

Tesis de Posgrado

Estudio sistemático de los distintos factores que intervienen en la reacción inmunocromatográfica del virus aftoso

Planes de Banchemo, Emilia Elsa

1961

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Planes de Banchemo, Emilia Elsa. (1961). Estudio sistemático de los distintos factores que intervienen en la reacción inmunocromatográfica del virus aftoso. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1103_PlanesdeBanchemo.pdf

Cita tipo Chicago:

Planes de Banchemo, Emilia Elsa. "Estudio sistemático de los distintos factores que intervienen en la reacción inmunocromatográfica del virus aftoso". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1961.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1103_PlanesdeBanchemo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FOYBAA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudio sistemático de los distintos
factores que intervienen en la reacción
inmunoprotectora del virus aftoso

Emilia Elsa Flores de Benabre

Tesis presentada para optar al
Título de Doctora en Químico

Año 1961

Tesis: 1103

A - NOTAS BIBLIOGRAFICAS

El primero en demostrar la presencia de anticuerpos específicos para el virus aftoso, mediante la técnica de fijación de complemento fué Ciuca (1) en 1928. Posteriormente ésta técnica fué perfeccionada y adecuada por Traub y Mühlmann (2),(3) en 1943. Este éxito fué un adelanto importantísimo en el diagnóstico y tipificación del virus aftoso.

Sin embargo numerosos investigadores durante años han tratado de adaptar, para el diagnóstico de la fiebre aftosa, técnicas sencillas usadas en bacteriología tales como aglutinación o precipitación.

La formación de un complejo virus-anticuerpo homólogo de alto peso molecular era previsible, pero la extrema pequeñez y reducida concentración del virus aftoso en el material infeccioso, era un inconveniente importante para la demostración del precipitado.

La cromatografía sobre papel de sustancias de RM elevada, como son la mayoría de los antígenos y los sueros; a pesar de algunos intentos (4,5,6,7,8) no ha dado hasta ahora resultados satisfactorios.(9,10)

Utilizando técnicas cromatográficas, Wastaneda (11) ha desarrollado para el diagnóstico de la brucelosis, lo que él llama "fijación de superficie". Por otra parte Hess y Reelcke (12) cromatografiaron sobre papel una gota de un suero específico aplicando luego, mediante un pincel un antígeno coloreado, de modo tal, que de acuerdo a la ubicación del antígeno, la reacción es considerada positiva o negativa.

Hedes y col. (13) basándose en principios similares de terminan anticuerpos en sueros deficientes de polio. Sin embargo, ninguno de estos métodos se ha podido imponer hasta ahora.

En 1957, Stöess (14) logra aplicar la cromatografía a precipitados entre diversos antígenos (proteicos, polisacáridos, lípidos) y antisueros correspondientes. Después de la precipitación un sistema antígeno-anticuerpo, contiene el complejo insoluble y la parte restante soluble proveniente de sustancias no reaccionantes por

tenecientes a antígeno y anticuerpo. Si este sistema se cromatografía, en forma ascendente monodimensional, el complejo debe quedar retenido en el punto de partida y las sustancias no reaccionantes migran con el frente del solvente. El precipitado consistente en una proteína, por lo menos, puede ser detectado por coloración.

Se lograba así aumentar 10 veces la sensibilidad de una reacción ya visible por medios serológicos comunes.

Stöess, en su trabajo, discute el término cromatografía y lo considera como una cromatografía extremadamente especializada, en la cual el precipitado tiene un valor $R_f = 0$ y la gran cantidad de otras sustancias que migran con el frente del solvente $R_f = 1$.

Hobohm y Rivenzen (15) (16) lograron visualizar el complejo formado por virus aftoso y sus anticuerpos específicos, por una técnica similar. Posteriormente (17), lograron identificar los tres tipos "A", "O", y "C" del virus aftoso que se encuentran en la Argentina.

Este método reúne algunas ventajas sobre las técnicas serológicas que se emplean en la investigación del virus aftoso y los anticuerpos, pues sólo necesita dos elementos: antígeno y anti suero específico; y estos en muy pequeña cantidad. (Una reacción es visible con 4.3 mg de antígeno y 0.87 mm^3 de suero.)

Es rápida y además posibilita la documentación. Por el contrario es menos sensible que la F de C., aunque altamente específica y no permite mediciones cuantitativas numéricas. Miquel, Horvath y Klatzo (18) utilizaron la cromatografía sobre papel y lograron mediciones bastante exactas, pero en precipitaciones ya visibles a simple vista.

El objeto de este trabajo es realizar un estudio sistemático de cada uno de los factores participantes en la inmunocromatografía del virus aftoso. Tratar de utilizar antígenos y sueros de distinto origen, pues hasta ahora se usaron aftas de bovinos infectados y sueros hiperinmunes de cobayo.

La influencia que ejercen la inactivación, concentración, purificación, conservación de antígenos y sueros, en función de la precipitación.

///

Tratar de encontrar un paralelismo entre esta técnica y las usuales. Estudiar las condiciones óptimas en que se produce la reacción antígeno-anticuerpo, simplificar la técnica original para transformarlo en un método comparativo de diagnóstico y tipificación.

De acuerdo a la índole del trabajo, analizaremos cada uno de los factores participantes en la inmunocromatografía, agrupándolos en antígeno - suero - mezcla reaccionante-cromatografía de la mezcla.

B) P A R T E E X P E R I M E N T A L

1 - M A T E R I A L E S

a) Antígenos víricos

Afta o linfa de bovino infectado - Obtenidos por inocular intradermo lingual de 10^{-6} DI 50 de cada uno de los virus tipos existentes en el Institute de Fiebre Aftosa. El material (epitelio o linfa) se recogió a las 24 hs. de la infección. El título de virus del epitelio determinado por técnica de Fijación de Complemento osciló entre 1/10 y 1/20 y de 1/600 para la linfa (19) (20).

Afta de cobayo - Obtenida por inoculación intradermo plantar de cobayo, con 0,5 ml. de una dilución 1/10 de virus conteniendo 2.5% de saponina y que había sido adaptado previamente a dicho animal, por pasajes sucesivos por la misma vía.

El material recogido a las 24 horas, tenía un título de fijación de complemento de 1/8.

Virus cultivado sobre cultivo de células renales de cerdo - Obtenido de acuerdo a las técnicas (24)(25)(26)(27) y (28). Estos materiales se conservaron siempre congelados a -20°C .

b) Sueros

Suero hiperinmune de cobayo - Obtenidos de acuerdo a (21). Los títulos de fijación de complemento oscilaron entre 1/30 y 1/100.

///

Sueros convalecientes de bovinos - Obtenidos de animales provenientes de una zona libre de aftosa inoculados por vía intradérmica, con sendas diluciones de los virus correspondientes y recogidos a los 16 días de post-infección, aproximadamente en el pico de mayor concentración de anticuerpos. El título determinado por fijación de complemento osciló alrededor de 1/640 (20).

Suero normal de bovino - Se extrajo de los mismos animales antes de ser infectados; con ellos se hizo una mezcla con la cual se trabajó.

Suero normal de caballo - Obtenido de por lo menos veinte animales por punción cardíaca y mezclado una vez obtenido.

Gemas globulinas - Obtenidas de sueros normales e hiperinmunes de caballo, por fraccionamiento con sulfato de amonio al 50% de saturación. Disolución del precipitado, diálisis para eliminar el exceso de sales y concentración a la mitad del volumen original del suero.

Se controló siempre la pureza mediante electroforesis sobre papel. En algunas ocasiones esta fracción globulínica se marcó con isotiocianato de fluoresceína y Lisianina Rodamina B de acuerdo a las técnicas de Marshall y col. (22) y Uehleke (23). Se determinaron los títulos del suero original, gemas globulinas y gemas globulinas marcadas por seroneutralización, obteniéndose los siguientes resultados:

suero original: 80.000 DM50/ml (dosis neutralizante 50% ml.)

gema globulina: 10.000 "

gema globulina marcada: 10.000 "

Estas determinaciones fueron realizadas por la sección Cultivo de Tejidos del Instituto. Todos los materiales se conservaron congelados a - 20° C.

///

2 - SOLUCIONES

a) Solución fisiológica fosfatada

ClNa - 8,1 gr.
PO₄H Na₂ 12 H₂O - 2,4 gr.
Agua destilada - 1000 cc.
pH : 7.7 - 7.9

Esta solución se empleó para: Diluciones de antígenos y sueros, buffer de diálisis.

b) Solución de ClNH₄

ClNH₄ - 3.7 g.
NH₃ al 25% - 2 cc.
Agua dest.- 1000 cc.
pH : 9-9.2

Esta solución se empleó para la cromatografía.

c) Solución de veronal-veronal sódica

Acido dietilbarbitárico - 4.6 gr.
Agua destilada - 500 cc.

Hervir y agregar

CO₃Na - 2.52 gr.
dietilbarbiturate de sodio - 3.0 gr.
Cl₂Mg - 1 gr.
Cl₂Ca - 0.16 gr.
ClNa - 83.8 gr.

Agua destilada a - 2000 cc.

pH : 7.6

Se empleó para cromatografía.

d) Solución de azul de bromofenol. De acuerdo a la técnica de (18).

Azul de bromo-fenol 0.05 g.
Alcohol etílico 70 cc.
Acido acético glacial 5 cc.
Agua destilada 30 cc.

Todos los antígenos y sueros fueron provistos por la Sección Serología y Cultivo de Tejidos del Instituto de Fiebre Aftosa.

///

3 - TECNICAS

a) Técnica de fijación de complemento

Realizada por la Sección Serología del Instituto de acuerdo a las técnicas de (19)(20).

b) Técnicas inmunocromatográficas

b₁) Preparación de la solución de antígeno

1 g. de antígeno (afta bovina o de cobayo). Se trituró en mortero con ayuda de arena estéril. Se suspendió en solución fisiológica fosfatada de modo de tener una suspensión vírica de 1:4. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos; con servándose el sobrenadante con una concentración de 1/10.000 de mertiolato.

Para su uso este sobrenadante se centrifugó nuevamente a 20.000 rpm durante 20 minutos a 4°C; en una ultracentrífuga Spince L.

El líquido obtenido se conservó algunos días a 4°C; centrifugándolo nuevamente antes de emplearlo en caso de turbidez.

En los casos que se empleó linfa o suspensión de virus proveniente de cultivo renal se hicieron diluciones algo distintas que se mencionarán, en caso, al tratar estos materiales.

b₂) Preparación de la solución de suero

Sueros hiperinmunes de cobayo, sin inactivar y sin fenicar, se diluyeron con dos partes de solución fisiológica fosfatada, agregándose mertiolato 1/10000 como conservador. Se centrifugarán a 20000 rpm durante 20 minutos en la ultracentrífuga Spince L. Es posible centrifugar los sueros a menor velocidad, si se cumple la condición fundamental de que estén perfectamente claros; pues cualquier turbidez enmascara la reacción.

b₃) Mezcla de reactivos

Se utilizó una proporción óptima de 5.3 mg. de antígeno por mm³ de suero.

Ejemplo: 0.14 cc de solución de antígeno 1:4, se mezcló con 0.02 cc. de solución de suero 1:3 en un tubo de hemólisis, incubándose durante dos horas a 37°C.

b₄) Ornatografía de la mezcla antígeno-anticuerpo

Tiras de papel de fibra de vidrio de Schleicher y Schüll (glasvaserpapier N° 6) de 1 x 8 cm bañadas en una solución acuosa de Tween 80 al 5% (humectante no iónico que disminuye la adsorción), se secaron a 80°C y se guardaron sobre sílica gel, hasta su utilización.

Se pipetearon (con pipeta tipo Pasteur graduada) 0.02 a 0.04 cc de la mezcla, a 2 cm. del borde inferior del papel; ubicado en un aparato semejante al descrito por Stöess(14) con la diferencia que el papel cuelga libremente en el aire, evitándose así, que la punta de la pipeta deje una impresión visible en su superficie.

Una vez transferido el líquido al papel, y sin permitir que se seque, se ubicó inclinado dentro de un vasito de 2,5 cm de diámetro por 4 cm. de altura, que contenía 3 ml. de la solución de NiCl_2 .

Como la mayor parte del papel está en el aire, se produce una evaporación del líquido que difunde, permitiendo un lavado adicional. Después de 1 hora a temperatura ambiente se retiró, coloreó con la solución de azul de bromo fenol durante 5 minutos y lavó sucesivamente, durante 5 minutos cada vez, con ácido acético al 1% y agua destilada. Para facilitar la operación de coloración y lavado, se usó una bandeja de 30 por 28 cm con divisiones.

Se secaron al aire y las partes inferiores de los papeles, se archivaron.

///

Controles de suero. Se usó la solución fisiológica fosfatada pues el epitelio lingual bovino normal contiene pocas proteínas solubles y además resultó muy difícil eliminar la turbidez por centrifugación.

Control de antígeno. Se usó suero normal de conejo. En los ensayos, a las reacciones positivas (puntos azules del mismo diámetro que la pipeta), se les asignó arbitrariamente los valores comprendidos entre + y ++++ .

Se controlaron siempre, por la técnica de fijación de complemento, los antígenos y sueros utilizados, con el fin de que resultados negativos en cromatografía no estuvieran ocasionados por materiales en malas condiciones.

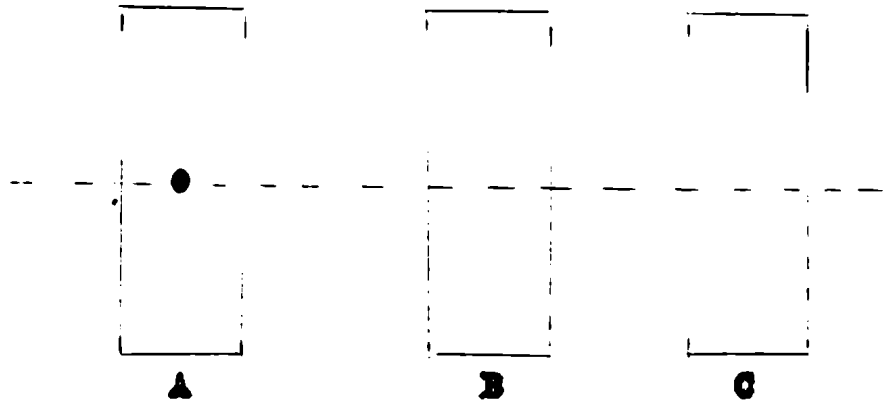


Fig. 1: A - Anestete de una reacción positiva entre virus O y suero homólogo.

B y C - Reacción negativa, el mismo virus con sueros heterólogos (anti A y anti C).

Nótese que en el caso de una reacción positiva la mancha que denota la formación del complejo antígeno-anticuerpo no corre y queda limitada a la zona de aplicación de la mezcla.

C) RESULTADOS

1 - Influencia del antígeno sobre la sensibilidad y especificidad de la reacción inmunocromatográfica.

Se ensayó la influencia de la linfa de origen bovino, afta de conejo y suspensión de virus proveniente de cultivo de tejidos.

///

En todos los casos se hicieron experiencias comparativas entre el material en estudio y uno que se tomó como tipo; en nuestro caso este fué una suspensión de virus proveniente de afta bovina que se empleó en una dilución tal como se indicó en el capítulo: Materiales.

En los cuadros N° 2, 3, 4 y 5 se indican los resultados obtenidos, así como las condiciones de cada experiencia.

CUADRO N° 1

Experiencia comparativa entre virus linfa y virus afta bovino

| Suero | Virus afta bovino(2) | Virus linfa (1) | Control suero |
|------------------|----------------------|-----------------|---------------|
| C(3) | + | ++++ | - |
| Control antigene | - | - | - |

- (1)- Linfa de bovino inactivada a 50°C diluida 1/10 en solución fisiológica. Título (fijación de complemento) 1/600-virus tipo C.
- (2)- Afta bovino diluida 1/4 en solución fisiológica fogatada. Título (fijación de complemento) 1/10 Virus tipo C .
- (3)- Suero hiperimmune de cobayo anti C. Título(fijación de complemento) 1/60

///

CUADRO N° 2

Experiencia comparativa entre virus afta cobayo y virus afta bovino

| Suero | Virus afta cobayo(2) | Virus afta bovino(1) | Control suero |
|-----------------|----------------------|----------------------|---------------|
| A (3) | - | ++++ | - |
| Control antiguo | - | - | - |

(1)- Ver cuadro N° 1. Virus tipo A

(2)- Afta de cobayo diluido 1/4 en solución fisiológica fosfatada. Título (fijación de complemento) 1/8

(3)- Suero hiperinmune de cobayo anti A.
Título (fijación de complemento) 1/60

Debido al resultado negativo obtenido se planeó otra experiencia variando:

a)- La concentración del antígeno (cobayo). Se empleó diluido 1/3.

b)- La relación antígeno-anticuerpo de la mezcla. En lugar de la relación 5/1, como se indicó al mencionar la técnica de trabajo, se ensayó una relación mayor, 7/1.

CUADRO N° 3

Experiencia comparativa entre afta de bovino y de cobayo
Variación de la relación antígeno-anticuerpo.

| Suero | Afta cobayo 1/4 Relación 7:1 | Afta cobayo 1/3 Relación 5:1 | Afta cobayo 1/3 Relación 7:1 | Afta bovino | Control suero |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------|
| A | - | +++ | +++ | ++++ | - |
| Control antiguo | - | - | - | - | - |

Ver cuadro N° 2

///

CUADRO N° 4

Experiencia comparativa entre afta de bovino y
virus de cultivo

| Suero (3) | Virus cultivo puro(2) | Virus cultivo diluido 1/4 | Afta bovino (1) | Control suero |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| A | - | - | ++++ | - |
| Control Antígeno | - | - | - | - |

(1) Ver cuadro N° 1. Virus tipo A

(2) Virus cultivado sobre células renales tipo A
Título: 10^7 DCP₅₀

(3) Ver cuadro N° 2

Esta experiencia se repitió con virus tipo O (título 10^4 DCP₅₀) siendo el resultado también negativo.

También se varió el tiempo de contacto de la mezcla antes de su corrida. Se dejó 24 horas. El resultado fue también negativo.

2 - Influencia de la pureza del antígeno sobre la sensibilidad y especificidad de la reacción inmunoelectroforética.

Se emplearon dos tipos de técnicas con el objeto de obtener suspensiones puras de antígenos.

a) métodos físicos - ultracentrifugación.

b) métodos químicos - Tratamiento con éter y cloroformo.

La purificación del virus por ultracentrifugación efectuada tal como se indicó más arriba, sigue siendo la técnica de elección para la aplicación de este método. Por ello el antígeno así purificado se tomó como elemento patrón de comparación.

///

CUADRO N° 5

Acción del tratamiento con éter sulfúrico sobre la pureza del antígeno

| Suero | Antígeno éter(1) | Antígeno éter(2) | Antígeno ultracentrifugado | Control suero |
|------------------|------------------|------------------|----------------------------|---------------|
| A (3) | ++++ | ++++ | +++ | - |
| Control antígeno | - | - | - | - |

- (1)- Afta bovina diluida 1/4. Centrifugada a 3500 rpm. durante 15 minutos. Sobrenadante más 50% de éter sulfúrico. Centrifugado a 3500 rpm. durante 15 minutos. Se empleó el sobrenadante.
- (2)- Suspensión afta bovina empleada en (1). Centrifugada a 3500 rpm. durante 15 minutos. El sobrenadante de tratar esta suspensión con 50% éter, se deja una noche a 4°C. Centrifugado a 3500 rpm. durante 15 minutos. Se empleó el sobrenadante.
- (3)- Ver Cuadro N° 1.

CUADRO N° 6

Acción del tratamiento con cloroformo sobre la pureza del antígeno

| Suero | Antígeno cloroformo (1) | Antígeno cloroformo (2) | Antígeno cloroformo (3) | Antígeno ultracentrifugado | Control Suero |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------|
| A(4) | +++ | +++ | ++ | ++++ | - |
| Control Antígeno | - | - | - | - | - |

- (1)- Afta bovina diluida 1/4. Centrifugada a 3500 rpm. durante 15 minutos. Sobrenadante más 10% de cloroformo. Se centrifuga a 3500 rpm. Se empleó el sobrenadante.
- (2)- Se usó el mismo procedimiento que en (1), pero con doble tratamiento de cloroformo.
- (3)- Se usó el mismo procedimiento que en (2), pero congelando el sobrenadante, entre el 1er. tratamiento con éter y el segundo.
- (4)- Ver Cuadro N° 2.

///

3 - Influencia de la concentración del antígeno sobre la sensibilidad y especificidad de la reacción inmunocromatográfica.

Frecuentemente reacciones negativas o débiles en cromatografía pueden tener su origen en el uso de antígenos débiles, de ahí la importancia que reviste la concentración de los mismos por métodos físicos o químicos.

Se ensayan las siguientes técnicas de concentración, ultracentrifugación y tratamiento con acetona y precipitación con $SO_4(NH_4)_2$.

a) Ultracentrifugación

Se empleó antígeno de afta bovino tipo 0, título en Fijación de Complemento 1/8, preparado en la forma ya indicada. El sobrenadante de centrifugar a 20000 rpm, se centrifugó nuevamente para eliminar proteínas desnaturalizadas durante 15 minutos a 5000 rpm.

Se comparó con el antígeno sin concentrar. No se observó ninguna diferencia en la cromatografía a pesar de que en la Fijación del Complemento, aumenta el título a más del doble.

b) Concentración con acetona

Se usó antígeno de afta bovino tipo 0, título en Fijación del Complemento 1/8, clarificado por tratamiento con cloroforme. Se agitó con una cantidad igual de acetona (a 4°C), se centrifugó a 4000 rpm. durante 20 minutos. El sedimento se disolvió en solución fisiológica fosfatada en la octava parte del volumen original de antígeno y que centrifugado nuevamente a 4000 rpm. durante 15 minutos para eliminar turbidez.

Se comparó con antígenos preparados por ultracentrifugación y sin concentrar. Esta técnica disminuyó la sensibilidad del método y no aportó ventaja alguna sobre la centrifugación. ///

c) Concentración con sulfato de amonio a media saturación.

Se emplearon afta de bovino tipo A, título Fij.de Compl. 1/4 y tipo o título en Fij.de Compl. 1/10 preparados en la forma acostumbrada. Se precipita con sulfato de amonio 50% saturación(30). Se disolvió el precipitado en la cuarta y octava parte del volumen original con solución fisiológica fosfatada. Se dializó durante 2 días contra esta misma solución a 4°C.

Se comparó con antígenos sin concentrar.

CUADRO N° 7

Influencia de la concentración mediante el sulfato de amonio en la sensibilidad y especificidad de la reacción inmunoelectroforética.

| Suero (3) | <u>VIRUS TIPO "O"</u> | | | <u>VIRUS TIPO "A"</u> | | | Control suero |
|------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------|
| | Ant. s/conc. | Ant. conc. 1/4 (1) | Ant. conc. 1/8 (2) | Ant. s/conc. | Ant. conc. 1/4 | Ant. conc. 1/8 | |
| O | +++ | ++++ | ++ | + | ++++ | + | - |
| A | - | - | - | - | - | - | - |
| Control Antígeno | - | - | - | - | - | - | - |

(1) Ver texto antígeno disuelto 1/4 con respecto al volumen original.

(2) Ver texto antígeno disuelto 1/8 con respecto al volumen original.

(3) Ver cuadro N° 2

4 - Acción protectora de diversas sustancias sobre los antígenos

Con el fin de evitar al máximo reacciones inespecíficas, sobre todo cuando la incubación de la mezcla es prolongada, se utilizaron diversas sustancias protectoras de los antígenos, a saber:

///

- a) Suero normal de cobayo - (1 cc. por gr. de antígeno).
- b) Suero normal de cobayo - (0.5 cc. por gr. de antígeno).
- c) Suero normal de cobayo inactivado - (0.5 cc. por gr. de antígeno).
- d) Suero normal de equino - (1 cc. por gr. de antígeno).
- e) Suero normal equino - (0.5 cc. por gr. de antígeno).
- f) Glicerina al 10% y 20%.

Se comparó con un antígeno sin proteger. A diferentes tiempos de incubación de la mezcla antígeno-anticuerpo, 2, 46 y 30 horas.

A intervalos largos de incubación todos protegen bien, pero al mismo tiempo a intervalos cortos retardan la reacción. Incubando 2 horas, se hace innecesario proteger el antígeno.

5 - Influencia de factores físicos y químicos inactivantes sobre la capacidad precipitante del antígeno.

Se emplearon antígeno de afta bovino tipos O, A y C (Título de fijación complemento 1/10). Los virus se extraen como se describe anteriormente en el capítulo de antígenos, y el sobrenadante obtenido de centrifugar a 3500 rpm; se dividió en tres fracciones:

- a) Se calentó a 56° C durante 30 minutos.
- b) Se trató con formal al 0.5% durante 3 días a 26° C.
- c) Se irradió con luz ultravioleta = 2537 Å con un tubo de 220 Volt, 50 ciclos; una capa de 1 mm de espesor del antígeno colocado en una caja de Petri, sin tapa, a una distancia de 15 cm. durante 10 minutos.

Los materiales de las tres experiencias se centrifugaron posteriormente a 20000 rpm. durante 20 minutos.

Se comparó con antígeno sin inactivar.

CUADRO N° 8**Influencia de la inactivación sobre la capacidad precipitante**

| Suero (4) | <u>del antígeno</u> | | | | | | | | | | | | Cont. Suero |
|---------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| | <u>Virus tipo "O"</u> | | | | <u>Virus tipo "A"</u> | | | | <u>Virus tipo "C"</u> | | | | |
| | A. g | A. i.(3) | A. i.(2) | A. i.(1) | A. g | A. i.(3) | A. i.(2) | A. i.(1) | A. g | A. i.(3) | A. i.(2) | A. i.(1) | |
| O | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A | - | - | - | - | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | - | - | - | - | - |
| C | - | - | - | - | - | - | - | - | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | - |
| Cont. Ant. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

A.=Antígeno

g = sin

i.=inactivado

(1) Ver texto antígeno inactivado por calor.

(2) Ver texto antígeno inactivado por formol.

(3) Ver texto antígeno inactivado por radiación ultravioleta.

(4) Ver Cuadro N° 2

6 - Influencia del tipo de suero sobre la sensibilidad y especificidad de la reacción inmunocromatográfica.

Se ensayaron :

a) Sueros de bovinos convalecientes.

Sueros de bovinos convalecientes tipo O y tipo A cuyos títulos de Fijación de Complemento fueron de 1/640. (20); diluidos 1/2 y 1/3 con solución fisiológica fosfatada.

Se empleó como antígeno afta bovino tipo O, título de Fijación de Complemento 1/10.

Se incubaron las mezclas durante 3 y 6 hs. con resultados negativos. Posteriormente se utilizó como antígeno linfa de bovinos infectados tipo A, título de Fijación de Complemento 1/600, diluida 1/10, inactivada a 56°C durante media hora; que para maestro ensayo reemplazó al antígeno de afta bovino diluido 1/4.

Se mezclaron en varias proporciones.

Con sueros diluidos 1/2, relación de antígeno / anticuerpo = 7/1, 5.3/1, 3.8/1, 2/1.

Con sueros diluidos 1/3, relación de antígeno / anticuerpo = 7/1, 5.3/1, 3.8/1, 2/1.

///

Los tiempos de incubación de las mezclas fueron de 3,6 y 12 horas, con resultados negativos.

Se supone que concentrando los sueros bovinos por pasaje a través de Sephadex (gel de dextrina polisacárida) (31), del que no se dispuso entonces, sería posible la precipitación con suero bovino, que se presentan sumamente débiles de Fijación de Complemento y sólo se puede tipificar con una técnica muy sensible (19). La posibilidad de usar sueros bovinos con valecientes facilitaría enormemente la recolección de material, pues a las dos semanas post-infección la curva de anticuerpos en el suero alcanza su máximo nivel.

b) gamas globulinas de sueros hiperinmunes de cabayos y las mismas marcadas con colorantes fluorescentes.

Se usó afta bovino tipo C, título de Fijación de Complemento 1/10. Las gamas globulinas fueron diluidas 1:2 con solución fisiológica fosfatada.

Se comparó con los mismos sueros sin fraccionar.

La reacción es más nítida con el suero sin fraccionar. En el fraccionamiento se pierde una gran parte de la capacidad reaccionante del suero. El mismo fenómeno se observa en Fijación de Complemento, presentando las gamas globulinas menor título que los sueros sin fraccionar. No es posible descartar totalmente, la utilidad que representará, el fraccionamiento de los sueros, en el sentido de eliminar proteínas no participantes en la reacción. Las técnicas de fraccionamiento en columna de DEAE celulosa (34) o electroforesis sobre gel de almidón que llevan a un mínimo la desnaturalización podrían resultar satisfactorios.

7 - Influencia de la inactivación sobre la capacidad precipitante de los sueros.

Como se disponía de un lote de sueros inactivados, era interesante saber, si conservaban su capacidad precipitante.

Se usó afta bovino tipos O y A, título de Fijación de Complemento 1/10, diluidas 1:5.

///

Sueros de cobayos tipos O y A, título de Fijación de Complemento 1/60, los que se dividieron en dos partes. A una se la inactivó por calentamiento a 50° C durante media hora.

La relación antígeno / anticuerpo en la mezcla fue

8/1.

CUADRO N° 9

Influencia de la inactivación sobre la capacidad precipitante de los sueros.

| Suero | Antígeno tipo O (4) | Antígeno tipo A(4) | Control suero |
|------------------|---------------------|--------------------|---------------|
| O(1) | ++++ | - | - |
| O(2) | - | + | - |
| A(1) | - | ++++ | - |
| A(3) | - | - | - |
| Control Antígeno | - | - | - |

- 1) Ver cuadro N° 2
- 2) Ver texto suero inactivado.
- 3) Ver texto suero inactivado.
- 4) Ver texto antígeno diluido 1:5

Disminuye casi totalmente la capacidad precipitante de los sueros al inactivarlos por calor.

Suponiendo que el complemento pudiera intervenir en la precipitación, se agregó suero fresco de cobayo como fuente de complemento de alto título; en variadas proporciones 1;2;3;4;5; 20 y 30% con respecto al suero.

Independientemente se variaron las proporciones de la mezcla antígeno-anticuerpo en el sentido de incrementar la cantidad de suero, desde 4/1;3/1;2/1 y 1/1.

Se efectuó un control con suero sin inactivar.

Se usaron antígeno afita bovino tipos O, A y C título de Fijación del Complemento 1/10 y los tres sueros tipo específicos O, A y C, cuyos títulos de Fijación de Complemento fueron 1/60.

///

CUADRO N° 10

Influencia del complemento en la capacidad precipitante de sueros inactivados.

Variación en la relación antígeno/anticuerpo

Suero tipo "O"

| A. afta | S. g | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | S. i. | Control Antigemo |
|---------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | 1. | |
| | | | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) | (10) | (11) | (12) | | | |
| 0 | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Control Suero | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

S.=Suero

g =sin

i.=inactivado

- (1) suero inactivado, con el agregado de 1% de suero fresco de ceba
- (2) idem, idem, con el agregado de 2% (yo normal.
- (3) idem, idem, con el agregado de 3%
- (4) idem, idem, con el agregado de 4%
- (5) idem, idem, con el agregado de 5%
- (6) idem, idem, con el agregado de 10%
- (7) idem, idem, con el agregado de 20%
- (8) idem, idem, con el agregado de 30%
- (9) Relación antígeno/anticuerpo en la mezcla 1/1
- (10-11-12) idem, idem, idem en la mezcla 2/1, 3/1 y 4/1 respectivamente

El esquema anterior se repitió exactamente con antígenos y sueros tipo A y C.

Prácticamente no hay precipitación, con sueros inactivados con el agregado de complemento; es decir, que éste no parece jugar ningún papel en la reacción antígeno-anticuerpo, estudiada mediante esta técnica.

Debe producirse seguramente una desnaturalización de los anticuerpos precipitantes o pérdida de su poder floculante(32) y (33).

8 - Acción de conservadores sobre los sueros

Se ensayaron como conservadores el fenol y el mertiolato, el primero en concentración del 0.5% y el segundo en concentración del 1%.

Los sueros así tratados se conservaron en heladera a 4°C. Como control se utilizaron los mismos sueros, sin el agregado de conservadores, congelados a - 20° C.

///

Se realizaron ensayos con los tres sueros, cada quince días, hasta cuatro meses después del agregado de conservadores comprobándose su inalterabilidad.

9 - Relación entre la actividad fijadora de complemento de sueros hiperinmunes de cobayo y su capacidad precipitante.

Sueros tipo C, cuyos títulos de Fijación de Complemento fueron de 1/30; 1/40; 1/50; 1/60; 1/80 y 1/100.

En el cuadro N° 11 se indican los resultados obtenidos.

CUADRO N° 11

Relación entre la actividad fijadora de complemento y capacidad precipitante de sueros hiperinmunes de cobayo

| Suero | Antígeno C (1) | Control de suero |
|------------------------|-------------------|---------------------|
| C T:1/30 (2) | ++ | - |
| C T:1/40 (3) | ++ | - |
| C T:1/50 (4) | +++ | - |
| C T:1/60 (5) | +++ | - |
| C T:1/80 (6) | ++++ | - |
| C T:1/100 (7) | ++++ | - |
| Control de antígeno | - | - |

- (1) Antígeno afta bovino tipo C, preparado de acuerdo a la técnica incluida en el capítulo, antígeno.
- (2) Suero de cobayo tipo C, título de fijación de complemento 1:30.
- (3) Idem, título 1/40.
- (4) Idem, título 1/50.
- (5) Idem, título 1/60.
- (6) Idem, título 1/80.
- (7) Idem, título 1/100.

10 - Factores que pueden afectar la reacción antígeno-anticuerpo.

a) Relación de antígeno y anticuerpo de la mezcla reaccionante

Se variaron las proporciones en la mezcla antígeno-anticuerpo, con el fin de lograr un máximo de

precipitación. Desde 8 mg de antígeno por mm³ de suero hasta 1 mg de antígeno por mm³ de suero. Se encontró el óptimo en la relación 5.3 mg de antígeno por mm³ de suero. Esta cifra no es estricta, pues en el caso de antígenos o sueros débiles, sería necesario aumentar la proporción en favor de algunos de los componentes. Pero trabajando con sueros cuyos títulos varían entre 1:40 y 1/100 y antígenos entre 1:10 y 1:20, es la más adecuada.^(x)

La cantidad mínima necesaria para obtener una reacción visible, es de 0.02 ml, y teniendo en cuenta la proporción anterior, corresponde a 0.00435 g de antígeno y 0.00087 ml de suero.

b) Acción de la temperatura y tiempo de incubación de la mezcla, sobre la sensibilidad y especificidad de la reacción inmunocromatográfica.

Se usaron aftos de bovinos tipos O, A y C con títulos de fijación de complemento 1/10 y sueros hiperinmunes de cobayo de los tres tipos con títulos de fijación de complemento 1/60.

Se incubó la mezcla a 37°C y 45°C, con la eliminación del suero normal de cobayo como agregado protector del antígeno (16), pues se comprobó anteriormente que protege los antígenos, pero al mismo tiempo inhibe la combinación antígeno-anticuerpo.

Se efectuaron ensayos dejando incubar la mezcla durante 30 minutos, 1 hora, 2, 3, 6, 12, 18 y 24 horas.

Se comprobó que: El aumento de temperatura no lleva aparejado aumento en la velocidad de reacción.

Con respecto al tiempo de incubación de la mezcla, ya se observó la precipitación a los 30 minutos.

(x) Estos resultados ya fueron adelantados en el trabajo publicado en el Zbl.f.Bakt.L.Orig., 182:135 (1961)

la que desarrolló perfectamente a las 2 horas de incubación.

Se logró con esta modificación, una disminución en el tiempo requerido para una tipificación.

Con la temperatura ocurre lo mismo que con la proporción antígeno-anticuerpo en la mezcla, los sueros débiles aumentan la precipitación, si se permite la incubación de la mezcla durante un período mayor de tiempo.

Por lo que, en caso de resultados negativos a las 2 horas, es aconsejable repetir el ensayo, con la misma mezcla, prolongando el período de incubación hasta 12 horas. (x)

c) Factores acelerantes de la precipitación

Físicos - agitación.

Las mezclas de antígenos y sueros, se agitan mecánicamente durante 20, 40 y 60 minutos, a 37°C. En todos los casos se completó la incubación hasta 2 horas.

No se observó diferencia en la precipitación, entre mezclas sometidas a agitación e incubadas en la forma usual.

d) Factores inhibidores de la precipitación

Con el fin de evitar reacciones cruzadas entre antígenos y sueros pertenecientes a distinto tipo, que frecuentemente presentan inespecificidad a baja dilución por fijación de complemento, se absorbieron los sueros antes de la mezcla, con soluciones de virus heterólogo.

Suero tipo O título de fijación de complemento 1:60.

A 0.25 cc. de este suero, se agregó 0.15 cc de un extracto vírico 1:4 tipo A + 0.15 cc de un extracto vírico 1:4 tipo C + 0.155 cc de solución fisiológica fosfatada + 0.045 cc de solución de mertiolato 1:10.000.

(x) Estos resultados ya fueron adelantados en el trabajo publicado en el Zbl.f.Bakt. I. Orig. 182:135(1961)

De manera tal, que el suero queda finalmente diluido 1:3. Se incubó durante 22 horas a 37°C. Se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos.

Se mezcló como de costumbre al antígeno y suero absorbido.

Se efectuó un control con el mismo suero sin absorber.

Se tomaron muestras de la mezcla ~~para~~ 2 horas y se realizó la cromatografía de ellas.

CUADRO N° 12

Influencia de la absorción de los sueros, en el tiempo de incubación de la mezcla antígeno-anticuerpo.

| Suero | Antig. afta 0 (3) | Antig. afta A (4) | Control suero |
|------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 0 s/abs. (1) | ++++ | - | - |
| 0 s/abs. (2) | - | - | - |
| Control antígeno | - | - | - |

| Suero | Antig. afta 0 (3) | Antig. afta A (4) | Control suero |
|------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 0 s/abs. (1) | ++++ | ++ | + |
| 0 abs. (2) | ++++ | - | - |
| Control antígeno | - | - | - |

12 a) Tiempo de incubación:
2 horas.

12 b) Tiempo de incubación:
26 horas.

- (1) Suero tipo 0, título de fijación de complemento 1:60, sin absorber, preparado de acuerdo a lo describe en capítulo de sueros.
- (2) Suero tipo 0, título de fijación de complemento 1:60, absorbido con virus heterólogo, ver texto anterior.
- (3) Antígeno afta bovino tipo 0, título de fijación de complemento 1:8.
- (4) Antígeno afta bovino tipo A, título de fijación de complemento 1:8.

De acuerdo a los resultados sintetizados en los cuadros 12 a) y 12 b), la absorción de los sueros con virus heterólogo, inhibe la capacidad de reacción

cruzada, que sí tiene lugar con los sueros sin absorber, cuando la incubación es prolongada. Pero al mismo tiempo retarda la precipitación homóloga.

De acuerdo a la experiencia, de todos los ensayos anteriores, en una incubación breve sólo reaccionan los virus y sueros homólogos específicamente; lo que hace obvio la absorción de los sueros.

11 - Factores que afectan la cromatografía de la mezcla

a) Tipos de papel utilizados.

Se demostró la superioridad del papel de fibra de vidrio de Schleicher y Schüll (Glasfaserpapier N° 6) sobre otros papeles como Schleicher y Schüll 2400; pues permite una visualización mejor del precipitado.

b) Soluciones utilizadas en la corrida cromatográfica

En todos los ensayos se utilizó la solución de cloruro de amonio pH 9 -9,2.

Sin embargo, previendo que ese pH resultara inconveniente, pues podría solubilizar algo, el precipitado específico; se realizó un ensayo comparativo utilizando solución de veronal pH 7 -7,2, como líquido de corrida cromatográfica.

No es posible apreciar ninguna diferencia utilizando estas dos soluciones.

c) Tiempo necesario para efectuar la corrida cromatográfica.

Se intentó disminuir el tiempo de cromatografía, de 1 hora a 30 minutos; no encontrándose resultados satisfactorios. Pues a los 30 minutos aún quedan retenidas, junto al precipitado, algunas proteínas inespecíficas.

12 - Estudio comparativo realizado con la técnica de fijación de complementos en inmunocromatografía, sobre los mismos materiales.

CUADRO N° 13

Estudio comparativo sobre materiales presuntamente infecciosos y otros, enviados al instituto para su tipificación; no obstante ambas técnicas.

| N° de muestra | Técnica inmuno-cromatográfica (1) | Técnica fijación de complemento (2) |
|---------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | neg | neg |
| 2 | neg | neg |
| 3 | neg | neg |
| 4 | neg | neg |
| 5 | neg | neg |
| 6 | A | A |
| 7 | neg | A |
| 8 | neg | A |
| 9 | C | C |
| 10 | A | A |
| 11 | O | O |
| 12 | O | O |
| 13 | neg | neg |
| 14 | neg | neg |
| 15 | neg | neg |
| 16 | A | A |
| 17 | O | O |
| 18 | neg | neg |
| 19 | O | O |
| 20 | neg | neg |
| 21 | neg | A |
| 22 | neg | C |
| 23 | neg | A |
| 24 | O | O |
| 25 | A | A |
| 26 | C | C |
| 27 | neg | C |
| 28 | A | A |
| 29 | neg | C |
| 30 | neg | C |
| 31 | neg | C |
| 32 | O | O |
| 33 | C | C |
| 34 | O | O |
| 35 | neg | neg |
| 36 | O | O |
| 37 | C | C |
| 38 | C | C |
| 39 | O | O |
| 40 | O | O |
| 41 | O | O |
| 42 | C | O |
| 43 | neg | C |
| 44 | O | O |
| 45 | neg | A |
| 46 | C | C |
| 47 | A | A |

- (1) Resultados obtenidos en la tipificación con la técnica inmunocromatográfica.
- (2) Resultados obtenidos en la tipificación de los mismos materiales, con la técnica de fijación de complemento.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la coincidencia entre ambos métodos es del 76%.

Los resultados no coincidentes han sido aquellos en que por usar antígenos débiles (como son por otra parte, la mayoría de los materiales de campo) no se produce ninguna reacción con la técnica cromatográfica.

La concentración de antígeno dió buenos resultados, como se demostró anteriormente, es posible por lo tanto aumentar la coincidencia entre ambas técnicas, concentrando los antígenos débiles.

D.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

Para sueros y antígenos cuyos títulos por fijación de complemento varían entre 1/30 y 1/100, y de 1/10 a 1/20 respectivamente, la relación óptima antígeno anticuerpo hallada fué de 5 mg. antígeno (afta bovina) por ml de suero (suero hiperimmune de cobayo).

El tiempo de incubación de la mezcla, necesario para la formación del complejo antígeno anticuerpo, fué reducido a sólo dos horas. Con lo que un diagnóstico de tipificación puede ser terminado en pocas horas.

En el caso de antígenos y sueros débiles, un aumento en el tiempo de incubación favorece la formación del complejo.

Se comprobó que la linfa de bovino, proveniente de animales infectados, es superior como antígeno al de afta bovina aún en menor concentración, y este puede ser reemplazado satisfactoriamente por aftas de cobayo infectadas, cuya obtención más accesible es obvio señalar.

La inactivación de los antígenos por medios físicos (calor, radiación ultravioleta) o químicos (formol) no modifica la formación del complejo antígeno anticuerpo lo que posibilitaría la aplicación de esta técnica a la valoración de vacunas con virus inactivado por formol.

En cambio los sueros inactivados por calor, pierden casi totalmente su capacidad de reaccionar frente al antígeno, o resulta imposible detectar el complejo antígeno anticuerpo, en el caso de formarse. No es posible atribuir esta inhibición a la pérdida de complemento que se produce también a 56°C.

Los sueros reaccionan perfectamente, aún después de ser conservados durante meses, a 4°C, con fenol o mertiolate.

La clarificación de los antígenos a altas velocidades puede ser evitada por la purificación con éter o cloroforme.

La concentración de antígenos débiles, por medios químicos (sulfato de amonio) se utilizó con éxito.

Las diversas sustancias usadas con el fin de proteger al antígeno y evitar precipitaciones inespecíficas retardan la formación del complejo antígeno anticuerpo. Ocurre algo similar cuando los sueros son absorbidos con virus heterólogos para evitar reacciones cruzadas entre sueros y virus de distinto tipo.

No ha sido posible utilizar satisfactoriamente como material de diagnóstico, sueros de bovinos convalescientes, posiblemente por su baja concentración de anticuerpos. Por otro lado el reemplazo de sueros por sus gamas globulinas, concentradas hasta seis veces su volumen original, no representa una ventaja. Se supone que sería necesario concentrar el suero, por otros medios que no llevaran aparejados desnaturalización de proteínas.

Se ha comprobado un cierto paralelismo entre los títulos de suero, determinados por fijación de complemento, y la capacidad de combinación con el antígeno en la inmunocromatografía. A mayor título por fijación de complemento, mayor intensidad de precipitado coloreado.

Se tipificaron materiales de campo presuntamente infecciosos y otros, por fijación de complemento y por inmunocromatografía, comprobándose una coincidencia del 76%.

Los resultados no coincidentes han sido aquéllos en que por usar antígenos débiles o sueros de bajo título, no se producen ninguna reacción. Pero nunca se han obtenido resultados diferentes entre inmunocromatografía y fijación de complemento, en el caso de reacciones positivas por cromatografía.

Los resultados encontrados demuestran la posibilidad de usar la inmunocromatografía como método comparativo para la tipificación y el diagnóstico del virus aftoso. Es una técnica menos sensible que fijación de complemento pero que reúne en cambio las ventajas de su sencillez, rapidez y economía.

Por otro lado, las bases generales establecidas para la inmunocromatografía del virus aftoso, pueden utilizarse en el futuro para la aplicación de esta técnica a otros virus en los que no se disponga de un método sencillo de diagnóstico y tipificación "in vitro".

2.- RESUMEN

Se realizó un estudio sistemático sobre la acción de factores de orden físico y químico, que actuando sobre antígeno, anticuerpo, y combinación antígeno anticuerpo, influyen en la sensibilidad y especificidad de la reacción inmunocromatográfica.

Se logró simplificar la técnica original, lo que posibilita su aplicación, como método comparativo, a la tipificación y diagnóstico del virus aftoso.

Se agradece profundamente al Dr. Carlos O. Hobohn, el asesoramiento prestado en el trabajo de tesis presentado. Ayuda que facilitó considerablemente la resolución de los problemas inherentes al mismo; como así también al Dr. Osvaldo A. Peso, por su ayuda en el ordenamiento del trabajo.

Se agradece al Director del Instituto de Fiebre Aftosa Dr. ^{Sección} Scholeim Rivenson, a todos los técnicos del mismo y al personal auxiliar de la Sección Química, la valiosa colaboración recibida.

Este trabajo fué realizado en el Instituto de Fiebre Aftosa, Centro de Investigaciones Agropecuarias. INTA.-

Adriano Zucchi

BIBLIOGRAFIA

- 1) CIUCA, A. - J. of Hyg. 28:325 (1929).
- 2) TRAUB, E. y MOHLMANN, H. - Zbl. f. Bakt. I. Orig. 150:289 (1943).
- 3) " " " " " " " " " 150:300 (1943).
- 4) FRANKLIN, A. E. y QUASTEL, H. J. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74:803 (1950).
- 5) FRANKLIN, A. E., QUASTEL, H. J. y van STRATEN, S. F. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 77:783 (1951).
- 6) GIRI, K. V. - Experientia, 11:165 (1955).
- 7) QUASTEL, J. H. y van STRATEN, S. F. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81:6 (1952).
- 8) TAUBER, H. y PETIT, E. L. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80: 143 (1952).
- 9) PORTER, R. - Brit. Med. Bull. 10:237, (1954).
- 10) WUNDERLY, Ch. - Die Papierelktrophorese. Verlag H. R. Sauerländer y Co. Aaran 1954.
- 11) CASTANEDA, M. R. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 83:36 (1953).
- 12) HESS, W. R. y ROELPKKE, M. H. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 77:409 (1951).
- 13) HODES, H. L., ZEPP, H. D., HENLEY, W. L. y BERGER, R. - Science, 125:1089 (1957)
- 14) STOESS, B. - Zbl. f. Bakt. I. Orig. 171:103 (1957).
- 15) HOBORN, K. O. y RIVENSON, S. - RIC (Rev. Invest. Gen.) (7):293 (1959).
- 16) " " " " " " " " " (9):129 (1960).
- 17) HOBORN, K. O., RIVENSON, S. y BANCHERO, E. P. de - Zbl. f. Bakt. I. Orig. 182:135 (1961).
- 18) MIQUEL, J., HORVATH, B. y KLATZO, F. - J. Immunol. 84:545 (1960).
- 19) OSLER, A., STRAUSS, J. H. y MAYER, M. - Am. J. Syph. Gen. and Vener. Dis. 36(2). (1952).
- 20) MARUCCI, A. A. - Am. J. of Vet. Res. 18(69). 1957
- 21) RIVENSON, S. - Rev. Med. Vet. 38(1):13-22, (1956).
- 22) MARSHALL, EVELAND y SMITH. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98:898-900 (1958).
- 23) UEHLEKE, H. - Die Naturwissenschaften, 45(4):87. (1958).
- 24) SELLERS, R. P. - Nature. 176:547 (1955).
- 25) DULBECCO, R. - Proc. US. Nat. Acad. Sci. - 38:747 (1952).
- 26) DULBECCO, R. y VOGT, M. - J. exp. Med. 99:167 y 183 (1954).
- 27) YOUNGNER, J. S. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 85: 202 (1954)
- 28) BACHRACH, H. L. y cols. - Science, 122:1269 (1955).
- 29) PYL, G. - Exp. Vet. Med. 7:238 (1953).

///

- 30) BROWN, F. y CRICK, J. - *Virology*, 5:133 (1958).
- 31) FLODIN, GELOTTE y DORATH. - *Nature*, 188(4749):493(1960).
- 32) KLECZKONSKI, - *Brit. J. Exp. Path.*, 22:188 (1941).
- 33) RAGLE, H. - *J. Exp. Med.*, 67:495 (1938).
- 34) LEVY, H. D. y SOBER, H. - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103:250(1960).