infección, se verificó la inexistencia de marcaje.

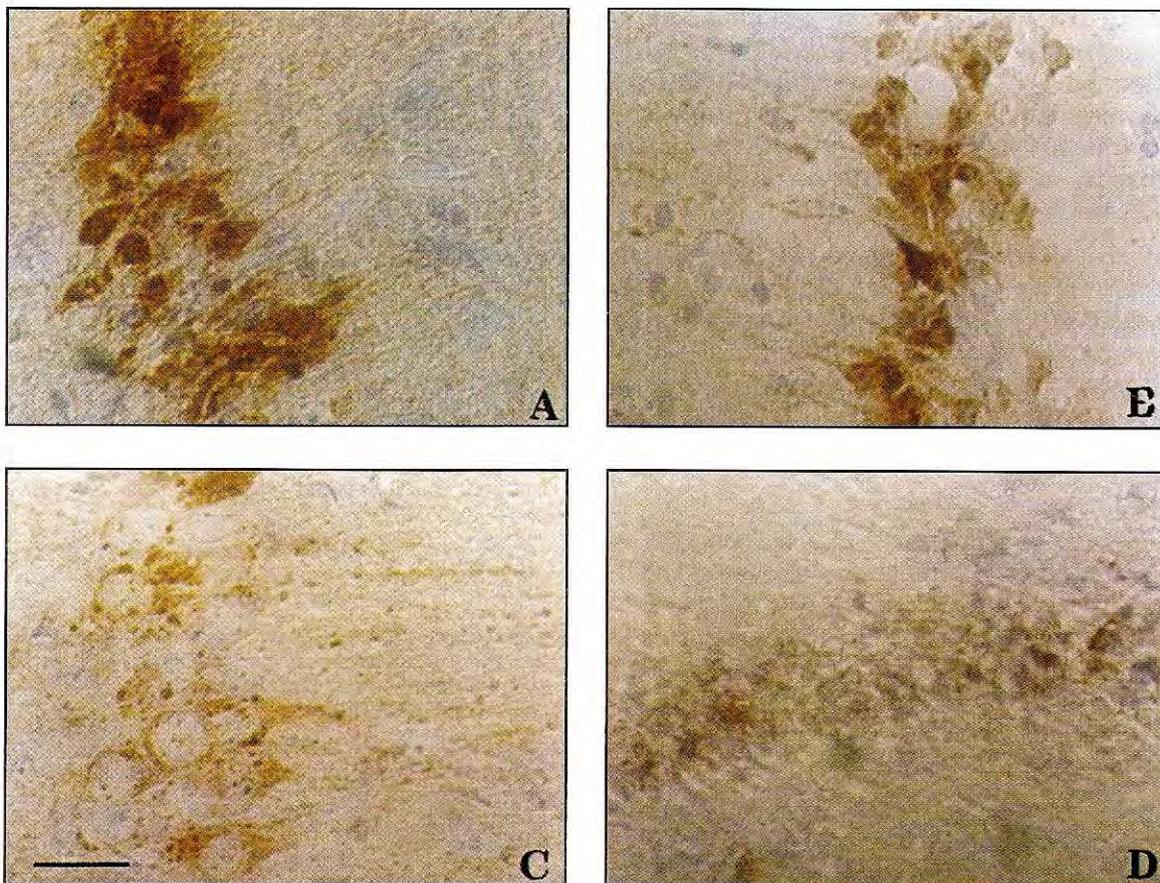


Figura 3. Efecto de los diferentes fijadores sobre el inmunomarcaje para virus de rabia en cerebros infectados. A: paraformaldehído 2% + Glutaraldehído 0,5%. B: paraformaldehído 2% + glutaraldehído 1%. C: paraformaldehído 2% + glutaraldehído 2%. D: paraformaldehído 2% + glutaraldehído 2,5%. La barra corresponde a 20 μ m .

Se realizó inmunofluorescencia para las diferentes condiciones de fijación con una dilución (1:30), que es la dilución de rutina en el Laboratorio de Virología del INS y que ha demostrado buena especificidad. Se observó un marcaje especialmente intenso en zonas muy susceptibles a la enfermedad, como son células del hipocampo, células de Purkinje en el cerebelo y corteza cerebral. En los cortes en los que se usó paraformaldehído al 4%, las observaciones en peroxidasa y fluorescencia coinciden (figura 2D). Para la fluorescencia, el fijador más adecuado es el paraformaldehído 4%, pues las mezclas que contienen glutaraldehído en cualquier concentración, producen autofluorescencia.

Discusión

Usamos el anticuerpo antirrábico que se produce en el INS para hacer detecciones en cerebros infectados tanto con inmunofluorescencia como con inmunoperoxidasa. En ambas técnicas, se logró hacer la detección de las zonas infectadas con un alto grado de especificidad, pero usando diluciones de anticuerpo diferentes, pues para la fluorescencia se usó la dilución de rutina (1:30) y la dilución que mejor se comportó en la técnica de peroxidasa fue de 1:480. Resultados similares se reportaron en un trabajo anterior (6, 7) y las dificultades fueron resueltas diluyendo también el anticuerpo primario. Los controles usados

demuestran una buena sensibilidad y especificidad, de tal manera que la técnica de cortar en vibrátomo cerebros fijados podría ser útil en los casos en que los especímenes hayan sido fijados antes de las pruebas de confirmación de fluorescencia de improntas o inoculación en cerebros de ratón.

Adicionalmente, la técnica es rápida, el uso del vibrátomo es fácil y utiliza cuchillas de afeitar comunes; por consiguiente, es una técnica de bajo costo en recursos humanos e insumos. Al no requerir el proceso de impregnación en parafina, la técnica puede ayudar en la conservación de la antigenicidad del virus, facilitando su inmunodetección.

Los datos muestran que el marcaje con ABC es menor cuando se hace la fijación con glutaraldehído; es posible que éste genere un cierto grado de entrecruzamiento que impide la entrada adecuada del anticuerpo secundario y, más aún, del complejo avidina peroxidasa o que el grado de entrecruzamiento modifique la antigenicidad del virus (8).

Es indudable que este tipo de inmunoperoxidasa puede ofrecer ventajas en la detección del virus en especímenes en estudio puesto que se desarrolla en unas pocas horas y no requiere de equipos o materiales costosos.

Referencias

1. **Wilde H.** Rabies, 1996. *Int J Infect Dis* 1997;1:135-42.
2. **Hematchuda T, Phanuphak P, Sriwantana B, Manutsathit S, Phanthumchinda K, Siriprasomsup W, Ukachoke C, Rasameechan S, Kaoroptam S.** Immunologic study of human encephalitic and paralytic rabies. Preliminary report of 16 patients. *Am J Med* 1988;84:673-7.
3. **Tierkel E, Atanasiu P.** Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological tests. In: Meslin, Kaplan, Koprowski, editors. *Laboratory techniques in rabies*. Fourth edition. Geneva: World Health Organization; 1996. p.55-65.
4. **Dean D, Abelsheith M, Atanasiu P.** The fluorescent antibody test. In: Meslin, Kaplan, Koprowski, editors. *Laboratory techniques in rabies*. Fourth edition. Geneva: World Health Organization; 1996. p.88-95.
5. **Jackson A, Reimer D.** Pathogenesis of experimental rabies in mice: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 1989;78:159-65.
6. **Castellanos J, Castañeda D, Hurtado H, Velandia A.** Inmunodetección por peroxidasa de células de ganglio sensorial infectadas por virus de rabia. *Biomédica* 1996;16:214-8.
7. **Castellanos J, Castañeda D, Velandia A, Hurtado H.** Partial inhibition of the in vitro infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons by rabies virus using nicotinic antagonists. *Neurosci Letters* 1997;229:198-200.
8. **Larsson L.** Antibody specificity in immunocytochemistry. In: Cuello C, editor. *Immunohistochemistry*. II. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1993. p.79-106.