Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Aplicación de las técnicas de fijación de complemento, inmunofluorescencia e inmunocromatografía al estudio del virus de la peste porcina

Zakin, Mario Manuel

1963

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 Master's and 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:
Zakin, Mario Manuel. (1963). Aplicación de las técnicas de fijación de complemento, inmunofluorescencia e inmunocromatografía al estudio del virus de la peste porcina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1192_Zakin

Cita tipo Chicago:
Zakin, Mario Manuel. "Aplicación de las técnicas de fijación de complemento, inmunofluorescencia e inmunocromatografía al estudio del virus de la peste porcina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1192_Zakin

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293
Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

1192

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Aplicación de las técnicas de fijación de complemento, inmunofluorescencia e inmunocromatografía al estudio del virus de la peste porcina

Mario Manuel Zakin

Resumen de tesis

Año 1963

R de Tesis 1192

Uno de los problemas más importantes en la lucha contra la peste porcina, es el de contar con un método de diagnóstico rápido y simple. Hasta el momento, el único medio de confirmar un diagnóstico de peste porcina es inocular en cerdos una suspensión filtrada de órganos de animales pertenecientes a la piara sospechosa, pero éste es un método que a la pérdida de tiempo, añade un costo muy elevado.

Esta necesidad de corroborar el diagnóstico es debida a que los síntomas clínicos de la enfermedad tales como elevación de la temperatura, anorexia, laxitud progresiva hacia la ataxia, vómitos, diarreas, convulsiones, decoloramiento de la piel, etc., hallados en los casos agudos y subagudos de peste porcina, pueden ser producidos por otros agentes etiológicos.

El presente trabajo tuvo por objeto, en primer término, detectar antígeno de peste porcina en los órganos de animales supuestamente enfermos, realizando un estudio comparativo con las técnicas de inmunofluorescencia, inmunocromatografía y fijación de complemento (50% de hemólisis), confirmándose los resultados con el método de inoculación en animales receptivos.

Se determinó la sensibilidad de cada uno de estos métodos, comprobándose que la técnica que más se acercó a la efectividad de la inoculación en cerdos fué la de fijación de complemento (50% de hemólisis). La coincidencia entre ambos procedimientos fué de un 74.3%.

Fué demostrada la superioridad del método de fijación de complemento, para la detección del virus de la peste porcina, sobre las técnicas de inmunofluorescencia e inmunocromatografía, sin haber agotado aún las investigaciones sobre esta última prueba serológica.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta primera fase de la experiencia emprendida, se postularía la importancia del método de fijación de complemento para el diagnóstico de laboratorio de la peste porcina, ya que en cualquier ocasión en que sería necesario diagnosticar un caso sospechoso, un resultado positivo en esta prueba serológica ahorraría inoculaciones en animales receptivos, mientras que un valor negativo, necesitaría confirmación,

///

justamente debido a su menor sensibilidad con respecto al método clásico actualmente en uso.

Esta postulación podría llevarse a la práctica una vez que se hayan realizado experiencias con materiales provenientes de cerdos infectados por otros agentes víricos o bacterianos, de manera tal, de eliminar cualquier sospecha de una reacción cruzada.

La segunda parte de este trabajo consistió en la detección de antígeno en animales infectados experimentalmente y sacrificados a distintos tiempos post-inoculación, con el fín de determinar el momento de aparición del antígeno en los distintos órganos de dichos animales.

Las técnicas usadas en esta segunda etapa fueron inmunofluorescencia y fijación de complemento (50% de hemólisis) y los órganos analizados fueron ganglios mesentéricos, bazo y riñón.

La inoculación de los cerdos se realizó con una suspensión al 1% de virus de peste porcina.

Si bien se consiguió detectar por fijación de complemento, vestigios de antígeno en los bazos de animales sacrificados a los seis y siete días después de su inoculación, se comprobó la aparición de antígeno en cantidades significativas, solamente en bazo y ganglios de animales sacrificados ocho días después de su infección.

En los riñones de los animales infectados no se pudo determinar la presencia de antígeno, habiéndose realizado ensayos hasta el octavo día post-inoculación.

En estas últimas pruebas se confirmó nuevamente la mayor sensibilidad de la técnica de fijación de complemento sobre la de inmunofluorescencia, en la detección del virus de la peste porcina.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Aplicación de las técnicas de fijación de complemento, inmunofluorescencia e inmunocromatografía al estudio del virus de la peste porcina

Mario Manuel Zakin

Tesis presentada para optar al
Título de Doctor en Química
(Orientación Química Biológica)

Año 1963

T. Q. 1963 1'2

Padrino de tesis:

Dr. Osvaldo A.Peso

Uno de los problemas más importantes en la lucha contra la peste porcina es el de contar con un método de diagnóstico exacto, rápido y simple. En general, los métodos serológicos tradicionales han resultado poco eficientes en ese sentido y hasta estos momentos la única forma de realizar un diagnóstico válido es mediante un estudio de las manifestaciones clínicas del supuesto enfermo con una posterior confirmación por estudios histológicos y tests de laboratorio, que a pesar de hallarse generalmente en estado de investigación, pueden contribuir grandemente a clarificar el panorama.

El mejor medio de confirmar un diagnóstico de peste porcina, es inocular en cerdos una suspensión filtrada de órganos de animales pertenecientes a la piara sospechosa, pero éste es un método que a la pérdida de tiempo añade un costo sumamente elevado.

La necesidad de hallar un método rápido y simple es aún más imprescindible en los casos crónicos de peste porcina que en los casos agudos, donde los trastornos clínicos son más manifiestos.

Los síntomas básicos de la enfermedad, tales como la elevación de la temperatura, anorexia, lasitud progresiva hacia la ataxia, vómitos, diarrea, convulsiones, decoloramiento de la piel, etc., hallados en los casos agudos y subagudos de peste porcina, pueden encontrarse presentes en numerosas enfermedades propias de los porcinos; de ahí la necesidad de realizar esos estudios confirmatorios aludidos en párrafos anteriores.

//2

De acuerdo a Dunne (1) el diagnóstico en animales con infección aguda puede ser hecho por demostración de leucopenia, en presencia de adecuados signos clínicos corroborados mediante resultados positivos en cualquiera de los métodos serológicos actualmente en estado de investigación.

Los procedimientos con que un investigador cuenta para detectar o titular los antígenos y anticuerpos de la peste porcina, cada uno de ellos con limitaciones de sensibilidad o especificidad, con la sola excepción de la técnica que será citada con el número 1, son:

1) Inoculación en cerdos
2) Hemaglutinación (2)
3) Técnica de la absorción del complemento aglutinante del suero equino (conglutinación) (3)
4) Test de seroneutralización con la única cepa citopatógena hallada hasta el momento (cepa A) (4)
5) Siembra en cultivos celulares de cepas no citopatógenas, en combinación con el virus de Newcastle, cuya patogenicidad para las células renales porcinas acelera (5)
6) Método de difusión en agar (6, 7).

Pocos ejemplos serán suficientes para comprender las limitaciones de cada método y, así, entender la necesidad de continuar las investigaciones en este problema.

Utilizando la técnica de hemaglutinación, Segre (2) encuentra que la eficiencia del método, en animales infectados experimentalmente, fué de un 44% sobre 32 bazos analizados.

En cambio, 10 de 12 animales con peste porcina natural, dieron resultado positivo. En este trabajo Segre discute la posibilidad de que la sangre podría ser mejor antígeno que el bazo, pero aún no se hicieron suficientes ensayos y no se determinó exactamente la presencia de reacciones positivas falsas.

El test de neutralización con la cepa A de peste porcina se halla aún en etapa experimental y sirve sólo para detectar anticuerpos en sueros de animales sospechosos.

Con respecto al método de difusión en agar, los resultados son variables, sobre todo analizando los trabajos de distintos autores. Asi, por ejemplo, Paarman y Ernst (6) diagnosticaron 56 casos en 110 cerdos muertos de peste porcina, lo que indica un 51% de efectividad; mientras que Kúlesko y Sobko (7) obtuvieron en animales enfermos un 95% de efectividad, pero una proporción de 24% de positivos en animales sanos, lo que indica un importante porcentaje de resultados falsos positivos; además obtuvieron reacciones positivas en 13 de 59 animales enfermos de gastroenteritis, y en 26 de 30 casos que no presentaban síntomas de peste porcina clásica.

Schoop y Wachendörfer (8) aconsejan la prueba de Ouchterlony, pero no indican el grado de sensibilidad del método ni su especificidad.

Otro de los métodos que pareció dar resultados fué el de Taylor (9), basado en la tendencia de que el virus de la peste porcina inhibe la producción de amilasa en el páncreas, pero posteriormente se objetó su ineficacia en enfermedades crónicas; además se demostró una serie de reacciones falsas, como

por ejemplo en ciertas toxemias, y de que dietas altas de grasas dieron resultados positivos en este test. En algunos casos de enteritis, también se observaron reacciones positivas.

El objeto de este trabajo fué, en primer término, detectar antígeno de peste porcina en órganos de animales supuestamente enfermos, mediante el empleo de las técnicas de inmunofluorescencia, inmunocromatografía y fijación de complemento (50% de hemólisis), comparativamente con el método más seguro de inoculación en animales receptivos. De esta manera se trató de determinar cuál de dichas técnicas sería la más sensible y específica, con el fin de eliminar el método de inoculación.

La segunda parte de estas experiencias consistió en la detección de antígeno en animales infectados experimentalmente y sacrificados a distintos tiempos post inoculación, con el objeto de determinar el momento de aparición del antígeno en los órganos de dichos animales. Las técnicas ensayadas en esta segunda etapa fueron inmunofluorescencia y fijación de complemento (50% de hemólisis).

Antecedentes históricos

INMUNOFLUORESCENCIA:

Fué en el año 1934 que Marrack (10) demostró la posibilidad de unión química entre moléculas de colorantes con anticuerpos, sin modificar la capacidad de estos últimos de reaccionar en forma específica con sus respectivos antígenos; posteriormente fueron Coons y col. en 1941 (11) y en 1942 (12), y Coons y Kaplan en 1950 (13), quienes desarrollaron las técnicas más precisas de

detección de antígenos de distinto tipo mediante anticuerpos acoplados con colorantes fluorescentes diversos, tales como isocianato e isotiocianato de fluoresceina.

Una de las corrientes más importantes en el empleo de los anticuerpos fluorescentes se dirigió hacia la investigación de antígenos víricos, y así, numerosos virus se pudieron detectar mediante la inmunofluorescencia, ya que dicha técnica permite la localización intracelular precisa del antígeno vírico. El método no solo se utilizó en la localización de un material virulento, sino también como método potencial de diagnóstico y en estudios de interacción virus-célula huésped. Dos son los antecedentes conocidos de aplicación de anticuerpos fluorescentes en peste porcina. Uno de ellos lo constituye el trabajo de Stair y col. (14), quienes, utilizando el método directo, obtuvieron resultados positivos en la detección del virus con cepas virulentas, siempre que se agregara a la reacción complemento de cobayo. Los ensayos también fueron satisfactorios con virus de cultivo, virulento; no así con virus modificados (lapinizados). En dicho trabajo no se determinó sensibilidad ni especificidad del método.

Solorzano (15) utilizó exitosamente la técnica en cultivos en monocapa, infectados, demostrando que el virus de una cepa virulenta se multiplica en células de testículos, bazos y nódulos linfáticos de cerdos, mientras que no se pudo reproducir en células de riñón bovino y porcino.

En el presente estudio se utilizó el llamado método indirecto, que consiste en tratar el antígeno con suero

hiperinmune y luego con el suero antisuero marcado con el colorante fluorescente.

FIJACION DE COMPLEMENTO:

Numerosos fueron los investigadores que trataron de adaptar la técnica de la fijación de complemento al estudio del virus de la peste porcina, pero siempre tropezaron con un problema aparentemente insoluble: el poder hemolítico de los sueros porcinos frente a los glóbulos rojos de carnero. La técnica que utilizaron era la que titulaba el complemento teniendo en cuenta el 100% de hemólisis. Pero, utilizando una técnica más sensible, titulando el complemento al 50% de hemólisis, y basándose en los trabajos de Osler y col. (16), y en la adaptación de Marucci (17) a la titulación de sueros bovinos infectados con fiebre aftosa, Costantini y Zakin (18) lograron detectar antígenos y anticuerpos de peste porcina, y aunque los sueros porcinos mantenían su poder hemolítico, dicho poder, en las condiciones de la reacción, no logró interferir en los resultados debido a que el rango de las diluciones de suero en que se manifiesta su poder fijador está por encima del título hemolítico y, además por la cantidad de complemento utilizada en la reacción. Es esta técnica la que se aplicó en el presente trabajo.

INMUNOCROMATOGRAFIA:

Correspondió a Stöss (19), en 1957, el ser el primero en aplicar la cromatografía a precipitados entre antígenos (polisacáridos, proteínas, lípidos) y sus correspondientes antisueros.

//7

Se basó en lo siguiente: luego de un período de incubación, en todo sistema antígeno-anticuerpo, encontramos un complejo insoluble y una parte soluble conteniendo fracciones no reaccionantes. Si a este sistema se lo cromatografía en forma ascendente monodimensional, la unión antígeno-anticuerpo queda retenida en el punto de partida, mientras que las sustancias no reaccionantes migran con el frente del solvente. El precipitado proteico que quedó en el punto inicial se lo visualiza posteriormente mediante una coloración adecuada.

Podemos considerar este método una cromatografía especializada, en la que el precipitado tiene un R_f=0, mientras que las sustancias que migran con el frente de solvente tienen un R_f=1.

La primera aplicación de esta técnica en materiales víricos correspondió a Hobohm y col. (20, 21) y Banchero (22), quienes visualizaron el complejo formado por el virus aftoso y sus anticuerpos e identificaron los tres tipos de virus aftoso O, A y C existentes en la Argentina, realizando además un estudio sistemático de los distintos factores que actúan sobre la reacción inmunocromatográfica del virus aftoso.

Basándose en estos trabajos es que en el presente estudio se adecuó la técnica de inmunocromatografía al estudio del virus de la peste porcina mediante variaciones en las proporciones entre antígeno y anticuerpo y en el tiempo y temperatura de incubación.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

1) Inmunofluorescencia

a) Antígenos víricos

Órganos de animales infectados natural y experimentalmente de peste porcina.

A - Los materiales utilizados en la primera parte de la experiencia provenían de animales infectados experimentalmente y muertos de peste porcina, así como de animales pertenecientes a piaras sospechosas. Estos últimos órganos fueron enviados desde distintos puntos del país.

B - Para la segunda serie de ensayos se infectaron cerdos de 25 a 30 kg con 2 ml, inyectados subcutáneamente, de una suspensión al 1% de virus de peste porcina LM 13, utilizado como material de descarga en los Laboratorios IFFA. Se sacrificaron animales entre el tercer y el octavo día post infección y se recogieron bazo, ganglio y riñón.

b) Sueros y globulinas

A - Suero hiperinmune de peste porcina, obtenido por inoculación de sangre desfibrinada virulenta en cerdos que ya tuvieron una cierta inmunidad anterior, sea por vacunación, sea por enfermedad. El suero fué provisto por los Laboratorios Fuerte Sancti Spiritu.

B - Suero de conejo antiporcino, obtenido por inoculaciones sucesivas en conejos macho o hembra, con dosis crecientes de suero normal porcino. Las dosis inoculadas variaron de 0.1 a 0.2 ml y el número de inoculaciones fué de 16, administradas en un período de un mes y medio. En la primera inoculación se utilizó el coadyuvante de Freund, en la proporción de 2 a 1 a favor del coadyuvante. Los títulos obtenidos mediante la técnica de precipitinas oscilaron entre 1/12800 y 1/25600.

El método para cada animal fué el siguiente:

Inoc. Nº	ml mat.	ml Freund	vía	tiempo de inoculación
1	0.1	0.2	sc(x)	
2	0.1	-	ip(xx)	1 semana después
3	0.1	-	im(xxx)	2 días "
4	0.1	-	sc	2 " "
5	0.1	-	ip	3 " "
6	0.1	-	im	2 " "
7	0.1	-	sc	2 " "
8	0.15	-	ip	3 " "
9	0.15	-	im	2 " "
10	0.15	-	sc	2 " "
11	0.15	-	ip	3 " "
12	0.15	-	im	2 " "
13	0.15	-	sc	2 " "
14	0.2	-	ip	3 " "
15	0.2	-	im	2 " "
16	0.2	-	sc	2 " "

(x) sc = subcutánea
(xx) ip = intraperitoneal
(xxx) im = intramuscular

//10

A los 5 días de finalizadas las inoculaciones se hizo una sangría de prueba y cuando el suero obtenido tuvo buen título precipitante, se hizo la sangría total.

La reacción de precipitinas se realizó del siguiente modo: Se efectuaron diluciones al duplo desde 1/100 hasta 1/25600 del antígeno (suero normal porcino) con solución fisiológica, mientras que el suero o la globulina del suero de conejo antiporcino se utilizó pura.

Se dispusieron en una gradilla 9 tubos de hemólisis, en los que se colocó 0.5 ml de cada dilución del antígeno, agregando luego 2 gotas del suero. Se agitó y se dejó 1 hora a baño maría a 37°C, luego de lo cual se mantuvo a 4°C durante unas 10 horas. Los controles de antígeno se efectuaron colocando en 2 tubos 0.5 ml de las diluciones 1/200 y 1/6400 del suero porcino, mientras que el control de suero se realizó colocando 0.5 ml de solución fisiológica en un tubo y añadiendo 2 gotas del suero antiporcino.

C - Gama globulinas, obtenidas del suero de conejo antiporcino, mediante dos métodos

I.-por precipitación con sulfato de amonio al 50% de saturación y posterior diálisis contra solución fisiológica fosfatada, pH 7.9 - 8.1

La técnica fué la siguiente:

A un volumen de suero se le agregó 3 volúmenes de agua y 4 de sulfato de amonio al 37%. Se agitó a medida que se agregaba el sulfato. Se centrifugó 15 minutos a

bajas revoluciones, descartándose el sobrenadante. Al precipitado se le añadió 2 ml de agua e igual cantidad de sulfato de amonio, se centrifugó 15 minutos. Se tomó el pH a la solución decantada (que no debe ser ácida). Se descartó el sobrenadante, y el precipitado se tomó con 0.5 ml de agua destilada, pasándoselo a una bolsita de celofán, para dializar contra solución fisiológica fosfatada, pH 7.9 - 8.1, cuya composición se dará más adelante.

Tres veces al día se cambió el buffer y se controló en él la presencia de amoniaco mediante el reactivo de Nessler (reacción a la gota). Cuando el control fué negativo, se centrifugó el contenido de la bolsita y en los casos necesarios se llevó al volumen deseado.

II.-por pasaje a través de una columna de DEAE (dietil-aminoetil)celulosa, según la técnica de Levy y Sober (23).

La DEAE celulosa se preparó para la reacción de la siguiente manera:

a) se lavó con OHNa 1N, una o dos veces, hasta que al centrifugar no presentaba coloración amarilla.
b) se lavó con ClH 1N, filtrándose rápidamente.
c) se agregó enseguida agua, se agitó y se filtró.
d) se trató con HONa 1N, se decantó y se lavó con agua, agitando y filtrando hasta llegar a pH 7.

Luego se filtró y se llevó a pH 6.3 con 0.2 M de fosfato monosódico, se filtró y se suspendió en un buffer fosfato 0.0175 M, de pH 6.3 .

//12

El suero a fraccionar se dializó durante una noche contra el mismo buffer fosfato 0.0175 M, pH 6.3.

Se armó la columna siguiendo las técnicas comunes, recogiéndose la primer fracción eluída con el buffer fosfato 0.0175 M, pH 6.3. Es esta fracción la que contiene las gama globulinas. Las fracciones séricas restantes se eliminaron de la columna haciendo pasar por la misma un buffer pH 5.2 (2 M de ClNa en 0.4 M de fosfato monosódico). Las gama globulinas eluídas se concentraron mediante una diálisis contra Carbowax 20 M (polietilenglicol de peso molecular 20.000) de acuerdo al método de Kohn (24) que consiste en llenar una bolsita de diálisis con Carbowax 20 M y sumergirla en un tubo especial conteniendo el líquido a concentrar. Dicho tubo presenta una pequeña concavidad en el fondo, donde permanece el líquido ya concentrado, sin estar en contacto con el Carbowax. Se mantiene a 4°C hasta llegar al volumen deseado, luego de lo cual la bolsita se descarta y el líquido concentrado se recoge.

D - Globulinas totales, obtenidas por precipitación del suero de conejo antiporcino, con sulfato de sodio al 27%.

El procedimiento consistió en colocar 10 ml de la solución de sulfato de sodio anhidro al 27% en un tubo; se añadió 0.5 ml del suero a fraccionar, se agitó, se dejó en reposo en estufa a 37°C durante una hora

y, finalmente, siempre dentro de la estufa, se filtró con papel Whatman N° 50.

Tanto las gama globulinas, como las globulinas totales, se llevaron a un volumen menor que el de partida del suero, para así permitir el ajuste de concentración proteica y de pH imprescindible para la conjugación con el colorante fluorescente.

La pureza de las gama globulinas y de las globulinas totales se controló por medio de la electroforesis sobre papel, utilizándose un aparato marca Hidrogenion Cf 8, usándose una corriente de 2.5 mA durante 16 horas y buffer veronal pH 8.6. El papel empleado fué el Whatman N° 1.

El contenido proteico se determinó por el método de Koch y McMeekin (25). El desarrollo de la reacción fué el siguiente: A 0.1 ml de la sustancia cuyo contenido proteico se quería determinar, se le agregó 1 ml de solución de digestión (las fórmulas de todos los reactivos empleados en esta reacción se dan en el párrafo "soluciones"). Esto se realizó en un tubo de 20 x 200 mm, marcado a 35 y 50 ml. En la boca del tubo se colocó un pequeño embudo, calentándose dicho tubo en un baño de arena hasta que el líquido tomó un color pardo y el tubo se llenó de vapores blancos de anhidrido sulfúrico. Se dejó enfriar y se añadió 0.50 ml de agua oxigenada, volviéndose el tubo al baño de arena hasta que el líquido se aclarara. Luego se dejó enfriar

//14

y se agregó agua hasta completar los 35 ml marcados en el tubo; posteriormente se agregó reactivo de Nessler hasta la marca 50. En ese momento se preparó el testigo, colocando 5 ml de solución tipo de sulfato amónico (0.2 mg de N), completándose con agua hasta 35 y con Nessler hasta 50.

Ambos tubos se compararon colorimetricamente. Se utilizó un fotocolorímetro marca Lumetron, modelo 400-A, leyéndose los valores a una longitud de onda de 530 mu. Los valores buscados se calcularon de la siguiente manera: suponiendo que la solución testigo dió un valor de 60 y la solución incógnita 70, tenemos:

$$\frac{60 \times 0.2}{70} \text{ (conc. de N de sol. testigo)} = 0.17 \text{ mgN/0.1 ml}$$

La conjugación del suero de conejo antiporcino, de sus globulinas totales y de sus gama globulinas, con el isotiocianato de fluoresceina, que fué el colorante usado en el trabajo, se realizó siguiento las téonicas de Marshall y col. (26).

Para la conjugación de las sustancias anteriormente citadas, el procedimiento fué el siguiente:

Una vez controlada la pureza y potencia del material, se determinó su contenido proteico, luego se añadió 0.05 mg de isotiocianato de fluoresceina por cada mg de proteina y la cantidad necesaria de solución fisiológica fosfatada para llevar la concentración proteica a 10 mg/ml de solución. El volumen total contenía un 12% de un buffer carbonato-bicarbonato pH 9, para ajuste de pH. De esta manera siempre se trabajó

en un rango semejante y conocido de concentración proteica y de pH. La solución proteica con el colorante se mantuvo en agitación de 14 a 18 horas, a una temperatura de 4°C, luego de lo cual se dializó durante varios días contra solución fisiológica fosfatada, pH 7, con el fin de eliminar principalmente el colorante no conjugado.

La purificación posterior de los conjugados se realizó por dos métodos:

I.- adsorción con polvos de tejidos, los que se prepararon de acuerdo a la técnica de Coons (27). Los órganos utilizados fueron bazos de cerdos. Los polvos se prepararon así: A una suspensión del órgano se le añadió igual volumen de solución fisiológica y cuatro volúmenes de acetona, todo bajo agitación. Luego se dejó decantar, se centrifugó y se lavó con solución fisiológica hasta que no se observó más hemoglobina. Se suspendió el precipitado en solución fisiológica en cantidad igual al precipitado y se agregó 4 volúmenes de acetona, se filtró por Buchner, se lavó el precipitado con acetona y se dejó secar en el filtro, pasándose luego a una estufa a 37°C hasta completa sequedad.

Las sustancias conjugadas se purificaron añadiendo a un volumen determinado de dichas sustancias, la mitad del mismo de polvos de tejidos, se agitó cada cinco minutos durante una hora

a temperatura ambiente y luego se centrifugó, descartándose el precipitado.

II.- purificación por pasaje a través de columna de DEAE celulosa, de acuerdo a la técnica de Courtain (28). La DEAE celulosa, una vez lavada y llevada a pH 6, se suspendió en un buffer 0.02 M, pH 6 (buffer fosfato), mientras que la sustancia conjugada, a purificar, se dializó una noche contra el mismo buffer.

La fracción purificada que interesaba, se eluyó con el buffer 0.02 M pH 6, mientras que las impurificaciones se eliminaron de la columna con un buffer pH 5.2, ya descrito anteriormente. El eluído se concentró al volumen original por diálisis contra Carbowax 20 M.

B - Suero normal porcino, obtenido de lechones llegados de piaras libres de peste porcina, y sin vacunar.

c) Soluciones y reactivos

A - Solución fisiológica fosfatada

$ClNa$..... 8.1 g
$PO_4HNa_2.12H_2O$ ..... 2.4 g
Agua destilada csp ..... 1000 ml
pH 7.8 - 8.1

B - Buffer carbonatobicarbonato

CO_3Na_2 ..... 1.57 g
CO_3HNa ..... 1.05 g
Agua destilada csp ..... 400 ml
pH 9

C - Buffer para diálisis de la proteina conjugada

ClNa .....32 g
$PO_4HNa_2.12H_2O$ ..... 7.2 g
Agua destilada csp .....4000 ml

pH 7

D - Buffer veronal para electroforesis

Veronal sódico ..... 7.33 g
Acetato de sodio ..... 4.86 g
ClH 0.1 N ..... 45 ml
Agua destilada csp ..... 750 ml

pH 8.6

E - Reactivos utilizados en el método colorimétrico de Koch y McMeekin (1924) modificado:

- Solución de digestión:

Se mezclaron 10 ml de solución de sulfato de cobre al 5% con 100 ml de ácido sulfúrico concentrado y puro. La solución obtenida se vertió con cuidado en 100 ml de agua destilada.

- Solución testigo de sulfato de amonio:

Se disolvieron 9.4332 g de sulfato amónico puro y seco en solución de SO_4H_2 0.2 N hasta completar 1000 ml. La solución de SO_4H_2 0.2 N se obtuvo disolviendo 5.6 ml de ácido concentrado en agua hasta obtener 1000 ml. Esta solución concentrada contenía 2 ml de N por ml y fué necesario diluirla para emplearla como testigo. Luego a 20 ml (40 mg de N) de solución sulfato de amonio concentrada, se añadió 180 ml de SO_4H_2 0.2 N y se completó a un litro con agua destilada. Cada ml de esta solución correspondió a 0.04 mg de N.

- Reactivo de Nessler:

Se disolvió 22.5 g de iodo en 20 ml de agua conteniendo 30 g de IK. Una vez que se completó la disolución se agregó 30 g de Hg metálico y se agitó bien, evitando que la mezcla se caliente, enfriando en corriente de agua. Se continuó la agitación hasta que el color propio del iodo desapareció. Se decantó el líquido sobrenadante y se probó si reaccionaba frente a una solución de almidón. Cuando la reacción era negativa, el reactivo tenía sales mercuriosas, por lo que se agregó algunas gotas de iodo de la misma concentración anterior. Se adicionó iodo hasta reacción ligeramente positiva frente al almidón. Se diluyó la solución con agua hasta completar 200 ml y luego se mezcló con dos volúmenes de OHNa al 10%.

F - Buffers utilizados en cromatografía en columna:

- Buffer fosfato 0.2 M pH 6.3:

387 ml de 0.2 M PO_4H_2Na (A) se mezcló con 112.5 ml de 0.2 M PO_4HNa_2 (B); de esta manera se tuvo un buffer fosfato 0.2 M de pH 6.3. De esta solución se tomó 100 ml y se agregó 1040 ml de agua destilada. Así se obtuvo el buffer fosfato 0.0175 M pH 6.3.

- Buffer fosfato 0.02 M pH 6:

877 ml de (A) se mezclaron con 123 ml de (B), obteniéndose un buffer fosfato 0.2 M pH 6. Diluyendo 100 ml a 1000 ml con agua destilada se obtuvo el buffer 0.02 M pH 6.

- Buffer pH 5.2

$PO_4H_2Na.H_2O$ ..... 13 g
ClNa ..... 26.8 g
Agua destilada csp ..... 250 ml
pH 5.2

Todos los materiales, salvo las soluciones, se mantuvieron congelados a -20°C hasta el momento de su uso. Las soluciones se hallaban a 4°C.

2) Fijación de complemento

a) Antígenos víricos:

Los mismos utilizados en inmunofluorescencia. Todos los materiales antigénicos fueron sometidos al siguiente proceso:

I - Triturado y suspensión 1/5 en buffer veronal

II - Congelación a -20°C durante 24 horas, como mínimo.

III - Descongelación. Centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos.

IV - Tratamiento con 20% de cloroformo, agitación durante un minuto y centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm para eliminar el cloroformo.

V - Repetición del mismo paso anterior si la opacidad del material lo hiciese necesario.

VI - Centrifugación a 15.000 rpm durante 15 minutos.

VII - Eliminación del cloroformo residual con bomba de vacío.

b) Sueros:

A - Suero hiperinmune de peste porcina

B - Suero normal porcino

C - Otros materiales:

Complemento de cobayo, sistema hemolítico y buffer veronal pH 7.6, fueron los mismos utilizados en los trabajos de rutina de la Sección Serología del Instituto de Fiebre Aftosa, INTA (29, 30, 31).

El complemento se obtuvo mediante sangría de cobayos machos de más de 400 g o hembras no grávidas. Dicho complemento fué titulado por la técnica del 50% de hemólisis descrita por Osler y col. (16)

Buffer veronal

Ácido dietilbarbitúrico ..... 9.200 g

se disolvió en 1 litro de agua destilada

Cl_2Mg ..... 2 g

Cl_2Ca ..... 0.330 g

Dietilbarbiturato de sodio ..... 6 g

ClNa ..... 167.600 g

CO_3HNa ..... 5.04 g

se completó a 4 litros con agua destilada y se filtró. Se esterilizó a 1 atm. durante 20 minutos.

pH 7.66

(para su uso se diluyó 1/5)

3) Inmunocromatografía

a) Antígenos víricos:

Los mismos utilizados en las dos reacciones anteriormente citadas. La preparación de los antígenos fué similar a la de los materiales para la fijación de complemento, salvo

en el paso I en el que las suspensiones se realizaron con solución fisiológica fosfatada pH 7.8 - 8, en lugar de hacerla con buffer veronal, pH 7.6.

b) Sueros:

A - Suero hiperinmune de peste porcina

B - Suero normal porcino

C - Otros materiales:

Solución fisiológica fosfatada, pH 7.8 - 8, cuya fórmula figura anteriormente.

Métodos

1) Técnica de inmunofluorescencia

Preparación del material: Se hicieron impresiones sobre portaobjeto [illegible] trozos de órganos anteriormente lavados con solución fisiológica fosfatada.

Los frotis fueron fijados durante 20 minutos a -20°C con acetona. Se lavaron con agua bidestilada, se secaron y se conservaron a 4°C.

Coloración: El método utilizado fué el indirecto. En primer término se depositaron gotas de suero hiperinmune no marcado, sobre el frotis, ya fijado. Se dejó en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C, se lavó con agua bidestilada durante 10 minutos, se dejó secar y se trató, nuevamente en cámara húmeda, con la sustancia marcada. La incubación fué en este paso de 30 minutos a 37°C. Se lavó los portaobjetos con agua bidestilada, se dejó secar y se guardó hasta su observación microscópica, a la temperatura de 4°C.

//22

Controles: Se hicieron controles con sueros normales y órganos porcinos normales, y además un control excluyendo la capa intermedia, es decir, el suero hiperinmune no marcado.

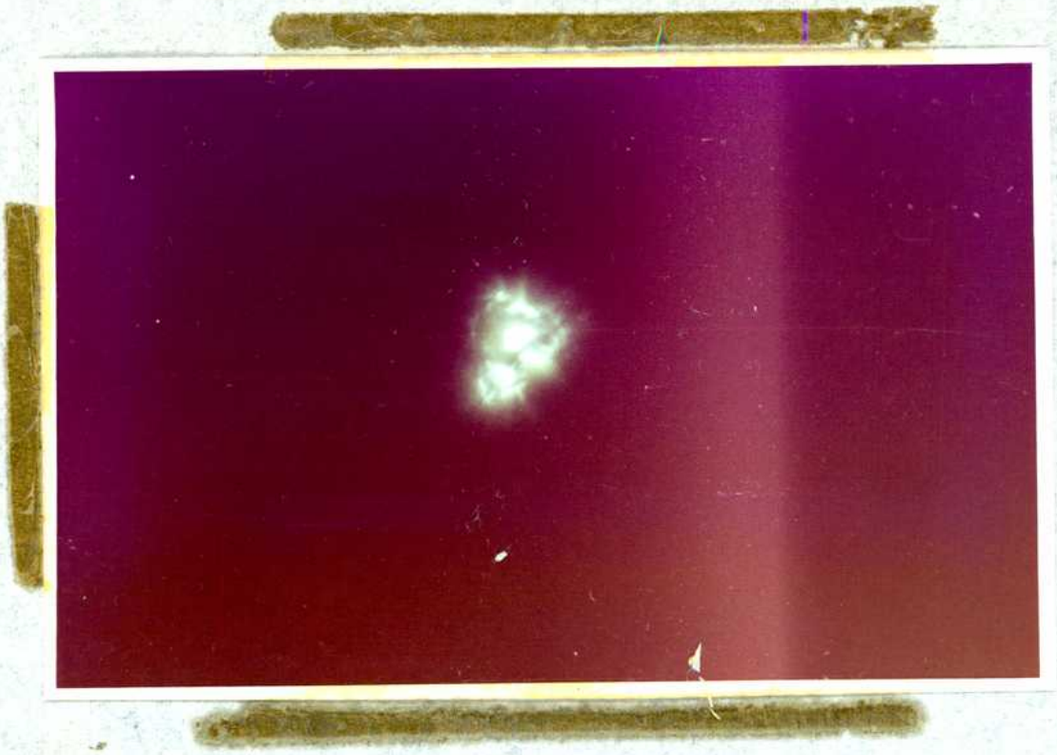
Observación microscópica: Se usó un microscopio Leitz Wetzlar. de tipo Ortholux, que tiene como fuente luminosa una lámpara de vapor de mercurio a alta presión, marca Philips CS 150. Los filtros protectores y secundarios pertenecían al equipo para luz fluorescente marca Leitz Wetzlar.

Se identificó el completo antígeno-anticuerpo como puntos brillantes, en zonas celulares. Dichos puntos eran de un color verde manzana, debido al colorante fluorescente utilizado. Un ejemplo de una reacción positiva puede observarse en las fotos Nº 1 y Nº 2.

[redacted]

[redacted]

Frotis de bazo infectado con peste porcina, tratado con suero hiperinmune y con gama globulina de conejo antiporcina marcada con isotiocianato de fluoresceina.



Frotis de bazo infectado con peste porcina, tratado con suero hiperinmune y con gama globulina de conejo antiporcina marcada con isotiocianato de fluoresceina. (x 225)

La forma característica en que se encaró una reacción inmunofluorescente en la detección de antígeno en un órgano porcino, se da a continuación:

1) Órgano infectado + suero normal + conjugado antiporcino
2) Órgano infectado + suero hiperinmune + conjugado antiporcino
3) Órgano infectado + conjugado antiporcino
4) Órgano normal + suero hiperinmune + conjugado antiporcino
5) Órgano normal + conjugado antiporcino

Estas 5 posibilidades se repitieron en cada reacción, por lo menos tres veces, para confirmar los resultados. En el ejemplo anterior, el único frotis que debía dar positivo era el del portaobjeto 2), es decir, que en cada reacción debíamos tener 3 frotis positivos como máximo, o sea los tratados con suero

hiperinmune y conjugado antiporcino.

Se consideraba un frotis positivo, cuando en el porta-objeto había una zona celular grande, con puntuaciones, o bien, 2 o más, pequeñas.

En la foto Nº 3 puede apreciarse el aspecto característico de una reacción negativa.

Frotis de bazo infectado con peste porcina, tratado con suero normal porcino y con gama globulina de conejo antiporcina marcada con isotiocianato de fluoresceina. (x 225)

2) <u>Técnica de la fijación de complemento</u>

Se siguió sin ninguna omisión los pasos indicados en el trabajo sobre peste porcina de Costantini y Zakin (18).

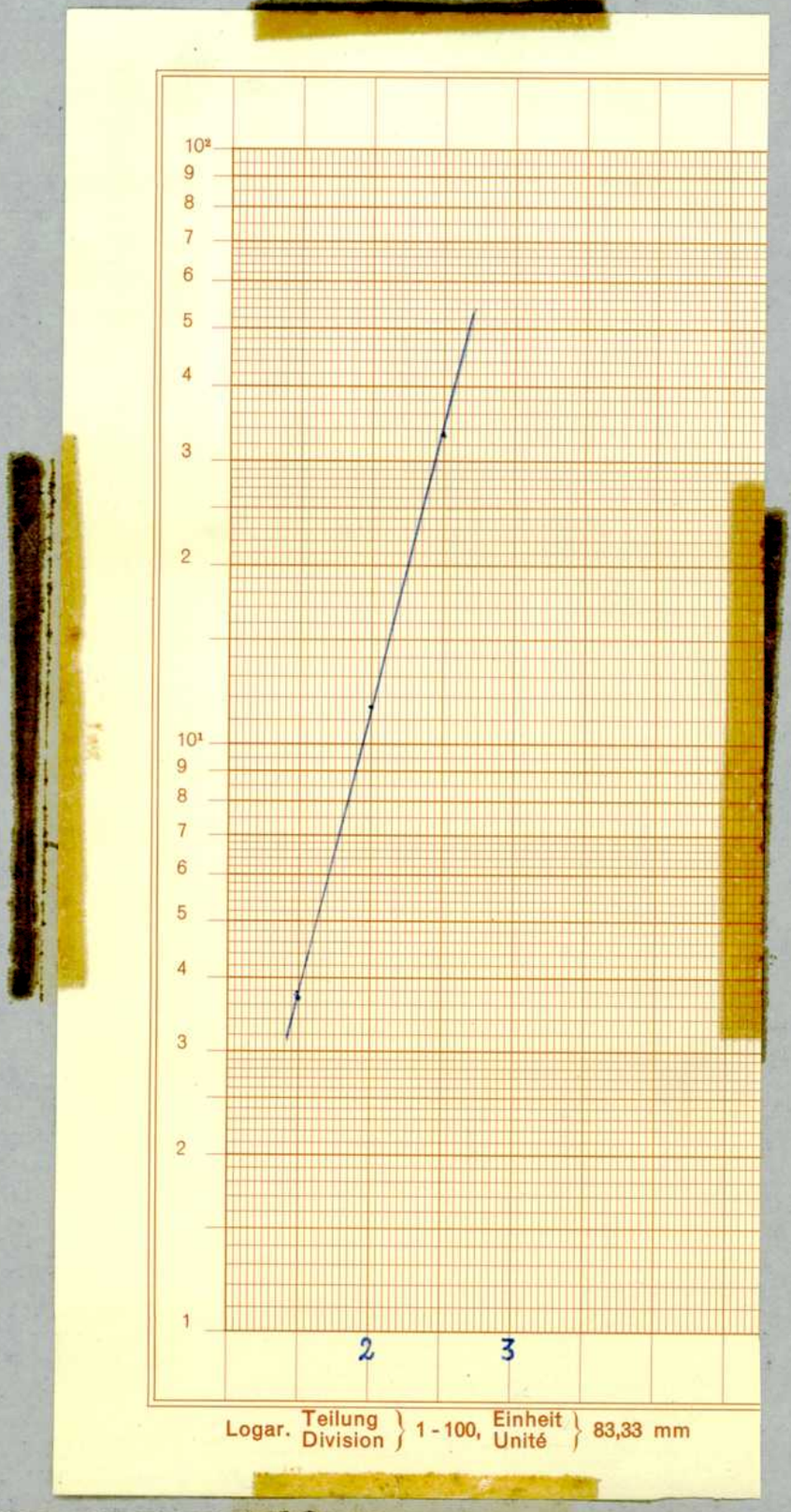
<u>El complemento se tituló</u> según Osler y col. (16) mediante la técnica del 50% de hemólisis. El método es el que se da a continuación: (se da un ejemplo para ilustrar)

Tubo Nº	Sist. hemol.	Buff. Veron.	Cº 1/500	DO	Prom.	Corr.	% lisis y	1-y	$\frac{y}{1-y}$
1	1.5	4.5	1.5	0.28 0.30	0.29	0.27	27	73	0.370
2	1.5	4	2	0.56 0.56	0.56	0.54	54	46	1.15
3	1.5	3.5	2.5	0.77 0.79	0.78	0.76	76	24	3.17
4	1.5	3	3	0.92 0.92	0.92	0.90	90	10	9
5	1.5	2.5	3.5	0.98 1.00	0.99	0.97	97	3	
6	1.5	5	1 1/25	1.02 1.02	1.02	1.00	100	-	
7	1.5	6	-	0.03 0.01	0.02	0.00	-		

En el esquema precedente están reseñados todos los datos y cálculos necesarios para la estimación del complemento, en términos de 50% de hemólisis. La reacción se hace por duplicado.

La segunda hilera vertical indica la cantidad de sistema hemolítico a añadir, por tubo, mientras que la tercera da la cantidad de buffer veronal. La cuarta fila, siempre vertical, indica la cantidad, en mililitros, de complemento diluído 1/500. Vemos que se añaden cantidades crecientes de complemento y, en el tubo 6, se agrega 1 ml de una dilución 1/25, es decir, un exceso, para así tener en ese tubo hemólisis completa, considerándose el valor obtenido como el 100% de hemólisis. El octavo tubo, en cambio, sin complemento, sirve como control del sistema hemolítico y nos da el 0% de hemólisis, o sea, fijación total.

La reproducción esquemática de log. x frente a log. $\frac{y}{1-y}$ da, en papel logarítmico, una recta de inclinación 1/n, y la intersección del valor en ordenadas, del 50% de lisis ($\frac{y}{1-y}$), con la recta, da en abscisas, los mililitros de complemento 1/500 que producen dicho porcentaje de hemólisis (este valor se indica como 1 $C'H_{50}$). En el gráfico Nº 1 están representados los valores del cuadro anterior y el valor obtenido en abscisas es 1.95



Es decir, que 1.95ml de una dilución 1/500 de suero de cobayo es equivalente a 1 $C'H_{50}$ en un volumen de reacción de 7.5 ml. Dado que el volumen lítico de la prueba de fijación de complemento es reducido por un factor de 5, o sea de 7.5 ml a 1.5 ml (volumen final de la reacción), con una reducción proporcional en el número de eritrocitos y, dado que la cantidad de complemento requerida para el 50% de lisis se ve reducida también en forma proporcional, de tal manera que en los 1,5 ml de volumen de reacción final se tendrán 0.5 ml de complemento, la dilución apropiada de suero de cobayo se calcula por proporción directa:

$$1.95\text{ml} \text{ ———— } 500$$

$$0.5\text{ ml} \text{ ———— } x = \frac{500 \times 0.5}{1.95} = 128$$

Es decir, que en la prueba se debe utilizar, según este ejemplo, 0.5 ml de una dilución 1/128 de suero normal de cobayo, por cada tubo.

La preparación del sistema hemolítico fué la siguiente: (se dan datos concretos para ilustrar)

a) Standardización de los glóbulos rojos de carnero: Luego de lavar tres veces con buffer veronal, sangre de carnero recogida en un mismo volumen de solución de Alsever (glucosa 24.6 g, citrato de sodio 9.6 g y cloruro de sodio 5.04 g, agua destilada csp 1200 ml, esterilizándose 10 minutos a 1 atmósfera, pH 6.1) se tomó, supongamos, 4 ml de glóbulos rojos y se llevaron a 80 ml con buffer veronal; a 1 ml de la suspensión (o 0.5 ml) se le agregó 14 ml de CO_3Na_2 al 1 o/oo (o 7.5 ml), produciéndose la hemólisis. Se agitó y se leyó en

un espectrofotómetro marca Beckman modelo B, a una longitud de onda de 530 mm. El dato correcto debe ser 0.68. Esto se realizó siempre que se preparó sistema hemolítico para cualquier prueba de fijación de complemento, para trabajar siempre con una concentración semejante de glóbulos rojos, lo que se logró preparando suspensiones que den un dato igual en la lectura espectrofotométrica, en nuestro caso 0.68.

b) Hemolisinas:

El suero de conejo antiglóbulos rojos de carnero, previamente titulado, se mantuvo congelado a -20°C; dicho suero se obtuve siguiendo la técnica de Ulrich y MacArthur (33). Cuando se quiso preparar, por ejemplo, 160 ml de sistema hemolítico, o sea, que se mezcló 80 ml de hemolisina con 80 ml de suspensión de glóbulos rojos, y teniendo en cuenta que el título del suero antiglóbulos era de 1/10.000, el procedimiento fué el siguiente:

10.000 ——————1 unidad hemolítica

80 ——————— x = 0.008

En la reacción se usaron 5 unidades hemolíticas, por consiguiente 5 x 0.008 = 0.04. El suero se guardó congelado, diluído 1/100, por lo que entonces se tomaron 4 ml del mismo, y se llevó a 80 ml con buffer veronal.

c) Sistema hemolítico:

El sistema se preparó así:

80 ml de suspensión standardizada de glóbulos rojos

+ 80 ml de suero hemolítico conteniendo 5 unidades hemolíticas.

La mezcla se dejó 30 minutos a 37°C, y se guardó en heladera.

Reacción de fijación de complemento

Una vez preparado el sistema hemolítico y titulado el complemento, se procedió de la siguiente manera:

En cada tubo se puso:

0.4 ml de las diluciones de suero

0.5 ml de la dilución correspondiente al título, de complemento

0.4 ml de las diluciones de antígeno

se dejó de 20 a 24 horas a 4°C, añadiéndose luego:

0.2 ml de sistema hemolítico;

se mantuvo de 30 minutos a una hora a 37°C, se centrifugó 5 minutos a 2000 rpm y se leyó al espectrofotómetro a 530 mu.

Un ejemplo de una reacción con un material de peste porcina positivo, está dado a continuación:

Material Nº 32 (bazo infectado)

	SN	SP	C/A	C/A S/C
1/5	48	5	44	2
1/10	56	1	55	3
1/20	56	7	55	2
1/40	50	23	54	0
C/S	57	57	-	-

donde: SN = suero normal porcino

SP = suero hiperinmune de peste porcina

C/A = control de antígeno

C/A S/C = control de antígeno sin complemento

1/5, 1/10, 1/20 y 1/40 : diluciones del antígeno Nº 32

C/S = control de suero

Los sueros hiperinmune y normal se diluyeron según el título del primero.

De las lecturas al espectrofotómetro se calculó que, siendo el 100% de hemólisis el valor 55 y el 50% su mitad, el título del antígeno Nº 32, al 50% de hemólisis, fué de 1/40.

3) Técnica de inmunocromatografía

El método, en líneas generales, era semejante al utilizado en los trabajos con virus aftoso (20, 21, 22), salvo en los siguientes detalles:

I. La preparación del material vírico, ya explicado antes.

II. Los sueros se diluyeron al medio y se centrifugaron antes de su uso, 15 minutos a 15000 rpm.

III. Las proporciones entre antígeno y antisuero fueron las siguientes:

$$\frac{\text{antígeno diluído 1/4}}{\text{antisuero diluído 1/2}} = \frac{0.10 \text{ ml}}{0.05 \text{ ml}} = \frac{1}{1}$$

$$\frac{\text{antígeno diluído 1/4}}{\text{antisuero diluído 1/2}} = \frac{0.10 \text{ ml}}{0.10 \text{ ml}} = \frac{1}{2}$$

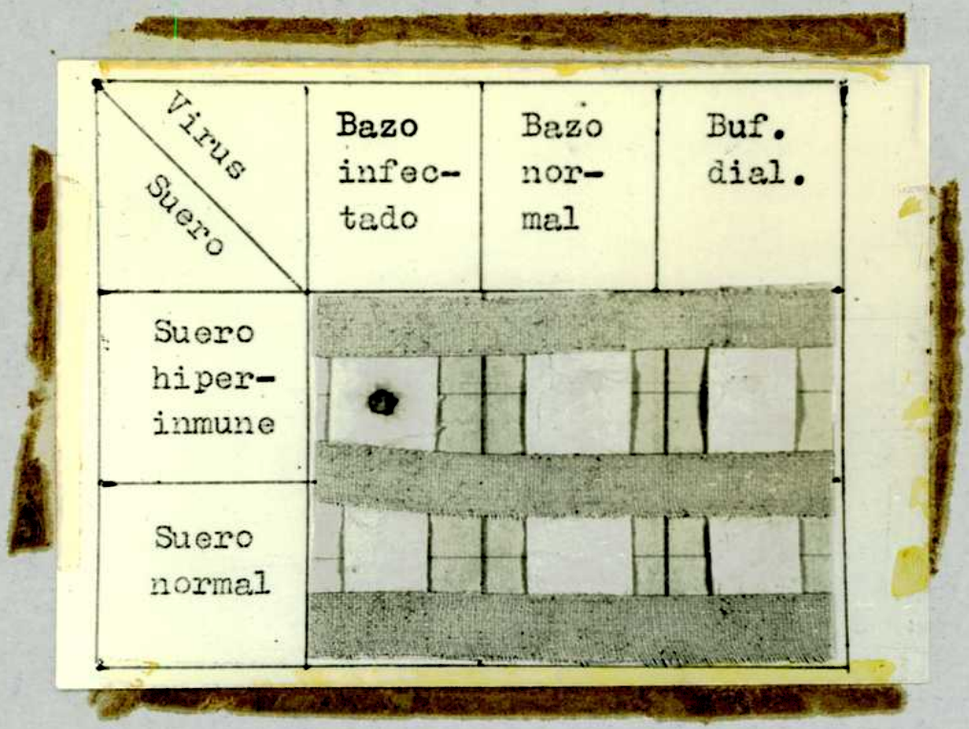
IV. El tiempo de incubación varió de 3 a 4 horas a 37°C, de acuerdo al aspecto del material.

El procedimiento fué el siguiente:

Tiras de papel de fibra de vidrio de Schleicher y Schüll (Glasfaserpapier Nº 6) de 1 x 8 cm, se bañaron en una solución acuosa de Tween 80 al 5% y se secaron a 80°C, guardándose sobre sílica gel hasta su uso. El Tween 80 es un humectante no

iónico que disminuye la adsorción.

De la mezcla incubada de antígeno y anticuerpo, en las proporciones anteriormente citadas, se pipetearon 0.02 a 0.04 ml en una especie de pipeta Pasteur, graduada, y se colocaron a 2 cm del borde inferior del papel. Una vez transferido el líquido al papel, se ubicó a éste, sin desecación previa, en un vasito que contenía 3 ml de un buffer de amonio (3.7 g $ClNH_4$ + 2 ml NH_3 al 25% y agua destilada csp 1000 ml, pH 9 [illegible] se hizo la corrida cromatográfica. Como la mayor parte del papel estaba en el aire, el líquido que subía por la tira se evaporaba, permitiendo así un lavado adicional. Esto se dejó una hora a temperatura ambiente, luego de lo cual las tiras de papel se colorearon con solución de azul de bromofenol durante 5 minutos, y se lavó sucesivamente, durante 5 minutos cada vez, con ácido acético al 1% y agua. Los papeles se secaron al aire y posteriormente se archivaron. Un círculo pequeño de color azul en el punto de partida de la cromatografía, tal como se observa en la fotografía Nº 4, indicó una reacción positiva. El tamaño e intensidad de dicho punto dependía del poder del virus de reaccionar con sus anticuerpos. En la misma fotografía se puede ver la forma en que se encaró una reacción, con sus respectivos controles.



Detección del virus de la peste porcina por reacción inmunocromatográfica (Buf.dial.: buffer diálisis)

4) Técnica de inoculación en cerdos

Para cada material en estudio se vacunó un cerdo de 25 a 30 kg con una dosis de virus lapinizado, administrada intramuscularmente. Al mismo tiempo se apartó un animal testigo, sin vacunar. A los 14 días de realizada la vacunación, se inoculó a los dos cerdos, por vía subcutánea, 5 ml de una suspensión al 10% de la muestra, filtrada por Seitz EK, para evitar contaminaciones bacterianas.

La observación de los animales se realizó a los 14 días.

RESULTADOS

1.- Estudio comparativo sobre los mismos materiales, realizado con las técnicas de fijación de complemento (50% de hemólisis), inmunofluorescencia, inmunocromatografía e inoculación en cerdos.

Se realizaron experiencias con 53 materiales provenientes de animales muertos de peste porcina o sospechosos de ella, así como con órganos de cerdos enfermos, sacrificados a los fines de la investigación. En el cuadro I figuran los materiales examinados que, como puede observarse, constituyen un grupo representativo de las muestras que suelen llegar al laboratorio para su control.

Como el único método de los aplicados en estas pruebas, que no se hallaba en ensayo y de cuya eficacia no se tenía dudas, sobre todo con respecto a su especificidad, era el de la inoculaciónen porcinos, fué con respecto a esta técnica que se refirió la sensibilidad de los otros métodos.

Del total de órganos llegados para su examen, 39 de los mismos fueron ensayados en cerdos con el objeto de determinar la presencia en ellos, de virus de peste porcina.

En el cuadro II están reseñadas todas las experiencias realizadas. Los lugares en blanco indican que la prueba no se efectuó. Es necesario destacar que se han de discutir los resultados obtenidos solamente en los casos en que la inoculación en cerdos haya sido realizada.

Analizando los valores del cuadro II, se aprecia que el método que más se acercó a los resultados obtenidos en la

//35

CUADRO 1

Materiales examinados

Material N°	Tipo de material analizado
1	Bazo
3	Bazo
4	Bazo
5	Bazo
6	Bazo
7	Bazo
8	Bazo
10	Bazo
1'	Bazo
2	Virus lapinizado
3'	Pool de órganos, filtrado
4'	Pool de órganos, filtrado
5'	El mismo pool, sin filtrar
6'	Pool de órganos, sin filtrar
12	Virus lapinizado
13	Virus lapinizado
14	Virus lapinizado
15	Pool de órganos, sin filtrar
16	Pool de órganos, sin filtrar
17	Pool de órganos, filtrado
18	Bazo
19	Pulmón
110	Pulmón
111	Bazo
20	Pool de órganos, sin filtrar
21	Pulmón
22	Riñón, del mismo animal que el 21
23	Pulmón y ganglio
24	Virus lapinizado
25	Vejiga y ganglio
26	Riñón
27	Virus lapinizado
28	Pool de órganos, sin filtrar
29	Pool de órganos, sin filtrar
30	Bazo
31	Pulmón
32	Pulmón
33.37.39	Pulmón, pulmón y ganglio de un solo animal
34.35.40	Riñón, bazo y pulmón de un solo animal
38	Pool de órganos, sin filtrar
41	Virus lapinizado
42	El mismo virus, diluído 1/10
43	Pool de órganos, sin filtrar
44	Pool de órganos, filtrado
45	Pool de órganos, filtrado
46	Pool de órganos, filtrado
47	Pool de órganos, filtrado
346	Bazo
Gral.Alvear	Bazo

CUADRO II

Resultados generales

Nº	FC	IF	IC	I cerdos
1	+ 1/20	±	+	+
3	+ 1/50	+	+	+
4	+ 1/40	+	+	+
5	+ 1/25	+	±	+
6	+ 1/75	+	+	+
7	-	-	-	+
8	+ 1/50			+
10	+ 1/33	+	-	+
1'	-			-
2	+ < 1/10		+	+
3'	+ 1/10 a 1/20			+
4'	-			+
5'	+ 1/7			+
6'	+ 1/35			-
12	-			+
13	a	-	-	+
14	+ 1/15	±	+	+
15	+ > 1/40	±	+	-
16	±	-	-	+
17	-	-	d	+
18	+ 1/52	+	+	-
19	-	-	d	
110	-	-	d	
111	-	-	d	
20	-			
21.22	a.-	-.-	-.+	
23	+ 1/38	+	-	
24	+ 1/32	±	-	+
25	+ 1/30	+	-	
26	+ 1/5	-		
27	+ > 1/40	+	-	+
28	+ 1/30	±	d	+
29	+ 1/33	+		
30	+ 1/24	+	-	+
31	+ 1/30	+	+	+
32	1/40	+	-	+
33.37.39	-. ±. -	-	-	+
34.35.40	+ . + . +	+	+	+
	1/18 1/38 1/40	-	-	-
38	+ 1/5	-	+	+
41	+ < 1/5			+
42	-			+
43	-	-	+	+
44	+ 1/17	+	+	+
45	+ 1/15	+	-	+
46	+ 1/40	+	-	+
47	+ 1/38	+	-	+
346	+ > 1/60		+	+
Gral.Alvear	+ 1/25	+		+

FC : Fijación de complemento
IF : Inmunofluorescencia
IC : Inmunocromatografía
I cerdos : Inoculación en cerdos

\+ : positivo
\- : negativo
± : débilmente positivo
d : dudoso
a : anticomplementario

Cuando en una misma línea se ponen varios materiales, significa

inoculación en cerdos, fué el de fijación de complemento (50% de hemólisis). La coincidencia entre ambas técnicas fué de un 74.3%.

Con respecto a la técnica de inmunofluorescencia, se hace evidente que su sensibilidad es aún bastante menor que la de fijación de complemento, y comparando los valores entre el método de inoculación y el de inmunofluorescencia, la coincidencia fué de un 43%, considerando los datos indicados como ± en la categoría de dudosos, y no de positivos ni de negativos.

En relación a la técnica de inmunocromatografía se puede apreciar que es, por el momento, la de menor sensibilidad.

Las comparaciones entre los resultados obtenidos mediante los cuatro métodos, y los porcentajes de coincidencia, se encuentran en los cuadros III, IV y V.

CUADRO III

Cuadro comparativo entre las cuatro técnicas utilizadas

Positivo en cerdos	Positivo en FC	% Coinc.	Positivo en IF	% Coinc.	Positivo en IC	% Coinc.
35	26	74.3	15	43	11	31.5

CUADRO IV

Cuadro comparativo entre inoculac.en cerdos y fijación complement

Positivo en cerdos	Positivo en fijación de complemento (50%)	% de coincidencia
35	26	74.3

CUADRO V

Cuadro comparativo entre las técnicas de fijación de complemento, Inmunofluorescencia e Inmunocromatografía

Positivos en fijación de complemento	Positivos en inmunofluorescencia	% Coinc.	Positivos en fijación de complemento	Positivos en inmunocromatografía	% Coinc.
26	19	73	25	12	48

Durante todo el desarrollo de las experiencias se han realizado ensayos con órganos provenientes de animales sanos y sin vacunar. Dichos materiales constituían un control de los resultados obtenidos con muestras positivas. En ninguna de las técnicas en estudio se obtuvo resultados falso positivos con dichas muestras, lo que constituyó una importante prueba de especificidad, aumentada con el ensayo realizado sobre cuatro materiales de campo enviados con supuesto diagnóstico de neumonía a virus. Las cuatro muestras fueron analizadas mediante las técnicas de inoculación en cerdos, inmunofluorescencia y fijación de complemento, resultando negativas en todos los métodos, corroborando de esta manera el primitivo diagnóstico clínico.

Tampoco se obtuvo resultados sospechosos cuando se quiso detectar anticuerpos en sueros normales porcinos.

Finalmente es necesario tener en cuenta que los métodos de inmunofluorescencia y de inmunocromatografía debieron ser adaptados al estudio del virus causante de la peste porcina, por lo que en el primer año de las experiencias se realizaron

ensayos en ese sentido utilizando materiales muy infecciosos provenientes de animales infectados con dosis fuertes de material virulento.

2.- Detección de antígeno en animales infectados experimentalmente y sacrificados a distintos tiempos post-infección.

Tal como se halla explicado en la sección materiales, en el párrafo B de antígenos utilizados en inmunofluorescencia, animales libres de peste porcina y sin vacunar fueron inoculados con virus y sacrificados al tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo días post-inoculación.

Se recogieron bazo, ganglios mesentéricos y riñón de dichos animales y se trató de demostrar la presencia de antígeno mediante fijación de complemento e inmunofluorescencia.

Los datos de los animales en experiencia, así como los trastornos clínicos que sufrieron, se encuentran en el cuadro VI.

CUADRO VI

Cuadro clínico de los animales en el momento del sacrificio

Animal N°	Trastornos clínicos	Tiempo de sacrificio post-infección
181	ninguno	3 días
182	ninguno	4 días
183	ninguno	5 días
184	temp. 41.5°C	6 días
185	temp. 41.5°C	7 días
186	temp. 42°C, decaimiento general	8 días
187	ninguno	3 días
188	ninguno	4 días
189	ninguno	5 días
190	temp. 41°C	6 días
191	temp. 42°C	7 días
192	temp. 42.5°C, decaimiento general	8 días

Los resultados obtenidos en los análisis de los materiales de los animales sacrificados fueron los siguientes:

CUADRO VII

Identificación del virus de la peste porcina a distintos tiempos post-infección

Animal Nº	Tiempo de sacrificio post-infección	Organos examinados					
		Ganglios mesenter.		Bazo		Riñón	
		FC	IF	FC	IF	FC	IF
181	3 días	-	-	-	-	-	-
182	4 días	-	-	-	-	-	-
183	5 días	-	-	-	-	-	-
184	6 días	-	-	±	-	-	-
185	7 días	-	-	±	-	-	-
186	8 días	+	-	+	+	-	-
187	3 días	-	-	-	-	-	-
188	4 días	-	-	-	-	-	-
189	5 días	-	-	-	-	-	-
190	6 días	-	-	±	-	-	-
191	7 días	-	-	±	-	-	-
192	8 días	+	-	+	+	-	-

Estos valores indican que la aparición franca de antígeno detectable por reacciones serológicas se produjo al octavo día de infectar un animal con dosis cirulentas. Si bien al sexto día después de ser inoculados, los bazos de los animales en experimentación presentaron vestigios de antígeno detectados por fijación de complemento, los valores obtenidos en ganglios y bazo del octavo día son más significativos y ya indican una cantidad importante de antígeno presente en dichos órganos. En riñón no se obtuvo ningún resultado positivo.

//41

Por otra parte, los datos clínicos de los animales infectados están acordes con la aparición de antígeno en los órganos examinados. Si bien al sexto día fué cuando se elevó la temperatura, los trastornos más evidentes e importantes se produjeron al octavo día post-infección.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Es evidente que para postular una técnica de laboratorio como método standard de diagnóstico, es necesario demostrar fehacientemente, además de su efectividad, su especificidad. Es necesario dejar bien en claro la imposibilidad de reacciones cruzadas.

De las experiencias realizadas en la primera parte de este trabajo se posible deducir claramente la futura importancia de la reacción de fijación de complemento (50% de hemólisis) en la detección de antígeno de peste porcina en órganos sospechosos de dicha enfermedad. Evidentemente es importante el hecho de que en ninguno de los materiales normales llegados al laboratorio se hayan obtenido resultados falso positivos, que pudieran ser motivo de discusión.

También es interesante el hecho de que órganos enviados con diagnóstico de neumonia presumiblemente a virus, dieran resultados negativos frente a sueros de peste porcina en los tests en estudio, confirmando de esa manera el punto de vista veterinario.

La imposibilidad material de conseguir en gran escala cerdos sanos y sin vacunar, para realizar estudios comparativos,

así como otros factores insalvables, tales como la obtención de los materiales, impidieron la realización de un número mayor de experiencias, especialmente con órganos provenientes de animales con enfermedades cuyos trastornos pudieran confundirse con los producidos por el virus de la peste porcina.

Sin embargo, los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, llevarían a postular a la reacción de fijación de complemento (50% de hemólisis) como uno de los métodos de laboratorio de futuro mayor provecho en el problema del diagnóstico de la peste porcina, ya que en cualquier ocasión en que sería necesario diagnosticar un caso difícil, sospechoso de peste porcina, un resultado positivo en fijación de complemento ahorraría inoculaciones en animales receptivos, mientras que un valor negativo necesitaría confirmación justamente debido a su menor sensibilidad con respecto al método clásico actualmente en uso. Es importante volver a recalcar que la coincidencia entre ambas pruebas fué de un 74.3%

Esta postulación podría llevarsea la práctica una vez que se hayan realizado experiencias con materiales provenientes de cerdos infectados por otros agentes víricos o bacterianos, de manera tal de eliminar cualquier sospecha de una reacción cruzada.

También podría resultar de gran utilidad la reacción de fijación de complemento en los casos crónicos de peste porcina. Es sabido que la pequeña concentración de antígeno en los órganos de los animales aquejados por dicha fase crónica de la enfermedad, imposibilitan su detección por los métodos serológicos aplicados en la actualidad.

//43

Un rastreo de anticuerpos en los sueros de dichos animales, mediante la fijación de complemento, podría solucionar el problema del diagnóstico en dichos casos.

Otra futura e interesante posibilidad en el empleo de la fijación de complemento, sería la utilización de la misma conjuntamente con la reacción de seroneutralización, en el estudio de las posibles relaciones antigénicas entre el virus causante de la diarrea bovina u otros enterovirus, y el de la peste porcina. Trabajos muy recientes, tales como el de Sheffy, Coggins y Baker (34) y el de Dinter (35) indican la posibilidad de dicha relación.

En lo que se refiere a la técnica de inmunofluorescencia, en el presente trabajo reveló una menor sensibilidad frente a la fijación de complemento, uniéndose a ello la evidente desventaja en lo que respecta a su practicidad manual, sobre todo en lo relacionado a la preparación de los materiales. Esto no hace sino confirmar el simple hecho de que a pesar de que son ya varios los años en que se ha trabajado utilizando esta técnica, son muy pocos los casos conocidos en que se ha recomendado dicho método como prueba de diagnóstico.

Los datos obtenidos en inmunocromatografía no deben llevar a engaño en relación a la posible futura importancia de esta técnica en el diagnóstico de la peste porcina, así como en el estudio de otros antígenos víricos. En el presente trabajo, por razones materiales, no han sido agotadas de ningún modo las posibilidades de mejorar la técnica. En efecto, se han buscado, variando distintos factores intervinientes en la reacción, las condiciones óptimas de la experiencia. Se ha

encontrado una serie de relaciones entre antígeno y anticuerpo así como un tiempo de incubación apto, para obtener resultados positivos con ciertos antígenos muy infecciosos. Con antígenos precipitantes más débiles, es necesario ahondar más en las experiencias, buscando proporciones antígeno-anticuerpo más apropiadas, o bien variando el tiempo o temperatura de incubación, de modo de poder aumentar la sensibilidad de la reacción. La concentración de los antígenos débiles mediante métodos tales como la diálisis contra altos polímeros como el Carbowax 20M (polietilen glicol de peso molecular 20000) podría ser utilizada con éxito.

Con respecto a la segunda fase de las experiencias quedó corroborada la importancia del bazo como gran reservorio de virus, además de haber sido el primer órgano en que fué posible detectar antígeno en una infección experimental. Es necesario dejar en claro que los órganos analizados fueron además del bazo, los ganglios mesentéricos y el riñón.

Esta última serie de ensayos volvieron a demostrar la mayor sensibilidad del método de fijación de complemento con respecto al de inmunofluorescencia, ya que por esta última técnica, tal como está indicado en el cuadro VII, sólo fué posible detectar antígeno en el bazo de los cerdos sacrificados ocho días después de su infección.

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo utilizando los mismos materiales, con las técnicas de fijación de complemento (50% de hemólisis), inmunofluorescencia e inmunocromatografía, determinándose la sensibilidad de dichos métodos con respecto a la prueba de inoculación en animales receptivos al virus de la peste porcina.

Se comprobó que el método que más se acercó a la efectividad de la inoculación en cerdos fué el de fijación de complemento (50% de hemólisis). La coincidencia entre ambas técnicas fué de un 74.3%.

Se demostró la superioridad del método de fijación de complemento para la detección de virus de peste porcina, sobre las técnicas de inmunofluorescencia e inmunocromatografía, sin haberse agotado aún las investigaciones sobre esta última prueba serológica.

Se analizó la futura importancia del método de fijación de complemento en el diagnóstico serológico de la peste porcina.

Se comprobó la aparición de antígeno en cantidades significativas en bazo y ganglio de animales sacrificados ocho días después de su infección con virus de peste porcina. Los primeros trastornos clínicos serios de dichos animales coincidieron con la época de aparición del antígeno en los órganos anteriormente citados.

Se agradece profundamente al Dr. Osvaldo A.Pesce la inestimable ayuda prestada durante todo el transcurso de las experiencias, así como a los Dres.J.A. Marini, F.Rossi y C. Schiappacasse por la contínua provisión de los materiales indispensables para la realización de los trabajos.

Se agradece al Director del Instituto de Fiebre Aftosa,Dr.S. Rivenson, a todos los técnicos del mismo, así como a los auxiliares Sta.C. Gonzalez Aquino, y Sres. A. Lovatto, H. Filippo y Alberto P. Scalise, la valiosa colaboración recibida.

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

BIBLIOGRAFIA

1) Dunne,H.W. (1963). Vet.Med. 53, 222.

2) Segre,D. (1962). Am.J.vet.Res. 23, 748.

3) Millian,S.J. y Englehard,W.E. (1961). Am.J.vet.Res.,22, 396.

4) Coggins,L. y Sheffy,B.E. (1961. Proc.65th Am.Meet.U.S.Livestock Sanit.Ass., Minneapolis, 333.

5) Kumagai,T., Shimizu,T y Matumoto,M. (1958). Science, 128, 366.

6) Paarman,E. y Ernst,H. (1962) Dtsch.tierärztl.Wschr.,69, 65.

7) Kulesko,I.I. y Sobko,A.I. (1960) Veterinariya, Moscú, 10, 68.

8) Schoop,G. y Wachendörfer,G. (1963). Mh.Tierheilk., 15, 164.

9) Taylor,R.L. (1961). Vet.Med., 56, 229.

10) Marrack,J. (1934). Nature, 133, 292.

11) Coons,A.H., Creech,H.J. y Jones,R.N. (1941). Proc.Soc.exp. Biol.Med., 47, 200.

12) Coons,A.H., Creech,H.J., Jones,R.N. y Belmer,E. (1942). J. Immunol., 45, 159.

13) Coons,A.H. y Kaplan,M.H. (1950). J.exp.Med., 91, 1.

14) Stair,E.L., Rhodes,M.B., Aiken,J.M., Underdahl,N.R. y Young,G.A. (1963). Proc.Soc.exp.Biol.Med., 113, 656.

15) Solorzano,R.F. (1962) Doctoral Thesis, Pennsylvania State University, University Park.Pa.

16) Osler,A., Strauss,J.H. y Mayer,M. (1952). Am.J.Syph.Gon.and Vener.Dis., 36, 140.

17) Marucci,A.A. (1957). Am.J.ver.Res., 18, 785.

18) Costantini,H.M.V. y Zakin,M.M. (1963).Rev.Inv.Gan., 16, 17.

19) Stöss,B. (1957) Zbl.Bakt.I.Orig., 171, 103.

20) Hobohm,K.O. y Rivenson,S. (1959). Rev.Inv.Gan., 7, 293.

21) Hobohm,K.O., Rivenson,S. y Scalise,A. (1960), Rev.Inv.Gan.,9,129.

22) Banchero,E.P.de, (1962). Rev.Inv.Gan., 14, 159.

23) Levy,H.B. y Sober,H.A. (1954) Proc.Soc.exp.Biol.Med.,86, 789.

24) Kohn,J. (1959) Nature, 183, 1055.

25) Koch,F.C. y McMeekin,T.L. (1924). J.Am.Chem.Soc., 46, 2066.

26) Marshall,J.D., Eveland,W.C. y Smith,C.W. (1958). Proc.Soc. exp.Biol.Med., 98, 898.

27) Ceons,A.H. (1956) International Review of Cytology,Ed.G.H. Bourne y J.F.Danielli, Academic Press,Inc.,N.Y., 5, 1.

28) Courtain,C.C. (1961). J.Histochem.Cytochem., 9, 484.

29) Rivenson,S. y Costantini,H.L.V. (1961).Rev.Inv.Gan., 11, 7.

30) Costantini,H.L.V., Segura,M. y Degiorgi,E. (1961) Rev.Inv. Gan., 12, 207.

31) Costantini,H.L.V., Rivenson,S., Degiorgi,E. y Segura,M. (1962) Rev.Inv.Gan., 14, 185.

32) Krogh,M.von, (1916). Coll.Chem.and Inm., J.inf.Dis., 19, 452.

33) Ulrich,C. y McArthur,F.- Copia en Biblioteca Inst.Fiebre Aftosa,INTA, Tomo 9, 264.

34) Sheffy,B.E.,Coggins,L. y Baker,J.A. (1962). Proc.Soc.exp.Biol. Med.,109, 349.

35) Dinter,Z. (1963). Zbl.Bakt.I.Orig.,188,475.