

Tesis de Posgrado

Tipificación de los virus aftosos

Vázquez Saavedra, Carmen E.

1964

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:

Vázquez Saavedra, Carmen E.. (1964). Tipificación de los virus aftosos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1244_VazquezSaavedra.pdf

Cita tipo Chicago:

Vázquez Saavedra, Carmen E.. "Tipificación de los virus aftosos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1964.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1244_VazquezSaavedra.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tipificación de los virus aftosos

Carmen E. Vázquez Saavedra

1244-

Resumen presentado para optar al

Título de Doctora en Química

1964

FOYSA

Se evaluaron las técnicas empleadas en la tipificación de los virus aftosos y se reseñaron los métodos de fijación del complemento con hemólisis del 100 % (Rottgardt y Charles); de fijación del complemento con lectura del 50 % de hemólisis (Margni modificada); de hemoaglutinación pasiva (Hirst) y de hemoaglutinación indirecta (Boyden); de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con gamma globulina de los antisueros hiperinmunes (Lombán, Vázquez Saavedra y Sa Fleitas); de aglutinación de partículas de colodio sensibilizadas con los virus aftosos (Sa Fleitas y Vázquez Saavedra) y los de difusión en agar (Oudin y Ouchterlony).-

Se compararon los resultados obtenidos por las dos técnicas de fijación del complemento, comprobando que, para los virus de epitelio lingual de bovino infectado, el porcentaje de reacciones positivas con el primer método era del 93 % y por el segundo del 95 %.

En cambio para los virus de cultivo en medio Frenkel o B.H.K., del 75 % para el 100 % de hemólisis y del 79 % para el 50 % H. - Sobre el total de virus estudiados (135) los porcentajes fueron del 91 %.-

Con las técnicas de fijación del complemento 50 % de hemólisis (C' 50H) los porcentajes fueron del 100 % para los virus de epitelio y del 79 % para los de cultivo: sobre las 135 muestras virales consideradas los porcentajes de reacciones positivas llegaron al 92 %.-

Con la técnica de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con gamma globulina de los antisueros hiperinmunes, las reacciones fueron positivas en un 90 % con virus de epitelio y en 60 % con virus de cultivo; sobre el total de virus estudiados, 132, la positividad fue del 81 %.-

En las pruebas de aglutinación de partículas de colodio sensibilizadas con los virus aftosos de epitelio, el porcentaje de reacciones positivas fue del 85 % y del 76 % cuando la sensibilización se realizaba con virus de cultivo.- Sobre los 128 antígenos estudiados por este método las reacciones fueron positivas en un 68 %.

En las técnicas de difusión en agar las reacciones fueron positivas para los virus de cultivo en un 64 % y para los de epitelio en 71 %; sobre el total de muestras analizadas, 131, fueron positivas el 68 %.-

Desde el punto de vista de la especificidad, todas las reacciones empleadas, excepto las de hemoaglutinación, no mostraron reacciones inespecíficas

en ninguna de las diluciones del antígeno ni del antisuero ensayadas.-
 Se compararon, además la sensibilidad de las reacciones empleadas en la titulación de los antisueros y virus patrones, encontrando que la prueba de fijación del complemento 50 % H. era la que mostraba mayor sensibilidad, tanto en los virus de cultivo como en los de epitelio.-

Las pruebas de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas muestra una buena correlación con los valores obtenidos con la técnica del 100 % de hemólisis; la técnica del colodio sensibilizado ofrece menor positividad porcentual que la prueba del látex para los virus de epitelio, no así con los de cultivo, en los que se observa un grado de positividad similar a los de la técnica de fijación del complemento 100 % de hemólisis.-

Se estudiaron, por otra parte, la relación existente entre el título infectante y la positividad, en las diferentes pruebas realizadas: las pruebas de aglutinación parecieran mostrar una relación directa entre el el título infectante (D.I.50) y el % de reacciones positivas, regularidad esta que no se manifiesta tan claramente en las de fijación del complemento.

Las conclusiones de este trabajo fueron:

- 1) Las pruebas de fijación del complemento son las que porcentualmente dan mayor número de reacciones positivas, en la tipificación de los virus aftosos.
- 2) Las pruebas de aglutinación de partículas de látex y de colodio sensibilizadas son promisorias como un procedimiento rápido y sencillo, de sensibilidad comparable a la técnica de fijación del complemento 100% H. --
- 3) Las pruebas de difusión en agar, a pesar de su especificidad, no son adecuadas a la tipificación de los virus aftosos, por exigir virus de altos títulos o la concentración de los mismos: su uso es adecuado para el estudio del mosaico antigénico de los virus aftosos.
- 4) El cálculo estadístico de (χ^2) , indica que la prueba de difusión en agar respecto de la técnica del 100 % de hemólisis da diferencias significativas, lo mismo que la del látex para el virus tipo "0" de cultivo. Los otros métodos, para los tres tipos de virus, no dan diferencias significativas respecto al de fijación de complemento 100 % de hemólisis.

Carolina R. Pérez Saavedra

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tipificación de los virus aftosos

Carmen E. Vázquez Saavedra

1244

Tesis presentada para optar al

Título de Doctora en Química

1964

UNIVERSIDAD

Enrique Savino

Padrino de Tesis
Prof. Dr. Enrique Savino

Enrique Savino

Trabajo de Tesis realizado en el Instituto Nacional de Microbiología, "Carlos G. Malbrán" y en el Departamento de Serología e Inmunología de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Bioquímica de Buenos Aires.

INTRODUCCION

La fiebre aftosa o glosopeda es definida por VERGE (1) como "una enfermedad contagiosa, virulenta, debida a un ultravirus específico. Ataca especialmente a los bovinos y se caracteriza clínicamente por un estado febril inicial, seguido de una erupción vesicular, sobre las mucosas y sobre la piel".

La enfermedad se transmite de animal a animal por medio del virus contenido en los fluidos vesiculares y en la leche, raramente es transmitido al hombre en forma directa(2).

VALLEE y CARRE (3), comunicaron en 1922, la pluralidad de los virus aftosos a los que denominaron "O" y "A"; WALDMANN y TRAUTWEIN (4) demostraron la existencia de un tercer tipo al que designaron "C", completándose así la tríada clásica "O", "A", "C" de los virus aftosos.

Después de la epizootia europea de 1951-52, se demostró la importancia de los sub-tipos o variantes virales.

Diferentes investigadores encontraron tres sub-tipos del virus "O"; once del "A" y tres del "C" (5). A los tipos de virus mencionados, deben agregarse los sudafricanos, S.A.T.1, S.A.T.2 y S.A.T.3, aislados en el Research Institute (Animal Virus Diseases), Pirbright, Surrey, England (6) y el tipo Asia 1, encontrado también en el mencionado Instituto.

El virus de la fiebre aftosa es considerado como un subgrupo de los enterovirus, vinculado al grupo Coxsackie.(7). Es uno de los más pequeños conocidos y el diámetro de su partícula esférica varía de 8 a 40 milimicrones (8). Está formado por dos tipos de partículas: una es la partícula infectante propiamente dicha, con un coeficiente de sedimentación alrededor de 140S y la otra, más pequeña, con un coeficiente de 14 S, es la partícula fijadora del complemento, aunque esta propiedad, en menor grado la posee también la partícula infecciosa. El diámetro de las mismas, es de 23 y 8 milimicrones respectivamente, valores estos obtenidos por microscopía electrónica y que coinciden, dentro de los errores experimentales con los obtenidos a partir del coeficiente de difusión.

BROWN y CRICK (9), estudian la estructura antigénica del virus total y de las partículas 20 y 7 milimicrones que se pueden obtener del mismo,

demostrando que las bandas de precipitación del virus total frente a los antisueros anti 20 y anti 7 milimicrones, eran serológicamente distintas y que una de ellas- 20 milimicrones- desaparecía cuando el virus se calentaba 30 minutos a 56°C.

Nosotros pudimos verificar este hecho, pues al tipificar los virus por el método de difusión en agar, observamos dos líneas al usar virus sin inactivar y sólo una cuando el virus había sido calentado previamente durante 30 minutos a 56°C. .-

El virus está formado por un núcleo de A.R.N. infectante, rodeado exteriormente por una sustancia proteica. El A.R.N. es el responsable del poder infeccioso, en tanto que la especificidad serológica del virus está determinada por la cobertura proteica y por los demás componentes glúcidos y lípidos que se encuentran relacionados estructuralmente, al esqueleto del ácido nucleico (10).-

Desde el punto de vista inmunológico, el virus aftoso no es un buen antígeno, confirmando la regla que establece que los virus bien definidos y sin subtipos serológicos, producen una inmunidad fuerte y prolongada y aquellos que tienen numerosos subtipos- influenza, dengue, aftosa, etc.- producen una baja y poco persistente inmunidad.-

A partir de 1911, cuando en Francia se crea el primer centro de investigación contra la fiebre aftosa, hasta nuestros días, ha sido un problema de vital importancia la lucha para la erradicación de esta enfermedad.

Los centros de Plum Island, Animal Diseases Laboratory, U.S. Department of Agriculture y el Research Institute (Animal Virus Diseases), Pirbright, Surrey, England, constituyen conjuntamente con el Institut Français de la Fiebre Aphteuse, Lyon, Rhone, France, los núcleos que concitan el mayor número de comunicaciones y marchan a la vanguardia en la investigación de los problemas relacionados con la fiebre aftosa.

En nuestro país la acción oficial, se realiza a través de dos instituciones: el Instituto Nacional de la Fiebre Aftosa, dependiente del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y la Comisión Asesora Nacional para la Erradicación de la Fiebre Aftosa.

Desde el punto de vista sanitario tres son los métodos en que se ha basado la acción profiláctica:

- 1) Eliminación de los animales infectados e incineración de los mismos.
- 2) Establecimiento de un cordón de inmunidad, rodeando los focos del brote por rebaños vacunados que eviten la propagación de la onda infectante y eliminación de los animales infectados.

3) Vacunación sistemática y repetida de los rebaños .-

Cualquiera que sea el método profiláctico que se intente emplear para la erradicación de la fiebre aftosa, debe ir acompañado de un plan de vacunación racional.

Las vacunas tipo VALLEE-SCHMIDT-WALDMANN preparadas con virus de epitelio de animales infectados, formolizado y adsorbido en $Al(OH)_3$, protegen aproximadamente al 90 % de los animales vacunados contra una agresión de la enfermedad.- Las vacunas bi y trivalentes no protegen con igual eficacia contra todos los tipos de virus.

Los niveles de anticuerpos se deben mantener con repetidas vacunaciones (11) pues la inmunidad se mantiene sólo durante 4-6 meses subsiguientes a la primo-vacunación.

Se han empleado, además, otros tipos de vacunas: vacunas saponinadas (12), vacunas con el complejo Violeta cristal + Sangre inactivada etc., con resultados dispares (13).-

El desarrollo de las técnicas de cultivo de los virus en cultivo de tejido ha permitido preparar vacunas con virus cultivado en medio Frenkel o B.H.K. Los resultados son promisorios pero es necesario una mayor información estadística para evaluar su verdadera eficacia.

Estos últimos años se ha intentado trabajar en la línea de las vacunas a virus vivo, buscando reducir la patogenicidad, para una especie animal, conservando se capacidad inmunogénica.

Los trabajos de SKINNER(14) y los de VERGE, PARAF, DHENNIN y ASSO (15) muestran que, por pasajes repetidos en conejos lactantes o ratones destetados, se logra atenuar la virulencia a límites que permiten su empleo como vacuna: estos trabajos no han salido aún de la fase experimental.

En un país como el nuestro en el que la economía tiene una base agropecuaria, es necesario extremar los esfuerzos para la erradicación definitiva de esta epizootia.-

Por esta razón elegimos como tema de nuestro trabajo, la tipificación de los virus aftosos, para estudiar comparativamente el verdadero valor de estas reacciones en la determinación del tipo de los virus aftosos.

Las pruebas clásicas usadas en la tipificación y estudio inmunológico de un virus, son la sero-neutralización y la fijación del complemento.

La primera de ellas exige suero del animal enfermo en el período agudo y de convalecencia, exigencia ésta que limita su aplicación, en el caso particular de la fiebre aftosa.

Por estas razones, analizamos en forma crítica, las técnicas de fijación del

complemento 100 % de hemólisis (C' 100 H.) y del 50 % de hemólisis(C' 50 H.) (16), se agregó el estudio de la hemoaglutinación activa y pasiva y de las pruebas de difusión an agar, incorporando, finalmente, dos nuevos métodos de aglutinación de partículas insoluble e inertes: látex y colodio.-

Esta batería de reacciones, aplicada a la tecnología de los procesos de obtención de vacunas por el procedimiento de WALDMANN o el cultivo del virus en medio Frenkel o en cultivos de epitelio renal de Mesocricetus auratus(B.H.K.), permitiría un mayor grado de certeza en la determinación del tipo de virus y en la titulación de las cepas: esa ha sido la inquietud que originara nuestro trabajo.-

BIBLIOGRAFIA

- 1) Levaditi, C., Lepine, P et Verge, J.: " Les ultravirus des maladies animales" Librairie Maloine Paris (Verge, J.: Cap. II Fievre Aphteuse pg.265 1943 .-
- 2) Hillemand, M.R.: Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases 2nd Edition American Public Health Association, 1956
- 3) Vallée H. et Carré, H.: Compt.rend.acad.sciences.Paris 174:1498, 1922
- 4) Waldmann, O. and Trautwein, K.: citados por Shahan, M.S.: The virus of foot-and-mouth disease, Annals of the New York Academy of Sciences, 101, 444, 1962 .
- 5) Research Institute, Pirbright, Surrey, England.: Report for the Years 1937-1953. Heffer and sons. England.
- 6) Burnet, F.M.: Principles of Animals Virology New York Academic Press 2nd Edition, 1960.-
- 7) Burnet, F.M. and Stanley, W.M. :The viruses New York Academic Press(V:III) 1959.-
- 8) Galloway, I.A and Elford, W.J.: Brit. J. Exp. Biol. and Med. 14:400, 1933.
- 9) Brown, F. and Crick, J.: Virology, 5:133, 1958.
- 10) Lepine, P. Les virus Presses Universitaires de France, Paris, 1961.
- 11) Camargo, N.F. and Mott, L.D.: Bull.Int. off Epizoot. 39:435, 1953.
- 12) Roger Guy Espinet: Gaceta veterinaria Nº 74, 1951.
- 13) Henderson, W.M. mGalloway, I.A. and Brooksby, J.B.: Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 69:77, 1948.
- 14) Skinner, H.H.: Bull.Int. Off.Epizoot.: 53:634, 1960.
- 15) Verge, J., Paraf, A., Dhennin, L. and Asso, J.: Bull.Int.Off.Epizoot. 49:93, 1958.-
- 16) Margni, R.A.: Las reacciones de fijación del complemento para sífilis con lecturas de 50 y 100 % de hemólisis. (en prensa), comunicación personal.

TECNICA GENERAL

La descripción de las pruebas serológicas estudiadas en nuestro trabajo comprenden una serie de esquemas en los que se detallan:

- 1) Introducción
- 2) Equipo
- 3) Material de vidrio
- 4) Drogas
- 5) Reactivos
- 6) Método
- 7) Resultados
- 8) Conclusiones
- 9) Bibliografía

Para obtener resultados comparables y reproducibles (1, 2), exigencia esencial en toda prueba serológica, es necesario:

- 1) Emplear reactivos estandarizados y controles adecuados.
- 2) Seguir estrictamente las indicaciones técnicas de cada método.
- 3) Consignar los resultados, en la forma especificada para cada procedimiento.

1) Introducción

Para analizar cada método desarrollado, se realiza una es-
cueta introducción histórica de la reacción, indicando la base teórica
de la misma y las modificaciones efectuadas a la técnica original.

2) Equipo

1- Autoclave: Autoclave American Sterelizer Co., Erie, Penn., Made
U.S.A.

2- Estufas: a) Estufa para cultivo, Lutz Ferrando, Mod.254, Tempera-
tura 37° C. Ind. Arg.

- b) Estufa para desecación de material de vidrio, Ciencia, Mod. 5040, Temperatura máxima 200° C. Ind. Arg.
- 3- Centrífugas: a) International Portable Refrigerated Centrifuge, Mod. PR 1. International Equipment Co., Boston, Mass., U.S.A.
- b) International Centrifuge, Size 2, International Equipment Co., Boston, Mass., U.S.A.
- 4- Congeladora: The Bastian Blessing Co., Mod. 8515
- 5- Refrigerador: Refrigerador de 0°-6° C con compartimiento de congelación, Westinghouse, Mod. S.P.F., U.S.A.
- 6- Destilador: Precision Water Still, Mod 3125, Precision Scientific Co., Chicago, U.S.A.
- 7- Balanzas: a) balanza de precisión, Sartorius, Gottingen
b) balanza E. Mettler, K5/T, Zurich, Swiss Made.
- 8- Microscopio: CARL ZEISS "JENA" N° 281981, tubo binocular-Germany.
- 9- Baños de María: a) Ciencia, Mod. 3G, temperatura 37-56° C., Ind. Arg.
b) Ciencia, tamaño 1 m. por 50 cm., temperatura 37-56° C, Ind. Arg.
- 10- Fotocolorímetro: Crudo Caamaño y Cía., Mod. 1349, Ind.Arg.
- 11- Potenciómetro: Beckman Zeromatic pH meter. Mod. 4922 C.
- 12- Termómetros: a) termómetro de máxima y mínima, Enfis, Ind. Arg.
b) termómetro 0-250° C.
c) termómetro 0-100° C.
- 13- Bombas de vacío: a) trompa de agua para vacío.
b) bomba para alto vacío, LANDI, Motor 1/2 HP, Mod. 1495. Ind. Arg.
- 14- Gradillas: a) de madera, para 10 y 20 tubos de ensayo.

b) metálicas tipo Kahn, para 24 y 30 tubos de hemólisis.

c) metálicas para 100 tubos de hemólisis

15- Jeringas: Vidrio Pyrex, de 10 ml., 5, 1 ml. Ind. Arg.
Becton, Dickinson and Co., B.D., Yale, 1/4 ml. U.S.A.

-16- Agujas: hipodérmicas, acero cromo inoxidable, 25/8; 25/6; 10/5,
Ind. Arg. B.D.27, U.S.A.

17- Morteros: de porcelana de 10- 12 cm. de diámetro.

18- Reloj de intervalo

19- Portapipetas

3) Material de vidrio

1) Frascos Pyrex de 60 ml. a 4 litros de capacidad.

2) Probetas Pyrex graduadas de 100 ml. a 2 litros de capacidad.

3) Matraces Erlenmeyer de 100 ml. a 2 litros de capacidad.

4) Pipetas serológicas graduadas hasta la punta:

a) de 1 ml. graduadas en 1/100 ml.

b) de 2 ml. graduadas en 1/100 ml.

c) de 5 ml. graduadas en 1/10 ml.

d) de 10 ml. graduadas en 1/10 ml.

5) Tubos para centrifugación de fondo cónico, con tapa de bakelita:

a) de 10 ml. de capacidad graduados 1/100 ml.

b) de 12 ml. de capacidad sin graduación.

c) de 40 ml. de capacidad graduados 1/10 ml.

d) de 40 ml. de capacidad sin graduación.

6) Matraces aforados Pyrex de 100, 250, 500 y 1.000 ml. de capacidad.

- 7) Vasos de precipitación Pyrex de 100 ml. a 4 litros de capacidad.
- 8) Embudos de vidrio:
 - a) de 18 a 20 cm. de diámetro
 - b) de 10 a 12 cm. de diámetro
 - c) de 5 a 6 cm. de diámetro
- 9) Tubos de ensayo Pyrex
- 10) Tubos para hemoaglutinación Pyrex de fondo redondo sin botón terminal.
- 11) Tubos de hemólisis Pyrex.
- 12) Placas de Petri de 12 cm. de diámetro.
- 13) Vidrios de reloj de diversos diámetros.
- 14) Portaobjetos.
- 15) Cubreobjetos.

Métodos de limpieza, preparación y esterilización de los materiales (3).

1) Material de vidrio:

Toda la cristalería debe ser usada químicamente limpia; el material nuevo exige un tratamiento previo con mezcla sulfocrómica o hipoclorito concentrado. Conviene marcar los émbolos y el cuerpo de las jeringas con el mismo número al igual que los frascos y matraces con sus respectivas tapas, para evitar intercambiar unas con otras .

En cuanto al material usado se lo trata en la siguiente forma:

- 1) Se deja varias horas en remojo en agua fría y se cepilla para remover todo resto grosero, adherido al vidrio.
- 2) Sumergir en solución detergente caliente y dejar 24 horas. Se emplea con buenos resultados el detergente 7X.
- 3) Escurrir el detergente y cepillar cada pieza bajo agua caliente.

- 4) Cepillar cada pieza con agua corriente fría.
- 5) Enjuagar repetidas veces con agua corriente caliente.
- 6) Enjuagar con agua destilada y con agua bidestilada cuando la técnica así lo exija (colodio).
- 7) Dejar escurrir y secar en estufa.
- 8) Seleccionar los tubos, eliminando los sucios y los rayados, que dificultan la lectura de los resultados. Los tubos y pipetas de los que no se han eliminado proteínas, restos de colodio, látex, etc., se los deja 24 horas en mezcla sulfocrómica, siguiendo luego con el tratamiento indicado.
- 9) Las pipetas se taponan en las boquillas con algodón, se las clasifica por sus capacidades en mililitros y se distribuyen en portapipetas metálicos.
- 10) Los tubos de hemólisis se preparan colocándolos, boca abajo, en recipientes metálicos o en vasos de precipitación (2-4 litros), tapados con gasa, con papel madera y atados, de acuerdo a la técnica bacteriológica.
- 11) Los tubos de ensayo, probetas, frascos Erlenmeyer etc. se preparan, para su esterilización, de acuerdo a la misma técnica.

2) Material de goma:

- 1) Hervir 15 minutos en solución detergente.
- 2) Enjuagar con agua corriente fría.
- 3) Enjuagar con agua destilada.
- 4) Secar en estufa.
- 5) Colocarlo en recipientes metálicos cerrados para su esterilización.

Esterilización

1) Material de vidrio:

Esterilizar en horno (calor seco) a 160° C. durante una hora o a 170° C. durante 30 minutos.

2) Material de goma y soluciones:

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 120° C. Cuando las soluciones se alteran a esa temperatura (ej. Solución Al-sever), se recurre a la tyndalización.-

4) Drogas:

Los productos químicos empleados deben ser de máxima pureza y satisfacer las exigencias de las técnicas desarrolladas. Hemos procurado emplear drogas que respondieran a estas características (B.D.H.), en cada caso se describe la sustancia empleada, consignando:

- 1) Nombre
- 2) Denominación en envase original
- 3) Grado de pureza
- 4) Fórmula
- 5) Peso molecular
- 6) Marca

5) Reactivos:

1) Agua destilada: el agua destilada y bidestilada se obtiene semanalmente del destilador general, ya descrito, verificando periódicamente el pH que está aproximadamente entre 6,5 - 6,7 unidades de pH.-

2) Soluciones salinas:

Las soluciones salinas se preparan con agua destilada o bidestilada, se envasan, se rotulan y esterilizan marcando el nivel

del líquido, para completar su volumen cuando se hubiera producido evaporación. Se las conserva a temperatura ambiente o en la heladera, de acuerdo a las características de las mismas.

3) Antígenos:

En nuestro trabajo empleamos los siguientes tipos de antígenos:

- a) Virus aftoso tipo o patrón (O,A,C).
- b) Virus aftoso extraído de epitelio lingual de bovino infectado espontánea o experimentalmente.
- c) Virus aftoso cultivado en medio Frenkel.
- d) Virus aftoso cultivado en cultivo de epitelio renal de "Cricketus auratus".
- e) Virus aftoso cultivado en cultivo de epitelio renal de bovino.
- f) Virus aftoso extraído de ratón lactante inoculado.
- g) Virus aftoso extraído de fluido vesicular de lesiones podales de cobayo inoculado.
- h) Virus aftoso de linfa de bovino inoculado experimentalmente o infectado espontáneamente.
- i) Suspensión de epitelio lingual normal de bovino (control negativo).

La procedencia de los antígenos que se consignan en el cuadro Nº 1, ha sido:

Los antígenos de epitelio lingual de bovino y de ratón lactante, del Laboratorio de la Comisión Asesora Nacional para la erradicación de la Fiebre Aftosa (C.A.N.E.F.A.) y los antígenos de cultivo en medio Frenkel y de cultivo en epitelio renal, del Instituto Nacional de la Fiebre Aftosa, dependiente del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (I.N.T.A.)

Los virus aftosos tipo y el epitelio lingual normal de bovino han sido proporcionados por ambos laboratorios.

4) Sueros

Empleamos los siguientes tipos:

a) Antisueros aftosos hiperinmunes O,A,C de cobayo

b) Sueros controles:

1) Control negativo: suero normal de cobayo.

2) Control de especificidad: suero equino antirrábico.

En el cuadro N° 2 se consigna, el número de origen de la muestra, el tipo a que corresponde, el título obtenido por la técnica de fijación de complemento y finalmente la procedencia.

5) Los reactivos de aplicación especial se detallan en la técnica respectiva.

6) Método

Este capítulo se lo subdivide en dos partes:

1) Se describen los distintos pasos seguidos en las técnicas (sensibilización de partículas inertes, calibración del fotocolorímetro para la prueba del 50 % de hemólisis, etc.)

2) Se detalla el desarrollo de la prueba en sí, consignando diluciones, volúmenes usados, temperaturas, etc.

7) Resultados:

Se protocolizan los resultados de acuerdo a las indicaciones establecidas por los autores de cada método.

8) Conclusiones

Se discuten los resultados y se analizan la sensibilidad y especifici-

dad de cada método en particular y en relación con los otros.

9) Bibliografía

La Bibliografía de cada tema se ajusta a las normas establecidas: apellido del autor, inicial del nombre, nombre de la revista, volumen, página, año.

CUADRO N° 1

ANTIGENOS

Muestra N°	Virus Tipo	N° de origen	Material remitido (1)	Título del virus (2)	Procedencia	
1	O	1238	M.C.	---	C.A.N.E.F.A.	
2	A	1033	A.E.B.	10 ^{-7,8}	"	
3	C	976	M.C.	---	"	
4	(3)	O	979	M.C.	---	"
		O	972	M.C.	---	"
		O	973	M.C.	---	"
		O	974	M.C.	---	"
5	A	975	M.C.	---	"	
6	A	978	M.C.	---	"	
7	A	977	M.C.	---	"	
8	C	1148	M.C.	---	"	
9	A	1476	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"	
10	O	1347	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"	
11	A	1196	A.E.B.	10 ^{-6,8}	"	
12	O	1089	A.E.B.	10 ^{-7,8}	"	
13	A	1202	M.C.	---	"	
14	A	1159	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"	
15	C	IV, (18)23	A.E.B.	---	"	
16	O	1301	M.C.	---	"	
17	O	8/5/63	A.E.B.	---	"	
18	C	1222	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"	
19	A	1207	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"	

20	A	1232	A.E.B.	10 ^{-7,63}	C.A.N.E.F.A.
	A	1296	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
21	O	1312	A.E.B.	--	"
	O	1146	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
	O	1266	A.E.B.	10 ^{-7,8}	"
22	C	1292	M.C.R.L.	10 ^{-7,63}	"
23	O	17/5/63	E.B.P.	10 ^{-7,8}	I.N.T.A.
24	A	17/5/63	E.B.P.	10 ^{-7,63}	"
25	C	17/5/63	E.B.P.	10 ^{-8,0}	"
26	O	1303	M.R.	10 ^{-7,8}	C.A.N.E.F.A.
27	C	1343	A.E.B.	10 ^{-7,96}	"
28	O	1339	A.E.B.	10 ^{-7,30}	"
29	O	1407	M.C.	--	"
30	O	1400	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
31	C	1395	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
32	O	--	E.C.P.	10 ^{-8,0}	Inst. Malbrán
33	A	--	E.C.P.	10 ^{-8,2}	" (4)
34	C	--	E.C.P.	10 ^{-7,8}	"
35	O	1424	M.C.	10 ^{-7,63}	C.A.N.E.F.A.
36	A	1380	M.C.	--	"
37	O	1407	M.C.	--	"
38	A	1387	M.C.	--	"
39	C	1396	M.C.R.L.	10 ^{-7,63}	"
40	A	1434	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
	A	1448	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
41	C	1429	M.C.	--	"
42	A	1541	M.C.	10 ^{-7,63}	"

43	O	1588	M.C.	—	C.A.N.E.F.A.
44	A	1559	M.C.	—	"
45	O	1510	M.C.	—	"
46	A	1514	M.C.R.L.	10 ^{-7,63}	"
47	C	1428	M.C.	—	"
48	C	1499	R.L.	10 ^{-7,63}	"
49	A	1528	A.C.F.	10 ^{-7,63}	"
50	A	1518	A.C.F.	10 ^{-7,80}	"
51	A	1611	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
52	—	—	E.N.B.	—	"
53	O	1604	M.C.	—	"
54	O	1636	M.C.	—	"
55	A	1526	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
56	C	1559	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
57	C	1677	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
58	O	1655	M.C.R.L.	10 ^{-7,63}	"
59	O	1705	M.C.	—	"
	O	1844	M.C.	—	"
60	C	1606	R.L.	10 ^{-7,63}	"
61	C	1699	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
62	O	1801	M.C.	10 ^{-7,6}	"
63	C	1939	M.C.	—	"
64	O	2149	M.C.	—	"
	O	2181	M.C.	—	"
	O	2279	M.C.	—	"
	O	2369	M.C.	—	"
65	O	—	E.B.P.	10 ^{-7,8}	(5)
66	A	—	E.B.P.	10 ^{-8,0}	(5)

67	C	--	E.B.P.	10 ^{-7,63}	(5)
68	O	1849	A.E.B.	10 ^{-7,63}	C.A.N.E.F.A.
69	C	1833	A.E.B.	10 ^{-7,63}	C.A.N.E.F.A.
70	C	2001	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
71	A	1969	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
72	C	2034	A.E.B.	10 ^{-6,80}	"
73	[O	2660	M.C.	--	"
	O	2456	M.C.	--	"
	O	2548	M.C.	--	"
74	[O	2625	M.C.	--	"
	O	2652	M.C.	--	"
75	O	2705	M.C.	--	"
76	A	2041	A.E.B.	10 ^{-6,30}	"
77	O	328	M.C.	--	"
78	C	2143	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
79	[O	2675	M.C.	--	"
	O	2734	M.C.	--	"
	O	3051	M.C.	--	"
80	O	2475	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
81	C	2343	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
82	O	2521	M.C.R.L.	10 ^{-7,63}	"
83	A	2522	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
84	[A	3550	M.C.	--	"
	A	3524	M.C.	--	"
85	O	4564	M.C.	--	"
86	[C	3333	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"
	C	3376	A.E.B.	10 ^{-7,63}	"

87	O	2277	A.E.B.	10 ^{-7,80}	C.A.N.E.F.A.
	O	2279	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
88	A	3600	M.C.	--	"
89	C	2172	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
	C	2202	A.E.B.	10 ^{-7,80}	"
90	O	30/9/64	E.B.P.	10 ^{-8,0}	"
91	A	30/9/64	E.B.P.	10 ^{-8,0}	"
92	C	30/9/64	E.B.P.	10 ^{-8,0}	"
93	--	30/9/64	E.N.B.	--	"
94	O	216	A.C.F.	10 ^{-7,80}	I.N.T.A.
95	O	213	A.C.F.	10 ^{-4,04}	"
96	O	214	A.C.F.	10 ^{-7,54}	"
97	A	223	A.C.F.	10 ^{-5,04}	"
98	A	224	A.C.F.	10 ^{-5,80}	"
99	A	225	A.C.F.	10 ^{-4,54}	"
100	A	226	A.C.F.	10 ^{-3,80}	"
101	A	227	A.C.F.	10 ^{-2,54}	"
102	A	237	A.C.F.	10 ^{-5,04}	"
103	A	236	A.C.F.	10 ^{-6,54}	"
104	C	234	A.C.F.	10 ^{-7,54}	"
105	C	235	A.C.F.	10 ^{-7,80}	"
106	O	232	A.C.F.	10 ^{-6,54}	"
107	O	233	A.C.F.	10 ^{-7,80}	"
108	O	254	A.C.F.	10 ^{-8,04}	"
109	O	255	A.C.F.	10 ^{-8,04}	"
110	O	260	A.C.F.	10 ^{-6,54}	"
111	O	250	A.C.F.	10 ^{-7,04}	"

112	A	258	A.C.F.	10 ⁻⁷ ,80	I.N.T.A.
113	A	259	A.C.F.	10 ⁻⁶ ,30	"
114	A	246	A.C.F.	10 ⁻⁶ ,80	"
115	A	247	A.C.F.	10 ⁻⁷ ,04	"
116	O	261	A.C.F.	10 ⁻⁷ ,54	"
117	A	262	A.C.F.	10 ⁻⁶ ,54	"
118	O	256	A.C.F.	10 ⁻⁷ ,54	"
119	A	257	A.C.F.	10 ⁻⁷ ,54	"
120	A	259	A.C.F.	10 ⁻⁶ ,30	"
121	O	268	A.C.F.	--	"
	O	269	A.C.F.	10 ⁻⁷ ,54	"
122	O	266	A.C.F.	10 ⁻⁶ ,80	"
123	O	270	A.C.F.	10 ⁻⁸ ,80	"
124	A	298	A.C.F.	10 ⁻⁶ ,04	"
125	A	302	A.C.F.	10 ⁻⁵ ,80	"
126	O	330	A.C.F.	10 ⁻⁷ ,80	"
127	O	3/7/63	B.H.K.(Cr)	10 ⁻⁷ ,80	"
128	A	28/8/63	B.H.K.(Cr)	10 ⁻⁶ ,48	"
129	C	17/8/63	B.H.K.(Cr)	10 ⁻⁸ ,0	"
130	C	8/8/63	B.H.K.(Cr)	--	"
131	O	18/4/64	B.H.K.(Bov.)	10 ⁻⁸ ,54	"
132	A	17/3/64	B.H.K.(Bov.)	10 ⁻⁶ ,54	"
133	C	13/3/64	B.H.K.(Bov.)	--	"
134	O	15/4/64	A.F.V.	10 ⁻⁸ ,54	"
135	A	21/4/64	A.F.V.	10 ⁻⁸ ,0	"

136	C	27/4/64	A.F.V.	7,73	I.N.T.A.
137	--	--	E.N.B.	--	"
138	O	17/4/64	E.C.P.	10 ^{-7,8}	Inst. Malbrán
139	A	23/4/64	E.C.P.	10 ^{-7,6}	"
140	C	29/4/64	E.C.P.	10 ^{-7,0}	"
141	O	10/6/64	A.L.B.	10 ^{-8,0}	(4)
142	A	10/6/64	A.L.B.	10 ^{-8,0}	(4)
143	C	24/6/64	A.L.B.	10 ^{-7,8}	(4)
144	C	1846	A.E.B.	10 ^{-7,63}	C.A.N.E.F.A

Referencias:

- (1) A.E.B. : antígeno de epitelio lingual de bovino.
E.N.B. : epitelio lingual normal de bovino.
R.L. : antígeno preparado a partir de ratón lactante inoculado con virus aftoso.
M.C. : muestra campo, corresponde a epitelio lingual de bovino infectado espontáneamente.
M.C.R.L.: muestra campo ratón lactante, corresponde a un pasaje por ratón de la muestra campo de epitelio lingual de bovino infectado.
A.C.F. : antígeno cultivo Frenkel, corresponde a la fase líquida del cultivo de tejido, agregada del sobrenadante por centrifugación de la extracción acuosa del tejido lingual.
E.C.P. : epitelio de cobayo, inoculado con virus patrón.
E.B.P. : epitelio lingual de bovino inoculado, usado como patrón, luego de haber sido tipificado (4 + , durante 30 min.) contra sueros hiperinmunes patrones.

B.H.K.(Cr) : antígeno cultivado en epitelio renal de Criceto dorado, corresponde a la fase líquida del cultivo de tejido, más el extracto sobrenadante del triturado del cultivo celular.

B.H.K.(Bov.): antígeno cultivado en epitelio renal de bovino, corresponde a la suspensión viral constituida por la fase líquida del cultivo de tejido, más el extracto sobrenadante del triturado del cultivo celular.

A.F.V. : antígeno de fluido vesicular de lesiones podales de cobayo inoculado con virus aftoso.

A.L.B. : antígeno de linfa de bovino.

- 2) Dosis letales límites 50 % (D.L. 50) de mortalidad en ratones lactantes; datos suministrados por I.N.T.A. y C.A.N.E.F.A.
- 3) En la preparación del antígeno se utilizó un "pool" de muestras.
- 4) Antígenos patrones de epitelio plantar de cobayos inoculados, de acuerdo a la técnica de Rottgardt y Charles, obtenidos por nosotros en el Instituto Malbrán.
- 5) Muestras adquiridas en laboratorios privados.

CUADRO N° 2

ANTISUEROS AFTOSOS DE COBAYOS HIPERINMUNIZADOS

Muestra N°	Antisuero Tipo	Título F.del C. (1)	Procedencia (2)
1	O	1:180	C.A.N.E.F.A.
2	O	1:180	C.A.N.E.F.A.
3	O	1:160	Instituto Malbrán
4	A	1:100	C.A.N.E.F.A.
5	A	1:80	Instituto Malbrán
6	C	1:160	C.A.N.E.F.A.
7	C	1:150	C.A.N.E.F.A.
8	C	1:180	Instituto Malbrán
9	O	1:100	I.N.T.A.
10	A	1:160	"
11	C	1:320	"
12	O	1:80	Instituto Malbrán
13	A	1:100	" "
14	C	1:160	" "
15	O	1:150	C.A.N.E.F.A.
16	A	1:160	"
17	C	1:160	"
18	O	1:100	I.N.T.A.
19	A	1:100	C.A.N.E.F.A.

20	C	1:150	I.N.T.A.
21	A	1:50	"
22	O	1:150	"
23	O	1:80	C.A.N.E.F.A.
24	C	1:200	C.A.N.E.F.A.
25	O	1:120	Instituto Malbrán
26	A	1:80	" "
27	C	1:150	" "
28	O	1:80	C.A.N.E.F.A.
29	A	1:90	"
30	C	1:250	"
31	O	1:80	"
32	A	1:90	"
33	C	1:250	"

Referencias:

(1) - Título de los sueros hiperinmunes obtenidos por la técnica de fijación del complemento (100 % H) tal como nos fueron remitidos por las Instituciones Oficiales: C.A.N.E.F.A. e I.N.T.A.

(2) C.A.N.E.F.A. : Comisión Asesora Nacional para la Erradicación de la Fiebre Aftosa.

I.N.T.A. : Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Instituto Malbrán: antisueros obtenidos y titulados en el Instituto Nacional de Microbiología, Carlos G. Malbrán.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Organización Panamericana de la Salud: Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis. Publicaciones Científicas N° 47, p.1-7,1959
- 2) Organización Mundial de la Salud: Normas para las sustancias biológicas, 6: Normas generales de esterilidad. Serie informes técnicos N° 200, Ginebra, 1960.-
- 3) Vanella, J.M. y colaboradores: Procedimientos y técnicas del laboratorio de virus, Instituto de Virología, Universidad Nacional de Córdoba, pg. 4, 1964.

6) Tipificación de los virus aftosos.

- 1) Diluir los sueros hiperinmunes "O", "A" y "C" en los títulos obtenidos en la prueba anteriormente descrita, calculando la cantidad necesaria para tipificar todos los antígenos.
- 2) Preparar diluciones de los antígenos 1:10 a partir de la dilución denominada "antígeno puro".
- 3) Preparar diluciones del complemento conteniendo 1 y 2 unidades $C'H_{50}$.
- 4) Colocar en gradillas para tubos de hemólisis, 2 filas de 5 y 4 tubos por cada antígeno a tipificar. Numerar los tubos de 1 a 8 e indicar N° del antígeno.
- 5) Colocar 0,40 ml. del antisuero "O" en los tubos N° 1 y N° 6, de antisuero "A" en los N° 2 y N° 7 y de antisuero "C" en los números 3 y 8.
- 6) Agregar a todos los tubos 0,40 ml. del antígeno en estudio.
- 7) En los tubos N° 4, 5 y 9 agregar 0,40 , 0,90 y 0,40 ml. de tampón de veronal respectivamente.
- 8) En los tubos del N° 1 al N° 4, adicionar 0,50 ml. de complemento con 1 unidad de $C'H_{50}$ y en los tubos del N° 6 al N° 9, 0,50 ml. de " $2C'H_{50}$ ".
- 9) Incorporar 3 tubos controles de antisuero:
 - Tubo N° 10 : 0,40 ml. antisuero "O" + 0,40 ml. tampón veronal + 0,50 ml. de complemento ($2C'H_{50}$).
 - tubo N° 11 : 0,40 ml. antisuero "A" + 0,40 ml. tampón veronal + 0,50 ml. complemento ($2C'H_{50}$)
 - Tubo N° 12 : 0,40 ml. antisuero "C" + 0,40 ml. tampón veronal + 0,50 ml. complemento ($2C'H_{50}$)
- 10) Agitar los tubos y dejar 20 horas a 4°C en heladera.
- 11) Agregar a todos los tubos 0,50 ml. de sistema hemolítico, agitar e incubar 60 minutos a 37°C.
- 12) En los tubos controles de antígeno, N° 4 y N° 9, debe haber hemólisis 50%; en el N° 5 debe haber fijación completa pues no lleva complemento.
- 13) Los tubos N° 10, 11 y 12 , controles de sueros hiperinmunes, deben presentar hemólisis 50%.
- 14) El tipo del virus está determinado por una fijación completa (4+) con un tipo de antisuero (antisuero homólogo) y hemólisis con los otros antisueros (antisueros heterólogos).
- 15) Las lecturas se realizan en el fotocolorímetro, como en los casos anteriores.
- 16) Anotar los resultados en el protocolo.

17) El esquema siguiente detalla el desarrollo de la prueba:

Tubo Nº	Antisuero	Antígeno 1:10	Tampón veronal	Complemento 1C'H ₅₀	Sistema hemolítico
1	0,40 "O"	0,40	---	0,50	0,50
2	0,40 "A"	0,40	---	0,50	0,50
3	0,40 "C"	0,40	---	0,50	0,50
4)	---	0,40	0,40	0,50	0,50
5	---	0,40	0,90	---	0,50
				2 C'H ₅₀	
6)	0,40 "O"	0,40	---	0,50	0,50
7)	0,40 "A"	0,40	---	0,50	0,50
8	0,40 "C"	0,40	---	0,50	0,50
9	---	0,40	0,40	0,50	0,50
10	0,40 "O"	---	0,40	0,50	0,50
11	0,40 "A"	---	0,40	0,50	0,50
12	0,40 "C"	---	0,40	0,50	0,50

7) Resultados:

La técnica de fijación del complemento aplicada a la tipificación de los virus aftosos, se realizó de acuerdo a los métodos siguientes:

- 1) Fijación del complemento tomando como punto final de lectura el 100 % de hemólisis.
 - 2) Fijación del complemento tomando como punto final de lectura el 50 % de hemólisis.
- 1) Para efectuar la tipificación debimos, previamente, titular los sueros hiperinmunes de acuerdo a la pauta de trabajo descripta en Método en este mismo capítulo.

Los títulos de los antisueros, en la técnica del 100 % de hemólisis, varían entre 1:50 y 1:320, como se puede observar en el cuadro de valores Nº 3 donde figura el total de los sueros titulados.

En la tipificación de las muestras virales, se estudiaron 135 antígenos (Cuadro Nº 4) a los que se les determinó el tipo, obteniéndose 98 % de reacciones positivas para los antígenos de epitelio y 75 % de positividad para los virus de cultivo.

Sobre el total de muestras examinadas la positividad fué del 91 %. Gráfica Nº 3 .

Si se expresa la positividad de las reacciones en función del título del virus (D.I.₅₀), se observa que, para el virus O, títulos menores de $10^{-7,0}$ dan 75 % de reacciones positivas, descendiendo al 65 % para títulos entre $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$. Títulos entre $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$ dan 100 % de positividad.

Para el virus A la reacción muestra el siguiente gradiente: títulos menores que $10^{-7,0}$, 63 % de reacciones positivas; títulos de $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$, 86 %; títulos de $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$, 100 % de reacciones positivas y finalmente, para el virus C, la positividad es del 100 % para los títulos comprendidos entre $10^{-2,5}$ y $10^{-8,5}$. Ver Gráfica Nº 4 .

Los valores encontrados no permiten establecer que exista una relación directa entre el título infectante (D.I.₅₀) y el título fijador del complemento, lo que se explicaría si se tiene en cuenta que el virus de la fiebre aftosa está formado por dos partículas de distintas características fisicoquímicas y antigénicas.

La más pequeña posee del 50-100 % de la actividad fijadora del complemento y la mayor entre el 90-98 % de la capacidad infectiva, pero, la estabilidad de ambas es diferente lo que hace variar, dentro de límites muy

amplios la proporción en que se encuentran una con respecto de la otra. Condiciones y líneas de trabajo que escapan a la índole de nuestra investigación, resolverían este problema. Para determinar la sensibilidad de nuestra técnica, tomamos un grupo de virus patrones y efectuamos con ellos la prueba de fijación del complemento en forma cuantitativa para determinar las máximas diluciones de los virus y de los antisueros que dan reacción positiva 4 + . El cuadro N° 5 muestra el desarrollo de la prueba.

CUADRO N° 5

Antígeno "O" N° 90	Diluciones del suero hiperinmune "O" N° 3					C.A
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
1:5	4 +	4 +	4 +	4 +	2 +	-
1:10	3 +	3 +	2 +	2 +	1 +	-
1:20	2 +	2 +	2 +	1 +	-	-
1:40	1 +	±	-	-	-	-
Antígeno "A" N° 91						
1:5	-	-	-	-	-	-
1:10	-	-	-	-	-	-
Antígeno "C" N° 92						
1:5	-	-	-	-	-	-
1:10	-	-	-	-	-	-

A continuación se transcriben los resultados obtenidos con los otros antígenos y antisueros patrones:

Suero "O", N°9 - 1:100	Antígeno "O", N°138 - 1:10
Suero "O", N°25 - 1:150	Antígeno "O", N°32 - 1:10
Suero "A", N° 4 - 1:100	Antígeno "A", N° 91 - 1:5
Suero "A", N°16 - 1:180	Antígeno "A", N° 139 - 1:10
Suero "A", N°26 - 1:80	Antígeno "A", N°33 - 1:5
Suero "C", N°11 - 1:400	Antígeno "C", N°92 - 1:20
Suero "C", N°17 - 1:160	Antígeno "C", N°140 - 1:10
Suero "C", N°27 - 1:160	Antígeno, N°34, "C" - 1:10

Estos antisueros y antígenos se titularon también por la técnica de 50 % de hemólisis. Los resultados y la comparación de los dos métodos, respecto a su sensibilidad, se incluyen en "Resultados de la fijación del complemento 50% H.

2) En la prueba de fijación del complemento con lectura fotocolorimétrica del 50% de hemólisis, la titulación de los antisueros se realizó siguiendo la técnica descripta en Método.

En total fueron titulados 22 sueros hiperinmunes con títulos que varían entre 1:400 y 1:3200 (Cuadro N° 3).

En la tipificación de los antígenos, de los que se estudiaron 135 muestras (Ver Cuadro N° 4), se encontró 95 % de positividad para los virus de epitelio y 79% para los de cultivo. Sobre el total de los antígenos examinados, la positividad fué del 92 % .- Para determinar la sensibilidad de esta técnica, tomamos un grupo de sueros hiperinmunes y de virus patrones y efectuamos la prueba de fijación del complemento 50% H., en forma cuantitativa, con el objeto de obtener las mayores diluciones de antígenos y antisueros que dan fijación completa 4 + .- El Cuadro N° 8 muestra el desarrollo de la prueba.

CUADRO N° 8

Antígeno "O" N° 90	Diluciones del suero hiperinmune "O" N° 15						
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	C.A.
1:10	4 +	4 +	4 +	3 +	1 +	-	-
1:20	4 +	4 +	2 +	-	-	-	-
1:40	4 +	4 +	2 +	1 +	-	-	-
1:80	4 +	4 +	2 +	-	-	-	-
1:160	-	-	-	-	-	-	-
1:320	-	-	-	-	-	-	-
C.S	-	-	-	-	-	-	-
Antígeno "A" N° 91							
1:20	+	±	-	-	-	-	-
1:40	-	-	-	-	-	-	-
1:80	-	-	-	-	-	-	-
Antígeno "C" N° 92							
1:20	+	+	-	-	-	-	-
1:40	+	-	-	-	-	-	-
1:80	-	-	-	-	-	-	-

A continuación se transcriben los resultados obtenidos con los otros antígenos y antisueros tipos:

Suero "O", Nº 3 -	1:1000	Antígeno "O", Nº 138 -	1:80
Suero "O", Nº 25 -	1:1000	Antígeno "O", Nº 32 -	1:80
Suero "A", Nº 10 -	1:1600	Antígeno "A", Nº 91 -	1:40
Suero "A", Nº 32 -	1:400	Antígeno "A", Nº 139 -	1:40
Suero "A", Nº 16 -	1:800	Antígeno "A", Nº 33 -	1:80
Suero "C", Nº 11 -	1:3200	Antígeno "C", Nº 92 -	1:160
Suero "C", Nº 14 -	1:1000	Antígeno "C", Nº 140 -	1:80
Suero "C", Nº 27 -	1:800	Antígeno "C", Nº 34 -	1:40

Comparación de la sensibilidad del método de 100% y del 50% de hemólisis en la titulación de los sueros hiperinmunes y los antígenos patrones.

Suero	Técnica 100%	Técnica 50%	Virus	Técnica 100 %	Técnica 50 %
O	1:160	1:800	O	1:5	1:80
O	1:100	1:1000	O	1:10	1:80
O	1:150	1:1000	O	1:10	1:40
A	1:100	1:1600	A	1:5	1:40
A	1:180	1:400	A	1:10	1:80
A	1:80	1:800	A	1:5	1:80
C	1:400	1:3200	C	1:20	1:160
C	1:160	1:1000	C	1:10	1:80
C	1:160	1:800	C	1:10	1:40

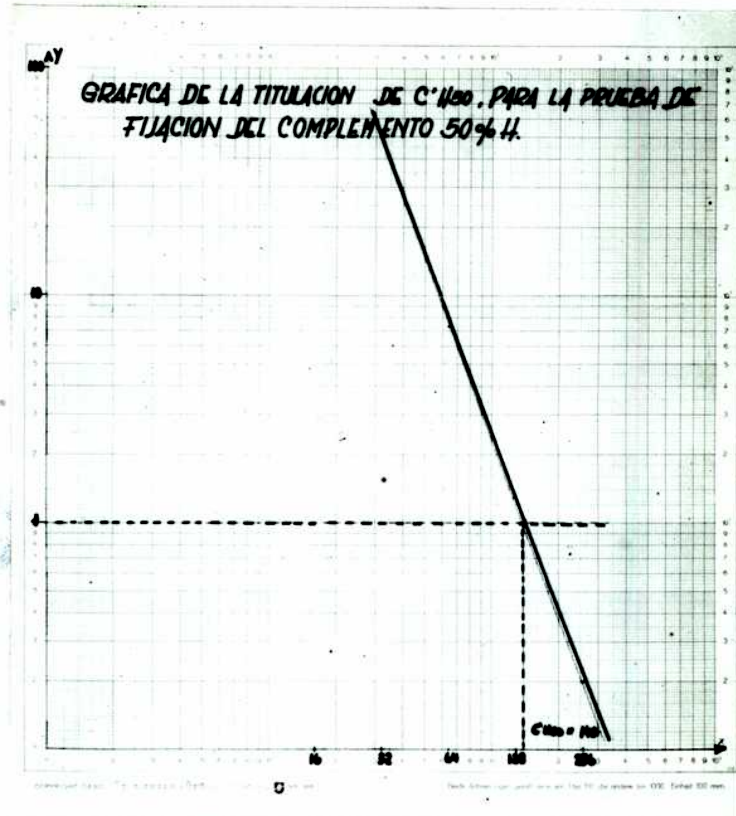
Por otra parte si expresamos la positividad de las 135 muestra tipificadas en función del título ($D.I. 50$) de las mismas, observamos que el virus "O" a títulos inferiores de $10^{-7,0}$ da 75 % de reacciones positivas; de $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$, 100 % ; para títulos de $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$, 93 % y para títulos mayores que $10^{-8,0}$, 100 % de positividad.

Para el virus "A" los resultados fueron: título menor que $10^{-7,0}$, 81 % de positivos; de $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$, 91 % ; de $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$, 100 % y para títulos mayores que $10^{-8,0}$, 100 % de positividad.-

Los resultados para el virus "C" dieron : títulos de $10^{-7,0}$ a $10^{-8,0}$, 100 % de positividad y, finalmente para títulos mayores de $10^{-8,0}$, todas las reacciones fueron positivas.- Gráfica Nº 6.-

La prueba de fijación del complemento, 100 % de hemólisis, fué tomada como prototipo, para correlacionar los valores obtenidos en las diferentes técnicas usadas en este trabajo. Los resultados finales muestran los cuadros comparativos.-

GRAFICA Nº1

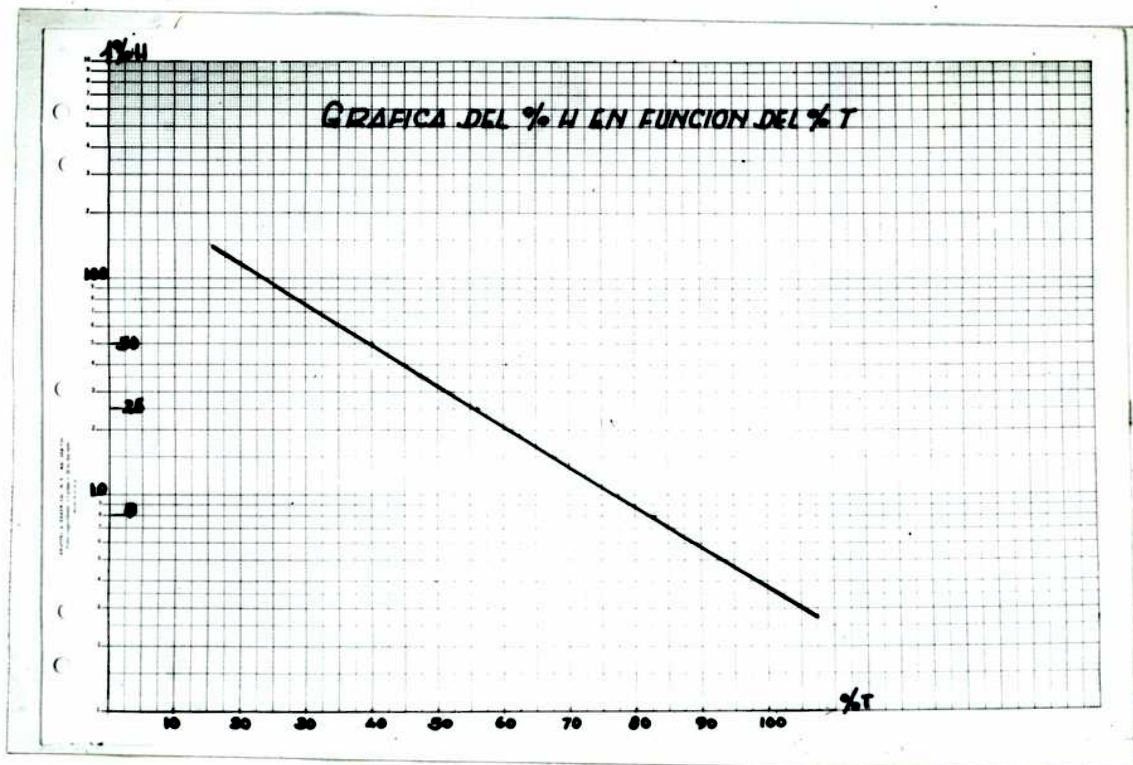


Referencias:

x: recíproca de la concentración de suero de cobayo.

$$y = \frac{\% \text{ hemólisis observada}}{100 - \% \text{ hem. observada}}$$

GRAFICA Nº2



Referencias:

x: % de transmisión.

y: % de hemólisis.

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, de EPITELIO y de CULTIVO, POR LA PRUEBA de FIJACION DEL COMPLEMENTO, 100% H.

CLASE DE VIRUS	VIRUS DE EPITELIO	VIRUS DE CULTIVO	VIRUS de EPITELIO + VIRUS de CULTIVO
VIRUS TIPO "O"			
VIRUS TIPO "A"			
VIRUS TIPO "C"			

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, EN FUNCION DEL TITULO DEL VIRUS, EN LA PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO, 100% H.

TITULO DE VIRUS	TITULO DEL VIRUS				
	MENOR de $10^{-7.0}$	de $10^{-7.0}$ a $10^{-7.6}$	de $10^{-7.7}$ a $10^{-7.8}$	MAYOR de $10^{-8.0}$	de $10^{-2.3}$ a 10^{-8}
VIRUS TIPO "O"					
VIRUS TIPO "A"					
VIRUS TIPO "C"	(2)			(2)	

Referencias:

- (1) + sector proporcional al % de positividad.
- sector proporcional al % de reacciones negativas.
- (2) Para el virus "C" no se tipificaron muestras con esos títulos.

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, DE EPITELIO y DE CULTIVO, POR LA PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO, 50% H.

CLASE DE VIRUS	VIRUS DE EPITELIO	VIRUS DE CULTIVO	VIRUS de EPITELIO + VIRUS de CULTIVO
VIRUS TIPO "O"			
VIRUS TIPO "A"			
VIRUS TIPO "C"			

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, EN FUNCION DEL TITULO DEL VIRUS, EN LA PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO, 50% H.

TIPO DE VIRUS	TITULO DEL VIRUS (1)				
	MENOR de $10^{-7.0}$	de $10^{-7.0}$ a $10^{-7.6}$	$10^{-7.7}$ a $10^{-8.0}$	MAYOR $10^{-8.0}$	de 10^{-25} a 10^{-25}
VIRUS TIPO "O"					
VIRUS TIPO "A"					
VIRUS TIPO "C"	(2)			(2)	

Referencias:

- (1) + sector proporcional al % de positividad.
- sector proporcional al % de reacciones negativas.
- (2) Para el virus "C" no se tipificaron muestras con esos títulos.

CUADRO Nº 3

ANTISUEROS AFITOSOS DE COBAYOS HIPERINMUNIZADOS, TITULADOS POR LA TECNICA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO: LECTURA 100% DE HEMOLISIS Y 50% DE HEMOLISIS.

Muestra Nº	Antisuero tipo	Título 100% H.(1)	Título 50% H.(1)
1	O	1:180	1:1200
2	O	1:160	-- (2)
3	O	1:160	1:1000
4	A	1:100	--
5	A	1:80	1:400
<u>6</u>	C	1:160	1:1000
7	C	1:160	1:1000
8	C	1:180	1:1000
9	O	1:80	--
10	A	1:160	1:800
11	C	1:320	1:3200
12	O	1:80	1:400
13	A	1:100	1:500
14	C	1:160	1:1000
15	O	1:150	1:800
16	A	1:120	1:500
17	C	1:160	--
18	O	1:80	--
19	A	1:100	1:500
20	C	1:160	1:1000
21	A	1:50	1:300
22	O	1:120	1:800
23	O	1:180	--
24	C	1:200	1:1600
25	O	1:120	1:800
26	A	1:80	--
27	C	1:150	1:800
28	O	1:80	1:400
29	A	1:80	--

30	C	1:250	1:2400
31	O	1:80	--
32	A	1:90	1:400
33	C	1:250	--

Referencias:

(1) Se denomina título del antisuero, la mayor dilución del mismo que da fijación completa(4+) frente al antígeno homólogo.

(2) Los antisueros consignados(--) corresponden a partidas no tituladas por este método.

CUADRO Nº 4

TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO POR LAS PRUEBAS DE FIJACION DEL COMPLEMENTO/.

Muestra Nº	Virus tipo	Resultados	
		100 % H	50 % H
1	O	O 4+	O 4+
2	A	A 4+	A 4+
3	C	C 4+	C 4+
4	O	O 2+	O 3+
5	A	A 4+	A 4+
6	A	A 1+	A 2+
7	A	A 4+	A 4+
8	C	C 4+	C 4+
9	A	A 4+	A 4+
10	O	O 3+	O 4+
11	A	A 4+	A 3+
12	O	O 4+	O 4+
13	A	A 4+	A 4+
14	A	A 4+	A 4+
15	C	C 4+	C 4+
16	O	O 4+	O 4+
17	O	O 3+	O 2+
18	C	C 4+	C 4+
19	A	A 4+	A 4+
20	A	neg.	A 2+
21	O	O 4+	O 4+
22	C	C 4+	C 4+
23	O	O 4+	O 4+
24	A	A 4+	A 4+
25	C	C 4+	C 4+
26	O	O 2+	O 4+
27	C	C 4+	C 4+
28	O	O 4+	O 4+
29	O	O 4+	O 4+
30	O	O 4+	O 4+
31	C	C 4+	C 4+
32	O	O 4+	O 4+

33	A	A 4+	A 4+
34	C	C 4+	C 4+
35	O	O 2+	O 3+
36	A	A 4+	A 4+
37	O	O 4+	O 4+
38	A	A 4+	A 4+
39	C	C 4+	C 4+
40	A	A 4+	A 4+
41	C	C 4+	C 4+
42	A	neg.	neg.
43	O	O 4+	O 4+
44	A	A 4+	A 4+
45	O	O 4+	O 4+
46	A	A 4+	A 4+
47	C	C 4+	C 4+
48	C	C 2+	C 4+
49	A	A 4+	A 4+
50	A	A 4+	A 4+
51	A	A 3+	A 4+
52	--	--	--
53	O	O 4+	O 2+
54	O	O 4+	O 4+
55	A	A 1+	A 4+
56	C	C 4+	C 4+
57	C	C 4+	C 4+
58	O	O 4+	O 4+
59	O	O 4+	O 4+
60	C	C 2+	C 3+
61	C	C 4+	C 4+
62	O	O 4+	O 4+
63	C	C 4+	C 4+
64	O	O 4+	O 4+
65	O	O 4+	O 4+
66	A	A 4+	A 4+
67	C	C 4+	C 4+
68	O	O 2+	O 4+
69	C	C 4+	C 4+
70	C	C 4+	C 2+

71	A	A 4†	A 4†
72	C	C 1†	C 2†
73	O	O 3†	O 2†
74	O	O 4†	O 4†
75	O	O 2†	O 2†
76	A	A 1†	A 2†
77	O	O 4†	O 4†
78	C	C 4†	C 4†
79	O	O 2†	O 2†
80	O	O 3†	O 4†
81	C	C 3†	C 4†
82	O	O 4†	O 4†
83	A	A 4†	A 4†
84	A	A 4†	A 4†
85	O	O 4†	O 4†
86	C	C 4†	C 4†
87	O	O 4†	O 4†
88	A	A 1†	A 2†
89	C	C 4†	C 4†
90	O	O 4†	O 4†
91	A	A 4†	A 4†
92	C	C 4†	C 4†
93	--	--	--
94	O	O 3†	O 3†
95	O	neg.	neg.
96	O	O 1†	O 2†
97	A	neg.	neg.
98	A	A <u>1</u>	A 1†
99	A	neg.	A 1†
100	A	neg.	neg.
101	A	neg.	neg.
102	A	neg.	neg.
103	A	A <u>1</u>	A 1†
104	C	C 2†	C 2†
105	C	C 3†	C 3†
106	O	O 3†	O 3†
107	O	O 2†	O 2†
108	O	O 1†	O 3†
109	O	O 4†	O 4†

110	O	O 1+	O 1+
111	O	O 1+	O 1+
112	A	A 2+	A 2+
113	A	A 1+	A 2+
114	A	A 1+	A 2+
115	A	A 1+	A 2+
116	O	neg.	O 1+
117	A	A 2+	A 2+
118	O	O 4+	O 4+
119	A	A 2+	A 2+
120	A	A 2+	A 2+
121	O	O 3+	O 3+
122	O	O 3+	O 3+
123	O	O 2+	O 2+
124	A	A 2+	A 2+
125	A	A 1+	A 2+
126	O	neg.	O 1+
127	O	neg.	neg.
128	A	A 1+	A 1+
129	C	C 2+	C 2+
130	C	neg.	neg.
131	O	O 4+	O 4+
132	A	A 2+	A 2+
133	C	C 3+	C 3+
134	O	--	--
135	A	--	--
136	C	--	--
137	--	--	--
138	O	O 4+	O 4+
139	A	A 4+	A 4+
140	C	C 4+	C 4+
141	O	--	--
142	A	--	--
143	C	--	--
144	C	C 3+	C 4+

Referencias:

Las muestras indicadas con (--) corresponden a epitelio normal, a fluido vesicular y a antígenos que, por no alcanzar el material, no se pudieron tipificar.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Pfeiffer, R. and Issaef; citado por Smith, D.T. and Conant, N.F.:
Microbiology, second edition, Appleton-Cen-
tury-Crofts, Inc., New York. p.165,1960.-
- 2) Bordet, J.: Ann. Inst. Pasteur, 12: 688, 1898.-
- 3) Bordet, J.: Ann. Inst. Pasteur, 13: 220, 1899.-
- 4) Ehrlich, P.: Studies in Immunity, John Wiley & Sons, Inc., New York,
1910.-
- 5) Ecker, E.E., Pillemer, L., Jones, C.B. and Seifter, S.: J.Biol.Chem.,
135:347, 1940.-
- 6) Pillemer, L.: Chem. Revs., 33: 1-26, 1943.
- 7) Pillemer, L., Blum, L. Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W. and Wardlaw,
A.C. : Science, 120-279, 1954.
- 8) Mayer, M.M., Osler, A.G., Bier, O.G. and Heilderberger, M.: J.Exp.Med.,
84: 535, 1946.-
- 9) Kent, J.F. et al. : J. Immunol., 53:37, 1946.-
- 10) Bordet, J. et Gengou, O.: Ann. Inst. Pasteur, 15: 129, 289, 1901.-
- 11) Wassermann, A., Neisser, A. and Bruck, C.: Deutsche Med. Wochnschr.,
32: 745, 1906 (traducida Ins-
tituto Malbrán).
- 12) Enders, J.F., and Cohen, S.: Proc. Soc. Exp. Biol.Med.: 50: 180,1942.-
- 13)Friedewald, W.F.: J. Exp. Med., 78: 347, 1943.-
- 14)Havens, W.P., Jr., Watson, D.W., Green, R.H., Lavin, G.I ., J.Exp.Med.
77:139, 1943.-
- 15) Casals, J. and Palacios, R., J. Exp.Med., 74: 409, 1941.-
- 16) Sosa Martinez, J. and Lennette, E.H., J. Bact., 70: 205, 1955.
- 17) Karrer, H., Meyer, K.F. and Eddie, B., J. Infet. Dis., 87: 13,1950.-

- 18) Lepine, P. et Sohier, R.: Techniques de Laboratoire Appliquées au Diagnostic des Maladies a Virus, Ed. Masson et Cie., Paris, 1954.-
- 19) Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases, Edition, Am. Pub. H. Ass., N.Y.C., U.S.A., 1956.-
- 20) Cox, H.R.: Am. J. Pub. Health, 38: 351, 1948.-
- 21) Wordsworth, A., Maltaner, F. and Maltaner, E.: J. Immunology, 35: 217, 1938.
- 22) Kabat, E.A. and Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry, Second Edition, Charles C. Thomas Springfield-Illinois, U.S.A. p. 133, 1961.-
- 23) von Krogh, M.: J. Infec. Dis., 19: 452, 1916.
- 24) Vanella, J.M. y colaboradores: Procedimientos y técnicas del laboratorio de virus. Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Córdoba, 1964.-
- 25) Oliveira de Almeida, J.O.: Hospital, 37: 847, 1950.
- 26) Communicable Disease Center-Virus and Rickettsia Section Manual for Course 8.20. Laboratory Methods in the Diagnosis of Viral and Rickettial Diseases 1958, Atlanta Ga., U.S.A., 1958.-
- 27) Rake, G. : Viral and Rickettsial Infections of man. Second Edition, Edited by T.M. Rivers, Philadelphia: J.B. Lippincott, Co. 1952.-
- 28) Waldmann, O. and Pape, citado por Levaditi, C., Lepine, P. et Verge, J.: Les Ultravirus des Maladies Animales. Librairie Maloine, Paris. p. 281, 1948.-
- 29) Vallée, H. et Carré, H. : C.R. Acad. Sci., 174: 207, 1922.
- 30) Mezinescu, O. , Baroni, V. et Calenescu, J. : Ann. Inst. Pasteur, 37: 1057, 1923.

- 31) Stockman, S. and Minett, F.: J. of Compar. Path. and Therap, 39: 231, 1926.
- 32) Minett, F.: J. of Compar. Path. and Therap., 40: 173, 1927.-
- 33) Olitsky, P.K., Traum, J. and Schoening, H.W. : Report of the Foot-and Mouth Disease Commission of the U.S. Department of Agriculture Tech. Bull N° 76, p. 93, 1928.
- 34) Ciuca, A.: J. of Hyg. , 28: 325, 1929.
- 35) Brooksby, J.B.: Agricultural Research Council, Rep.Ser., N° 9, London, 1949.-
- 36) Brooksby, J.B., Galloway, I.A. and Henderson, W.M.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 69: 74, 1948.
- 37) Camargo, F., Eichhorn, E.A., Levine, J.M. and Giron, A.T.: Proceedings Book; Am. Vet.Med. Assoc., 87th Annual Meeting, p.207, 1950.-
- 38) Aramburu, H.G.: Rev. Med. Vet. 29:793, 1947.
- 39) Rottgardt, A. y Charles, E.G. : Rev. Med. Vet. y Paras. 9 (1-4): 29, 1950.
- 40) Osler, A.G., Strauss, J.H. and Mayer, M.M. : Am. J.Syph. Gon.Ven.Dis. 36(2), 140, 1952.
- 41) Stein G.J. and Ngu Dang: J. Immunol. 65: 17, 1950
- 42) Marucci, A.A.: Am. J. Vet. Res., 18: 785, 1957.
- 43) Smith, D. and Heining, A.: Arch. für Exp. Vet., 14: 452, 1960 (Traducido por el Servicio Argentino de Información Bibliográfica).

- 44) Rivenson, S. y Costantini, H.L.V.: Revista de investigaciones ganaderas N° 11 p. 7, 1961.-
- 45) Margni, R.: Las reacciones de fijación de complemento para sífilis con lectura de 50 y 100 % de hemólisis, en prensa. (Comunicación personal).
- 46) Kolmer, J.A. : Diagnóstico clínico por los análisis de laboratorio, Editorial Interamericana, S.A., Méjico, II tomo, p. 1066, 1954.
- 47) Frenkel, H.S.: Am. J. Vet. Res., 11: 371, 1950.
- 48) Rivenson, S. y Segura, M. : Revista de Investigaciones Ganaderas R.I. G., N° 18, 1963.

FIJACION DEL COMPLEMENTO

En 1894, PFEIFFER (1) comunica que el suero de cobayos sobrevivientes a la inoculación experimental, con una suspensión de *Microspira comma*, contenía una sustancia capaz de lisar el vibrión colérico, demostrando el carácter inmunológico del fenómeno.

Cuatro años más tarde, BORDET (2) prueba que cuando se inoculan eritrocitos de conejo a un cobayo, el suero de este último es capaz de hemolizar específicamente los glóbulos rojos de conejo. Ambas experiencias, ocurrían en presencia de complemento y pusieron de manifiesto, la capacidad que tiene un anticuerpo (bacteriolisina o hemolisina) de reaccionar en forma específica, con el antígeno que le dió origen.

Experiencias posteriores de BORDET y de EHRLICH (3) demuestran que la hemólisis se produce, por la acción conjunta de tres sustancias:

- 1) Glóbulos rojos de una especie animal fijada.
- 2) Suero hemolítico, inactivado, anti-glóbulos rojos de la especie elegida.
- 3) Suero normal de cobayo, fresco (complemento).

La hemolisina o amboceptor es un anticuerpo específico, termoestable, provocado por la inyección del antígeno y capaz de combinarse con él.

El complemento o alexina (del griego, sustancia protectora), es un grupo de proteínas séricas ligado a las globulinas (5), del que se han podido identificar cuatro fracciones: C'1, C'2, C'3 y C'4.

La fracción C'1 es una globulina, termolábil a 55° C.; C'2, una glucoproteína, termolábil a 55° C.; C'3, un fosfolípido, termoestable a 55° C. que pierde su estabilidad por calentamiento a 66° C., durante 30 minutos y C'4, una glucoproteína levógira relacionada con el ion calcio

y termoestable a 55° C. Para que la hemólisis se produzca, se requieren los cuatro componentes.

Recientemente PILLEMER (6,7) ha descubierto un nuevo componente proteico, inespecífico, del suero humano normal, esencial para la bacteriolisis y la hemólisis de los glóbulos rojos, al que denominó properdina y cuya intervención en los sistemas antigénicos, es aún objeto de estudio.

Los trabajos de MAYER (8) y KENT (9), demuestran que el Mg^{++} y otros iones divalentes como el Ca^{++} , Ni^{++} y Co^{++} , son esenciales para la acción hemolítica del complemento.

El fenómeno de la hemólisis es un magnífico indicador para poner en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo, siempre que se establezcan, de una manera unívoca, las condiciones de trabajo y se definan la unidad de complemento y la unidad hemolítica usadas en el sistema.

Son BORDET y GENGOU (10) los primeros en intuir el mecanismo de esta reacción y aplicarlo, en el transcurso de una controversia con EHRLICH y MORGENROTH, acerca de la unidad o multiplicidad del complemento en los sueros normales, al sistema Pasteurella pestis-suero equino anti-pestis.

WASSERMANN, NEISSER y BRUCK (11) comprenden la transcendental importancia del método y lo aplican al diagnóstico de la sífilis. A partir de este momento, se convierte en la técnica más empleada en los estudios inmunológicos (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

El método se puede dividir, en dos partes principales:

- 1) Se ponen en contacto el antígeno, el anticuerpo y el complemento. Si el anticuerpo y el antígeno son específicos, se combinan y el complejo antígeno-anticuerpo, es capaz de unirse al complemento (fijación del complemento). Si el antígeno y el anticuerpo no son específicos o si falta uno de ellos, no se produce el complejo antígeno-anticuerpo

y el complemento queda en libertad (no ocurre fijación de complemento).

- 2) La reacción de fijación de complemento, necesita un sistema accesorio que indique si la reacción se ha producido o no. El sistema empleado, es el sistema hemolítico (glóbulos rojos + hemolisina) que revela la presencia de complemento libre, hemolizándose totalmente (reacción de fijación de complemento negativa), o en forma parcial (reacciones positivas intermedias) o que permanece inalterado, sin mostrar hemólisis (reacción de fijación de complemento positiva) si no hubiera complemento libre.

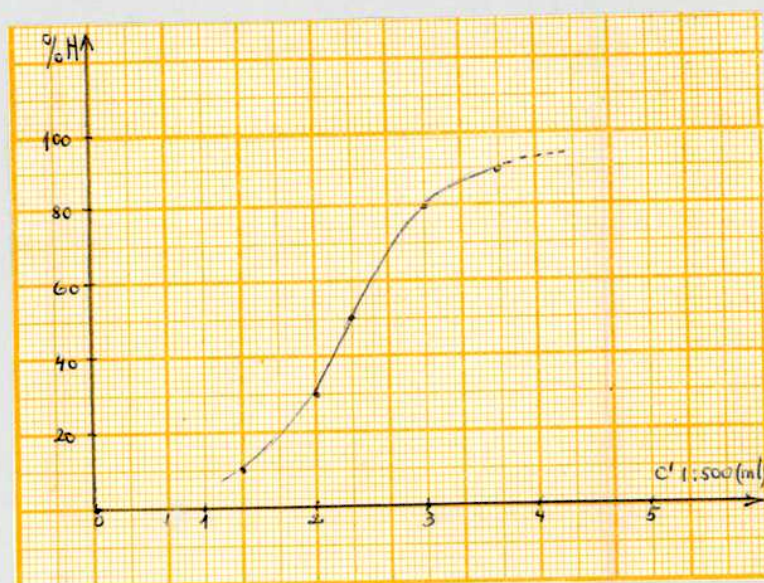
En las pruebas de tipificación de virus aftoso, se emplearon dos técnicas: la del 100 % de hemólisis y la del 50 % de hemólisis, que difieren sólo en la forma en que se evalúa el punto final de la hemólisis.

Originariamente, la unidad hemolítica del complemento, se expresaba como la menor cantidad del mismo que producía la lisis total (C'H100) de los glóbulos rojos sensibilizados.

Los trabajos de WODSWORTH y MALTANER y colaboradores (21) demostraron la ventaja de expresar, como unidad de complemento, la cantidad que lisa exactamente el 50 % de los glóbulos rojos sensibilizados.

Observando el gráfico que tabula los porcentajes de hemólisis en función de las cantidades de complemento usado, señalaron que la proporción de células lisadas no responde a una función lineal sino a una curva sigmoidal. La forma de esta curva evidencia que el 100 % de hemólisis, como punto final de la reacción es solo una expresión aproximada del fenómeno, puesto que, se necesitan grandes cantidades de complemento para lisar los últimos 5-10 % de glóbulos rojos, En la parte media de la curva, el grado de lisis es más sensible, a los pequeños aumentos

del complemento, como lo muestra el gráfico siguiente:



Se llega a una más precisa titulación de la actividad del complemento, fijando como unidad hemolítica ($C'H_{50}$) la cantidad del mismo que lisa exactamente un 50 % de los glóbulos rojos sensibilizados. Esta unidad, como lo hacen notar KABAT y MAYER (22) es "completamente arbitraria puesto que sus magnitudes dependen de la concentración de glóbulos rojos, de la fragilidad de los mismos, de la cantidad de anticuerpo usado en la sensibilización, de la fuerza iónica del sistema, de la concentración de los iones Ca y Mg, del pH, del tiempo de reacción y de la temperatura".

La ecuación de von KROGH (23), denominada función de crecimiento o función logística, pronostica matemáticamente con buena aproximación, los datos experimentales. En esta expresión:

$$x = K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{\frac{1}{n}}$$

x, representará la cantidad de complemento diluido, en ml.; y, el grado de

lisis; K, la unidad de complemento 50 % H y n, una constante paramétrica que depende de las condiciones de trabajo.

La técnica de fijación de complemento, con cualquiera de sus innumerables variantes, tendientes a dar mayor sensibilidad al método, ha permitido (24):

- 1) Tipificar un virus situándolo dentro de un determinado grupo inmunológico (25, 26).
- 2) Investigar en las encuestas serológicas, los anticuerpos para un agente o grupo de agentes en una población determinada (27).

La técnica de fijación del complemento aplicada a la tipificación del virus aftoso.

1) Introducción

Hasta el año 1922, no se conoció ningún procedimiento satisfactorio para el diagnóstico serológico de la fiebre aftosa. Recién cuando WALDMAN, N. y PAPE (28) demuestran la receptividad del cobayo al agente infeccioso, pueden VALLEE y CARRE (29) probar la pluralidad de los virus de la glosopeda y estudiar los métodos de inmunización activa y pasiva: se inicia así, la investigación sistemática de la respuesta del sistema inmunitario a la infección.

Los resultados dispares logrados al intentar aplicar el método de fijación del complemento a la tipificación del virus aftoso (30, 31 y 32), llevan al gobierno de EE.UU. a designar una Comisión, dependiente del Departamento Nacional de Agricultura e integrada por LATSLEY, OLITSKY, TRAUM y SCHOENING, para estudiar la técnica mencionada como método diagnóstico de la fiebre aftosa. En su informe afirman no haber logrado poner de manifiesto ningún anticuerpo específico en el suero de los animales de experiencia (cobayos, cerdos y ovejas), demostrando solamente la presencia de anticuerpos sensibilizantes (33).

Un año después CIUCA (34) encuentra las condiciones precisas en que se debe realizar la prueba y demuestra:

- 1) La existencia de anticuerpos fijadores del complemento en el suero de los cobayos convalescientes, entre el 7° y 15° día subsiguiente a la inoculación.
- 2) Que los anticuerpos son estrictamente específicos para los tipos de virus O, A y C, y que no existen en el suero de los cobayos normales.

Distintos investigadores (35,36,37,38 y 39) comunican modificaciones técnicas al método original, tendientes a lograr una mayor sensibilidad y una estandarización de las condiciones de trabajo que aseguren la reproducibilidad de las pruebas.

Posteriormente WADSWORTH, MALTANER y MALTANER (21) OSLER,

STRAUSS y MAYER (40), V. STEIN y VAN NGU (41), describen métodos de técnica más rigurosa para la fijación del complemento, los que tienen de común el empleo del complemento estandarizado en unidades hemolíticas 50% ($C'_{50} H$). Estos procedimientos exigen la lectura espectrofotométrica o fotocolorimétrica y una escrupulosa pauta de trabajo lo que limita su aplicación a planes investigativos.

MARUCCI (42), SMITH y HEINING (43) aplican estos procedimientos a la tipificación y titulación de los virus y anticuerpos aftosos, logrando una mayor sensibilidad que la obtenida por el método clásico (44).

En nuestro trabajo usamos dos técnicas para la fijación de complemento:

- 1) Tomando como punto final de la reacción el 100% de hemólisis y definiendo el título del complemento como la menor concentración del mismo que produce hemólisis total (39).
- 2) Tomando como unidad hemolítica del complemento exactamente la cantidad que lisa el 50% de los glóbulos rojos sensibilizados de acuerdo al procedimiento de Margni (45).

2) Equipo:

Se emplea el instrumental descrito en el capítulo Técnica General.

3) Material de vidrio:

Se emplea el material de vidrio descrito en el capítulo Técnica General.

4) Drogas:

- a) Cloruro de sodio: Sodium Chloride "Analar", $ClNa$ M.W. 58,45, B.D.H.
- b) Citrato de sodio: Sodium Citrate: $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, M. W. 294,11, Baker Analyzed Reagent.
- c) Glucosa: Dextrose Monohydrate Crystal, "Analar" $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$, M.W. 198,178 B.D.H.
- d) Acido cítrico: Citric Acid Monohydrate Crystal: $H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$, M.W. 210,146.
- e) Acido dietil-barbitúrico: Barbitone: $(C_2H_5)_2 \underline{CO.NH.CO.NH.CO}$, M.W. M. W. 184,20, B.D.H.
- f) Dietil-barbiturato de sodio: Barbitone sodium: $(C_2H_5)_2 \underline{C.CO.NH.C(ONa): N.CO}$, M.W. 206,18 B.D.H.

- g) Cloruro de magnesio: Magnesium Chloride: "Analar" $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, M.W. 203,33, B.D.H.-
- h) Cloruro de calcio: Calcium Chloride: "Analar", $CaCl_2$ M.W. 110,994, B.D.H.
- i) Glicerina: Glycerol "Analar": $CH_2(OH)-CH(OH)-CH_2,OH$, M.W. 92,10, B.D.H.

5) Reactivos:

1) Agua destilada:

Se emplea agua destilada estéril que se conserva en recipientes de vidrio herméticamente tapados. Se la prepara semanalmente y se la conserva en la heladera a $4^\circ C$.

2) Solución fisiológica:

$ClNa$ 9 g.
 H_2O destilada c.s.p. 1 litro

El cloruro de sodio para esta solución debe desecarse previamente en horno de aire caliente durante 30 minutos a $160-180^\circ C$., enfriar en desecador y recién pesar. La sal se disuelve en agua destilada, agitando cuidadosamente para lograr una perfecta disolución y, previa filtración, se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a $120^\circ C$.

3) Solución Alsever:

Glucosa 2,50 g.
Citrato de sodio..... 0,80 g.
Cloruro de sodio42,00 g.
Acido cítrico 0,55 g.

Llevar a pH 6,1 con ácido cítrico y esterilizar por bujía esterilizante. Conservar en la heladera a $4^\circ C$.

4) Solución buffer de veronal isotónico:

ClNa	83,80 g.
5,5 dietilbarbitura- de sodio	3,00 g.
CO ₃ HNa	2,52 g.
5,5 ácido dietilbar- bitúrico	4,60 g.
Cl ₂ Mg.6 H ₂ O	1,00 g.
Cl ₂ Ca. 2 H ₂ O	0,20 g.

Las tres últimas drogas se disuelven en alrededor de 500 ml. de agua destilada caliente, agregar a la solución los componentes restantes, enfriar a temperatura ambiente y adicionar agua destilada hasta llevar a un volumen exacto de 2 litros. Esta solución que constituye, la solución madre de veronal se conserva en la heladera a 4° C. y se diluye 1:5, con agua destilada en el momento de su uso. El pH del buffer de veronal isotónico diluido, debe ser 7,2-7,4.

5) Suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5 %.

- a) La recolección y preservación de la sangre de carnero, se la realiza de acuerdo a las indicaciones dadas por KOLMER (46).
- b) A partir de la sangre recolectada sobre solución de Alsever, se toman, previa filtración a través de gasa, una cantidad adecuada de sangre para el trabajo del día, transvasándola a tubos de centrifuga de fondo redondo de 40 ml. de capacidad a los que se añade 8 -10 volúmenes de solución fisiológica.
- c) Centrifugar los tubos a 2.000 r.p.m., durante 5 minutos.
- d) Separar el líquido sobrenadante, por succión con una pipeta capilar, quitando la capa superior de glóbulos blancos.
- e) Repetir el lavado con solución salina, resuspendiendo los glóbulos rojos por agitación suave e inversión de los tubos.

- f) Centrifugar y repetir este procedimiento hasta efectuar tres lavados. Si al tercer lavado el líquido sobrenadante no es incoloro, los glóbulos son demasiado frágiles y no deberán utilizarse.
- g) Después de separar el líquido sobrenadante del tercer lavado, los glóbulos se transvasan a un tubo de centrifuga graduado 1/100 y se centrifugan a la misma velocidad, durante 15 minutos para sedimentar las células firme y uniformemente.
- h) Leer el volumen de glóbulos rojos sedimentados en el tubo de centrifuga y separar el líquido sobrenadante.
- i) Preparar una suspensión al 6 % en solución fisiológica.
- j) Se colocan 10 ml. de esta suspensión en un tubo de centrifuga graduado 1/100 y se centrifuga 10 minutos a 2.000 r.p.m. La lectura de sedimento nos da la concentración real de la suspensión.
- k) Con ese dato se calcula, por regla de tres simple, la cantidad de solución fisiológica que es necesario agregarle al total de glóbulos al 6 % para llevarlos al 5 %. Una vez preparada se repite el mismo control, para verificar si realmente ha quedado al 5 %.
- l) La suspensión se conserva en refrigerador hasta el momento de su uso.
- m) Los glóbulos rojos de carnero conservados en solución Alsever, pueden ser usados aproximadamente durante cuarenta días.

6) Complemento:

- a) Seleccionar 4 ó 5 cobayos machos, grandes y sanos. Mantenerlos en ayuno durante 24 horas.
- b) Con jeringa y aguja estériles, extraerles de 3 a 5 ml. de sangre por punción cardíaca. Colocar en tubos de ensayo estériles y de-

jar coagular en pico de flauta.

- c) Colocar en estufa 1 hora para retracción del coágulo, y 3 horas en la heladera a 4° C.
- d) Se transvasa el suero a tubos de centrifuga y se lleva 10 minutos a 2.000 r.p.m. -
- e) Mezclar los sueros de todos los tubos en los que el suero se presenta límpido. Centrifugar de nuevo iguales tiempo y revoluciones.
- f) Fraccionar en volúmenes de 1-1,5 ml. que se conservan ampollados, en la congeladora a - 20° C, durante unos 15 días, o liofilizarlo y conservarlo en la heladera.
- 7) Suero hemolítico: anti glóbulos de carnero.

Se emplea el método de DARTER (29) según el cual :

- 1) Se eligen 6-8 conejos de aproximadamente 2 kilogramos cada uno.
- 2) Desfibrinar con cuentas de vidrio, una pequeña cantidad de sangre de carnero fresca.
- 3) Administrar a cada conejo, una serie de 5 inyecciones intracutáneas de sangre total de carnero, cada 3 días, comenzando con una dosis de 0,5 ml. y aumentando 0,5 ml. cada vez.
- 4) Preparar una suspensión de glóbulos rojos de carnero, al 20%, lavando perfectamente los glóbulos con una solución salina 0,9 % a la que se agrega sulfato de magnesio al 0,01 %.
- 5) Administrar 2 inyecciones endovenosas de 1 ml. de suspensión de glóbulos de carnero al 20 %, tres días después de haber aplicado la última inyección de sangre total de carnero.

El esquema siguiente resume el programa de inyecciones:

Día	Dosis (ml.)	Vía de administración	Material inyectado
1	0,5	Intracutánea	Sangre total
3	1,0	Intracutánea	Sangre total
5	1,5	Intracutánea	Sangre total
7	2,0	Intracutánea	Sangre total
9	2,5	Intracutánea	Sangre total
12	1,0	Endovenosa	Glóbulos lavados al 20%
15	1,0	Endovenosa	Glóbulos lavados al 20%
18	Sangrado de prueba		

- 6) Las sangrías de prueba se hacen comenzando 3 días después de la 2a. inyección endovenosa, por punción de la vena marginal de la oreja y recolectando 1 ml. de sangre aproximadamente.
 - 7) Titular la hemolisina de acuerdo al método elegido (24).
 - 8) Sangrar a blanco los conejos que tengan por lo menos una unidad hemolítica en la dilución 1: 2000.
 - 9) Separar los sueros de los coágulos, por centrifugación. Inactivar 30 minutos a 56° C. en baño de agua.
 - 10) Agregarle igual cantidad de glicerina neutra y conservarlos en la heladera a 4° C.
 - 11) Repetir las inyecciones endovenosas de glóbulos rojos lavados al 20 %, en los conejos que presenten un título bajo de hemolisina y continuar en la forma ya indicada.
- h) Antígenos:
- Los antígenos, consignados en el Capítulo Técnica General, fueron preparados de acuerdo al siguiente método:

1) Antígeno de virus aftoso de epitelio plantar de cobayo inoculado:

se inoculan cobayos por vía intradermopltar, con cada uno de los virus aftosos patrones.

A las 24-48 horas de la inoculación, se extraen por separado:

1) Fluido vesicular, el líquido tal como se extrae se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos, se recupera el sobrenadante y se conserva en congeladora a -20° C.

Antes de usarlo se inactiva a 56° C., 30 minutos (si la técnica así lo exigiera) y se centrifuga nuevamente a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. Este constituye el antígeno de fluido vesicular de cobayo (A.F.V.).

2) Epitelio plantar: se prepara el antígeno siguiendo el método que describimos para la preparación del antígeno de epitelio lingual de bovino.

El antígeno de epitelio podal de cobayo (E.C.P.) una vez tipificado con los sueros hiperinmunes tipos, se usa como virus o antígeno patrón o tipo. Debe dar fijación completa, 4+ durante 30 minutos, frente al suero homólogo.

2) Antígeno de epitelio lingual de bovino inoculado(o infectado espontáneamente): tipificado con los sueros hiperinmunes patrones, debe dar fijación completa, 4+ durante 30 minutos, con el suero homólogo. Se usa como antígeno o virus patrón o tipo.

Preparación: el material, recibido en forma de epitelio lingual de bovino, se lava con solución fisiológica estéril y se corta en trozos pequeños, se tritura en un mortero con vidrio molido, ambos estériles. Se agrega solución fisiológica en la proporción 1:5 (peso/volumen) y se deja en maceración en la heladera a 4° C., durante 3 horas.

Se centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos. Se recupera el sobrenadante y se inactiva a 56° C. durante 30 minutos, en baño de maría. Se centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos.

El sobrenadante se congela a -20° C. y se conserva a esa temperatura hasta su uso.

El antígeno se conserva congelado, durante meses y hasta un año.

Para la prueba se descongela, con agitación continua, a temperatura ambiente y se centrifuga nuevamente a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos. Este procedimiento se aplica a todos los materiales de origen

de epitelio lingual de bovino, ya sea inoculado (antíg. ep. bov.) o infectado espontáneamente (muestra campo: M.C.).

3) Antígeno de ratón lactante inoculado:

Se sigue las mismas indicaciones que para la preparación del antígeno de epitelio lingual de bovino inoculado.

4) Antígeno de virus aftoso cultivado en medio Frenkel:

En la prueba utilizamos, previa centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 3 minutos, la suspensión del virus aftoso, consistente en la fase líquida agregada del sobrenadante por centrifugación, de la extracción acuosa del tejido lingual, tal como nos fuera proporcionada por el Instituto de la Fiebre Aftosa, donde se emplea para su elaboración la técnica de FRENKEL (47) modificada por el mismo autor (antíg. Frenkel).

5) Antígeno de virus aftoso cultivado en cultivo de epitelio renal de Criceto dorado o en epitelio renal de bovino.

Empleamos, previa centrifugación a 2.500 r.p.m. durante tres minutos la suspensión viral (fase líquida del cultivo de tejido, más el extracto sobrenadante del triturado del cultivo celular), tal como nos fuera suministrada por el Instituto de la Fiebre Aftosa, donde se desarrolla un método de cultivo celular en monocapa en frascos rotantes (48). (antíg. ep. renal).

Se conservan en congeladora a -20° C.; antes de su uso se descongelan, se inactivan durante 30 minutos a 56° C. y se centrifugan 2.500 r.p.m. durante tres minutos. Al Antígeno así obtenido se lo denomina "antígeno puro".

i) Antisueros aftosos:

Los antisueros de cobayos se preparan de acuerdo al método preconizado por ROTTGARDT y CHARLES (39), según el cual se utilizan cobayos machos de 400-500 gramos que se infectan con los virus patrones por vía intradérmica plantar. Los virus patrones cada 8 ó 9 pasajes

por cobayo, deben sufrir 1 ó 2 por bovino y luego volver a cobayo. Tras completo restablecimiento de las lesiones podales, 3 a 4 semanas, se reinfectan por la misma vía los que hubieran generalizado la infección, éstos no deben enfermar.

A los 3 ó 4 días de la reinfección, comienza la hiperinmunización. Esta consiste en 3 inoculaciones intradermoplantales de 0,3 ml. de la suspensión de virus al 10 %, con intervalos de 3 a 4 días, y finalmente una inyección endovenosa de 1 ml. después de otro intervalo de 3 a 4 días.

Se sangran los cobayos a blanco, a los dos días de la última inyección. Una vez obtenido el suero, se inactiva a baño de María 30 minutos a 56° C., se filtra por Zeitz EK, se fracciona y se conserva en congeladora a - 20° C.

METODO

Tipificación del virus aftoso por la técnica de fijación del complemento con lectura de 100 % de hemólisis.

El desarrollo de esta prueba comprende los siguientes pasos:

- 1) Titulación del suero hemolítico.
- 2) Preparación del sistema hemolítico.
- 3) Titulación del complemento.
 - a) solo
 - b) frente al antígeno
- 4) Titulación del antígeno.
- 5) Determinación, en los sueros hiperinmunes, de:
 - a) tipo y especificidad
 - b) de actividad o título
- 6) Tipificación de los virus.

1) Titulación del suero hemolítico (24).

1) Colocar en una gradilla una fila de 11 tubos de ensayo. Rotular

con el título de las diluciones de hemolisina, de acuerdo al siguiente esquema:

Hemolisina 1 %	Solución salina	Separar	Título
(ml.)	(ml.)	(ml.)	
1,0	1,0		1:200
0,5	1,5		1:400
0,3	1,5		1:600
0,3	2,1		1:800
0,2	1,8		1:1000
0,2	2,8		1:1500
0,2	3,8	2	1:2000
0,2	5,8	4	1:3000
0,2	7,8	6	1:4000
0,2	9,8	8	1:5000
0,2	11, 8	10	1:6000

Guardar la gradilla en la heladera hasta el momento de su uso.

- 2) Preparar una suspensión de glóbulos rojos de carnero, al 2,5 %, tal como se describió en "Suspensión de glóbulos rojos de carnero".
- 3) Preparar una dilución de complemento: 1:10. Colocar, con pipeta de 1 ml., en el fondo de un tubo de ensayo, 0,4 ml. de complemento. Descartar esa pipeta. Agregar 3,6 ml. de solución fisiológica. Mezclar perfectamente con una pipeta limpia.
- 4) Preparar una gradilla tipo Kahn, con 11 tubos de hemólisis. Rotular indicando la dilución del suero hemolítico.
- 5) Colocar en cada tubo 0,25 ml. de cada dilución del suero hemolítico, 0,25 ml. de complemento 1:10 y 0,25 ml. de glóbulos

rojos de carnero al 2,5 %.

- 6) Incorporar tres tubos controles:
 - a) Control del suero hemolítico: 0,5 ml. de suero hemolítico 1:200 más 0,25 ml. de suspensión de glóbulos rojos al 2,5%.
 - b) Control de la solución fisiológica: 0,5 ml. de solución fisiológica, + 0,25 ml. de suspensión de glóbulos rojos al 2,5 %.
 - c) Control del complemento: 0,5 ml. de complemento 1:10 + 0,25 ml. de la suspensión de glóbulos rojos al 2,5 %.
- 7) Agitar los tubos e incubarlos a baño de María durante 15 minutos a 37° C.
- 8) Leer y anotar los resultados, consignando como título de la hemolisina la más alta dilución de ésta, que da hemólisis completa.
- 9) Si el título quedara comprendido entre dos tubos, o fuera mayor que 1:6000, debe repetirse la prueba, efectuando diluciones intermedias o ampliando la gama de diluciones.

2) Preparación del sistema hemolítico.

- 1) Preparar una dilución del suero hemolítico que contenga 5 unidades hemolíticas por ml. Por ejemplo, si el título del suero hemolítico fuera 1:4000, se prepara una dilución 1:800.
- 2) Mezclar iguales cantidades de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5 % y de la dilución de suero hemolítico que contiene 5 dosis hemolíticas.
- 3) Agitar suavemente e incubar a baño de maría a 37° C. durante 20 minutos. Se deja 15 minutos a temperatura ambiente y se conserva en heladera mientras no se usa.
- 4) El sistema hemolítico se debe preparar para la tarea del día.

3) Titulación del complemento (24).

a) Titulación del complemento solo.

- 1) Preparar una dilución 1:10 del complemento.
- 2) Colocar en gradilla tipo Kahn una fila de 5 tubos de hemólisis.
- 3) Se coloca, con pipeta de 1 ml., 0,05 ml. de complemento 1:10, en el fondo del primer tubo. En los tubos siguientes se agregan 0,10; 0,15; 0,20 y 0,25 ml. respectivamente.
- 4) Llevar el volumen en todos los tubos a 0,5 ml. con solución fisiológica. De esta forma se obtienen diluciones del complemento del 1, 2, 3, 4 y 5 %.
- 5) A cada tubo se le agrega 1 ml. de solución fisiológica y 1 ml. de sistema hemolítico.
- 6) Agitar e incubar 15 minutos a 37° C. en baño de maría.
- 7) Leer y anotar los resultados, considerando título del complemento la menor concentración del mismo que produce hemólisis total.
- 8) Se considera unidad complementaria, la cantidad de complemento que corresponde al tubo siguiente al que ha dado el título. Si el título es del 2 %, la unidad complementaria será del 3 %.
- 9) El esquema siguiente resumen las cantidades y el orden de los tubos:

	1%	2%	3%	4%	5%
Complemento 1:10(ml.)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Solución fisiológica (ml.)	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25
Solución fisiológica (ml.)	1	1	1	1	1
Sistema hemolítico (ml.)	1	1	1	1	1

b) Titulación del complemento frente al antígeno.

Esta titulación nos permite obtener la cantidad del complemento que luego se empleará en las pruebas de determinación de tipo y título de sueros hiperinmunes, en la titulación de los antígenos y en la prueba de tipificación.

Esta titulación del complemento frente al antígeno, consiste en colocar cantidades constantes de antígeno, frente a cantidades variables de complemento (1, 2, 3 y 4 u.c.) y observar en cuales tubos se produce hemólisis total.

- 1) Preparar, en una gradilla con 4 tubos de ensayo, diluciones del complemento conteniendo 1, 2, 3 y 4 u.c.
- 2) Colocar en una gradilla tipo Kahn una fila de 5 tubos de hemólisis cada una, por cada antígeno a tipificar.
- 3) En todos los tubos de cada fila, colocar 0,25 ml. del antígeno correspondiente.
- 4) A los tubos N° 1, 2, 3 y 4, de cada fila, adicionarles 0,25 ml. de las diluciones del complemento que contienen 1, 2, 3, y 4 u.c. respectivamente.
- 5) Agregar a los tubos N° 1, 2, 3 y 4, de cada fila, 0,25 ml. de solución fisiológica y al último tubo 0,50 ml.
- 6) Incubar 20 minutos a 37° C. en baño de maría.
- 7) Adicionar a todos los tubos, 0,50 ml. de sistema hemolítico.
- 8) Incubar 30 minutos a 37° C.
- 9) Leer y anotar los resultados, considerando título del complemento frente al antígeno, la menor cantidad del mismo que produce hemólisis total.
- 10) En el tubo N° 5, control de antígeno, no se debe observar hemólisis.

11) Si no se produce hemólisis total en ningún tubo, significa que el antígeno ha fijado el complemento, es decir, que el antígeno tiene poder anticomplementario.

12) El esquema siguiente resume el desarrollo de la prueba:

Tubo N°	Antígeno N° (ml.)	Complemento (ml.)	Solución fisiológica (ml.)	Sistema hemolítico (ml)		
1	0,25	0,25 (1u.c.)	0,25	Incubar 20 minutos a 37° C.	0,50	Incubar 30 minutos a 37° C.
2	0,25	0,25 (2u.c.)	0,25		0,50	
3	0,25	0,25 (3u.c.)	0,25		0,50	
4	0,25	0,25 (4u.c.)	0,25		0,50	
5	0,25	----	0,50		0,50	

4) Titulación del antígeno.

Se utiliza cuando se tiene interés en conocer o verificar su título.

1) Preparar las siguientes diluciones:

- a) Antígeno, desde 1:5 hasta 1:160, en solución fisiológica.
- b) Suero hiperinmune homólogo 1:5, en solución fisiológica.
- c) Complemento, conteniendo 2 u.c., en solución fisiológica.

2) En gradilla tipo Kahn, colocar una fila de 8 tubos de hemólisis, por cada antígeno a titular.

3) Con pipeta de 1 ml. transferir 0,25 ml. de cada dilución del antígeno a los 6 primeros tubos.

4) Agregar 0,25 ml. del suero hiperinmune homólogo 1:5, a los tubos N° 1 al 7 .

5) Adicionar a todos los tubos 0,25 ml. la dilución del complemento conteniendo 2 u.c.

- 6) A los tubos N° 7 y N° 8 se les agrega 0,25 ml. de solución fisiológica y al tubo N° 8, 0,25 ml. del antígeno en la dilución 1:5.
El tubo N° 7 constituye el control de suero hiperinmune y en el N° 8, el control de antígeno.
- 7) Se incuban 20 minutos a 37° C. en baño de maría.
- 8) Se agrega a todos los tubos 0,50 ml. del sistema hemolítico, agitar para homogenizar.
- 9) Incubar 30 minutos a 37° C.
- 10) Leer y anotar los resultados, considerando el título del antígeno, la más alta dilución del mismo que da fijación completa (4 +); verificar que los tubos controles N° 7 y N° 8, presenten hemólisis total.
- 11) El esquema siguiente, indica la forma en que se desarrolla la prueba:

Tubo N°	Antígeno N°	Antisuero 1:5	Complemento 2u.c.	Sol.fisiológica		Sist.hemolítico	
1	0,25 (1:5)	0,25	0,25	--	Incubar 20 minutos a 37° C.	0,50	Incubar 30 minutos a 37° C.
2	0,25 (1:10)	0,25	0,25	--		0,50	
3	0,25 (1:20)	0,25	0,25	--		0,50	
4	0,25 (1:40)	0,25	0,25	--		0,50	
5	0,25 (1:80)	0,25	0,25	--		0,50	
6	0,25 (1:160)	0,25	0,25	--		0,50	
7	--	0,25	0,25	0,25		0,50	
8	0,25 (1:5)	--	0,25	0,25		0,50	

12) Los patrones de lectura del grado de hemólisis, se efectúa del siguiente modo:

- a) Colocar 6 ml. de una suspensión de glóbulos rojos al 5%, en un Erlenmeyer de 100 ml., y agregar 24 ml. de solución

fisiológica.

- b) Separar en un tubo de ensayo, la mitad de la mezcla anterior; congelar y descongelar hasta conseguir hemólisis total.
- c) Disponer en una gradilla, 5 tubos de ensayo y agregar de a) y b), las siguientes cantidades:

	1	2	3	4	5
a)	5	3,75	2,5	1,25	0
b)	0	1,25	2,5	3,75	5
Lectura	4 +	3 +	2 +	1 +	(-)

- d) Colocar en una gradilla tipo Kahn, 5 tubos de hemólisis, rotulados : 4+, 3+, 2+, 1+ y (-).
- e) Transferir 1,25 ml. de los tubos de ensayo 1, 2, 3, 4 y 5 a los tubos de hemólisis respectivos, con el objeto de tener los patrones en volúmenes y tubos iguales a los de la prueba
- f) La lectura se realiza a ojo desnudo, comparando la hemólisis de los tubos de reacción con la de los tubos patrones.

5) Sueros hiperinmunes: con estos sueros se realizan dos tipos de determinaciones:

- a) Prueba de especificidad y tipo: que consiste en enfrentar cada suero hiperinmune O, A. y C a los antígenos aftosos patrones O, A y C respectivamente, con el objeto de determinar con cuál de ellos produce fijación total y comprobar si esta fijación es específica.

La reacción consiste en:

- 1) Titular el complemento frente a los antígenos patrones O, A y C, de acuerdo a las indicaciones dadas en " Titulación de complemento frente al antígeno ".

- 2) Con el resultado obtenido se preparan diluciones del complemento con 1 y 2 u.c.
- 3) Preparar diluciones de los sueros hiperinmunes 1:5.
- 4) En gradilla tipo Kahn, colocar dos filas de 4 tubos de hemólisis cada una; numerarlos de 1 a 8.
- 5) En todos los tubos colocar 0,25 ml. del antisuero "O" en la dilución 1:5.-
- 6) En los tubos N° 1 y 5, colocar 0,25 ml. de antígeno "O" patrón; en los N° 2 y 6, 0,25 ml. de antígeno "A" patrón; en los N° 3 y 7, 0,25 ml. de antígeno "C" patrón y en los N° 4 y 8, agregar 0,25 ml. de solución fisiológica.
- 7) A los tubos de la primer fila adicionar 0,25 ml. de complemento con 2 u.c.
- 8) Repetir los pasos desde 4) a 7) con los antisueros "A" y "C", usando los antígenos patrones.
- 9) Agitar e incubar 20 minutos a 37° C. en baño de maría.
- 10) Agregar a todos los tubos 0,50 ml. de sistema hemolítico, agitar suavemente e incubar 30 minutos a 37° C. en baño de maría.
- 11) Leer y anotar los resultados.
- 12) Los tubos N° 4 y 8, se observan a los 5, 10 y 15 minutos pues si el suero produce hemólisis después de ese tiempo, se lo desecha por tener acción anticomplementaria.
- 13) El suero hiperinmune debe dar fijación completa (4+) frente al antígeno homólogo (prueba de tipo) y hemólisis total, frente a los antígenos heterólogos (prueba de especificidad). La prueba se dispone como sigue:

Tubo N°	Antisue- ro "O" 1:5	Antígeno	Complemen- to 1 u.c.	Sol.fisió- lógica		Sist.he- molítico	
1	0,25	0,25 "O"	0,25	---		0,50	
2	0,25	0,25 "A"	0,25	---	Incub-	0,50	Incub-
3	0,25	0,25 "C"	0,25	---	bar	0,50	bar
4	0,25	---	0,25	0,25	20 mi- nutos	0,50	30 mi- nutos
			<u>2 u.c.</u>				
5	0,25	0,25 "O"	0,25	---	a	0,50	a
6	0,25	0,25 "A"	0,25	---	37° C.	0,50	37° C.
7	0,25	0,25 "C"	0,25	---		0,50	
8	0,25	---	0,25	0,25		0,50	

b) Prueba de actividad o título de los sueros hiperinmunes: consiste en determinar el título de los antisueros aftosos que, en la prueba anterior, resultaron específicos.

La técnica se efectúa de la manera siguiente:

- 1) Preparar diluciones de los antisueros aftosos desde 1:5 hasta 1:320.
- 2) Preparar diluciones del complemento conteniendo 2 u.c.
- 3) Colocar en gradilla tipo Kahn, 1 fila de 8 tubos de hemólisis.
- 4) En los tubos N° 1 al 7, colocar 0,25 ml. de cada dilución del antisuero "O", desde 1:5 hasta 1:320.
- 5) En todos los tubos agregar 0,25 ml. de antígeno "O" patrón y 0,25 ml. de complemento con 2 u.c.
- 6) Al tubo N° 8, adicionar 0,25 ml. de solución fisiológica.
- 7) Agitar e incubar 20 minutos a 37° C. en baño de maría.
- 8) Adicionar a todos los tubos 0,50 ml. de sistema hemolítico,

agitar suavemente e incubar 30 minutos a 37° C.

- 9) Verificar el tubo N° 8 (control de antígeno) que debe dar hemólisis total.
- 10) Se denomina título del antisuero la mayor dilución del mismo que da fijación completa (4+). Si el título quedara comprendido entre dos diluciones, se efectúan diluciones intermedias y se repite la titulación.

Todos los antisueros aftosos deben ser titulados por este método. Se rotulan los tubos indicando tipo, título y fecha de titulación.

La prueba se realiza de acuerdo al esquema siguiente:

Tubo N°	Antisuero "C"	Antígeno "O"	Complemento 2 u.c.	Sol.fisiológica	Sist.hemolítico
1	0,25 1/5	0,25 ml.	0,25	---	0,50ml.
2	0,25 1/10	0,25 ml.	0,25	---	0,50ml.
3	0,25 1/20	0,25 ml.	0,25	---	0,50ml.
4	0,25 1/40	0,25 ml.	0,25	---	0,50ml.
5	0,25 1/80	0,25 ml.	0,25	---	0,50ml.
6	0,25 1/160	0,25 ml.	0,25	---	0,50 ml.
7	0,25 1/320	0,25 ml.	0,25	---	0,50ml.
8	-----	0,25 ml.	0,25	0,25	0,50ml.

6) Tipificación de los virus aftosos:

- 1) Diluir los sueros hiperinmunes O, A y C en sus títulos correspondientes, calculando la cantidad necesaria para tipificar todos los antígenos.
- 2) Preparar diluciones del complemento conteniendo 1 y 2 u.c. de acuerdo al título obtenido al titular complemento frente a cada antígeno.

- 3) Colocar en gradillas para tubos de hemólisis 2 filas- de 5 y 4 tubos - por cada antígeno problema. Numerar los tubos de 1 a 9 e indicar N° del antígeno.
- 4) Colocar 0,25 ml. del antisuero "O" en los tubos N° 1 y N° 6, de antisuero "A" en los tubos N° 2 y N° 7 y de antisuero "C" en los tubos N° 3 y N° 8.
- 5) Agregar a todos los tubos 0,25 ml. del antígeno problema, en la dilución denominada "antígeno puro".
- 6) En los tubos N° 4, N° 5 y N° 9 agregar 0,25, 0,50 y 0,25 ml. de solución fisiológica respectivamente.
- 7) En los tubos del N° 1 al N° 4 adicionar 0,25 ml. de complemento conteniendo 1 u.c. y en los tubos del N° 6 al N° 9, 0,25 ml. de complemento conteniendo 2 u.c.
- 8) Incorporar 3 tubos controles de antisuero:
 - 10) 0,25 ml. antisuero "O" + 0,25 ml.S.F. + 0,25 ml. complemento (2 u.c.)
 - 11) 0,25 ml. antisuero "A" + 0,25 ml.S.F. + 0,25 ml. complemento (2 u.c.)
 - 12) 0,25 ml. antisuero "C" + 0,25 ml.S.F. + 0,25 ml. complemento (2 u.c.)
- 9) Agitar suavemente los tubos e incubar 20 minutos a 37° C. en baño de maría.
- 10) Agregar a todos los tubos 0,50 ml. de sistema hemolítico, agitar e incubar 30 minutos a 37° C.
- 11) El esquema siguiente detalla el desarrollo de la prueba.

Tubo N°	Antisuero	Antígeno N°	Sol.fisiológica	Complemento 1 u.c.	Sist.hemolítico
1	0,25 "O"	0,25	---	0,25	Incu- 0,50
2	0,25 "A"	0,25	----	0,25	bar 20 0,50
3	0,25 "C"	0,25	---	0,25	minutos 0,50
4	----	0,25	0,25	0,25	a 37° 0,50
5	----	0,25	0,50	---	C. 0,50
2 u.c.					
6	0,25 "O"	0,25	---	0,25	0,50
7	0,25 "A"	0,25	---	0,25	Incu- 0,50
8	0,25 "C"	0,25	---	0,25	bar 0,50
9	----	0,25	0,25	0,25	20 mi- 0,50
10	0,25 "O"	----	0,25	0,25	nutos 0,50
11	0,25 "A"	----	0,25	0,25	a 0,50
12	0,25 "C"	----	0,25	0,25	37° C. 0,50

- 12) En los tubos controles de antígeno N° 4 y 9, debe haber hemólisis total. En el N° 5, debe haber fijación completa (4 +), pues no lleva complemento.
- 13) Los tubos N° 10, 11 y 12, controles de sueros hiperinmunes, deben presentar hemólisis total.
- 14) El tipo del antígeno está determinado por una fijación completa (4+) con un antisuero, antisuero homólogo y hemólisis total con los antisueros heterólogos.
- 15) Los antígenos que fijan con más de un antisuero, indican que son mezclas de más de un tipo de virus.
- 16) Rotular indicando N° de antígeno, tipo y fecha de tipificación. Conservar en congeladora a - 20° C.
- 17) Protocolizar los resultados.

METODO

Tipificación del virus aftoso por la técnica de fijación del complemento (C_H 50) con lectura fotocolorimétrica del 50 % de hemólisis .

El desarrollo de esta prueba comprende los siguientes pasos:

- 1) Titulación del suero hemolítico.
 - 2) Preparación del sistema hemolítico.
 - 3) Titulación del complemento (C_H 50)
 - 4) Determinación del por ciento de hemólisis: trazado de la gráfica.
 - 5) Titulación de los sueros hiperinmunes.
 - 6) Tipificación de los virus.
-
- 1) Titulación del suero hemolítico:
 - 1) El suero hemolítico se lo emplea en el título obtenido en la titulación del mismo para la prueba de fijación del complemento, 100 % de hemólisis.
 - 2) Preparación del sistema hemolítico:
 - 1) Se prepara una dilución que contenga 4 D.H./ml. (45) .
 - 2) Preparar una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5 %, lavados y resuspendidos en tampón de veronal.
 - 3) Mezclar iguales volúmenes de 1) y 2). Incubar 30^m a 37°C, en baño de maría.
 - 3) Titulación del complemento(45).:

"En una serie de 5 tubos de hemólisis, colocar 1 ml. de buffer. Al primero añadir 1 ml. de una dilución en buffer 1:8 de suero fresco de cobayo (complemento). Mezclar y transferir un mililitro al segundo, mezclar y transferir 1 ml. al tercero y continuar así hasta el último. Añadir 2 testigos conteniendo 1 ml. de buffer (0 % de hemólisis: blanco) y 1 ml. de agua destilada (100 % de hemólisis).

Añadir a todos los tubos 1 ml. de sistema hemolítico. Se coloca la mezcla en baño de agua a 37°C por 30 minutos, se retira y se coloca en baño de agua fría para detener la hemólisis.

Se centrifugan los tubos a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. Se toman 1 ml. y de los dos controles y se vuelcan en tubos conteniendo 9 ml. de solución de carbonato de sodio uno por mil o de amoníaco uno por mil.

El gradiente de hemólisis en cada tubo es leído en fotocolorímetro (Crudo Caamaño 420 o Coleman 540).

El título del complemento corresponde a la recíproca de la concentración de suero de cobayo que da 50% de hemólisis.

Este puede calcularse por la fórmula de van KROGH(23):

$$x = K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}$$

o mediante el método gráfico que resulta más accesible y que es el que hemos empleado en nuestro trabajo.

x: recíproca de la concentración final del suero de cobayo

y: $\frac{\% \text{ de hemólisis observada}}{100 - \% \text{ de hemólisis observada}}$

Se tabula y para cada valor de x en triple papel logarítmico.

La cantidad de complemento que causa el 50% de hemólisis está dada por el punto en el cual una línea trazada con los valores experimentales corta a la abscisa para y=1 . "

Ejemplo de valoración:

x	D.O.	%T.	%H	y
1:16	660	22	100	-
1: 32	650	22,5	98	49
1:64	580	26,5	88	7,3
1:128	377,5	42	57	1,3
1:256	143	72	21	0,2
Testigos:				
0 % Hemólisis		100	0	-
100 % Hemólisis	660	22	100	-

Marcando en la gráfica los valores de y obtenidos para cada valor de x y uniendo esos puntos, en el lugar que dicha recta corta a y= 1 , esa concentración de x corresponde a la que da 50% de hemólisis. En nuestro ejemplo dilución 1:140 (Gráfica Nº 1) .

4) Determinación del por ciento de hemólisis.

"Para determinar el % de hemólisis es necesario confeccionar una gráfica en papel semilogarítmico la que se obtiene de la siguiente manera: en un tubo de hemólisis colocar 2 ml. de la dilución del complemento que da 50% de hemólisis (glóbulos rojos 5% y 4 D.H.). Colocar la mezcla en baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Retirar y colocar en baño de agua fría para detener la hemólisis. Centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. Tomar 2 ml. del sobrenadante y verterlos en 18 ml. de carbonato de sodio uno por mil. Dejar en contacto 5 minutos (muestra A).

Se mezclan 8 ml. de la muestra A con igual volumen de carbonato de sodio uno por mil (muestra B).

De la muestra B se toman 4 ml. y se mezclan con 8 ml. de carbonato de sodio uno por mil (muestra C).

Las muestras A, B y C corresponden respectivamente al 50, 25 y 8% de hemólisis. Se leen al fotocolorímetro con filtro adecuado (en nuestro caso filtro 420). Anotar los resultados en % de transmisión.

Ejemplo:

<u>Muestra</u>	<u>% de hemólisis</u>	<u>% de transmisión</u>
A	50	40
B	25	56
C	8	83

En papel semilogarítmico trazar la gráfica en función de los % de transmisión y % de hemólisis (gráfica N° 2 9).

Interpretación de la lectura:

50 % H	negativo
35-40 % H	1 +
25 % H	2 +
12 a 15 % H	3 +
0 % H	4 +

La curva conviene controlarla periódicamente."

5) Titulación de los sueros hiperinmunes aftosos.

La técnica anteriormente descrita la hemos adaptado para la titulación de los sueros hiperinmunes, de la siguiente manera:

- 1) Efectuar diluciones del antisuero "0" desde 1:50 a 1:3.200.
- 2) Colocar en una gradilla tipo Kahn una fila de 8 tubos de hemólisis.
- 3) En los tubos del N° 1 al N° 7, colocar 0,40 ml. de cada dilución del antisuero "0" .-

- 4) Colocar en todos los tubos 0,40 ml. del antígeno "0" patrón 1:10(a partir de la dilución denominada "antígeno puro").
- 5) Agregar a todos los tubos 0,50 ml. de complemento que da 50% de hemólisis
- 6) Repetir los pasos de 1 a 5 con los antisueros "A" y "C" y sus antígenos homólogos.
- 7) Agitar e incubar 18-20 horas en heladera a 4°C. .
- 8) Añadir 0,50 ml. de sistema hemolítico e incubar 60 minutos a 37°C, retirar y colocar en baño de agua fría.
- 9) Centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 10) Verter 1 ml. del sobrenadante de cada tubo en 9 ml. de carbonato de sodio uno por mil.
- 11) Leer al fotocolorímetro las transmisiones respectivas. El esquema siguiente indica el desarrollo de la prueba:

Tubo Nº	Suero hip. "0"	Antígeno "0" 1:10	Complemento C'H 50%	Tampón Veronal	Sistema hemolítico
1	0,40(1:50)	0,40	0,50	—	0,50
2	0,40(1:100)	0,40	0,50	—	0,50
3	0,40(1:200)	0,40	0,50	—	0,50
4	0,40(1:400)	0,40	0,50	—	0,50
5	0,40(1:800)	0,40	0,50	—	0,50
6	0,40(1:1600)	0,40	0,50	—	0,50
7	0,40(1:3200)	0,40	0,50	—	0,50
8	—	0,40	0,50	0,40	0,50

- 12) Con los valores de transmisión leídos y utilizando la gráfica $\%T = f(\%H)$, se obtiene el % de hemólisis. Con este último dato se expresan los resultados de acuerdo a las indicaciones dadas en "Interpretación de la lectura"
- 13) Se denomina título del antisuero la más alta dilución del mismo que da fijación completa(4+). Si el título quedara comprendido entre dos diluciones, se efectúan diluciones intermedias y se repite la titulación.
- 14) En el tubo Nº 8(control de antígeno)debe haber hemólisis 50%.
- 15) Anotar los resultados en el protocolo consignando Nº de antisuero, tipo, título y fecha de titulación.
- 16) Los sueros hiperinmunes se conservan fraccionados en congeladora a -20°C. .

HEMOAGLUTINACION

1) Introducción

Con los trabajos de McClelland y Hare (1) y de Hirst y Pickels (2) en los que se demuestra la aglutinación directa y la inhibición de la misma en los glóbulos rojos de pollo, frente al virus de la influenza, se inicia una serie de comunicaciones sobre la aplicación de esta propiedad a otros virus (3,4,5).

Para hacer evidente este fenómeno, se mezclan suspensiones de glóbulos rojos de pollo, cobayo o humanos, según el virus considerado, con suspensiones virales y se dejan en reposo. Los glóbulos rojos sedimentan en grumos de mediano tamaño, visibles macroscópicamente.

La cohesión de los eritrocitos no es del mismo tipo que en la aglutinación común y los grumos se dispersan fácilmente por medio de una suave agitación.

Existen virus que, al ser mezclados con suficiente cantidad de glóbulos rojos, son adsorbidos a los eritrocitos a los pocos minutos y luego comienzan a eluir espontáneamente (influenza, parotiditis, enfermedad de Newcastle, viruela, vacuna, etc.) y otros en los que el agente aglutinante es una sustancia soluble, separable de las partículas virales.

Los anticuerpos contra el antígeno soluble, denominado también antígeno S., aparecen antes en el curso de una infección, que los anticuerpos contra el antígeno fijo al virus o antígeno V. Ambas formas antigénicas son fijadoras del complemento, serológicamente diferenciables y tienen importancia en la interpretación epidemiológica de los resultados encontrados.

Debe recordarse, por otra parte, la hemoaglutinación producida por sustancias que no son antígenos virales: las fito-aglutininas que se muestran capaces de precipitar los glóbulos rojos y algunos extractos vegetales, como los de la *Ulex europeus* (6), aglutinan selectivamente el grupo O y el A₂ de los eritrocitos humanos, y la *Sophora japonica*,⁽⁷⁾ los del grupo A y B más fuertemente que los del grupo O. Agrégase a esto un con-

siderable número de bacterias (*H. pertussis*; *E. coli* ; *Cl. botulinum*) que poseen sustancias causantes de la directa aglutinación de los glóbulos rojos, propiedad esta que se busca aprovechar en las reacciones antígeno-anticuerpo.

En nuestro trabajo hemos dividido las técnicas empleadas en los grupos siguientes:

- 1) Reacciones de hemoaglutinación directa.
 - a) Aglutinación de una determinada clase de glóbulos rojos frente a un tipo de virus (8,9).
 - b) Reacción de inhibición de la hemoaglutinación directa (10,11,12,13,14).
- 2) Reacciones de aglutinación pasiva o indirecta.
 - a) Aglutinación de un determinado tipo de glóbulos rojos, sin tratar, sensibilizados con el antígeno, frente a diluciones crecientes del antisuero (15,16,17).
 - b) Aglutinación de un determinado tipo de glóbulos rojos tanados y sensibilizados con el antígeno, frente a diluciones crecientes del antisuero (18,19,20,21).
 - c) Aglutinación de un determinado tipo de glóbulos rojos tanados y sensibilizados con gamma globulina del antisuero, frente a diluciones crecientes del antígeno homólogo (20,21,22).

Reacciones de hemoaglutinación directa.

Este tipo de reacciones nos permite:

- a) La concentración del virus, por aglutinación de los glóbulos rojos con el virus adsorbido y posterior elución del mismo (23).
- b) Titulación del antígeno, enfrentando diluciones crecientes del mismo con cantidades constantes de glóbulos rojos (17).
- c) Hacer específico este tipo de pruebas, recurriendo al artificio

de inhibir la hemoaglutinación por neutralización de las hemoaglutininas por el antisuero homólogo correspondiente (13).

Siguiendo la nomenclatura de Jawetz, Melnick y Adelberg (24) la "unidad aglutinante" del antígeno se define como " 0,5 ml. de la más alta dilución del antígeno que aglutina completamente, 0,5 ml. de una suspensión tipo de eritrocitos humanos ". La lectura de los resultados se efectúa de acuerdo a los tipos descriptos por Salk (12), según el cual:

- a) La aglutinación positiva (4 +) está indicada por un revestimiento rojo, granular y difuso, de la concavidad del tubo.
- b) La ausencia de hemoaglutinación (-) está indicada por la formación de un botón rojo, compacto, en el fondo del tubo.
- c) La aglutinación parcial (\pm , + , 2 + y 3 +) está indicada por un aspecto intermedio entre el revestimiento difuso del tubo y el botón rojo. Este toma el aspecto de un anillo con el centro vacío. Los anillos son de diverso tamaño, dependiendo del grado de aglutinación.

La hemoaglutinación es inhibida por los anticuerpos producidos por el virus homólogo. De manera que puede utilizarse para averiguar de qué antígeno o anticuerpo se trata. El sistema de trabajo usado comprende:

- 1 - Un antígeno viral del que se usan, generalmente 4 dosis hemoaglutinantes.
- 2 - Un anticuerpo, que se pone de manifiesto por inhibir, en algunas de las diluciones usadas, la hemoaglutinación.
- 3 - Los glóbulos rojos, de la especie animal elegida, que actúan como indicador de la reacción.

Reacciones de hemoaglutinación pasiva o indirecta.

En la hemoaglutinación pasiva o indirecta, se efectúa la reacción antígeno/anticuerpo usando el eritrocito como soporte inerte del

antígeno o del antisuero. Las sustancias que sensibilizan los glóbulos rojos, a las que se suele denominar hemosenstitinas, son generalmente polisacáridos o lipo-polisacáridos.

Los eritrocitos pueden ser de pollo, ganso, cobayo, humanos, etc., según el tipo de virus a tipificar y sus concentraciones varían entre 0,25 y 6 %.

Los trabajos de Keogh, North y Warburton (25,26) y de Middlebrook y Dubos (27), fueron el punto de partida de una línea de trabajo tendiente a fijar antígenos bacterianos, de naturaleza polisacárida sobre los glóbulos rojos. Pero, cuando se quiso efectuar la sensibilización con antígenos proteicos purificados, se encontró que la adsorción era difícil o que no tenía lugar.

Boyden (20,21) estudia el proceso de la sensibilización partiendo de la hipótesis de que el mecanismo se podía realizar en dos partes. En la primera, por acción de determinados reactivos se lograba la alteración de la membrana globular y en la segunda, en ajustadas condiciones de temperatura y pH, la adsorción del antígeno por el glóbulo rojo.

Boyden y posteriormente Stavitsky (22) analizan las condiciones para lograr una alteración de la membrana del glóbulo, que permita la adsorción con óptimo rendimiento, de proteínas purificadas. Esta fase (fase de alteración) la consiguen por la acción del ácido tánico 1/20.000, a pH 7,2 y 37° C. de temperatura.

La segunda fase (fase de adsorción) tiene su óptimo cuando se trabaja a pH 6,4 y 37° C. de temperatura.

Jandl y Simmons (28), analizan la acción de los cationes metálicos sobre la membrana celular del glóbulo rojo, en función de su capacidad de adsorción frente a distintos antígenos y Kritzman, empleando cloruro crómico como sustancia modificadora de la membrana, logra la adsorción de gamma globulina a la misma y la precipitación en forma específica frente a la antigamma globulina (reacción de Coombs modificada (29)).

También se ha procurado en algunas técnicas alterar la membrana celular, con proteínas enzimáticas (papaína, pepsina, tripsina) para

lograr un mayor rendimiento en la sensibilización.

El principal inconveniente de este tipo de reacciones, es que, exige una respetuosa sujeción a técnicas laboriosas y que obliga a usar los glóbulos rojos tanados dentro de las 24 horas de preparados.

Por esta razón, se buscó sustituir los glóbulos rojos frescos por glóbulos rojos formolizados que podían ser conservados (30,31), previa liofilización, durante cinco meses sin que perdieran su capacidad de ser sensibilizados.

Cole y Farrell (32) lograron una mayor sensibilidad en este tipo de reacciones, copulando previamente las proteínas con bencidina tetradiazotada.

2) Equipo:

- a) Se emplea el instrumental descrito en el capítulo Técnica General.

3) Material de Vidrio:

- a) Se emplea el material descrito en el capítulo Técnica General.

4) Drogas:

- a) Fosfato monopotásico: Potassium dihydrogen ortho phosphate "Analar" KH_2PO_4 , M. W. 136,09 B.D.H.-
- b) Fosfato disódico anhidro: di-Sodium hydrogen ortho phosphate anhydrous "Analar", Na_2HPO_4 , M. W. 141,97 B.D.H. -
- c) Fosfato monosódico: Sodium dihydrogen ortho phosphate "Analar", $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ B.D.H. -
- d) Cloruro de sodio: Sodium chloride "Analar", ClNa , M. W. 58,45 B.D.H. -
- e) Sulfato de amonio: Ammonium sulphate "Analar" $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. M. W. 132,15 B. D.H.-

- f) Acido tánico: Tannic acid $C_{76}H_{56}O_{46}$, M. W. 1701, 25 B.D.H.
- g) Citrato de sodio: di-sodium hydrogen citrate $Na_2HC_6H_5O_7 \cdot 1\frac{1}{2} H_2O$
"Analar" M. W. 263,12 B.D.H.
- h) Acido cítrico: Citric acid: $C(OH)(COOH)(CH_2 \cdot COOH)_2 \cdot H_2O$ M. W.
210,15 "Analar" B. D. H. -
- i) Glucosa anhidra: D (+) Glucose anhydrous: $CHO \cdot (CH \cdot OH)_4 \cdot CH_2OH$,
"Analar" M. W. 180,16 B.D.H.-
- j) Hidróxido de sodio: Sodium hydroxide "Analar" Na.OH, M.W. 40,00
B.D.H. -
- k) Acido clorhídrico: Hydrochloric acid "Analar", H.Cl 35 % B.D.H.-

5) Reactivos

a) Soluciones madres

- 1) Solución de cloruro de sodio 1,5 M .
 $ClNa$ 87,675 g.
 Agua bidestilada c.s.p. 1.000 ml.

Se conserva a temperatura ambiente

- 2) Solución de fosfato disódico 0,5 M.
 PO_4HNa_2 anhidro 70,99 g.
 H_2O bidestilada c.s.p. 1.000 ml.

Conservar a temperatura ambiente

- 3) Solución de fosfato monosódico 1 M.
 $PO_4H_2Na \cdot H_2O$ 138,01 g.
 H_2O bidestilada c.s.p. 1.000 ml.

- 4) Solución de fosfato monopotásico 0,15 M.
 PO_4H_2K 20,41 g.
 H_2O bidestilada c.s.p. 1.000 ml.

5) Solución de fosfato disódico 0,15 M.

PO_4HNa_2 anhidro	21,29 g.
H_2O bidestilada c.s.p.	1.000 ml.

6) Solución de ácido tánico 1: 1000

Acido tánico	0,200 g.
H_2O bidestilada c.s.p.	200 ml.

7) Solución fisiológica 0,85 %

ClNa	8,5 g.
H_2O bidestilada c.s.p.	1.000 ml.

b) Soluciones de trabajo.

1) Solución pH 6.0

Se mezclan las soluciones madres en la siguiente proporción.

ClNa 1,5 M.	50 ml.
PO_4HNa_2 0,5 M.	16 ml.
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 1 M	92 ml.
H_2O bidestilada c.s.p.	500 ml.

Conservar en la heladera a 4° C.

2) Solución pH 7,0

ClNa 1,5 M.	50 ml.
PO_4HNa_2 0,5 M.	120 ml.
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 1,M.	40 ml.
H_2O bidestilada c.s.p.	500 ml.

3) Solución tampón de fosfatos pH 7,2 .

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,15 M.	12 ml.
PO_4HNa_2 0,15 M	38 ml.
Solución fisiológica 0,85 %	50 ml.

Conservar en heladera

4) Solución tampón de fosfatos pH 6,4.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,15 M.	34 ml.
PO_4HNa_2 0,15 M.	16 ml.
Solución fisiológica 0,85 %	50 ml.

5) Solución de ácido cítrico 10 %.

Acido cítrico	10 g.
H_2O destilada c.s.p.	100 ml.

6) Solución de Alsever modificada.

Se usa la misma solución que indica el capítulo Fijación de complemento.

7) Solución de ácido tánico 1: 20.000

Solución ácido tánico 1 o/oo	ml. 5
Solución fisiológica 0,85 % c.s.p.	ml. 100

8) Solución de Veronal:

Se indica en el capítulo Fijación de complemento.

9) Solución D. G. V.

Gelatina blanca	0,6 g.
Glucosa	10,0 g.
Solución tampón veronal	200 ml.
H_2O bidestilada c.s.p.	1.000 ml.

Se disuelve la gelatina en 300 ml. de agua bidestilada caliente, hasta completar disolución, se agrega la glucosa y una vez disuelta, se deja enfriar; agregar la solución tampón de veronal y completar a 1.000 ml. Fraccionar y esterilizar en autoclave. Conservar a 4° C.

c) Antígenos

Se usan los antígenos descriptos en el capítulo Técnica General.

d) Sueros

- 1) Sueros hiperinmunes aftosos. Se usan los sueros descriptos en el capítulo Técnica General.
- 2) Sueros controles negativos. Se usan los sueros descriptos en el capítulo Técnica General.

e) Gamma globulina.

La gamma globulina se obtiene de acuerdo a la técnica siguiente:

- 1) Tomar cinco frascos de centrífuga de 250 ml. cada uno y numerarlos de 1 a 5.
- 2) Adicionar al primero, 2 ml. de suero antiaftoso "O"; al segundo, 2 ml. de suero antiaftoso "A"; al tercero, 2 ml. de suero antiaftoso "C"; al cuarto, 2 ml. de suero normal de cobayo y al quinto, 2 ml. de suero antirrábico equino.
- 3) Agregar a cada uno de los frascos, con suave agitación, 100 ml. de sulfato de amonio 1,39 M.
- 4) Colocar los frascos 30 minutos a 37° C. y 24 horas a 4° C., para completar la precipitación de la gamma globulina.
- 5) Centrifugar 30 minutos a 2.500 r.p.m. en centrífuga refrigerada.
- 6) Decantar cuidadosamente el sobrenadante y desecharlo.
- 7) Resuspender el depósito en solución fisiológica con 1 % de suero normal de conejo y llevar a su volumen original (2 ml.).
- 8) Las soluciones de gamma globulina, se conservan en congeladora a - 20° C hasta el momento de usarlas.

f) Suspensiones de glóbulos rojos,

Las suspensiones de glóbulos rojos, se preparan de acuerdo a la

técnica de CLARKE y CASALS (10), conservándolas:

- 1) En solución Alsever en relación 1: 2 para las especies, carnero, pollo, cobayo, conejo, ratón y humanos (O Rh neg.)-
- 2) En solución D. G. V. en proporción 1:5 cuando se trata de glóbulos de ganso.

METODO

- 1) Reacción de hemoaglutinación directa.

Para el desarrollo de esta prueba, utilizamos la pauta de trabajo empleada en el Instituto de Virología de la Universidad Nacional de Córdoba,(33) dividiendo la técnica en dos partes:

- a) Determinación de la unidad hemoaglutinante.

- 1) Se disponen en una gradilla, 2 filas de 10 tubos de hemólisis por cada virus a titular. La primera fila se designa fila de dilución, la segunda "fila de reacción".
- 2) Rotular el primer tubo de cada fila de reacción con el nombre del antígeno y su dilución inicial.
- 3) Preparar las diluciones de los antígenos al 1:2; con una pipeta de 5 ml. colocar 0,5 ml. de la solución fisiológica tamponada al pH de trabajo, en todos los tubos de la fila de dilución, menos en el primero.
- 4) Con una pipeta de 1 ml. agregar 0,5 ml. del antígeno original al segundo tubo de la fila de dilución correspondiente; y 0,25 ml. al primer tubo de la fila de reacción descartar la pipeta. Con una nueva pipeta mezclar bien el contenido de ese segundo tubo, transferir 0,5 ml. al tercer tubo de la misma fila y descartar la pipeta.
- 5) Realizar igual operación con el resto de los tubos, de la fila

de dilución.

- 6) Transferir 0,25 ml. del décimo tubo de dilución al décimo tubo de la fila de reacción, con la misma pipeta, transferir 0,25 ml. del noveno al noveno, hasta terminar.
- 7) Con una pipeta de 1 ml. agregar 0,25 ml. de solución fisiológica a cada tubo de la fila de reacción.
- 8) Con una pipeta de 5 ml. agregar a cada tubo, de la fila de reacción, 0,5 ml. de la suspensión de eritrocitos.
- 9) Preparar un control de eritrocitos, con 0,5 ml. de solución fisiológica más 0,5 ml. de suspensión de eritrocitos.
- 10) Repetir iguales operaciones con una suspensión de epitelio lingual normal de bovino (control negativo).
- 11) Agitar bien la gradilla y dejar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 12) Realizar la lectura de acuerdo a las indicaciones de Salk. Protocolizar los resultados considerando como "unidad hemoaglutinante", la mayor dilución que da aglutinación completa. Los controles deben ser todos negativos. (Ver cuadros Nº 9 y 10)
- 13) Preparar de cada virus, una suspensión que contenga 4 u. h. , por ej.: si la unidad hemoaglutinante se obtuvo en la dilución 1:128, la suspensión de ese virus se prepara en la dilución 1:32.

b) Tipificación de los virus por inhibición de la hemoaglutinación.

- 1) La inhibición específica de la hemoaglutinación por el antisuero homólogo ha permitido, en distintos sistemas virales, la tipificación del virus en estudio, cuando se tienen los antisueros tipos correspondientes.

En el caso del virus aftoso no se pudo realizar esta prueba, debido a que, en la determinación de la unidad hemoaglutinante, a pesar de las numerosas variantes incorporadas a la téc-

nica, no se logró en ningún caso hemoaglutinación específica

2) Reacción de hemoaglutinación indirecta o pasiva.

Seguimos la pauta de trabajo descripta por BOYDEN y STAVITSKY, dividiendo la marcha de la reacción en dos partes: la primera, en que se tanan y sensibilizan los glóbulos rojos y la segunda en la que se produce hemoaglutinación.

a) Tanado de los glóbulos rojos.

- 1- Tomar 10 ml. de la suspensión de glóbulos rojos al 2,5 % en tampón de fosfatos pH 7,2, agregar 10 ml. de la solución de ácido tánico 1:20.000, preparada en el momento de la prueba.
- 2- Incubar 15 minutos a 37° C., agitando suavemente cada 5 minutos.
- 3- Centrifugar 10 minutos a 2.000 r.p.m. y decantar el sobrenadante con pipeta Pasteur unida a una bomba de agua.
- 4- Resuspender los glóbulos rojos en solución tampón de fosfatos pH 7,2, en un volumen doble del inicial. Centrifugar iguales tiempo y revoluciones.
- 5- Decantar el sobrenadante en la forma ya descripta, resuspender a la concentración inicial de 2,5 % (10 ml.), con solución fisiológica no tamponada.
- 6- Estos glóbulos rojos tanados pueden conservarse hasta 24 horas en la heladera, a 4° C.

b) Sensibilización de los glóbulos rojos tanados, con antígenos virales.

- 1- Colocar 7 tubos de centrifuga de 12 ml. en un soporte.
- 2- Agregar a los tubos del N° 2 al N° 7, 2 ml. de solución fisiológica a la que se le ha adicionado, suero normal de conejo, adsorbido, al 1 %.

- 3- Agregar al tubo N° 1 y al N° 2, 2 ml. de la suspensión de antígeno aftoso tipo "O". Descartar esa pipeta.
 - 4- Mezclar el contenido del tubo N° 2 y transferir 2 ml. al 3er. tubo, usando pipeta de 2 ml. Repetir la operación cambiando la pipeta cada vez, hasta el último tubo, del que se desechan 2 ml. El antígeno queda diluido de 1:1 a 1:64.
 - 5- Agregar a cada tubo 8 ml. de solución tamponada de pH 6,4 y 2 ml. de suspensión de glóbulos rojos tanados al 2,5 %. Incubar 15 minutos a 37° C., en estufa, agitando suavemente cada 5 minutos.
 - 6- Centrifugar 10 minutos a 2.000 r.p.m. y decantar el sobrenadante de cada tubo con pipeta Pasteur, unida a una bomba de agua.
 - 7- Lavar con 4 ml. de solución fisiológica, adicionada con suero normal de conejo, adsorbido, al 1 %.
 - 8- Centrifugar 10 minutos a 2.000 r.p.m. Decantar el sobrenadante con pipeta Pasteur.
 - 9- Resuspender en 2 ml. de solución fisiológica, con suero normal de conejo, adsorbido, al 1%, llevando los glóbulos rojos tanados y sensibilizados, a una concentración final de 2,5 %.
 - 10- Efectuar idénticas operaciones con los antígenos "A" y "C" y con la suspensión de epitelio lingual normal de bovino, que se usa como control.
 - 11- Incorporar también, como control de glóbulos rojos tanados, un tubo, en el que se sustituye el antígeno por solución fisiológica, siguiendo la misma marcha.
- c) Sensibilización de los glóbulos rojos tanados, con gamma globulina de los antisueros aftosos.
- 1- Con las gamma globulinas de los antisueros O,A,C,, preparadas de acuerdo a la técnica anteriormente detallada, efectuar di-

luciones de 1:5 a 1:2560, en solución fisiológica.

- 2- Con estas diluciones, realizar las mismas operaciones descritas para la sensibilización de glóbulos rojos tanados con antígenos virales, sustituyendo en cada caso, estos últimos, por las respectivas diluciones de las gamma globulinas.
- 3- Incorporar como controles, gamma globulina de suero normal de cobayo, en las mismas diluciones y glóbulos rojos tanados más solución fisiológica.

3) Desarrollo de la prueba.

- a) Glóbulos rojos tanados y sensibilizados con los antígenos virales frente a diluciones crecientes de los antisueros.
- 1- Preparar una gradilla con 5 filas de 10 tubos de ensayo cada una. Rotular indicando tipo de suero y dilución.
 - 2- En el tubo N° 1 de cada fila, colocar 8 ml. de solución fisiológica con suero normal de conejo, adsorbido, al 1 %, y en los tubos restantes 5 ml. de la misma solución.
 - 3- En el tubo N° 1, de la primera fila, agregar 2 ml. de antisue-ro aftoso tipo "0" y descartar esa pipeta.
 - 4- Con pipeta de 5 ml. mezclar el contenido de ese tubo, extraer 5 ml. y transferir al tubo N° 2 de la misma fila.
 - 5- Repetir esta operación, cambiando de pipeta cada vez, hasta el último tubo, del que se desechan 5 ml.
 - 6- Repetir los pasos 3, 4 y 5 en las filas restantes, con los antisueros aftosos A y C. con suero normal de cobayo y con suero antirrábico equino.
 - 7- Las diluciones de los sueros van desde 1:5 a 1:2560.
 - 8- Preparar para la prueba final, una gradilla con 12 filas de 10 tubos de hemólisis cada una, de las cuales 7 filas corres-

- luciones de 1:5 a 1:2560, en solución fisiológica.
- 2- Con estas diluciones, realizar las mismas operaciones descritas para la sensibilización de glóbulos rojos tanados con antígenos virales, sustituyendo en cada caso, estos últimos, por las respectivas diluciones de las gamma globulinas.
 - 3- Incorporar como controles, gamma globulina de suero normal de cobayo, en las mismas diluciones y glóbulos rojos tanados más solución fisiológica.

3) Desarrollo de la prueba.

- a) Glóbulos rojos tanados y sensibilizados con los antígenos virales frente a diluciones crecientes de los antisueros.
 - 1- Preparar una gradilla con 5 filas de 10 tubos de ensayo cada una. Rotular indicando tipo de suero y dilución.
 - 2- En el tubo N° 1 de cada fila, colocar 8 ml. de solución fisiológica con suero normal de conejo, adsorbido, al 1 %, y en los tubos restantes 5 ml. de la misma solución.
 - 3- En el tubo N° 1, de la primera fila, agregar 2 ml. de antisuero aftoso tipo "0" y descartar esa pipeta.
 - 4- Con pipeta de 5 ml. mezclar el contenido de ese tubo, extraer 5 ml. y transferir al tubo N° 2 de la misma fila.
 - 5- Repetir esta operación, cambiando de pipeta cada vez, hasta el último tubo, del que se desechan 5 ml.
 - 6- Repetir los pasos 3, 4 y 5 en las filas restantes, con los antisueros aftosos A y C. con suero normal de cobayo y con suero antirrábico equino.
 - 7- Las diluciones de los sueros van desde 1:5 a 1:2560.
 - 8- Preparar para la prueba final, una gradilla con 12 filas de 10 tubos de hemólisis cada una, de las cuales 7 filas corres-

ponden a las diluciones del antígeno aftoso "O" desde 1:1 a 1:64 y las restantes, a los antígenos controles "A" y "C", a la suspensión de epitelio lingual normal de bovino, al suero control negativo y al suero control de especificidad. Ver cuadro tipo N° 11 .

10- Colocar en los 10 primeros tubos de la última hilera, 0, 4 ml. de la dilución del antisuero "O" 1:2560, siguiendo en las otras hileras con las diluciones restantes. En las dos últimas filas, colocar las distintas diluciones del suero control negativo y del suero control de especificidad.

11- Repetir los pasos 8, 9 y 10 con los antisueros aftosos "A" y "C".

12- Agitar a mano para homogenizar y dejar 30 minutos a 37° C., en estufa, y 18 horas en heladera a 4° C.

13-La lectura se efectúa a las 24 horas, sobre espejo cóncavo, por la imagen que forman los glóbulos rojos aglutinados en el fondo del tubo, de acuerdo a las indicaciones de STAVITZKY (22).

14- Anotar los resultados en el protocolo.

b) Glóbulos rojos tanados y sensibilizados con gamma globulinas de los antisueros aftosos frente a diluciones crecientes de los antígenos.

1- Preparar una gradilla con 5 filas de 7 tubos de ensayo cada una y rotular indicando tipo de antígeno y dilución.

2- En los tubos desde el N° 2 al N° 7, colocar 5 ml. de solución fisiológica con suero normal de conejo, adsorbido, al 1 %.

3- En el tubo N° 1, de la primera fila, colocar 14 ml. y en el N° 2, 5 ml. de antígeno aftoso "O". Descartar la pipeta.

4- Con pipeta de 5 ml. mezclar el contenido del tubo N° 2 y transferir 5 ml. al tubo N° 3.

- 5- Repetir esta operación, cambiando la pipeta cada vez, hasta el último tubo del que se desechan 5 ml.
- 6- Repetir los pasos 2, 3, 4 y 5 con los antígenos "A" y "C" y con la suspensión de epitelio lingual normal de bovino.
- 7- Las diluciones de los antígenos van de 1:1 a 1:64.
- 8- Preparar para la prueba final, gradillas con 12 filas de 10 tubos de hemólisis cada una, que corresponden a las diluciones del antígeno "O" de 1:1 a 1:64; a los antígenos controles "A" y "C", a la suspensión de epitelio lingual normal de bovino, al suero control negativo y al suero control de especificidad.
- 9- Colocar en todos los tubos de la primera fila, 0,4 ml. del antígeno aftoso "O" 1:1. En las filas siguientes, 0,4 ml. de las diluciones restantes.
- 10- En las filas octava y novena, colocar 0,4 ml. de los antígenos controles "A" y "C", respectivamente, en la dilución 1:1.
- 11- En la décima fila, colocar 0,4 ml. de la suspensión de epitelio lingual normal en la dilución 1:1.
- 12- En todos los tubos de las dos últimas filas, colocar 0,4 ml. del antígeno aftoso "O" en la dilución 1:1.
- 13- Adicionar a los 10 primeros tubos de cada hilera, 0,05 ml. de glóbulos rojos tanados y sensibilizados con las distintas diluciones de la gamma globulina del antisuero aftoso "O".
- 14- En la fila N° 11, adicionar a todos los tubos 0,05 ml. de glóbulos rojos tanados y sensibilizados con la gamma globulina de suero normal de cobayo y en la última fila 0,05 ml. de glóbulos rojos tanados y sensibilizados con la gamma globulina de suero antirrábico equino.
- 15- Repetir los pasos desde el 8 al 14 con los antígenos aftosos

"A" y "C".

- 16- Agitar los tubos para homogenizar, dejar 30 minutos a 37° C., en estufa y luego 18 horas en heladera a 4° C.
- 17- Efectuar la lectura a las 24 horas, de acuerdo a las indicaciones de Stavitsky.
- 18- Anotar los resultados en el protocolo.

7) Resultados:

En las pruebas de hemoaglutinación se emplearon los siguientes antígenos:

- a) E.B.P.,epitelio bovino patrón.
- b) A.E.B.,antígeno epitelio bovino.
- c) A.C.F.,antígeno cultivo Frenkel.
- d) B.H.K.(Cr),antígeno B.H.K. de Criceto dorado.
- e) B.H.K.(Bov),antígeno cultivo B.H.K. de bovino.

Se estudiaron en total 120 antígenos de diferente origen,con los que se realizaron las reacciones que detallamos a continuación:

1) Hemoaglutinación directa:

- a) Hemoaglutinación directa en función del pH de la solución fisiológica y de la temperatura(para cada tipo de eritrocitos). Cuadro N° 9 .
- b) Hemoaglutinación directa en función del pH y de la concentración de eritrocitos(para cada tipo de eritrocitos) Cuadro N°10 .

En nuestras condiciones de trabajo no fué posible determinar,con ninguna de las variantes introducidas,la unidad hemoaglutinante: los resultados se consideran negativos para los tipos de virus aftosos usados.

2) Hemoaglutinación indirecta,con glóbulos rojos sensibilizados con los distintos tipos de virus aftosos:

- a) Hemoaglutinación indirecta en función del pH de la solución fisiológica y de la temperatura,para cada tipo de eritrocitos sensibilizado.
- b) Hemoaglutinación indirecta en función del pH y de la concentración de eritrocitos,para cada tipo de eritrocito sensibilizado.

Las modificaciones introducidas en nuestra pauta de trabajo no han permitido determinar ningún tipo de hemoaglutinación específica,por lo que los resultados se consideran negativos para esta prueba. Los cuadros que muestran los resultados obtenidos se omiten,por ser similares a los expuestos en la hemoaglutinación directa.

3) Hemoaglutinación indirecta con glóbulos rojos tanados y sensibilizados con los virus aftosos y con la gamma globulina de los sueros hiperinmunes:

- a) Hemoaglutinación indirecta por sensibilización de los glóbulos rojos tanados con virus aftosos y enfrentamiento con diluciones crecientes de antisuero aftoso. Cuadro N°11 .

**Protocolización de las pruebas de hemo-aglutinación directa,
para virus aftoso, en función del pH de la concentración de
eritrocitos y de la temperatura**

Tempe- ratura	Solución fisioló- gica pH (2)	Diluciones del antígeno aftoso, tipo "O" (1)										
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Control E eritrocitos (3)
4°C	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23°C	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
37°C	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Referencias:

- (1) Se utilizaron antígenos de epitelio lingual de bovinos infectados y de cultivo tipo Frenkel. Este se muestra en el cuadro, antígeno "O" N°121.
- (2) La solución fisiológica tamponada con fosfatos a distintos pH, se empleó para las diluciones de los antígenos y para las suspensiones de eritrocitos. El cuadro corresponde a eritrocitos de pollo al 0,25%. Se repitió la misma prueba con eritrocitos al 0,50% y al 1%, y con variaciones de temperatura: 4°C (heladera), 23°C (temperatura ambiente) y 37°C (estufa).
- (3) Suspensiones de eritrocitos en las concentraciones ya indicadas + solución fisiológica tamponada con fosfatos, a los pH usados en la prueba.

**Protocolización de las pruebas de hemo-aglutinación directa
para virus aftoso, en función del pH y de la concentración
de eritrocitos**

Solución fisiológica pH (2)	Eritrocitos de pollo % (3)	Diluciones del antígeno aftoso, tipo "A" (1)											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Control Eritrocito (5)	
6,0	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,1	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,2	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,3	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,4	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,5	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,6	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,7	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,8	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,9	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,0	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias:

- (1) Se utilizaron antígenos de epitelio lingual de bovinos infectados y de cultivo tipo Frenkel. En el presente caso se usó antígeno de epitelio bovino, tipo "A", N° 44.
- (2) Las diluciones de los antígenos y las suspensiones de eritrocitos se efectuaron en solución fisiológica tamponada con fosfatos, a pH desde 6,0 a 7,0.
- (3) Esta prueba se repitió con suspensiones de eritrocitos de carnero, cobayo, conejo, ratón, ganso y humanos (0 Rh negativo), en las concentraciones indicadas en el cuadro.
- (4) Control de eritrocitos: suspensiones de eritrocitos en las concentraciones correspondientes + solución fisiológica tamponada con fosfatos, a los pH usados en la prueba.

Protocolización de las pruebas de hemo-aglutinación pasiva, con antígenos aftosos

Antígenos			Diluciones del antisuero aftoso, tipo "O" (1)										
			1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	
Diluciones del antígeno aftoso	Glóbulos rojos tanados y sensibilizados con antígeno aftoso, tipo "O" (2)	1:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CONTROLES	N°1	Glóbulos r. t. y s. (3) con antígeno tipo "A"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N°2	Glóbulos tanados y sensibilizados con antígeno, tipo "C" (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N°3	Glóbulos rojos tanados sensibilizados con suspensión epitelio normal (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N°4	Glóbulos rojos tanados sensibilizados con antígeno, tipo "O" (4)	Diluciones de suero normal de cobayo (control negativo)										
	N°5	Glóbulos rojos tanados sensibilizados con antígeno, tipo "O" (4)	Diluciones de suero equino antirrábico (control especificidad)										

Referencias:

- (1) Suero de cobayo hiperinmunizado, se usó como diluyente solución fisiológica con suero normal de conejo adsorbido, al 1%, lo mismo que para los antígenos. Las diluciones que se indican son las iniciales, antes de mezclarlas con las suspensiones de glóbulos rojos que se indican en (2) y (3). En el caso del cuadro se usó suero hiperinmune, tipo "O", N° 3.
- (2) Se utilizaron antígenos derivados de epitelio lingual de bovinos infectados, de cultivo en células renales de criceto dorado y de cultivo tipo Frenkel, que es el que se muestra en el cuadro. Las diluciones se efectuaron a partir del antígeno denominado "puro" (preparación original del antígeno en relación 1:5, peso/volumen en solución fisiológica). Antígeno tipo "O", N° 109.

- (3) Se usaron como antígenos controles de especificidad, los antígenos de epitelio lingual tipo "A", N° 55 y tipo "C", N° 47; como control negativo, glóbulos rojos tanados y sensibilizados con una suspensión de epitelio lingual normal de bovino, N° 52.
- (4) Para estos controles se utilizó la suspensión de glóbulos rojos tanados y sensibilizados con el antígeno tipo "O", N° 3, en la dilución denominada "pura".

Estas pruebas se realizaron también, con glóbulos rojos tanados y sensibilizados con gamma globulina de los antisueros aftosos, frente a diluciones crecientes de los antígenos correspondientes.

BIBLIOGRAFIA

- 1) McClelland, L. and Hare, R.: Can. Public Health J., 32: 530, 1941.
- 2) Hirst, G.K. and Pickels, E.G.: J. Immunol., 45: 273, 1942.-
- 3) Hirst, G.K. : Science, 94: 22, 1941.-
- 4) Markham, F.S. and others: Progress in Biophysics, 13:61, 1953.-
- 5) Levens, J.H. and Enders, J.F.: Science, 102: 117, 1953.-
- 6) Kabat, E.A.: Blood Group Substances. Acad. Press.- N. Y., 1956
- 7) Kabat, E.A. and Mayer, M.M. : Experimental Immunochemistry, 2nd.ed., Charles C.Thomas, Springfield-Illinois, U.S.A. pág. 116.-
- 8) Casals, J. and Brown, L.V.: J. Exp. Med., 99: 429-449, 1954.-
- 9) Casals, J. : Bull. O.M.S., 24: 723, 1961.-
- 10) Clarke, D.H. and Casals, J. : Am.J. Trop. Med. and Hyg, 7: 561-573, 1958.-
- 11) Shope, R.E. : Anais de Microbiologia, II parte A: 167-171, 1963.-
- 12) Salk, J.E. : J. Immunol., 49: 87, 1944.-
- 13) Robbins, F.C., Kilham, L., Levens, J.H. and Enders, J.F. : J.Immunol., 61: 235, 1949.-
- 14) Smith, W. and Westwood, M.A.: Brit. J. Exper. Path., 30: 48, 1949.-
- 15) Chang, S. : J. Immunol., 70: 212, 1953.-
- 16) Chang, S., Murray, E.S. and Snyder, J.C.: J. Immunol. 73: 8, 1954.-
- 17) Horsfall, F.L., Jr. : Diagnosis of Viral and Rickettsial Infection, New York, Columbia Univ. Press. pág. 42,1949.-
- 18) Kumajai, R.N. and Balducci, D.: Rendu. Ist. Sup.Sanita, 22: 368-378, 1959.-
- 19) Weinbach, R. : Rumanian Med. Rev., 5: 23-26, 1961.-

- 20) Boyden, S.V. : J. Exp. Med., 93: 107, 1951.-
- 21) Boyden, S.V. : Nature, 171: 412, 1953.-
- 22) Stavitsky, A.V. : J. Immunol. 72; 320-367, 1954.-
- 23) Knight, C.A. : Ann. Rev. Microbiol., 4: 261, 1950. -
- 24) Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A.: Manual de Microbiología Médica, 1^a. edición en español, El Manual Moderno, México, p.277, 1960.-
- 25) Keogh, E.V., North, E.A. and Warburton, M.F.: Nature, 160: 63,1947.
- 26) Keogh, E.V., North, E.A. and Warburton, M.F.: Nature, 161: 687,1948.
- 27) Middlebrook, G. and Dubos, R.: J. Exp.Med., 88: 521, 1948.-
- 28) Jandl, J. H. and Simmons, R.L. : Brit. J. Haemat. 3: 19, 1957.
- 29) Kritzman, J.: J. Lab. and Clin. Med., 52: 328-334, 1958.
- 30) McKenna, J.M.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 95: 591, 1957.
- 31) Hubert, E.G. and others: J. Bact., 86 (3): 569-572, 1963.-
- 32) Cole, L.V. and Farrell, V.R.: J. Exp. Med., 102: 631, 1955.
- 33) Vanella, J.M. y colaboradores : Procedimientos y técnicas del Laboratorio de Virus. Universidad Nacional de Córdoba. pág. 183-194, 1964.-

DIFUSION EN AGAR

1) Introducción

El uso de medios gelificados para poner en evidencia la reacción de precipitación de un sistema antígeno-anticuerpo, data de 1905 (1) pero recién en 1946 en manos de OUDIN (2,3), adquiere el verdadero valor que tiene en la sistemática de los estudios de inmunoquímica.

La difusión simple y la doble difusión - en una o dos dimensiones - desarrolladas por OUCHTERLONY (4) y ELEK (5) y perfeccionadas por OAKLEY y FULLTHORPE (6), permiten la aplicación de las leyes generales de la difusión en medios líquidos, a la difusión en geles y el cálculo de las constantes físicoquímicas que rigen este fenómeno.

GRABAR, (7,8,9) en el Instituto Pasteur, combina la electroforesis en agar con la inmunodifusión y desarrolla la inmunolectroforesis, que permite resolver exhaustivamente sistemas antigénicos complejos.

Con estas técnicas se demuestra la relación inmunológica de uno o varios antígenos frente a un suero anti, por el análisis de los arcos de precipitación que se forman al difundir los antígenos y anticuerpos a través de un gel. Inversamente permite descartar relaciones antigénicas y evidenciar la unicidad o pluralidad de un antígeno. Las bandas de precipitación tienen una posición que depende de la concentración del antígeno, (10) una curvatura que depende del coeficiente de difusión del antígeno (11) y una densidad que es función del contenido en anticuerpos (12,13).

El procedimiento de difusión simple de OUDIN consiste, en la estratificación en tubos pequeños (7 cm. x 5 mm.) de dos capas; la primera, contiene mezcladas con el agar las distintas concentraciones del antisuero (reactante interno) y la segunda, las diferentes diluciones del antígeno (reactante externo).

El antígeno al difundir, desciende y se separa en fracciones que tienen distinta velocidad de difusión las cuales al alcanzar la concentración óptima para reaccionar con el anticuerpo disuelto en el gel, precipitan formando planos horizontales a distintas alturas del tubo.

Esta reacción se puede realizar también en cápsulas de Petri, en las que se cubre el fondo con el gel de agar que contiene el antisuero y

el antígeno se vierte en un orificio que se practica en el centro de la placa. Las distintas proteínas difunden formando círculos concéntricos y precipitan en la zona de concentración óptima para la reacción.

El método de doble difusión en una dimensión, desarrollado por OAKLEY y FULLTORPHE (6) y perfeccionado por PREER (14), consiste en lograr la difusión simultánea del antígeno y del anticuerpo, ambos mezclados con el agar, los que en una capa de agar intermedia, forman las clásicas líneas de precipitación.

En este caso en un tubo de dimensiones adecuadas, se coloca una cierta cantidad del agar fundido mezclado con el anticuerpo, se lo deja solidificar y se le adiciona una cantidad de agar fundido de modo que forme una pequeña columna de agar; se lo deja solidificar y se adiciona el agar fundido que contiene las distintas diluciones del antígeno. Se deja solidificar este último estrato, se tapa herméticamente con tapón de goma y se deja difundir a la temperatura elegida.

El método de OUCHTERLONY (15) o de doble difusión en dos dimensiones, tiene la ventaja sobre los anteriores que permite la directa comparación de varios antígenos con distintos antisueros, siendo de utilidad para analizar las reacciones cruzadas.

La técnica se puede desarrollar en macro o en micro-escala, en un caso se efectúa la difusión en cápsulas de Petri y en el otro en porta-objetos. En esencia el método consiste en cubrir la cápsula o el porta-objeto con una capa de agar y practicar en ella una serie de orificios simétricos a un orificio central. Se carga el orificio medio con un tipo de antisuero y los periféricos con los antígenos a estudiar.

Cuando hay especificidad entre el antígeno y el antisuero, al difundir forman la típica banda de precipitación.

La sensibilidad de este método varía de acuerdo al sistema antígeno anticuerpo analizado, al peso molecular de los reactantes y al pH en que se realiza la reacción.

Los métodos de OUDIN (2,3) y de PREER (14) detectan de 2 a 18 micro gramos de nitrógeno por mililitro de anticuerpo y de 3 a 9 microgramos de nitrógeno por mililitros del antígeno, mientras que los métodos de OUCHTERLONY (4) requieren varias veces estas concentraciones.

Estos valores representan términos medios en distintos sistemas considerados. Desde el punto de vista práctico, la principal limitación de estos procedimientos es que exige, en el caso específico del virus aftoso, un virus de alto título infectante (10^{-7} - 10^{-8} I.D $_{50}$) lo que obliga a emplear virus de alta concentración.

Los trabajos de BROWN y CRICK (16) demuestran que, tanto en la técnica de difusión en tubo como en placa, se observan dos líneas netas separadas aproximadamente 1 mm. una de otra y que corresponden a compuestos antigénicos serológicamente distintos (20 y 7 milimicrones), que pueden obtenerse por ultracentrifugación diferencial.

Para cada antisuero se determina la dilución óptima que con el antígeno homólogo tipo da una banda más neta, empleando la técnica en micro-escala, ya que, sin pérdida de sensibilidad ni especificidad requiere menores cantidades de antígeno y antisuero.

Esta dilución óptima se emplea en forma sistemática en la tipificación en placa.

2) Equipo

1) Se emplea el instrumental descrito en el capítulo Técnica General.

3) Material de vidrio

1) Se emplea el material de vidrio descrito en el capítulo Técnica General.

4) Drogas

1) Cloruro de sodio: Sodium chloride "Analar" ClNa M. W. 58,45 B.D.H. -

2) Fosfato monopotásico: Potassium dihydrogen ortho-phosphate "Analar"
 KH_2PO_4 M. W. 136,09 B.D.H. -

3) Fosfato disódico anhidro: di-sodium hydrogen ortho-phosphate anhydrous
"Analar" Na_2HPO_4 M. W. 141,97 B.D.H. -

4) Merthiolate: Thimerosal N. F. Elanco Products Company Ind. U. S.A.

5) Acido tricloroacético: Tri-chloro-acetic acid "Analar" $\text{CCl}_3.\text{COOH}$

M. W. 163,40 B.D.H. -

- 6) Acido acético glacial: Acetic acid glacial "Analar" CH_3COOH M. W. 60,05 B.D.H.-
- 7) Acetato de sodio: Sodium acetate anhydrous "Analar" CH_3COONa M. W. 82,04 B.D.H. -
- 8) Cloruro de calcio: Calcium chloride hydrated "Analar" $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ M. W. 219,09 B.D.H.-
- 9) Sulfato de magnesio: Magnesium sulphate " Analar" $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ M.W. 246,50 B.D.H. -
- 10) Acido dietil-barbitúrico: Barbitone: $(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \cdot \underline{\text{CO.NH.CO.NH.CO}}$ M.W. 184,20 B.D.H. -
- 11) Dietil-barbitúrate de sodio: Barbitone sodium: $(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \cdot \underline{\text{C.CO.NH.C}}$
 $(\text{ONa}) \cdot \underline{\text{N.CO}}$ M. W. 206,18 B.D.H. -
- 12) Glicerina: Glycerol "Analar" $\text{CH}_2(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{CH}_2\text{OH}$. M. W. 92,10.
- 13) Agar Oxoid-Ion N° 2: Ionagar Code Number L 12.
- 14) Nigrosina: B.D. H. microscopical Stains in solid form.
- 15) Rojo de Thiazina R.: B.D.H. Microscopical Stains in solid form.

5) Reactivos

a) Soluciones salinas:

- 1) Solución de cloruro de sodio 0,85 %
 ClNa 8,50 g.
 H_2O dest. c.s.p. 1000 ml.
- 2) Solución de cloruro de calcio 10 %:
 $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 19,7 g.
Agua destilada c.s.p. 100 ml
- 3) Solución tampón de veronal-veronal sódico:
Cloruro de sodio 85,0 g

Acido dietil-barbitúrico	5,750 g
Dietil-barbitúrate sódico	3,750 g.
SO ₄ Mg.7 H ₂ O	0.294 g
H ₂ O dest. c.s.p.	2 litros

4) Solución de ácido tricloroacético al 3 %

Ac. tricloroacético	3,0 g
H ₂ O dest. c.s.p.	100 ml.

5) Solución de ácido acético 2 %

Acido acético glacial	2,0 g
H ₂ O dest. c.s.p.	100 ml.

b) Soluciones colorantes:

1) Solución colorante Ponceau S.

Ponceau S.	0,2 g
Ac. tricloroacético 3%	100 ml.

2) Solución colorante de Nigrosina

Nigrosina	0,001 g
Ac. acético al 2 %	100 ml.

3) Solución de Rojo Thiazina R.

Rojo de Thiazina R.	30 g
Sol. tampón de acetato	1 litro

c) Solución madre de agar

- 1) Pesar 60 g. de agar Oxoid-ion N° 2 y agregarlos, en un vaso de precipitación de 2 litros, a 900 ml. de agua destilada.
- 2) Calentar con agitación en baño de María, hasta disolución completa.
- 3) Adicionarle 100 ml. de cloruro de calcio al 10 %.

- 4) Manteniendo la temperatura a 80° C, incorporar lentamente albúmina de huevo para completar la precipitación de impurezas iniciada por el cloruro de calcio.
- 5) Filtrar en caliente por filtro con camisa de agua caliente.
- 6) Completar a 1 litro con agua destilada.
- 7) Verterlo sobre una bandeja plana dejándolo que solidifique.
- 8) Cortarlo en cubos de aproximadamente 2 cm. de lado y colocarlos en agua destilada, que se renueva cada 24 h., durante 3 días.
- 9) Verter el agua, fundir el agar y, en una parte alícuota, determinar la concentración real de agar, efectuando un residuo seco.
- 10) A partir de este agar así calculado, adicionarle la cantidad necesaria de agua destilada para que su concentración final sea del 5%.
- 11) Agregarle cloruro de sodio de manera que su concentración sea del 8,5 por mil y merthiolate en concentración de 1: 10.000.
- 12) Fundir el agar, fraccionarlo en tubos de ensayo en volúmenes de 10 ml. y marcar el nivel de los mismos para completarlo con agua destilada, si fuera necesario, en caso de evaporación. Conservarlos en heladera hasta el momento de su uso.

d) Soluciones de agar para la macro-prueba de OUDIN:

- 1) Fundir a 60° C, en baño de María dos tubos de la solución madre de agar al 5 %.
- 2) Con pipeta, calentada por flameo en llama de mechero de Bunsen, transvasar 10 ml. a un Erlenmeyer de 150 ml., manteniéndolo a 56° C en baño de María.
- 3) Adicionarle 40 ml. de solución fisiológica con merthiolate 1: 10.000, este constituye el agar 1%.
- 4) Repetir con un segundo Erlenmeyer los pasos 1 y 2.

5) Agregar 90 ml. de solución fisiológica con merthiolate 1: 10.000, este constituye el agar 0,5 %.

e) Soluciones de agar para la micro-prueba de OUDIN:

- 1) Fundir a 60° C en baño de María, tubos de ensayo con solución madre de agar al 5 %.
- 2) Con pipeta, calentada por flameo, transvasar a sendos Erlenmeyer designados con los números 1 y 2, 12 ml. de agar fundido.
- 3) Agregar al N° 1, 88 ml. de tampón de veronal-veronal sódico M/20 y al N° 2, 88 ml. de solución fisiológica con merthiolate 1:10.000 tamponada a pH 7, con tampón de fosfato.
- 4) Distribuir en tubos de hemólisis volúmenes de 0,5 ml. de cada tipo de agar e identificarlos con las denominaciones: N° 1 Agar 0,6 % V-V; N° 2 Agar 0,6 % T.F. -

f) Solución de agar para la macro-prueba de OUCHTERLONY:

- 1) Fundir dos tubos de la solución madre al 5 %, a 60° C, en baño de agua.
- 2) Con pipeta calentada, flameándola en llama de mechero, colocar 30 ml. en un Erlenmeyer de 250 ml.
- 3) Agregar 70 ml. de solución fisiológica con merthiolate 1:10.000.
- 4) Distribuirlo en tubos de ensayo, colocando aproximadamente 15 ml. de agar en cada uno, taparlo con tapones de goma, marcar el nivel y conservarlos en heladera a 0° C. - Este constituye el agar 1,5 %.

g) Solución de agar para la micro-prueba de OUCHTERLONY:

- 1) Fundir a 60° C en baño de María, cuatro tubos de la solución madre de agar al 5 %.
- 2) Con pipeta calentada, flameándola por llama de mechero, colocar

en un Erlenmeyer de 250 ml. exactamente 30 ml. de la solución de agar al 5 %.

- 3) Agregar 70 ml. de solución de veronal-veronal sódico M/20.
- 4) Distribuir en tubos de ensayo volúmenes de 15 ml. aproximadamente, cerrarlos con tapones de goma. Conservar en la heladera a 0° C, marcando el nivel para completarlo, por la adición de agua destilada, si fuera necesario en el momento de usarlo.

h) Sueros: se usan los mismos detallados en el capítulo Técnica General.

i) Antígenos:

- 1) Se puede usar para la prueba directamente el fluido vesicular obtenido de lesiones de epitelio lingual de bovino o de lesiones podales en cobayo, los que contienen una cantidad suficiente de virus, para dar líneas de precipitación.
- 2) Cuando los antígenos tienen un grado de infectividad menor que 10^{-7} I. D 50, se los concentra:
 - a) Por precipitación por sulfato de amonio a media saturación (16).
 - b) Por ultracentrifugación a 40.000 r.p.m. durante 3 horas a 0° C.

METODO

Desarrollo de la prueba

- 1) La técnica de OUDIN (2,3) en macro y micro escala nos permite obtener las diluciones óptimas en que deben emplearse los antisueños O, A, y C en la macro prueba de OUCHTERLONY (4,15) y en su adaptación en microescala de acuerdo a los procedimientos de Crowl (17) y de Grasset y colaboradores (18).

a) Macro-prueba de OUDIN: doble difusión.

- 1) Seleccionar 10 tubos de hemólisis y numerarlos.
- 2) Adicionar a los tubos, colocados en gradilla de Kahn en baño de agua a 56° C, agar fundido para la reacción de OUDIN y haciendo girar suavemente cada tubo, bañar uniformemente las paredes interiores de los mismos, vertiendo el remanente.
- 3) Sacarlos del baño y dejarlos 5 minutos en heladera para su solidificación.
- 4) Preparar en gradilla aparte diluciones crecientes del antisueño, en un volumen de 1 ml. desde 1:1 a 1:512.
- 5) Transvasar 0,5 ml. de cada dilución a los tubos de hemólisis preparados con el baño interior de agar.
- 6) Agregarle a cada tubo 0,5 ml. de agar al 1%, mientras se mantienen los tubos a temperatura constante no mayor de 56° C.
- 7) Pipetear varias veces dentro del agar para obtener una mezcla bien homogénea.
- 8) Sacar los tubos del baño y ponerlos en la heladera para que el agar solidifique bien.
- 9) Adicionar a cada tubo 0,5 ml. de agar al 0,5 % y llevar nuevamente a heladera para su solidificación.
- 10) Preparar la dilución del antígeno que se desea ensayar y mezclarla con igual cantidad de agar fundido al 1 %.

- 11) Agregar a cada tubo 0,5 ml. de la mezcla agar-antígeno, llevarlos a la heladera nuevamente, tapados con tapones de goma.
- 12) Mantenerlos a temperatura ambiente y leer a las 24 y 48 horas, en algunos casos las reacciones se hacen positivas dentro de los 7 días.
- 13) Protocolizar los resultados.

b) Micro-prueba de OUDIN modificada por PREER

- 1) Fundir dos tubos de agar 0,6 % V-V a 60° C.
- 2) Separar 30 micro-tubos, adicionarles rápidamente a cada uno una pequeña cantidad de agar fundido para obtener un baño uniforme en las paredes interiores de los mismos.
- 3) Verter el agar remanente y llevar a la heladera para su solidificación.
- 4) Numerar los tubos y colocarlos en tres hileras de 10 tubos cada una, en el soporte para micro tubos. Adicionar a los tubos 0,01 ml. de cada una de las diluciones del antisuero empleando micropipetas de Pasteur.
- 5) Luego con sumo cuidado para conseguir una neta separación de las dos fases, agregar, también con micro-pipeta una capa de agar 0,6 % V-V, fundido. Llevar a la heladera para su solidificación.
- 6) Agregar 0,01 ml. del antígeno suspendido en el mismo tampón.
- 7) Sellar los tubos con esmalte de uñas e incubarlos a temperatura ambiente.
- 8) Efectuar la lectura a las 24 y 48 horas continuando la observación durante siete días.
- 9) Protocolizar los resultados

Las bandas encontradas representan el número mínimo de sistemas antígeno-anticuerpo presentes, considerando la dilución óptima del antisuero aquella en la que la banda de precipitación apareciera más pronunciada, es-



ta dilución es la que se emplea en la prueba de difusión en placa.

2) Las técnicas de doble difusión en placa y en portaobjetos permiten la tipificación de los virus aftosos, empleando el título del antisuero determinado con la técnica de PREER.

a) Macro-prueba de OUCHTERLONY:

- 1) Seleccionar cápsulas de Petri estériles, de vidrio homogéneo. Convienen las cápsulas de vidrio fino y completamente transparente para facilitar la lectura.
- 2) Fundir varios tubos de agar al 1,5%, para la macro prueba de OUCHTERLONY.
- 3) Verter de 6 a 8 ml. en cada placa moviendo suavemente la placa para su distribución homogénea. Dejar solidificar.
- 4) Colocar sobre esta capa el molde para la obtención de los orificios (ver fotografía N° 1).
- 5) Agregarle otra capa de 6 a 8 ml. y dejar solidificar. Retirar el molde.
- 6) Tapar la cápsula que queda así, lista para la siembra.
- 7) Preparar diluciones de los antisueros en agar fundido en la dilución obtenida por el método de OUDIN.
- 8) Colocar en el orificio central una cantidad de antisuero-agar suficiente para llenar el orificio.
- 9) Efectuar la misma operación en los orificios periféricos con los antígenos a estudiar. Tapar las cápsulas.
- 10) Incubar a temperatura ambiente y efectuar las lecturas a las 24 y 48 horas. La última lectura se efectúa a los 7 días.
- 11) Protocolizar los resultados.

7) Resultados:

La aplicación de las técnicas de difusión en agar para la tipificación de los virus aftosos, se realizó en dos partes:

- 1) Determinación del título de óptima precipitación de los antisueros hiperinmunes: microtécnica de Oudin, modificada por Preer.

La protocolización de esta prueba, se muestra en el cuadro siguiente en el cual se puede observar que el título obtenido para el suero "O", nº 12 fué de 1:64 (Cuadro Nº 12)

CUADRO Nº 12

Protocolo tipo de la prueba de difusión en agar para obtener el título de anti-sueros aftosos - Microtécnica de Oudin

Antígenos (2)	Diluciones del suero hiperinmune tipo "O" (1)						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Antígeno "O" patrón (nº141)							
Antígeno "A" patrón (nº142)							
Antígeno "C" patrón (nº143)							
Suspensión de epitelio normal de bovino (nº137)							

Referencias:

- (1) Suero de cobayo hiperinmunizado, se usó como diluyente tampón de veronal.
- (2) Los antígenos se usaron concentrados con sulfato de amonio a media saturación o por ultracentrifugación.

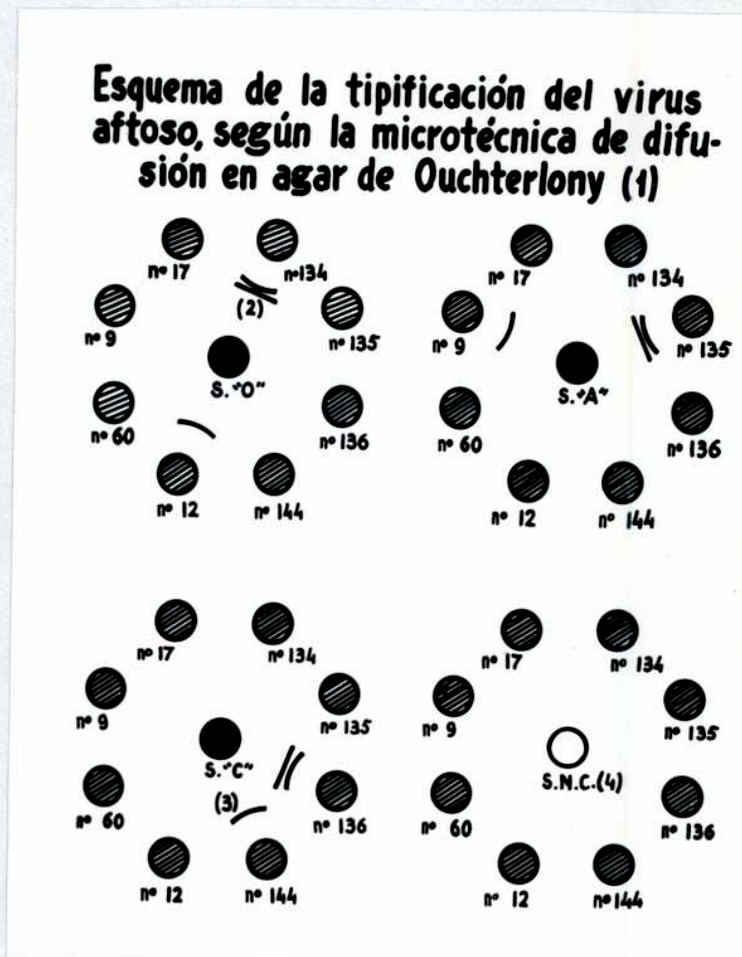
Se titularon 26 sueros hiperinmunes, los resultados se consignan en el Cuadro Nº 13. Estos títulos se emplearon en las pruebas de difu-

si3n en placa, para la tipificaci3n de los virus.-

En las fotografias N3 3 y N3 4, se pueden ver las bandas de precipitaci3n en macro y micro escala. Las l3neas pueden ser una o dos, seg3n se trate de virus sin inactivar a 563C durante 30 minutos, observaci3n esta coincidente con las conclusiones de BROWN y CRICK(16).

- 2) La tipificaci3n de los virus problema, empleando la micro t3cnica de OUCHTERLONY(4) modificada por MARGNI(19), tal como se efectu3, se indica en el Gr3fico N3 7

GRAFICO N3 7



Referencias:

- (1) Micro t3cnica de doble difusi3n en portaobjetos .-
- (2) Virus "O"(A.F.V.), sin inactivar: se observan dos bandas de precipitaci3n.-
- (3) Virus "C" inactivado: una l3nea de precipitaci3n.
- (4) Suero normal de cobayo: control negativo.

Las fotografías N^o5, N^o6, N^o7 y N^o8, muestran la nitidez y especificidad de las bandas obtenidas, tanto en macro como en micro escala.

El Cuadro N^o14 consigna los resultados de la tipificación de los virus por este método. En total se estudiaron 131 muestras virales, a las que se les determinaron su tipo, logrando 71% de reacciones positivas para los antígenos de epitelio y el 64% para los virus de cultivo. Sobre el total de las muestras la positividad fué del 68%. Gráfico N^o8.

En las reacciones de difusión en agar el % de positividad aumenta en forma directa con la concentración del virus, como lo muestran los valores obtenidos cuando se expresa la positividad en función del título del virus.

Así, para el virus tipo "O" se obtiene 75% de reacciones positivas con virus de título menor de $10^{-7,0}$; 76% con títulos de $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$; 79% con títulos de $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$ y 100% con títulos mayores que $10^{-8,0}$.

Con virus "A" los valores son de 38% para títulos inferiores a $10^{-7,0}$; 86% para títulos de $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$ y 90% para los títulos $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$.

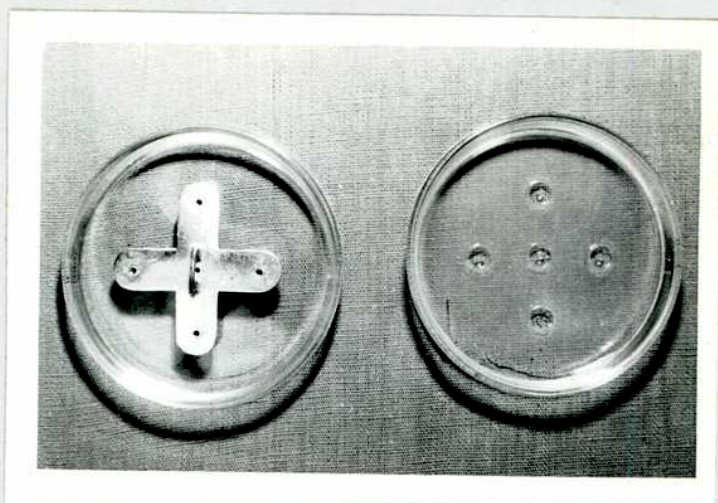
Y para el virus "C" los valores positivos son del 76% para títulos de $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$ y del 90% para títulos de $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$.

Hemos observado que cuando se trabaja con fluido vesicular, de cobayo o de bovino, se obtienen bandas de una marcada nitidez.

El Gráfico N^o9 muestra el aumento de positividad con el aumento del título. Debe tenerse en cuenta que los valores de los títulos indicados se refieren al título original de la muestra, pues su título final después de la concentración con sulfato de amonio a media saturación o por ultracentrifugación, se eleva en uno o dos logaritmos sobre el valor inicial(16).

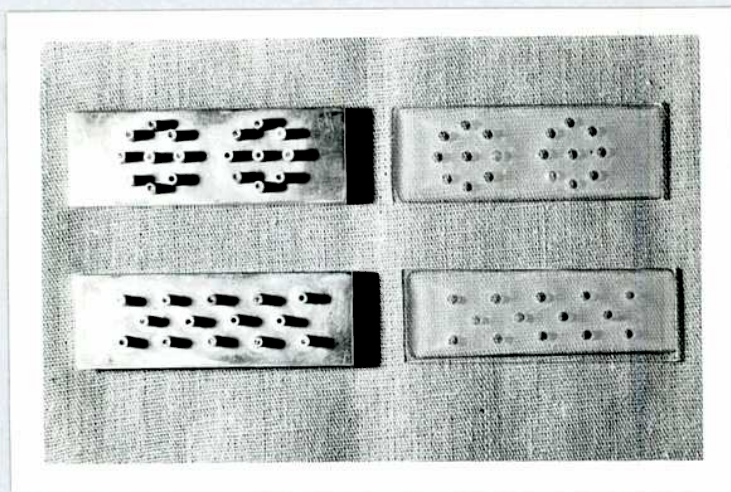
El método de difusión en agar, adaptado a la tipificación de los virus aftosos, exige la concentración del virus, técnica cuidadosa y extensa, lo que reduce las posibilidades de emplearlo como un procedimiento de rutina. En donde se aprecia el verdadero valor de este tipo de pruebas, es en el estudio de la constitución antigénica de los virus, lo que ha permitido, en el caso específico del virus aftoso separar las distintas fracciones que se pueden obtener del virus total y establecer las relaciones antigénicas que existen entre las mismas y los anticuerpos neutralizantes y fijadores del complemento.

FOTOGRAFIA Nº 1



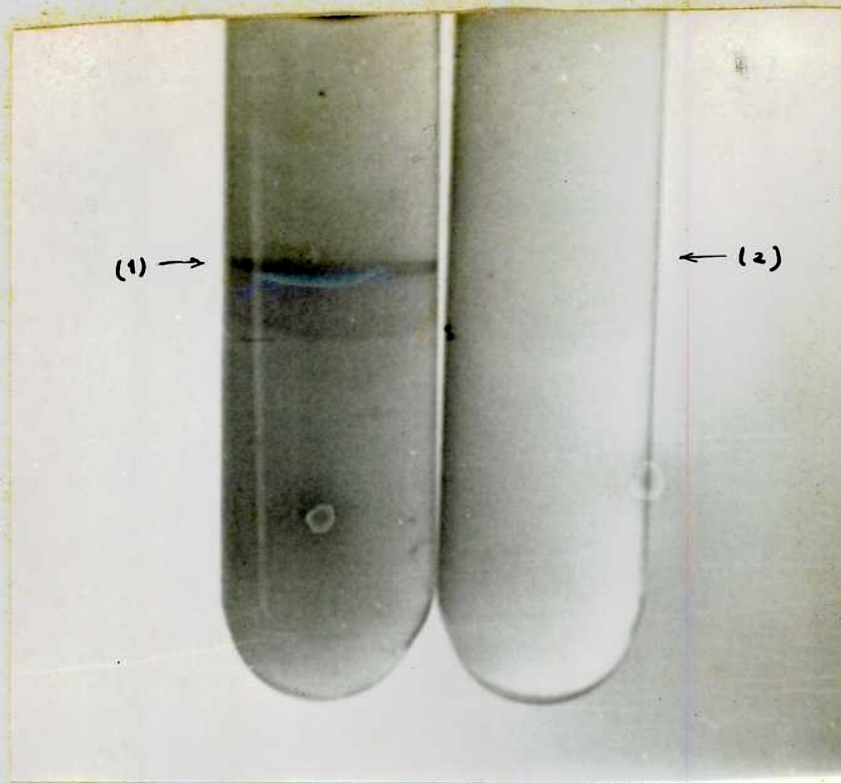
Moldes para la prueba de Macrodifusión según Ouchterlony (Cortesía Dr. R. Margni)

FOTOGRAFIA Nº 2



Moldes para la Micro-difusión según Ouchterlony (Cortesía Dr. R. Margni)

FOTOGRAFIA N° 3



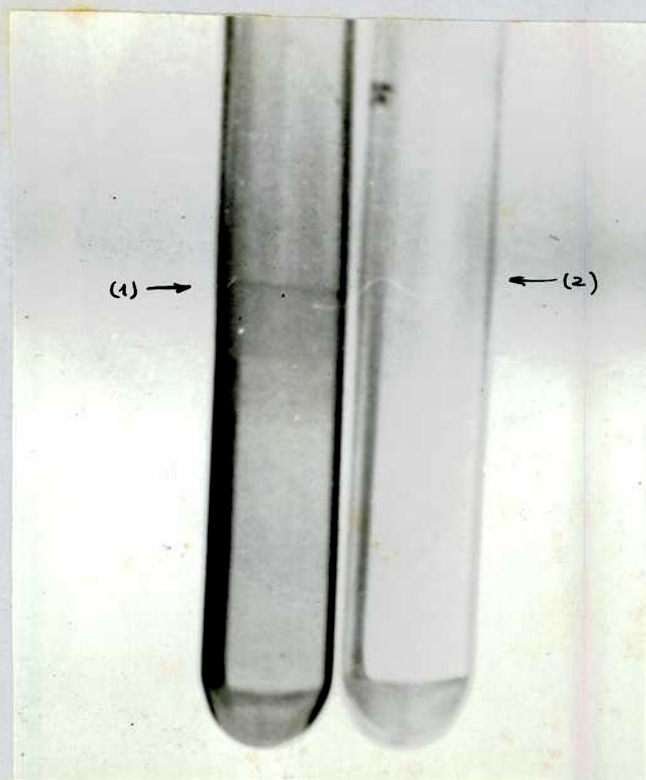
Referencias:

Suero "O" N° 23

1) Virus "O" N° 141: 2 líneas de precipitación.

2) Control negativo.

FOTOGRAFIA N° 4



Referencias:

Suero "C" N° 11.

1) Virus "C" N° 47 (Reacción positiva)

2) Control negativo.

FOTOGRAFIA Nº 5



Referencias:

Macro técnica de OUCHTERLONY.

Suero "C" Nº 17.

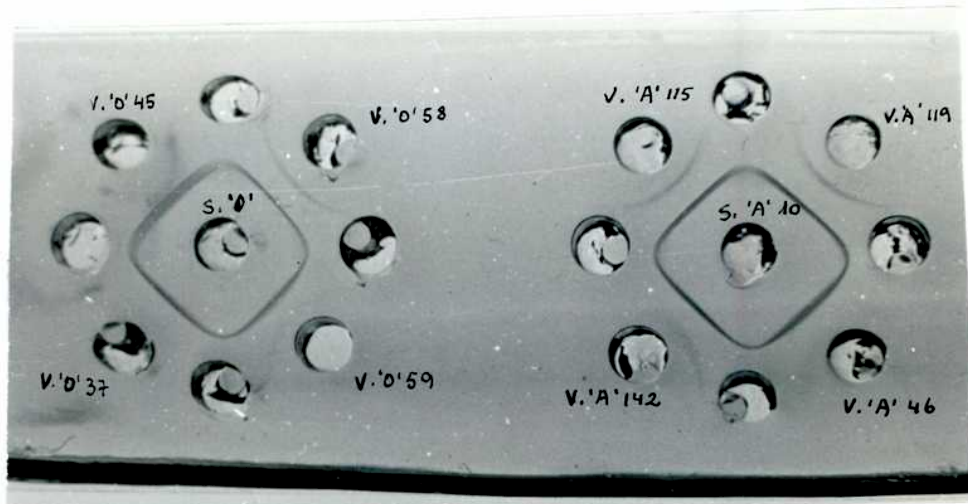
Virus "O" Nº 12.(Reacción: negativa)

Virus "A" Nº 24.(Reacción: negativa)

Virus "C" Nº 104, inactivado, concentrado por ultracentrifugación.(Reacción positiva)

Suspensión epitelio normal lingual de bovino Nº52.(Control negativo)

FOTOGRAFIA Nº 6



Referencias:

Micro-técnica de OUCHTERLONY en portaobjeto.

Suero "O" Nº 18

Virus "O", Nº 37, inactivado (Reacción positiva)

Virus "O", Nº 45, inactivado (Reacción positiva)

Virus "O", Nº 58, s/inactivar (Reacción positiva: dos líneas)

Virus "O", Nº 59, s/inactivar (Reacción positiva)

Los orificios intermedios no se sembraron.

Suero "A", Nº 10

Virus "A", Nº 142 s/inactivar (Reacción positiva 2 líneas)

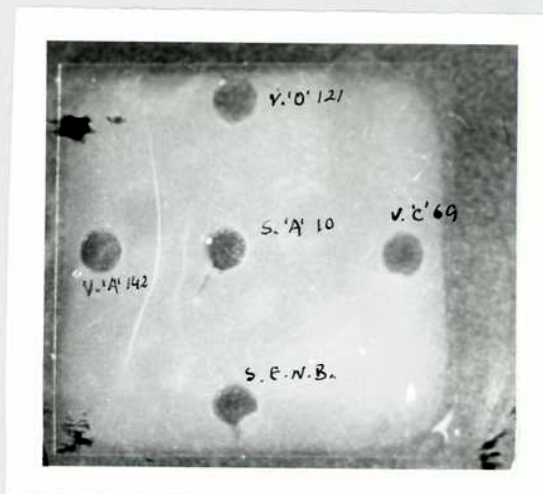
Virus "A", Nº 115 s/inactivar (Reacción positiva 2 líneas)

Virus "A", Nº 119 s/inactivar (Reacción positiva 2 líneas)

Virus "A", Nº 46 inactivado (Reacción positiva, 1 línea.)

Los orificios intermedios no fueron sembrados.

FOTOGRAFIA Nº 7



Referencias:

Micro-técnica en cubreobjeto.

Suero "A", Nº 10

Virus "A", Nº 142 (Reacción positiva: 2 líneas)

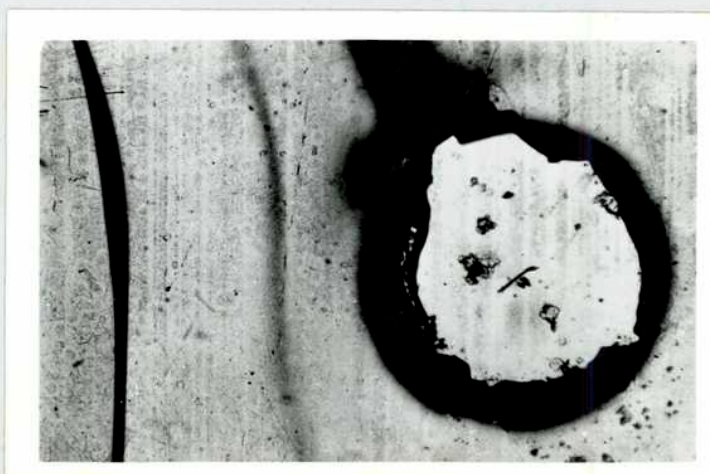
Virus "O", Nº 121 (Reacción negativa)

Virus "C", Nº 69 (Reacción negativa)

Suspensión epitelio normal lingual de bovino

Nº 52 (Control negativo)

FOTOGRAFIA Nº 8



Referencia:

Fotografía Nº 7 en aumento, mostrando un orificio y las dos bandas de precipitación.

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, DE EPITELIO Y DE CULTIVO, POR LA PRUEBA DE DIFUSION EN AGAR.

CLASE DE VIRUS	VIRUS DE EPITELIO	VIRUS DE CULTIVO	VIRUS DE EPITELIO + VIRUS de CULTIVO
VIRUS TIPO "O"			
VIRUS TIPO "A"			
VIRUS TIPO "C"			

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, EN FUNCION DEL TITULO DEL VIRUS, EN LA PRUEBA DE DIFUSION EN AGAR

TITULO DEL VIRUS	TITULO DEL VIRUS				
	MENOR de 10^{-20}	de 10^{-20} a 10^{-26}	de 10^{-27} a 10^{-30}	MAYOR de 10^{-30}	
VIRUS TIPO "O"					
VIRUS TIPO "A"					
VIRUS TIPO "C"	(2)			(2)	

Referencias:

- (1) † sector proporcional al % de positividad.
- sector proporcional al % de reacciones negativas.
- (2) Para el virus "C" no se tipificaron muestras con esos títulos.

CUADRO N°13

TITULO DE LOS SUEROS AFTOSOS HIPERINMUNES OBTENIDOS EN LA PRUE-
BA DE DIFUSION EN AGAR SEGUN LA MICRO-TECNICA DE OUDIN

Muestra N°	Antisuero Tipo	Título (1)
1	O	1:16
2	O	1:32
3	O	1:32
4	A	- (2)
5	A	1:64
6	C	1:64
7	C	1:16
8	C	1:32
9	O	1:32
10	A	1:64
11	C	1:64
12	O	1:64
13	A	-
14	C	1:32
15	O	1:32
16	A	1:32
17	C	1:64
18	O	1:64
19	A	-

20	C	1:16
21	A	1:32
22	O	1:64
23	O	1:64
24	C	1:64
25	O	1:32
26	A	1:32
27	C	1:32
28	O	-
29	A	1:64
30	C	1:64

Referencias:

- (1) - Se denomina título a la mayor dilución del antisuero que da líneas de precipitación netas.
- (2) - Los antisueros consignados con (-) corresponden a partidas no tituladas por este método.

CUADRO N° 14

TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO POR EL METODO DE DIFUSION EN AGAR

Muestra N°	Virus Tipo	Virus s/concentrar Método Ouchterlony	Virus concentrado con SO ₄ (NH ₄) ₂ Método Ouchyrtlony	Virus concentrado Ultracentrifugado Método Ouchterlony
1	O	Neg.	Neg.	O+
2	A	Neg.	A+	--
3	C	Neg.	Neg.	Neg.
4	O	Neg.	Neg.	Neg.
5	A	Neg.	Neg.	A+
6	A	Neg.	Neg.	Neg.
7	A	Neg.	Neg.	Neg.
8	C	Neg.	Neg.	C+
9	A	Neg.	Neg.	A+
10	O	Neg.	O+	--
11	A	Neg.	Neg.	A+
12	O	Neg.	O+	--
13	A	Neg.	--	--
14	A	Neg.	A+	--
15	C	Neg.	Neg.	Neg.
16	O	Neg.	Neg.	O+
17	O	Neg.	Neg.	Neg.
18	C	Neg.	--	--
19	A	Neg.	Neg.	A +
20	A	Neg.	--	--
21	O	Neg.	O+	--
22	C	Neg.	Neg.	C+
23	O	Neg.	O+	--
24	A	Neg.	A+	--
25	C	Neg.	C+	--
26	O	Neg.	O+	--
27	C	Neg.	Neg.	C+

28	O	Neg.	--	--
29	O	Neg.	Neg.	O+
30	O	Neg.	O+	--
31	C	-- (1)	C+	--
32	O	--	Neg.	O+
33	A	--	A+	--
34	C	--	Neg.	Neg.
35	O	--	Neg.	Neg.
36	A	--	Neg.	A+
37	O	--	O+	--
38	A	--	A+	--
39	C	--	C+	--
40	A	--	Neg.	A+
41	C	--	Neg.	C+
42	A	--	Neg.	Neg.
43	O	--	O+	--
44	A	--	Neg.	Neg.
45	O	--	O+	--
46	A	--	Neg.	A+
47	C	--	C+	--
48	C	--	Neg.	Neg.
49	A	--	A +	--
50	A	--	Neg.	A+
51	A	--	Neg.	Neg.
52	--	--	--	--
53	O	--	Neg.	O+
54	O	--	O+	--
55	A	--	Neg.	Neg.
56	C	--	Neg.	C+
57	C	--	C+	--
58	O	--	Neg.	O+
59	O	--	Neg.	O+
60	C	--	Neg.	Neg.
61	C	--	C+	--

62	O	---	Neg.	O4
63	C	---	Neg.	---
64	O	---	O+	---
65	O	---	O+	---
66	A	---	A+	---
67	C	---	Neg.	C+
68	O	---	Neg.	Neg.
69	C	---	C+	---
70	C	---	C+	---
71	A	---	A+	---
72	C	---	Neg.	Neg.
73	O	---	---	---
74	O	---	Neg.	O+
75	O	---	Neg.	O+
76	A	---	---	---
77	O	---	---	---
78	C	---	C+	---
79	O	---	Neg.	O+
80	O	---	Neg.	O+
81	C	---	Neg.	Neg.
82	O	---	---	---
83	A	---	A+	---
84	A	---	A+	---
85	O	---	Neg.	O+
86	C	---	Neg.	C+
87	O	---	O+	---
88	A	---	Neg.	Neg.
89	C	---	C+	---
90	O	---	Neg.	Neg.
91	A	---	A+	---
92	C	---	C+	---
93	---	---	---	---
94	O	---	Neg.	O+
95	O	---	Neg.	Neg.

96	O	---	Neg.	O+
97	A	---	Neg.	Neg.
98	A	---	Neg.	Neg.
99	A	---	Neg.	Neg.
100	A	---	Neg.	Neg.
101	A	---	Neg.	Neg.
102	A	---	Neg.	Neg.
103	A	---	A+	---
104	C	---	Neg.	C+
105	C	---	Neg.	C+
106	O	---	O+	---
107	O	---	O+	---
108	O	---	O+S	---
109	O	---	O+	---
110	O	---	O+	---
111	O	---	O+	---
112	A	---	A+	---
113	A	---	Neg.	Neg.
114	A	---	Neg.	Neg.
115	A	---	Neg.	A+
116	O	---	Neg.	O+
117	A	---	Neg.	Neg.
118	O	---	O+	---
119	A	---	A+	---
120	A	---	Neg.	Neg.
121	O	---	O+	---
122	O	---	O+	---
123	O	---	O+	---
124	A	---	A+	---
125	A	---	Neg.	A+
126	O	---	Neg.	Neg.
127	O	---	Neg.	Neg.
128	A	---	Neg.	A+
129	C	---	C+	---

130	C	---	Neg.	Neg.
131	O	---	O+	---
132	A	---	A+	---
133	C	---	C+	---
134	O	---	O+	---
135	A	---	A+	---
136	C	---	C+	---
137	---	---	---	---
138	O	---	O+	---
139	A	---	A+	---
140	C	---	C+	---
141	O	---	O+	---
142	A	---	A+	---
143	C	---	C+	---
144	C	---	C+	---

Referencias:

(1) : Las muestras a partir del N° 30 en adelante no se realizan en la dilución sin concentrar.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bechold, H.: citado por Kabat, E.A. and Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry, Second Edition, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois U.S.A., p. 78, 1961.-
- 2) Oudin, J.: Comptes rend. Acad. Sc., 222: 115, 1946.-
- 3) Oudin, J.: Annals de l'Institut Pasteur, 75: 30, 1948.-
- 4) Ouchterlony, O. : Progr. Allergy, 5: 1-78, 1948.-
- 5) Elek, S.D.: J. Exp. Path., 118: 756, 1949.-
- 6) Oakley, C.L. and Fullthorpe, A.J.: J. Path. and Bact., 65: 49-60, 1953.-
- 7) Grabar, P. : Bull. soc. chim. biol., 36: 65, 1954.-
- 8) Grabar, P. and Williams, C.A. : Biochim. biophys. Acta, 10: 193, 1953.-
- 9) Grabar, P. and Williams, C.A. : Biochim. biophys. Acta, 17: 67, 1955.-
- 10) Feinberg, J.G. : Internat. Arch. Allergy, 11: 129, 1957.-
- 11) Korngol, L. and Van Leeuwen Gerda. : J. Immunol. 78: 172, 1957.-
- 12) Neff, J.C. and Becker, E.L. : J. Immunol. 78: 5, 1957.
- 13) Engelberg, J. : J. Immunol. , 82: 467, 1959.-
- 14) Preer, J.R. : J. Immunol., 77: 52-60, 1956.-
- 15) Ouchterlony, O. : Acta Path. Microbiol. Scand., 25: 186, 1948.-
- 16) Brown, F. and Crick, J. : Virology, 5: 133-144, 1958.-
- 17) Crowle, A.J. : J. Lab. and Clin. Med., 52: 784-787, 1958.-
- 18) Grasset, E., Bonifas, V. and Pongratz, E. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 97: 72-77, 1958.-
- 19) Margni, R.A. : Comunicación personal.

AGLUTINACION

Si definimos los "anticuerpos como globulinas modificadas por un animal en respuesta a la introducción de un antígeno y que tienen la propiedad de reaccionar con él de un modo específico, en cualquier forma susceptible de ser observada (1,2), inferimos que, las distintas denominaciones con que se designa la unión antígeno-anticuerpo, dependen de la forma en que esta reacción se pone en evidencia.

Así, cuando GRUBER y DURHAM (3) comunican la agrupación específica del vibrión colérico, frente al antisuero correspondiente (reacción de aglutinación) o cuando KRAUS (4) observa la precipitación específica formada al poner en contacto suero antivibrión colérico frente a filtrado estéril de los cultivos del mismo germen (reacción de precipitación), ponen de manifiesto dos facetas de un mismo fenómeno.

DOERR (2) destaca claramente " que si un mismo antígeno aglutina las bacterias intactas y precipita los extractos de las mismas; parece poco probable que precipitinas y aglutininas no sean sino una doble designación de los mismos anticuerpos ".

Nosotros, para denominar este tipo de reacciones, hemos seguido el criterio de KABAT y MAYER (5) para quienes " cuando el antígeno tiene una dimensión molecular tal que puede permanecer en solución, es adecuado denominar a la agrupación con el anticuerpo, como una precipitación; en el caso de las partículas antigénicas que centrifugan alrededor de 1.000 a 2.000 r.p.m. o en el caso en que aparezcan como partículas de regular tamaño bajo el microscopio, al estado de agregación de estas partículas suspendidas, corresponde llamar aglutinación".

Si comparamos la reacción de aglutinación de un bacilo frente a su antisuero homólogo y la de precipitación de una molécula de globulina frente a su antiglobulina, veremos que, la diferencia de tamaño entre ambas se traduce, como bien lo hace notar ADLER (6), en una diferencia apreciable del número de grupos antigénicos receptores, que en la *Salmonella typhosa* O 901, es de $5,6 \times 10^5$ en la superficie total, en contraste con los 62 receptores potenciales y 30 receptores efectivos que tiene, por ejemplo, la molécula de ovoalbúmina. Esto explica por qué se necesitan

menos moléculas de un anticuerpo para poner de manifiesto una reacción de aglutinación que una de precipitación, al par que aclara el por qué un mismo antisuero da generalmente más alto título cuando se lo mide por aglutinación que por precipitación.

GRUBER, sugirió el nombre de aglutinación para designar este fenómeno e intentó explicarlo suponiendo que la formación de grumos era debido a la acción de una aglutinina sobre la membrana de la bacteria que se hacía más y más viscosa, facilitándosele de este modo, su aglutinación.

BORDET (7,8) define la aglutinación como " la unión en masa de partículas organizadas que por alguna peculiar influencia, cambian sus propiedades de adhesión molecular ". Sus experiencias con suspensiones de *Microspira comma*, en soluciones salinas y en agua destilada, frente al antisuero colérico, lo llevaron a pensar que este tipo de reacciones serológicas se desarrolla en dos fases:

- 1) La primera fase-fase de adsorción de la aglutinina específica estaba regida por las leyes físicoquímicas de la adsorción (isoterma de LANGMUIR)
- 2) La segunda fase-fase de aglutinación- era función de la concentración de electrolitos del medio.

MARRACK (9) confirma este punto de vista y demuestra que existe un óptimo de precipitación a una determinada concentración salina y que, a concentraciones mayores, la precipitación disminuye debido a la formación de una atmósfera electrolítica, alrededor de los iones polares del antígeno y el anticuerpo, que reduce la atracción entre ambos.

EHRlich (10) refuta la hipótesis de BORDET y destaca la importancia de la estructura química de la aglutinina a la que se supone poseedora de grupos capaces de producir la aglutinación. Estas ideas son retomadas por LANDSTEINER (11) quien analiza el fenómeno de la especificidad de las reacciones serológicas desde el punto de vista químico y estereoquímico. Su libro " The Specificity of Serological Reactions " es una clásica obra en el estudio de los fenómenos de inmunoquímica.

NORTHROP Y DEKRUIF (12) modifican la teoría de las dos fases de BORDET e incorporan a ella los conceptos de BECHOLD, H. J. y NEISSER y FRIEDEMANN (13) respecto al papel que juegan las cargas eléctricas perdidas en el fenómeno de la aglutinación. Sus ideas pueden resumirse en los siguientes postulados (14):

- 1) La aglutinación debe ser considerada como la resultante de dos fuerzas antagónicas, una fuerza de repulsión debidas a las cargas eléctricas que tienden a mantener a las bacterias separadas y una fuerza de cohesión que tiende a producir la agrupación. En una suspensión bacteriana las fuerzas de repulsión son, en general, mayores que las de cohesión y todo factor que modifique este equilibrio, produce la floculación.
- 2) En el caso de bacterias no sensibilizadas, los electrolitos en concentraciones menores que 0,01 N afectan esencialmente el potencial y en diluciones mayores que 0,01 N afectan principalmente a las fuerzas de cohesión.
- 3) Se puede así, sin alterar las fuerzas de cohesión, producir la aglutinación por reducción de la carga, por efecto de los electrolitos, a un nivel inferior al nivel crítico que está alrededor de los 15 mV.
- 4) Cuando las bacterias se tratan con suero inmune, su fuerza de cohesión es protegida de alguna manera del efecto depresor de la sal concentrada y la aglutinación está determinada solamente por la carga. Por eso es que cuando el potencial de una bacteria sensibilizada se reduce, por la acción de un electrolito, a un valor menor que 15 mV., la suspensión aglutina.

PRESSMAN, CAMPBELL y PAULING (15) con agudo sentido crítico, ponen en duda la influencia de las cargas de superficie reducidas en el fenómeno de la aglutinación. En una ingeniosa experiencia copulan no más de 60 grupos azo por célula y las enfrentan con los antisueros correspon-

dientes, observando que se produce la hemoaglutinación. Luego hacen el siguiente razonamiento: " si se supone el anticuerpo extendido en una fina película de 3,5 Angström sobre la membrana celular, ocuparía sólo un 0,02 % de la superficie total " lo que les condujo a pensar que en el sistema antígeno-anticuerpo por ellos estudiado, la aglutinación no era debida a cambios en las propiedades de la superficie de la célula.

MARRACK (9), explica el mecanismo de la precipitación, suponiendo que el estado de agregación, es función de la atracción específica entre las partículas que es mutua y debida a la ligadura suministrada por ulteriores moléculas de antígeno. Bastan, de acuerdo a su hipótesis, dos grupos determinantes para que una molécula pueda formar un agregado de tamaño ilimitado, lográndose una arquitectura molecular similar a la de un "enrejado".

HEIDELBERGER y KENDALL (16,17) identifican el mecanismo que rige la formación de los precipitados inmunes, al que regula la aglutinación de una bacteria por su antisuero. Eligen como sistema de trabajo el polisacárido específico del Neumococo tipo III, de naturaleza no proteica y su antisuero homólogo. La velocidad y el óptimo de esta reacción pueden medirse en función del nitrógeno proteico de los precipitados que es proporcionado exclusivamente por el anticuerpo. De esta forma, la cinética podía expresarse cuantitativamente como una reacción bimolecular seguida de una serie de reacciones competitivas que dependen de la proporción relativa de los componentes.

BOYD (18) resume las ideas de HEIDELBERGER en cuatro premisas esenciales:

- 1) El antígeno (G) y el anticuerpo (A) son química e inmunológicamente multivalentes uno con respecto del otro, es decir, cada sustancia posee dos o más agrupaciones capaces de reaccionar con la otra.
- 2) El anticuerpo puede ser considerado matemáticamente como si su comportamiento medio fuese el de una sustancia simple.

- 3) La reacción se concibe como una serie de reacciones bimoleculares que tienen lugar antes que ocurra el de una sustancia simple.
- 4) La Ley de acción de las masas se aplica siempre que las cantidades formadas de los productos de la reacción, sean proporcionales a las concentraciones de las sustancias reaccionantes.

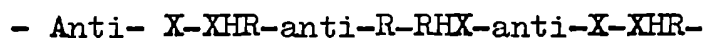
La teoría de MARRACK-HEILDELBERGER es la que mejor explica las reacciones de aglutinación y precipitación en los sistemas antígeno-anticuerpo y los datos experimentales confirman sus puntos de vista: Pauling y colaboradores (19) demuestran que en la precipitación de los haptenes sintéticos con dos o más grupos combinantes específicos frente al antisuero homólogo se forman compuestos del tipo:



tal como lo predice la teoría.

Igualmente concluyentes son las experiencias de PAULING, PRESSMAN y CAMPBELL (20) quienes mediante la síntesis de un haptene con dos grupos específicos conocidos: R (ácido arsanílico) y X (ácido carboxílico) y la obtención de sueros anti-R y anti-X prueban que:

- 1) El haptene no precipita ni con el antisuero R ni con el antisuero X.
- 2) La precipitación tiene lugar con una mezcla equimolecular de suero anti-R - anti-X.
- 3) Los precipitados tienen una constitución del tipo:



GHOSH (21) analiza las reacciones antígeno-anticuerpo con criterio físicoquímico y resuelve matemáticamente el estudio de las condiciones de equilibrio, suponiendo:

- 1) Que el antígeno se combina reversiblemente con el anticuerpo en proporciones múltiples.
- 2) Que la afinidad de cualquier posición no es afectada por el estado de combinación de cualquier otra posición del antígeno.

A partir de estas premisas, dedujo una expresión matemática similar a la isoterma de LANGMUIR (22).

KLOTZ (23), FOWLER (24) y BOYD (25) encuentran distintas ecuaciones que describen la cinética del proceso y que, cuantitativamente, muestran una significativa coincidencia entre los valores que predice la teoría matemática y los encontrados experimentalmente.

En nuestra investigación seleccionamos los soportes inertes empleados en distintos sistemas antigénicos: bentonita (26, 27, 28), caolín (29,30), resinas de intercambio iónico (31,32), colodio (33,34,35) y látex (36,37,38,39,40,41) procurando adaptar los trabajos originales, al caso particular de los virus aftosos.

Optamos, finalmente, por suspensiones de partículas de colodio y de látex que tienen sobre los restantes soportes inertes, la ventaja de proporcionar dispersiones estables, de partículas de diámetro uniforme.

AGLUTINACION DE PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS

1) Introducción

Las partículas de látex son un soporte biológicamente inerte, que proporcionan una superficie esférica de diámetro uniforme y libre de toda interferencia orgánica (42). En suspensiones acuosas están cargadas negativamente, lo que las hace sumamente estables.

ORESQUES y SINGER (43), estudian el mecanismo de la adsorción de gamma globulina humana a partículas de látex de poliestireno y expresan sus resultados en la siguiente ecuación:

$$\frac{r}{a} = KN - Ka$$

en donde , r es la cantidad de proteína adsorbida; a, la cantidad de proteína remanente en solución cuando se alcanza el equilibrio; N, la cantidad máxima de proteína que puede ser adsorbida y K, una constante,

La cantidad de proteína adsorbida, por miligramo de látex, es mayor para las partículas más pequeñas, lo que era previsible, por ser la superficie del agente adsorbente inversamente proporcional al diámetro de sus partículas.

De esta manera, una partícula de 0,20 micrones de diámetro, adsorbe por unidad de peso, cuatro veces más gamma globulina que una partícula de 0,80 micrones de diámetro.

En algunos sistemas antigénicos, tiene especial importancia la forma en que se obtiene la gamma globulina.

SINGER, ALTMAN, GOLDENBERG y PLOTZ (44) destacan que, en la sensibilización del látex con gamma globulina, para la prueba diagnóstica de la artritis reumatoidea, se debe usar exclusivamente la fracción II de COHN (45) por ser el único procedimiento que permite obtener una gamma globulina adecuada a la reacción. Hacen notar que las gamma globulinas obtenidas por electroforesis a flujo continuo, fraccionamiento salino, filtración

por gel, etc., suelen dar reacciones falsas negativas, fenómenos de prozona e incluso inhibición de la aglutinación (42,45).

Nosotros ensayamos, con buenos resultados, la obtención de la gamma globulina:

- 1) Por precipitación con cincuenta volúmenes de sulfato de amonio 1,39 M y agitación a 37° C, dejando en heladera a 0° C. durante 24 horas, para completar la precipitación. Centrifugación posterior a 2500 r.p.m. durante 30 minutos y resuspensión del depósito a su volumen original (45).
- 2) Por precipitación con soluciones de etanol 95% en las condiciones de pH., temperatura y fuerza iónica que describen COHN y colaboradores (46).

Ambos tipos de gamma globulinas no mostraban, electroforéticamente, rastros de albúmina, condición esencial para que la reacción se produzca.

A pesar de que la cantidad de proteína adsorbida, por miligramo de látex, es mayor para las partículas más pequeñas, los trabajos de LOMBAN, VAZQUEZ SAAVEDRA y SA FLEITAS (47) demuestran que, en el caso del virus aftoso, el óptimo de aglutinación se logra con partículas de 0,81 micrones de diámetro.

Estos resultados parecieran indicar que la reacción depende no solamente de la adsorción de gamma globulina al soporte inerte, sino también de otros factores que deben ser estudiados: punto isoeléctrico y tamaño de los virus, fuerza iónica y pH. de las suspensiones.

En nuestro trabajo analizamos la sensibilidad de la reacción en relación con la gamma globulina adsorbida y en función del pH., la temperatura y el tiempo de incubación, tanto en la fase de sensibilización como en la de aglutinación propiamente dicha.

2) Equipo

- a) Se emplea el instrumental descrito en el capítulo Técnica General.
- b) Agitador eléctrico universal con reóstato para regulación de velocidades de 1/50 H.P. Emil Gruner & Co. .-

3) Material de vidrio

Se emplea el material de vidrio descrito en el capítulo Técnica General.

4) Drogas

- a) Polystyrene látex particles (Dow Chemical Company, Midland, Mich.): suspensión de látex con 27,6 % de sólidos totales y diámetro medio de las partículas: 0,81 micrones (L.D. 0,81).
- b) Styrene-butadiene látex: Dow Latex 630 (Dow Chemical Company, Midland, Mich.): suspensión de látex con 48 % de sólidos totales y diámetro medio de las partículas de 0,14 micrones (L.D. 0,14).
- c) Polystyrene látex particles (Dow Chemical Company Midland, Mich.): suspensión de látex con 40 % de sólidos totales y diámetro medio de las partículas de 0,5-2,0 micrones. Por centrifugación fraccionada se preparan suspensiones con partículas de 0,5-1,0 micrones (L.D. 0,5-1,0) y partículas de 1,5-2,0 micrones (L.D. 1,5-2,0).
- d) Polystyrene látex particles (Molter, Serum-Institut Dr. Hans Molter: 6900. Heidelberg) Suspensión de partículas de látex con 10 % de sólidos totales y diámetro medio de las partículas de 0,81 micrones (L.M. 0,81).
- e) Cloruro de sodio: Sodium chloride "Analar", NaCl, M.W. 58,45 B.D. H,
- f) Hidróxido de sodio: Sodium hydroxide "Analar", Na.OH, M.W. 40,00 B.D.H.

- g) Cloruro de calcio: Calcium Chloride "Analar" CaCl_2 , M. W. 110,99 B.D.H. -
- h) Acido bórico: Boric acid, Baker Analyzed Reagent, H_3BO_3 , M.W. 61,84, J. T. BAKER. -
- i) Glicina: glycine: $\text{H}_2\text{N}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$ M.W. 75 Pfanstiehl Lab. Inc. Wankegan. Illinois. U.S.A.
- j) Acido clorhídrico: Duperial, Cl H, P.M. 36,46 Dens. 1,185-1,192, Ind. Arg.

5) Reactivos

a) Soluciones salinas:

1) Solución tampón de glicina (pH 8,2)

ClNa	9,00 g.
Cl ₂ Ca	1,00 g.
Glicina	7,31 g.
Na.OH N	3,50 ml.
H ₂ O bidestilada c.s.p. ...	1 litro.

2) Solución "tampón" de boratos (pH 8,2)

H ₃ BO ₃ 0,1 M.	50 ml.
Na.OH 0,1 N.	5,90 ml.
ClNa	0,85 g.
H ₂ O bidestilada c.s.p.	100 ml.

3) Solución de sulfato de amonio 1,39 M.

SO ₄ (NH ₄) ₂	183,50 g.
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1 litro

b) Suspensiones de látex para la prueba:

A partir de las suspensiones originales de látex, se preparan

suspensiones en "tampón" de borato (pH 8,2) o de glicina (pH 8,2), de modo tal que su concentración sea el doble de la concentración, cuya turbidez corresponda a la escala N° 6 de McFARLAND. Las suspensiones finales de látex se denominan de acuerdo al tipo de látex, al tamaño de la partícula y al tampón en que se las suspendió:

- 1) L.D. 0,81 G
- 2) L.D. 0,14 B.
- 3) L.D. 0,5-1,0 B.
- 4) L.D. 1,5-2,0 B.
- 5) L.M. 0,81 G.

METODO

La prueba consiste en provocar la aglutinación específica de partículas de látex, sensibilizadas con las gamma globulinas de los antisueros aftosos, frente a diluciones crecientes de los antígenos homólogos.

La pauta de trabajo comprende cuatro partes:

- a) Sensibilización de las partículas de látex.
 - b) Diluciones de los antígenos.
 - c) Determinación del título de la gamma globulina adsorbida.
 - d) Tipificación de las muestras de virus aftosos.
- a) Sensibilización de las partículas de látex con gamma globulina de los antisueros aftosos.

La sensibilización de las partículas de látex, se realiza según la relación: 9,5 ml. de la suspensión madre de látex + 0,5 ml. de solución de gamma globulina.

- 1) Preparar diluciones de la gamma globulina del antisuero aftoso "O", tipo, desde 1:5 hasta 1:2560.
- 2) Colocar en gradilla para tubos de ensayo, una fila de 10 tubos.
- 3) Poner en el último tubo 0,50 ml. de la dilución 1:2560, continuar de igual modo con los otros tubos, hasta la dilución 1:5 del primer tubo.
- 4) Agregar a todos los tubos 9,5 ml. de la suspensión madre de látex.
- 5) Preparar iguales diluciones con las gamma globulinas de los sueros normal de cobayo y antirrábico equino, usando la relación 0,1 ml. de cada dilución más 1,9 ml. de la suspensión madre de látex, para la sensibilización.
- 6) Repetir los pasos 1 al 5, con la gamma globulina de los antisueros aftosos "A" y "C" respectivamente.
- 7) Tapar los tubos, agitarlos intensamente e incubar en heladera a 4° C durante 24 horas.

b) Diluciones de los antígenos.

- 1) En gradilla para tubos de ensayo colocar 1 fila de 12 tubos.
- 2) En los 7 primeros tubos se efectúan diluciones del antígeno "O", tipo, en volúmenes de 6 ml. desde 1:1 hasta 1:64.
- 3) En el tubo N° 8 se agrega, cuando se dispone de él, 6 ml. de un antígeno "O" ya titulado (control positivo).
- 4) En los tubos N° 9 y 10 se preparan iguales volúmenes de los antígenos A y C (controles de especificidad).
- 5) En el tubo N° 11, se preparan 6 ml. de suspensión de epitelio lingual normal de bovino en dilución 1:2 .
- 6) En el último tubo se preparan 12 ml. de una dilución 1:2 del

antígeno "O", tipo.

- 7) Repetir los pasos 1 al 6, para los otros dos antígenos tipo "A" y "C".

c) Determinación del título de la gamma globulina adsorbida:

- 1) Preparar, en gradilla para tubos de hemólisis, trece filas de 10 tubos cada una. (Ver cuadro tipo N° 15).
- 2) En las filas N° 1 al 7, colocar en cada tubo 0,5 ml. de las respectivas diluciones del antígeno "O".
- 3) En los tubos de la fila N° 8, colocar 0,5 ml. del antígeno "O" en la dilución 1:2 (control positivo).
- 4) En las filas N° 9 y 10 colocar 0,5 ml. de los antígenos A y C, en la dilución 1:2.
- 5) En la fila N° 11, se colocan 0,5 ml. de la suspensión de epitelio lingual normal de bovino.
- 6) Agregar a los tubos de las filas N° 12 y 13, 0,5 ml. del antígeno "O" en la dilución 1:2.
- 7) Agitar la gradilla un minuto para la homogeneización de los tubos.
- 8) Incubar durante 90 minutos a 56° C. en baño de María.
- 9) Centrifugar 5 minutos a 2.500 r.p.m. -
- 10) Leer a ojo desnudo, sobre fondo negro y con fuerte iluminación lateral, agitando suavemente los tubos.
- 11) Los resultados se protocolizan de acuerdo al siguiente criterio de lectura:
 - 4+ flóculos grandes (2-3 mm) observables a simple vista con clarificación de la suspensión.
 - 3+ flóculos medianos (1-2 mm) y clarificación del medio.

2+ flóculos finos, fácilmente visibles y escasa clarificación del medio.

1+ flóculos muy finos.

+ flóculos extremadamente finos, difícilmente visibles (dudoso).

- los tubos son considerados negativos cuando muestran una apariencia opalescente, sin depósito o con pequeño depósito, que se dispersa con facilidad por agitación suave (ver fotografía N° 9).

12) Se denomina "título de la gamma globulina", a la más alta dilución de la misma que da aglutinación 4+ con una de las diluciones del antígeno homólogo tipo, dilución esta que, a su vez, se designa "título" del antígeno.

13) Determinados los títulos de las gamma globulinas O, A y C y los títulos de los antígenos tipos correspondientes, se fraccionan y rotulan consignando la fecha en que se efectuó la prueba, y se conservan en la congeladora a -30° C., hasta el momento en que se los emplee para la tipificación.

d) Tipificación de los virus aftosos.

1) En gradilla para tubos de hemólisis preparar una fila de 4 tubos por cada virus a tipificar: rotular indicando N° de virus (ver cuadro N° 16).

2) Incorporar 3 filas de 4 tubos cada una para los antígenos controles positivos.

3) En los tubos de las hileras N° 1, 2 y 3, colocar 0,5 ml. de la suspensión de látex sensibilizado con gamma globulina de los antisueros O, A y C respectivamente, en su título.

4) En los tubos de la última hilera agregar 0,5 ml. de la suspensión

madre de látex, en tampón de glicina.

- 5) Agregar en los tubos de cada fila 0,5 ml. de las suspensiones virales problema y en las tres últimas filas 0,5 ml. de las suspensiones de los antígenos O, A y C tipos, como controles positivos.
- 6) Agitar intensamente durante un minuto e incubar una hora y media a 56° C. en baño de maría.
- 7) Centrifugar 3 minutos a 2.500 r.p.m. -
- 8) Leer y consignar los resultados en el protocolo.

Este tipo de prueba se realizó con los sistemas siguientes:

- a) Aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con gamma globulina frente a los virus a tipificar.
- b) Aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con los antisueros aftosos frente a los virus problema.
- c) Aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con virus aftosos problema, frente a los antisueros aftosos.

7) Resultados.

Para realizar la prueba de aglutinación de partículas de látex, se procedió primero a estudiar las condiciones de trabajo que dieran resultados comparables y reproducibles.

Se efectuaron reacciones de aglutinación de partículas de látex (L.M.0,81) sensibilizadas con las gamma globulinas de los tres tipos de sueros, frente a los virus homólogos, usando como variables, en la fase de sensibilización, la temperatura (0° , 25°), el pH (7,0- 8,2) y el tiempo de incubación (2,24 horas). Cuadro N° 17.

Los resultados de esas pruebas condujeron a fijar las variables en: 0°C , 24 h. y pH 8,2.

En las otras condiciones de trabajo, se obtenían reacciones negativas y algunas inespecíficas.

Estas pruebas se realizaron también con partículas de látex de distintos tamaños y procedencias (ver Drogas).

De todas ellas las que dieron aglutinación positiva y específica fueron las de Dow Chemical Company, 0,81 y las de Molter Serum Institut 0,81; optamos finalmente por las L.M. 0,81, por sernos más accesible su provisión. Una vez elegidas las partículas (L.M.0,81) y establecidas las condiciones de trabajo (0°C , 24 h. y pH 8,2) se procedió a titular los sueros hiperinmunes.

Se titularon 23 sueros hiperinmunes, contra los antígenos patrones, obteniendo títulos que van desde 1:80 a 1:320. Cuadro N° 18.

Una vez conocidos los títulos de los sueros hiperinmunes, se los aplicó en la tipificación de las muestras virales.

Se estudiaron 132 muestras a las que se les determinaron sus tipos (Ver Cuadro N° 19), obteniéndose un 90% de reacciones positivas para los virus de epitelio y un 60% para los de cultivo. Sobre el total de las muestras la positividad fué del 81%. Gráfico N° 10.

En las reacciones de tipificación por partículas de látex, si se expresa la positividad obtenida en función del título del virus, se observa que para el virus "0", a títulos menores que $10^{-7,0}$ le corresponden reacciones positivas en el 50% de las pruebas estudiadas; entre $10^{-7,0}$ y $10^{-7,6}$, 65%; con títulos $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$, 70% y a títulos mayores que $10^{-8,0}$, el 100%. Gráfico N° 11.

Para el virus "A", a títulos inferiores que $10^{-7,0}$, se obtiene 40% de positividad, que asciende al 86% para títulos comprendidos entre $10^{-7,0}$ y $10^{-7,6}$, llegando al 100% para títulos de $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$.

Para el virus "C", a títulos comprendidos entre $10^{-7,0}$ y $10^{-8,0}$, se obtuvo 100% de positividad.

Los antígenos usados para esta prueba(132), correspondientes a los tres tipos de virus, tanto las muestras de epitelio lingual como los virus de cultivo, dieron aglutinación positiva frente a los antisueros homólogos y resultados negativos frente a los antisueros heterólogos lo mismo que con los sueros controles negativo y de especificidad.

Para determinar la sensibilidad de la prueba se efectuaron reacciones de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con gamma globulinas de los antisueros aftosos, frente a los virus homólogos, tipos. Los resultados fueron obtenidos de acuerdo a la pauta detallada en el Cuadro N°15. Se consignan a continuación los valores encontrados:

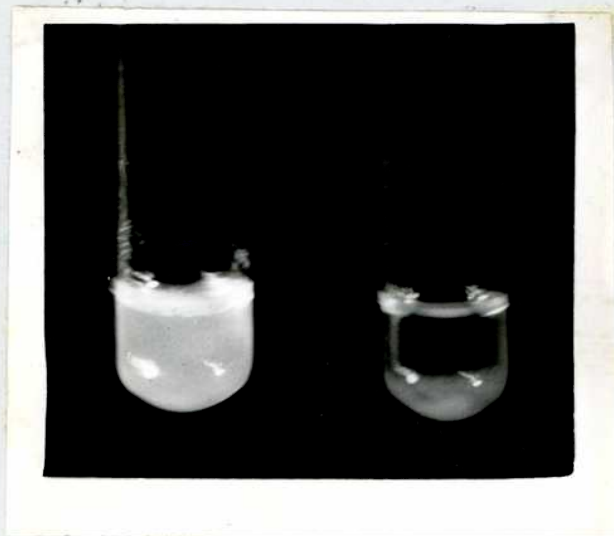
Suero "O", N° 3	1:160	Antígeno "O", N° 90	1:4
Suero "O", N° 9	1:80	Antígeno "O", N°138	1:2
Suero "O", N°25	1:120	Antígeno "O", N° 32	1:2
Suero "A", N° 4	1:100	Antígeno "A", N° 91	1:8
Suero "A", N°16	1:160	Antígeno, N°139 "A"	1:4
Suero "A", N°26	1: 80	Antígeno, "A", N°33	1:2
Suero "C", N°11	1:320	Antígeno "C", N°92	1:8
Suero "C", N°17	1:160	Antígeno "C", N°140	1:2
Suero "C", N°27	1:160	Antígeno "C", N° 34	1:4

Los títulos resultantes para los diferentes antígenos, son ligeramente inferiores a los obtenidos por la técnica de fijación del complemento 100% H. En cuanto al de los antisueros, se obtienen valores similares a los que da el citado método.

Todas estas pruebas se realizaron usando partículas de látex sensibilizadas con gamma globulina y se omiten los resultados obtenidos con partículas sensibilizadas con sueros hiperinmunes y con virus aftosos, en razón de los bajos títulos obtenidos.

Esta reacción por su especificidad y sencillez constituye un procedimiento que puede ser empleado como prueba tamiz en las encuestas epidemiológicas.

FOTOGRAFIA Nº 9



Referencias:

4: flóculos grandes, con clarificación
de la suspensión.

- Apariencia opalescente.

Protocolización de las pruebas de aglutinación de partículas de látex, sensibilizadas con gamma globulina de suero "C"

Antígenos		Diluciones de la gamma globulina tipo "C" (1)													
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560				
Diluciones del antígeno aftoso "C"	Antígeno tipo "C" epitelio lingual de bovino (2)	1:1 (3)	++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+	-	-
		1:2	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+	-	-
		1:4	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+	-	-
		1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Controles	N°1	Antígeno "C" (4) epitelio	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++	-	-	-	-	
	N°2	Antígeno "A" (4) epitelio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N°3	Antígeno "O" (4) epitelio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N°4	Suspensión epitelio lingual normal bovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N°5	Antígeno "C" (5) epitelio	Suero normal de cobayo (control negativo)															
	N°6	Antígeno "C" (5) epitelio	Suero antirrábico equino (control especificidad)															
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias:

- (1) Gamma globulina de suero hiperinmune "C", N° 27, el diluyente fué tampón de glicina.
- (2) Antígeno "C", N° 34.
- (3) Se denomina antígeno en la dilución 1:1, al sobrenadante de la extracción en solución fisiológica, del triturado de epitelio lingual, en relación 1:5 o a los sobrenadantes de los cultivos en medio Frenkel y en B.H.K.
- (4) Se usaron, los antígenos, en sus títulos, cuando se conocían o en la dilución 1:2.
- (5) El antígeno se usó en la dilución 1:2.

Tipificación de virus aftoso por la prueba de aglutinación del latex

Fila nº	Antígenos (1)	Antisue-ro (2) "O" 1:80	Antisue-ro (2) "A" 1:160	Antisue-ro (2) "C" 1:320	Control Antígeno	Resultados
1	nº 1089 A.E.B.	++++	-	-	-	Virus "O"
2	nº 1207 A.E.B.	-	++++	-	-	Virus "A"
3	nº 1232 A.E.B.	-	++	-	-	Virus "A"
4	nº 1588 M.C.	+	-	-	-	Virus "O"
5	nº 30/9/64 E.B.P.	-	-	++++	-	Virus "C"
6	nº 234 A.C.F.	-	-	++	-	Virus "C"
7	nº 17/8/63 B.H.K.(C ₂)	-	-	+++	-	Virus "C"
8	nº 18/4/64 B.H.K.(B ₂)	++++	-	-	-	Virus "O"

Controles (3)

9	Antígeno "O" patrón E.C.P. 1:8	++++	-	-	-
10	Antígeno "A" patrón E.C.P. 1:8	-	++++	-	-
11	Antígeno "C" patrón E.C.P. 1:16	-	-	++++	-

Referencias:

- (1) Antígenos de distintos tipos usados en la dilución 1:1.
- (2) Antisueros aftosos hiperinmunes en la dilución correspondiente a sus títulos.
- (3) Se usan los antígenos "O", "A", "C", en sus respectivos títulos (antígenos patrones).

Protocolo correspondiente a las pruebas de aglutinación de partículas de látex, L.M. 0,81, sensibilizadas con gamma globulina de antisuero aftoso, en función del pH, de la temperatura y del tiempo de incubación, en la fase de sensibilización

				Recíproca de las diluciones de gamma globulina de antisuero aftoso tipo "C" (1)											
Antígenos (2)	pH (3)	Temperatura	Tiempo (h)	5	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560		
Antígeno de epitelio tipo "C"	7,0	0°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			24	+	±	+	±	±	-	-	-	-	-		
	8,2	0°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			24	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	±	-		
7,0	25°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8,2	25°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		24	+	±	+	-	±	-	-	-	-	-	-		
Antígeno de epitelio tipo "O"	7,0	0°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			24	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-		
	8,2	0°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7,0	25°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
8,2	25°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Antígeno de epitelio tipo "A"	7,0	0°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			24	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
	8,2	0°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7,0	25°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
8,2	25°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
				Recíproca de las diluciones de gamma globulina de suero normal de cobayo (control negativo)											
Antígeno de epitelio tipo "C"	7,0	0°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			24	-	±	±	+	-	-	-	-	-	-		
	8,2	0°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7,0	25°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
8,2	25°C	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Referencias:

- (1) Diluciones gamma globulina de antisuero "C", Nº 8 - suspensión látex L.M.0,81.
- (2) Los antígenos usados fueron, "C", Nº 22; "O", Nº 59 y "A", Nº 46.
- (3) pH 7,0 se usó solución fisiológica tamponada con fosfatos.
pH 8,2 tampón de glicina.

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, DE EPITELIO y DE CULTIVO, POR LA PRUEBA DEL LATEX

CLASE DE VIRUS	VIRUS DE EPITELIO	VIRUS DE CULTIVO	VIRUS DE EPITELIO VIRUS DE CULTIVO
VIRUS TIPO "O"			
VIRUS TIPO "A"			
VIRUS TIPO "C"			

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, EN FUNCION DEL TITULO DEL VIRUS, EN LA PRUEBA DEL LATEX

TITULO DEL VIRUS (1)	TITULO DEL VIRUS (1)				
	MENOR de 10 ^{-7,0}	de 10 ^{-7,0} a 10 ^{-7,6}	de 10 ^{-7,7} a 10 ^{-8,0}	MAYOR de 10 ^{-8,0}	de 10 ^{-2,5} a 10 ^{-8,5}
VIRUS TIPO "O"					
VIRUS TIPO "A"					
VIRUS TIPO "C"	(2)			(2)	

- Referencias: (1) + sector proporcional al % de positividad.
 - sector proporcional al % de reacciones negativas.
 (2) Para el virus "C", no se tipificaron muestras con esos títulos.

CUADRO N° 18

TITULO DE LOS SUEROS AFTOSOS HIPERINMUNES OBTENIDOS EN LA
PRUEBA DE AGLUTINACION DE PARTICULAS DE LATEX

Muestra N°	Antisuero Tipo	Título (1)
1	O	1:160
2	O	- (2)
3	O	1:160
4	A	1:80
5	A	1:80
6	C	1:320
7	C	1:160
8	C.	1:160
9	O	1:80
10	A	-
11	C	1:320
12	O	1:80
13	A	1:80
14	C	1:80
15	O	-
16	A	1:160

17	C	1:160
18	O	1:160
19	A	1:80
20	C	-
21	A	-
22	O	1:80
23	O	1:80
24	C	1:160
25	O	1:80
26	A	1:80
27	C	1:160
28	O	-
29	A	1:80
30	C	-
31	O	-
32	A	-
33	C	-

Referencias:

- (1) Se denomina título del antisuero (o de la gamma globulina) a la más alta dilución del mismo que da aglutinación 4+, frente a la mayor dilución del antígeno homólogo, patrón.
- (2) - Los antisueros consignados con (-), corresponden a partidas no tituladas por este método.

CUADRO N° 19

TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO POR LA PRUEBA DEL LATEX

Muestra N°	Virus Tipo	Resultados
1	O	O4+
2	A	A4+
3	C	C4+
4	O	O2+
5	A	A4+
6	A	Neg.
7	A	A4+
8	C	C4+
9	A	A3+
10	O	O2+
11	A	A2+
12	O	O4+
13	A	A4+
14	A	A4+
15	C	C2+
16	O	O4+
17	O	—
18	C	C4+
19	A	A4+
20	A	A2+
21	O	O4+
22	C	C4+
23	O	O4+
24	A	A4+
25	C	C4+
26	O	Neg.
27	C	C4+

28	O	O4+
29	O	O2+
30	O	O4+
31	C	C4+
32	O	O4+
33	A	A4+
34	C	C4+
35	O	O4+
36	A	A4+
37	O	Neg.
38	A	A4+
39	C	C4+
40	A	A1+
41	C	C4+
42	A	Neg.
43	O	O1+
44	A	A4+
45	O	O4+
46	A	A4+
47	C	C3+
48	C	C4+
49	A	A2+
50	A	A4+
51	A	A3+
52	—	—
53	O	O4+
54	O	O4+
55	A	A2+
56	C	C4+
57	C	C4+
58	O	O4+
59	O	O4+
60	C	C1+
61	C	C4+

62	O	Neg.
63	C.	C4+
64	O	O4+
65	O	O4+
66	A	A4+
67	C	C4+
68	O	O4+
69	C	C4+
70	C	C4+
71	A	A4+
72	C	Neg.
73	O	O1+
74	O	O4+
75	O	O2+
76	A	Neg.
77	O	O4+
78	C	—
79	O	O1+
80	O	O2+
81	C	C1+
82	O	O2+
83	A	A4+
84	A	A4+
85	O	O2+
86	C	C4+
87	O	O4+
88	A	A2+
89	C	C4+
90	O	O4+
91	A	A4+
92	C	C4+
93	—	—
94	O	O2+
95	O	Neg.

96	O	O2+
97	A	Neg.
98	A	Neg.
99	A	Neg.
100	A	Neg.
101	A	Neg.
102	A	Neg.
103	A	A ⁺ ₋
104	C	C2+
105	C	C2+
106	O	O2+
107	O	O2+
108	O	Neg.
109	O	O4+
110	O	Neg.
111	O	O1+
112	A	A2+
113	A	A ⁺ ₋
114	A	-
115	A	Neg.
116	O	O1+
117	A	A2+
118	O	O4+
119	A	A2+
120	A	A1+
121	O	O3+
122	O	O2+
123	O	O2+
124	A	A2+
125	A	Neg.
126	O	Neg.
127	O	Neg.
128	A	A1+
129	C	C3+

130	C	Neg.
131	O	O4+
132	A	A1+
133	C	C3+
134	O	—
135	A	—
136	C	—
137	—	—
138	O	O4+
139	A	A4+
140	C	C4+
141	O	—
142	A	—
143	C	—
144	C	C3+

Referencias:

Las muestras indicadas con (—) corresponden a epitelio normal, a fluido vesicular, a linfa de bovino y a antígenos que por no alcanzar el material no se pudieron tipificar.

AGLUTINACION DE PARTICULAS DE COLODIO SENSIBILIZADAS
CON VIRUS AFTOSO

1) Introducción

Las bases teóricas del método de aglutinación con partículas de colodio sensibilizadas fueron establecidas por LOEB (48), quien demostró, que las partículas en suspensión acuosa estaban cargadas negativamente y que la máxima diferencia de potencial cataforético (P.D.) entre las partículas y el líquido dispersante era aproximadamente de 70 mV. Este alto potencial de superficie dá estabilidad a las suspensiones que flocculan solamente cuando su potencial, por variación del tamaño de las partículas, del pH o de la fuerza iónica, cae por debajo de su nivel crítico, que está alrededor de los 14 mV.

CANNON y MARSHALL (49) adaptan el método de aglutinación de partículas de colodio al sistema albúmina de huevo-anti albúmina de huevo y estudian las variantes que rigen su aglutinación.

Pero es CAVELTI (50) quien, en una serie de exhaustivos trabajos, analiza de una manera minuciosa, todos los factores que inciden en el mecanismo de aglutinación de las partículas de colodio sensibilizadas con distintos antígenos.

Sus conclusiones se resumen en los siguientes puntos:

- a) Debe usarse para la obtención de las suspensiones de colodio, una solución etéreo-alcohólica de colodio de pureza que responda a la Farmacopea Americana (51).
- b) La precipitación de las partículas se efectúa con una solución de agua-acetona en condiciones determinadas de temperatura, de acuerdo al esquema descrito en su trabajo (50).
- c) La selección del tamaño de las partículas que oscila entre el límite inferior de la visibilidad microscópica y 4-5 micras, se logra por centrifugación selectiva.

d) Las inespecíficas se evitan:

- 1) Por inactivación del suero a 56° C. durante 30 minutos, inmediatamente antes de su uso.
- 2) Agregando agentes estabilizantes del tipo suero normal de conejo, a las soluciones salinas.
- 3) Usando soluciones salinas de ClNa 1,1 % preparadas en agua tridestilada, libres de iones calcio y sulfato que disminuirían sensiblemente el potencial cataforético del sistema produciendo la aglutinación espontánea de las partículas.

Nosotros empleamos suspensiones de colodio obtenidas de acuerdo a las técnicas siguientes:

- 1) Precipitación según el método de CANNON y MARSHALL, modificado por CAVELTI.
- 2) Precipitación según las indicaciones de ARJONA y JIMENEZ DIAZ (52).

Preferimos trabajar con las suspensiones del primer procedimiento, aunque más laborioso y de ajustada técnica, proporciona partículas de diámetro más uniforme y suspensiones de mayor estabilidad.

Buscamos las condiciones óptimas en que se produce la aglutinación, para el virus aftoso, estudiando la influencia de la concentración salina, la temperatura y el tiempo, tanto en la sensibilización de las partículas como en la prueba de aglutinación.

2) Equipo:

- a) Se emplea el instrumental descrito en el capítulo Técnica General.
- b) Agitador eléctrico universal con reóstato para la regulación de velocidades 1/50 H.P. Emil Gruner & Co.

3) Material de vidrio:

Se emplea el material de vidrio descripto en el capítulo Técnica General.

4) Drogas

- 1) Cloruro de sodio: Sodium Chloride, Analar, ClNa M.W. 58,45, B.D.H.
- 2) Acetona: Acetone, Baker Analyzed Reagent, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, M.W. 58,08 J.T. BAKER.
- 3) Colodio: solución etéreo-alcohólica, Off. F.A., Sintorgan, Ind. Arg.

5) Reactivos

a) Soluciones salinas

1) Solución fisiológica:

ClNa..... 8,5 g.
H₂O tridestilada c.s.p..... 1 litro
Se esteriliza antes de usarla.

2) Solución de cloruro de sodio 1,1 % g.

ClNa 11,0 g
H₂O tridestilada c.s.p. ... 1 litro

Se esteriliza antes de usarla. Para todas las diluciones usadas en esta prueba se emplea este diluyente.

b) Solución agua-acetona:

Acetona 1 volumen
Agua tridestilada 3 volúmenes

c) Antígenos:

Se usan los antígenos consignados en el capítulo Técnica General.

d) Sueros:

Se usan los antisueros y los sueros controles negativos consignados en el capítulo Técnica General.

e) Suspensión madre de colodio:

Para la preparación de la suspensión madre de colodio, se sigue la técnica de CAVELTI (50), adaptada al virus aftoso por SA FLEITAS Y VAZQUEZ SAAVEDRA (54).

f) Suspensión de colodio para la prueba:

A partir de la suspensión madre de colodio, se prepara una nueva suspensión, de modo tal, que su concentración sea el doble de la concentración cuya turbidez corresponda al N° 2 de la escala turbidimétrica de McFARLAND (55).

METODO

La tipificación de los virus aftosos por el procedimiento de aglutinación de partículas de colodio, comprende:

- a) Sensibilización de las partículas de colodio con antígenos aftosos "tipo".
 - b) Determinación del título óptimo de los antisueros aftosos.
 - c) Tipificación de los virus problemas.
- a) Sensibilización de las partículas de colodio con los virus aftosos:
- 1) Preparar diluciones de los antígenos aftosos tipo O, A y C desde 1:1 hasta 1:64.
 - 2) Mezclar iguales cantidades de las diferentes diluciones de los antígenos con la suspensión de colodio. Preparar iguales mezclas con antígenos O, A y C, ya titulados, que se los usa como controles.

- 3) Cuando los antígenos utilizados provienen de epitelio lingual de bovino (antígeno de epitelio) se agrega el correspondiente control constituido por: suspensión de colodio sensibilizado con suspensión de epitelio lingual normal de bovino, preparado con las mismas técnicas utilizadas para el epitelio lingual de bovino inoculado..
- 4) Agitar los tubos intensamente y dejar 24 horas en la heladera a 4° C.
- 5) Las partículas así preparadas están listas para la prueba.

b) Determinación del título óptimo de los antisueros aftosos.

- 1) Preparar diluciones de los antisueros aftosos O, A y C desde 1:1 hasta 1:2560. Incorporar como controles, iguales diluciones de suero normal de cobayo y suero antirrábico equino.
- 2) Preparar gradillas con 12 filas de 10 tubos de hemólisis cada una.
- 3) Colocar en los 10 primeros tubos de la última hilera 0,2 ml. de la dilución del antisuero aftoso "O", 1:2560, continuar con las otras diluciones hasta la dilución 1:5. Ver cuadro tipo N° 20.
- 4) En las filas N° 11 y 12, colocar 0,2 ml. de las diluciones de los sueros controles.
- 5) Agregar a los tubos de las filas N° 1 a N° 7, 0,2 ml. de las suspensiones de colodio sensibilizadas con las diferentes diluciones del antígeno "O".
En la fila N° 8, colocar 0,2 ml. de las suspensiones de colodio sensibilizados con antígeno O, usado como control positivo.
- 6) En las filas N° 9 y 10, colocar 0,2 ml. de las suspensiones de colodio sensibilizadas con los antígenos A y C.

- 7) En las filas N° 11 y 12, agregar en todos los tubos, 0,2 ml. de la suspensión de colodio sensibilizada con el antígeno "0".
- 8) Tapar los tubos, agitar e incubar en la heladera a 4°C durante 24 horas
- 9) Centrifugar los tubos 3 minutos a 1.400 r.p.m., en centrífuga refrigerada.
- 10) Repetir esta prueba usando los sistemas Suero "A"-Antígeno "A" y Suero "C"-Antígeno "C" .
- 11) Luego de la centrifugación, se procede a la lectura: a cada tubo se lo agita suavemente para lograr la resuspensión de las partículas.
- 12) Se interpreta la aglutinación de acuerdo a cuatro criterios principales:
 - a) Presencia de aglutinación visible a simple vista, sobre fondo negro e iluminación lateral.
 - b) Apreciación de diferencias en el grado de transparencia de la suspensión en su conjunto.
 - c) Apreciación de la aglutinación reflejada sobre espejo cóncavo.
 - d) Observación microscópica de la aglutinación entre porta y cubre-objeto.
- 13) Efectuar la lectura utilizando el primero de estos criterios. El grado de positividad, se expresa de acuerdo al tamaño del grumo:

+++ grumos de 1- 2 mm

++ grumos pequeños de menos de 1 mm.

+ "granulado fino" en el límite de la visibilidad di -
recta.

+ granulado difícilmente visible (dudoso)

- no se observa a simple vista grumos: ni granulaciones.

Fotografías N° 10 y 11.-

14) Se denomina "título del antisuero" la mayor dilución del mismo que da un grado de positividad de 3+, frente a la mayor dilución del antígeno tipo, que a su vez se denomina "título del antígeno".

c) Tipificación de los virus problema.

- 1) Sensibilizar la suspensión de colodio, con los antígenos problema, en las condiciones ya descritas (54).
- 2) Preparar una gradilla con una fila de cuatro tubos de hemólisis por cada antígeno a tipificar. Cuadro N° 21.
- 3) Colocar 0,2 ml. de los antisueros O, A y C en los tubos N° 1, 2 y 3 respectivamente, en las diluciones que corresponden a sus títulos.
- 4) Adicionar a todos los tubos 0,2 ml. de la suspensión de colodio sensibilizada con el antígeno a tipificar.
- 5) Agregar en el tubo N° 4, 0,2 ml. de solución salina 1,1 % adicionada de suero normal de conejo al 1 %.
- 6) Repetir estas operaciones con cada virus problema.
- 7) Incorporar al sistema, como control positivo, suspensiones de colodio sensibilizadas con los antígenos tipo O, A y C en los respectivos títulos.
- 8) Tapar los tubos, agitar e incubar 24 horas en la heladera a 4° C.
- 9) Centrifugar 3 minutos a 1.400 r.p.m.
- 10) Leer y anotar los resultados en el protocolo.
- 11) Una vez obtenido el tipo de cada virus problema puede determinarse el título del mismo lo que permite comparar su poder aglutinante con el de los antígenos patrones.

7) Resultados:

Para realizar la prueba de aglutinación de partículas de colodio, se procedió primero, a seleccionar el tipo de partículas que resultara más conveniente para ese fin.-

Con tal objeto se efectuaron reacciones de aglutinación con partículas de /colodio sensibilizadas con los tres tipos de virus, frente a diluciones crecientes de los antisueros homólogos, usando:

- 1) Partículas obtenidas por el método de CAVELTI(50).
- 2) Partículas precipitadas según las indicaciones de ARJONA y JIMENEZ DIAZ(52).

A su vez se estudiaron las variables temperatura(0,25 y 37°C) y tiempo de sensibilización de las partículas(2 y 24 horas). Cuadro N° 22.

Los resultados de esa pruebas condujeron a elegir las partículas según CAVELTI, para efectuar las tipificaciones.-

Las otras partículas daban reacciones inespecíficas en algunas condiciones de trabajo y en otras reacciones negativas.-

También las partículas de CAVELTI, a 25 y 37°C, con tiempo de incubación de 2 y 24 horas, no daban resultados satisfactorios.

Finalmente se fijaron, como consecuencia de los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de sensibilización: 0°C y 24 horas. Establecidas esas variables, se efectuó la prueba de aglutinación usando como diluyente solución de cloruro de sodio 0,85 % y 1,1 %.-

La primera de ellas daba algunas reacciones inespecíficas, no así las reacciones realizadas con la segunda solución que se eligió como diluyente definitivo.-

Una vez elegido el tipo de partículas(CAVELTI) y establecidas las condiciones de trabajo(0°C y 24 horas), se procedió a titular los sueros hiperinmunes . Se analizaron por este método 21 sueros, frente a antígenos patrones, obteniendo valores que van desde 1:80 hasta 1:320. Cuadro N° 23 .

Los sueros hiperinmunes en los títulos obtenidos, se usaron en la tipificación de los virus aftosos.-

Se tipificaron en total 128 muestras virales(Cuadro N° 24), encontrando 90 % de reacciones positivas para los virus de epitelio y 80 % para los de cultivo. Sobre el total de muestras la positividad fué del 81 %.- Ver Gráfico N° 12 .-

Si expresamos los resultados en función del título del virus, se observa : para el virus "0" a títulos menores que $10^{-7,0}$, 50 % de reacciones positi-

vas; de $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$, 65%; de $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$, 86% y a títulos mayores que $10^{-8,0}$, 100% de positividad.

Para el virus "A", con títulos inferiores a $10^{-7,0}$, 54% de reacciones positivas; de $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$, 86%; entre $10^{-7,7}$ y $10^{-8,0}$, 88% y a títulos mayores que $10^{-8,0}$, 100% de positividad.

Finalmente, para el virus "C", a títulos entre $10^{-7,0}$ a $10^{-7,6}$, 84% y para títulos $10^{-7,7}$ a $10^{-8,0}$, 100% de positividad. Gráfica N° 13.

Todos los antígenos utilizados, tanto los de epitelio lingual, como los provenientes de cultivo tipo Frenkel y B.H.K., correspondientes a los tres tipos de virus, dieron aglutinación positiva frente a los antisueros homólogos y resultados negativos frente a los antisueros heterólogos y con los sueros controles negativo y de especificidad (suero normal de cobayo y suero equino antirrábico).

Para determinar la sensibilidad de la prueba se efectuaron reacciones de aglutinación de partículas de colodio sensibilizadas con los virus tipo, frente a los antisueros homólogos, patrones. Los resultados fueron obtenidos de acuerdo a la pauta detallada en el cuadro N° 20, a continuación se consignan los valores encontrados:

Suero "O", N° 3	1:80	Antígeno "O", N° 90	1:32
Suero "O", N° 14	1:160	Antígeno "O", N° 138	1:16
Suero "O", N° 25	1:80	Antígeno "O", N° 32	1:32
Suero "A", N° 4	1:80	Antígeno "A", N° 91	1:32
Suero "A", N° 5	1:80	Antígeno "A", N° 139	1:32
Suero "A", N° 26	1:80	Antígeno "A", N° 33	1:16
Suero "C", N° 11	1:160	Antígeno "C", N° 92	1:16
Suero "C", N° 17	1:80	Antígeno "C", N° 140	1:32
Suero "C", N° 27	1:160	Antígeno "C", N° 34	1:8

Los títulos obtenidos para los diferentes antígenos, son generalmente superiores a los correspondientes títulos obtenidos por la técnica de fijación del complemento, 100% H.

En cuanto a los títulos de los antisueros, se obtienen valores similares a los obtenidos con la citada técnica.

Esta reacción, por su especificidad y sensibilidad, proporciona un instrumento eficaz para la tipificación de los virus aftosos.

FOTOGRAFIA Nº 10



Aglutinación + + +, imagen reflejada sobre espejo cóncavo del microscopio.-

FOTOGRAFIA Nº 11



Reacción negativa(-), imagen reflejada sobre espejo cóncavo del microscopio.

Protocolización de las pruebas de aglutinación de colodio sensibilizado con antígenos aftosos, frente a sus antisueros homólogos.

Antígenos		Diluciones del antisuero aftoso tipo "0" (1)													
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560				
Diluciones del antígeno aftoso	Antígeno tipo "0" Frenkel-colodio	1:1 ⁽²⁾	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		1:2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		1:4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1:8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

controles	M-1	Antígeno tipo "0" (3) epitelio lingual bovino-colodio	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	
	M-2	Antígeno tipo "A" (3) Frenkel-colodio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M-3	Antígeno tipo "C" (3) Frenkel-colodio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M-4	Antígeno tipo "0" Frenkel-colodio (4)	Diluciones de suero normal de cobayo (control negativo)												
	M-5	Antígeno tipo "0" Frenkel-colodio (4)	Diluciones de suero antirrábico equino (control especificidad)												

Referencias:

- (1) Suero de cobayo hiperinmunizado, tipo "0" Nº 2, el diluyente fué solución salina 1,1 %.
- (2) Antígeno "0" Nº 108. Se llama antígeno en la dilución 1:1, al sobrenadante de la extracción en solución fisiológica del triturado de epitelio lingual en la relación 1:5 o a los sobrenadantes de los cultivos en medio Frenkel y en cultivo de células renales.
- (3) Para sensibilizar la suspensión de colodio se emplea la dilución óptima del antígeno (título del antígeno), cuando esta se conoce o en su defecto, la dilución denominada 1:1. Antígeno "A" Nº 119 y "C" Nº 105.
- (4) Se emplea la dilución del antígeno denominada 1:1.

CUADRO Nº 21

Tipificación de virus aftoso por la prueba de aglutinación de colodio

Fila nº	Antígenos (1)	(2)	(2)	(2)	Control antígeno	Resultados
		Antisuero "O" 1:64	Antisuero "A" 1:32	Antisuero "C" 1:128		
1	nº 330 Frenkel	++	-	-	-	Virus "O"
2	nº 1611 M.C.	-	+++	-	-	Virus "A"
3	nº 1801 M.C.R.L.	+++	-	-	-	Virus "O"
4	nº 234 Frenkel	-	-	++	-	Virus "C"
5	nº 1846 M.R.	-	-	+++	-	Virus "C"
6	nº 226 Frenkel	-	-	-	-	Negativo
7	nº 2522 M.R.	-	+	-	-	Virus "A"

Controles (3)

8	Antígeno "O" tipo título 1:16	+++	-	-	-	
9	Antígeno "A" tipo título 1:4	-	+++	-	-	
10	Antígeno "C" tipo título 1:64	-	-	+++	-	

Referencias:

- (1) Antígenos de distintos tipos usados en la dilución 1:1 .-
- (2) Antisueros aftosos hiperinmunes, en la dilución correspondiente a su título.-
- (3) Se usan como controles los antígenos "O", "A" y "C"- tipos en sus respectivos títulos.-

Protocolización de las pruebas de aglutinación de partículas de colodio, preparadas según la técnica de Cavetti, sensibilizadas con virus aftoso "A", en función de las variables, temperatura y tiempo

		Incubación (1)		Recíproca de las diluciones del antisuero aftoso "A" (1)										Control suspensión colodio (4)
		Temperatura (°C)	Tiempo (h)	5	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	
ANTÍGENOS	Suspensión Colodio antígeno "A"	0	2 24	+	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	
		25	2 24	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	
		37	2 24	++	++	+	+++	±	-	-	-	+	+	
	Suspensión Colodio antígeno "O"	0	2 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		25	2 24	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	
		37	2 24	+	+	++	-	+	-	-	±	-	-	
	Suspensión Colodio antígeno "C"	0	2 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		25	2 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		37	2 24	-	+	+	-	++	-	-	-	-	-	
	Recíproca de las diluciones del suero normal de cobayo (control negativo)													
	CONTROLES	Suspensión Colodio antígeno "A"	0	2 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			25	2 24	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
37			2 24	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Referencias:

- (1) Suero de cobayo hiperinmunizado, tipo "A" N° 26 (título 1:80); el diluyente fué solución salina 1,1%, también para los antígenos. Las diluciones que se consignan se refieren a las diluciones iniciales, antes de mezclarlas con las diluciones de antígenos. El volumen total de las mezclas en cada tubo fué de 0,4 ml. (0,2 ml. de dilución del antisuero + 0,2 ml. de dilución antígeno-colodio).
- (2) Los antígenos usados fueron, "A" N° 19, "O" N° 21 y "C" N° 25 .
- (3) La misma prueba se efectuó a 0,25 y 37°C de temperatura y dejando 2 y 24 horas para la sensibilización de las partículas.
- (4) Control de la suspensión de colodio, contiene 0,2 ml de suspensión de colodio + 0,2 ml. de solución salina 1,1 % adicionada de suero normal de conejo o de cobayo al 1%

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, EN FUNCION DEL TITULO DEL VIRUS, EN LA PRUEBA DEL COLODIO

TITULO DEL VIRUS	TITULO DEL VIRUS				
	MENOR de 10^{-70}	de 10^{-70} a 10^{-76}	de 10^{-77} a 10^{-80}	MAYOR de 10^{-80}	de 10^{-25} a 10^{-85}
VIRUS TIPO "O"					
VIRUS TIPO "A"					
VIRUS TIPO "C"	(2)			(2)	

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO, DE EPITELIO y DE CULTIVO POR LA PRUEBA DEL COLODIO.

CLASE DE VIRUS	VIRUS DE EPITELIO	VIRUS DE CULTIVO	VIRUS de EPITELIO y VIRUS de CULTIVO
VIRUS TIPO "O"			
VIRUS TIPO "A"			
VIRUS TIPO "C"			

Referencias:

- (1) Positivo(+), sector proporcional al % de positividad.
Negativo(-), sector proporcional al % de negatividad.
- (2) Para el virus "C" no se tipificaron muestras con esos títulos.

CUADRO N° 23

TITULO DE LOS SUEROS AFTOSOS HIPERINMUNES OBTENIDOS EN LA
PRUEBA DE AGLUTINACION DE PARTICULAS DE COLODIO

Muestra N°	Antisuero Tipo	Título (1)
1	O	1:160
2	O	1:160
3	O	1:80
4	A	1:80
5	A	1:80
6	C	- (2)
7	C	1:160
8	C	1:160
9	O	-
10	A	1:320
11	C	1:160
12	O	1:80
13	A	1:80
14	C	1:160
15	O	-
16	A	-
17	C	1:80

18	O	-
19	A	-
20	C	-
21	A	-
22	O	1:80
23	O	-
24	C	1:320
25	O	1:80
26	A	1:80
27	C	1:160
28	O	-
29	A	-
30	C	-
31	O	1:80
32	A	1:80
33	C	1:320

Referencias:

- (1) - Título del antisuero es la mayor dilución del mismo que da un grado de positividad de 3+ frente a la mayor dilución del antígeno homólogo, patrón.
- (2) - Los antisueros consignados con (-), corresponden a partidas no tituladas por este método.

CUADRO N° 24

TIPIFICACION DEL VIRUS AFTOSO POR LA PRUEBA DEL COLODIO

Muestra N°	Virus Tipo	Resultados
1	O	O3+
2	A	A3+
3	C	C3+
4	O	O1+
5	A	A3+
6	A	A +
7	A	A2+
8	C	C3+
9	A	A2+
10	O	O1+
11	A	A3+
12	O	O3+
13	A	A3+
14	A	A3+
15	C	C2+
16	O	O3+
17	O	O1+
18	C	C3+
19	A	A3+
20	A	A1+
21	O	O3+
22	C	C2+
23	O	O3+
24	A	A3+
25	C	C3+
26	O	O +
27	C	C3+

28	O	O3+
29	O	-
30	O	O3+
31	C	C3+
32	O	O3+
33	A	A3+
34	C	C3+
35	O	O2+
36	A	A4+
37	O	O +
38	A	A1+
39	C	Neg.
40	A	A3+
41	C	C3+
42	A	Neg.
43	O	O2+
44	A	A3+
45	O	O3+
46	A	A3+
47	C	C2+
48	C	C3+
49	A	A1+
50	A	--
51	A	A3+
52	--	--
53	O	O3+
54	O	O3+
55	A	A +
56	C	C3+
57	C	C3+
58	O	O3+
59	O	O3+
60	C	Neg.
61	C	C3+

62	O	O3+
63	C	C3+
64	O	O3+
65	O	O3+
66	A	A3+
67	C	C3+
68	O	O3+
69	C	C3+
70	C	C3+
71	A	A2+
72	C	Neg.
73	O	Neg.
74	O	O3+
75	O	O1+
76	A	Neg.
77	O	O3+
78	C	C2+
79	O	O ⁺
80	O	O2+
81	C	C2+
82	O	O3+
83	A	A1+
84	A	A3+
85	O	O2+
86	C	C3+
87	O	O1+
88	A	Neg.
89	C	C3+
90	O	O3+
91	A	A3+
92	O	C3+
93	--	--
94	O	O2+
95	O	Neg.

96	O	O1+
97	A	Neg.
98	A	A +
99	A	Neg.
100	A	Neg.
101	A	Neg.
102	A	Neg.
103	A	Neg.
104	C	C2+
105	C	C3+
106	O	O2+
107	O	O2+
108	O	O1+
109	O	O3+
110	O	O +
111	O	O1+
112	A	A1+
113	A	A1+
114	A	A +
115	A	Neg.
116	O	Neg.
117	A	A1+
118	O	O3+
119	A	A2+
120	A	A2+
121	O	O2+
122	O	O3+
123	O	O2+
124	A	A2+
125	A	A +
126	O	O2+
127	O	Neg.
128	A	A +
129	C	C1+

130	C	Neg.
131	O	O3+
132	A	A2+
133	C	C2+
134	O	--
135	A	--
136	C	--
137	--	--
138	O	O3+
139	A	A3+
140	C	C3+
141	O	--
142	A	--
143	C	--
144	C	C3+

Referencias:

Las muestras indicadas con(--) corresponden a epitelio normal a fluido vesicular y a antígenos que por no alcanzar el material, no se pudieron tipificar.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Smith, D.T. and Conant, N.F.: Microbiology, Twelfth Edition, Appleton-Century Inc., New York p. 129, 1960.-
- 2) Doerr, R.: Las investigaciones sobre inmunidad: Los anticuerpos (1ª parte), Revista de Occidente, Madrid, p. 1, 1952.-
- 3) Grüber, M. and Durham, H.E.: citado por Sherwood, N.P.: Immunology, Third Edition, The C.V. Mosby Company, St. Louis, U.S.A., p. 274, 1951. -
- 4) Kraus, E.: Acta Krausi: 1: 8, 1957 (traducida de Wiener Klinische Wochenschrift: Tomo X B° 18 p. 431, 1897.-
- 5) Kabat, E.A. and Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry, Second Edition, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois U.S.A. p. 22, 1961.⊕
- 6) Adler, F.L.: Immunol. , 70: 79, 1953.-
- 7) Bordet, J.: Ann. Inst. Pasteur, 10: 193, 1896.
- 8) Bordet, J.: Ann. Inst. Pasteur, 13: 225, 1899.-
- 9) Marrack, J.R.: Med. Research Council (Brit.) Spec. Rept. Ser., N° 230, 1938.-
- 10) Ehrlich, P.: Studies in Immunity, John Wiley and Sons, New York, p. 573, 1910.-
- 11) Landsteiner, K.: The specificity of Serological Reaction, Harvard University Press, 1945.-
- 12) Northrop, J.H. and DeKruif, P.H.: J. Gen. Physiol., 4: 639, 1922.-
- 13) Bechold, H.; Neisser, M. and Friedemann, U.: citados por Sherwood, N.P.: Immunology, Third Edition, The C.V. Mosby Co. St. Louis, U.S.A. p. , 1951.
- 14) Shibley, G.S.: J. of Exp. Med., 44: 667, 1926.-
- 15) Pressman, D., Campbell, D.H. and Pauling, L.: J. Immunol., 44: 101, 1942.-
- 16) Heidelberger, M. and Kendall, F.E.: J. Exp. Med., 61: 563, 1935.

- 17) Heildelberger, M. and Kendall, F.E.: J. Exp. Med., 65: 647, 1937.-
- 18) Boyd, W.C.: Fundamentos de Inmunología, EUDEBA, Editorial Universitaria de Buenos Aires, p. 308, 1963.-
- 19) Pauling, L., Pressman, D., Campbell D.H., Ikeda, C. and Ikawa, M.: J. Am. Chem. Soc., 64: 2944, 1940.-
- 20) Pauling, L., Pressman D. and Campbell, D.H.: J. Am. Chem.Soc., 66: 330, 1944.-
- 21) Ghosh, B.N.: Indian J. Med. Research, 23: 285, 1935.-
- 22) Langmuir, I.: J. Am. Chem. Soc., 40: 1361, 1918.-
- 23) Klotz, I.M,: "Protein Interactions" en " The Proteins ", H.Neurath y K. Bailey, eds., vol. 1, part. B., p. 727. Academic Press, Nueva York, 1953.-
- 24) Fowler, R.H.: Statistical Mechanics, Imprenta de la Universidad de Cambridge, 1936.
- 25) Boyd, W.C.: J. Exp. Med., 75: 407, 1942.-
- 26) Bozicevich, J., Bunim, J.J., Freund, J. and Ward, S.: Soc. Exp. Biol. and Med. Proc., 97:180, 1958.-
- 27) González Castro, J. y Chordi Corbo, A.: Atti del VII Congresso Internazionale di Idatidologia, p. 258, 1960. -
- 28) Kayhoe, D.E., Nason, J.P. and Bozicevich, J.: New England J.Med. 263 (1): 5, 1960
- 29) Takahashi, Y., Adachi, K.: Comp. Rend. Soc. Biol. 154: 1129,1960.
- 30) Takahashi, Y., Mochizachi, and Nagayama: Comp. Rend. Soc. Biol. 154, 1132, 1960.
- 31) Evans, E.E. and Haines, R. F.: J. Bacteriol.; 68: 130, 1954.

- 32) Segre, D.: J. Immunol. 78: 304, 1957.
- 33) Saslaw, S. and Campbell, C.C. : Pub. Health Rep., 64, 424, 1949.
- 34) Havens, W.P. and Lloyd, H.: Proc, Exper. Biol. and Med.: 72:98, 1949.
- 35) Board, A.V. and Kempff, J.E. : J. Lab. Clin. Med.: 37, 914, 1951.
- 36) Christian, C.L., Byran, R.M. and Larson, D.L.: Proc. Soc. Exp.
Biol. and Med.: 98:820
1958.
- 37) Innella, F. and Redner, W.J.: J.A.M.A., 171, 885, 1959.
- 38) Carlisle, H.N. and Sastow, S.: J. Lab. and Clin. Med., 51, 793, 1953.
- 39) Szyfres, B. y Kagan, I.G.: Bol. de la Ofic. Sanitaria Panamericana,
3, 208, 1963.
- 40) Uyeda, Ch. T.: Am. Clin. Path., 40, 329, 1963.
- 41) Philip, J.R., Weir, D.M., Stuart, A.E. and Irwine, W.J.: J. Clin.
Path. 15: 148,
1962.
- 42) Bernhard, G.C., Cheng, W. and Talmage, D.W.: J. Immunol., 88, 750,
1962.
- 43) Oreskes, I. and Singer, J.M. : J. Immunol., 86: 3, 338, 1961.
- 44) Singer, J.M., Altmann, G., Goldenberg, A. and Plotz, Ch.: Arthritis
and Rheumatism, 3, 515, 1960.
- 45) Cohn, E.J., Gurd, F.R.N., Surgenor, D.M., Barnes, B.A., Brown, R.K,
Derouaux, G., Gillespie, J.M., Kahnt, F.W., Lever, W.F., Liu, Ch.,
Mittleman, D., Mouton, R.F., Schmid, K. and Uroma, E. : J. Amer.
Chem. Soc.,: 72: 465/74, 1950.
- 46) Cohn, E.J., Hugues, L.E., Mulford, W.L. (jr.), Ashworth, J.N.,
Melin, M. and Taylor, H.L. : J. Amer. Chem. Soc. 68: 459, 1946.

- 47) Lomban, F.R., Vazquez Saavedra, C.E. y Sa Fleitas, M.J. (trabajo en preparación, Instituto Malbrán).
- 48) Loeb, J. : J. Gen. Physiol.: 5, 109, 1922-23.
- 49) Cannon, P.R. and Marshall, Ch. E. , J. Immunol.,38:365,1940 .-
- 50) Cavelti, P.A. : J. Immunol., 57: 141, 1947.
- 51) The Pharmacopœia of the United States of America (Twelfth Revision U.S.P. XII, Mack Printing Company, Easton.
- 52) Arjona, E., Jiménez Díaz, C, Segovia, J.M. y Ortega, A.: Acta Allergologica, 7 (1-2): 215, 1954.

Resultados generales:

En nuestro trabajo estudiamos las distintas técnicas empleadas en la tipificación del virus aftoso, desde dos puntos de vista: 1) especificidad 2) Sensibilidad.-

- 1) Desde el punto de vista de la especificidad, todas las reacciones empleadas, excepto las de hemoaglutinación, se mostraron completamente específicas, en todas las diluciones del antígeno y el antisuero.
- 2) Al comparar la sensibilidad de las reacciones empleadas en la titulación de los antisueros y virus patrones, se observó que:
 - a) Con la técnica de fijación del complemento 100% H se encontraron, para los antisueros, títulos desde 1:80 hasta 1:400; para los virus correspondieron títulos de 1:5 a 1:20.-
 - b) Con la prueba de fijación del complemento 50% H., las reacciones se muestran positivas en diluciones de 1:400 a 1:13200 para los antisueros y de 1:40 a 1:160, para los virus patrones.
 - c) Las pruebas de aglutinación de partículas sensibilizadas con látex, dan para los sueros hiperinmunes, títulos desde 1:80 hasta 1:320 y para los virus patrones 1:2 a 1:8 .
 - d) Con partículas de colodio sensibilizadas se obtienen para los antisueros títulos desde 1:80 hasta 1:160 y para los virus 1:8 a 1:32.
 - e) Los métodos de difusión en agar, mostraron ser específicos, pero los títulos que dan óptima precipitación oscilan entre 1:1 y 1:64.- El virus, en todos los casos, debe tener al to título infectante (D.I.50) o en su defecto ser concentrado por alguno de los métodos descriptos.
 - f) En las pruebas de hemoaglutinación, no se pudo demostrar, dentro de nuestras condiciones de trabajo, ningún tipo de precipitación.-

El Cuadro Nº 25 tabula porcentualmente, los valores encontrados con cada una de las pruebas ensayadas, para los tres tipos de virus de origen epitelio lingual de bovino infectado o medios de cultivo tipo Frenkel o B.H.K. .-

De la comparación de estos métodos se desprende que la mayor positividad porcentual, se obtiene con el método de fijación del complemento 100% H,

para los virus de epitelio y con la técnica del 50% H para los virus de

cultivo.-

Las pruebas de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas, da 90% de positividad para los virus de epitelio, mostrando una buena correlación

con el método clásico de fijación del complemento.

Las técnicas con colodión sensibilizado, ofrece menor positividad porcen--

tual que la prueba del látex para los virus de epitelio, no así con los

de cultivo, en los que se observa, un grado de positividad similar a los de

la técnica de fijación del complemento 100% H. .-

La difusión en agar da, tanto con los virus de epitelio como con lo de cul-

tivo, porcentajes acenudadamente menores de reacciones positivas que con

las técnicas clásicas.

Resultados comparativos de la tipificación del virus aftoso

Resultados porcentuales de la tipificación de virus aftoso, de epitelio y de cultivo, por la prueba de fijación del complemento, 50% H

Clase de virus	Virus de epitelio		Virus de cultivo	
Resultados	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Tipo de virus	ns	%	ns	%
Virus "O"	53	100	0	0
Virus "A"	48	96	1	4
Virus "C"	34	100	0	5
Virus totales	135	95	1	5

Resultados porcentuales de la tipificación de virus aftoso, de epitelio y de cultivo, por la prueba de fijación del complemento, 20% H

Clase de virus	Virus de epitelio		Virus de cultivo	
Resultados	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Tipo de virus	ns	%	ns	%
Virus "O"	53	100	0	13
Virus "A"	48	96	1	16
Virus "C"	34	100	0	5
Virus totales	135	95	1	5

Resultados porcentuales de la tipificación de virus aftoso, de epitelio y de cultivo, por la prueba de difusión en agar

Clase de virus	Virus de epitelio		Virus de cultivo	
Resultados	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Tipo de virus	ns	%	ns	%
Virus "O"	50	82	3	18
Virus "A"	47	67	9	33
Virus "C"	34	62	11	38
Virus totales	131	71	26	29

Resultados porcentuales de la tipificación de virus aftoso, de epitelio y de cultivo, por la prueba del látex

Clase de virus	Virus de epitelio		Virus de cultivo	
Resultados	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Tipo de virus	ns	%	ns	%
Virus "O"	52	89	4	11
Virus "A"	47	89	3	11
Virus "C"	33	93	2	7
Virus totales	132	90	9	10

Resultados porcentuales de la tipificación de virus aftoso, de epitelio y de cultivo, por la prueba del colodión

Clase de virus	Virus de epitelio		Virus de cultivo	
Resultados	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Tipo de virus	ns	%	ns	%
Virus "O"	52	89	4	11
Virus "A"	42	74	7	26
Virus "C"	34	90	3	10
Virus totales	128	85	14	15

FOFA

Si analizamos estadísticamente los resultados obtenidos para cada método, en comparación con los de la técnica de fijación del complemento 100 % H, aplicando el criterio de $(\chi c)^2$ de Pearson, resulta:

Virus tipo "O"

Métodos que se comparan	Virus de epitelio (χc) ²	Virus de cultivo (χc) ²
100 % H - 50 % H	0,0138	0,1634
100 % H - Látex	2,9865	<u>4,1551</u>
100 % H - Colodio	2,5248	1,2884
100 % H - Dif. Agar	<u>5,1258</u>	0,0000

Virus tipo "A"

100 % - 50 % H	0,0050	0,3126
100 % - Látex	0,0708	1,4540
100 % - Colodio	2,6555	0,1036
100 % - Dif. Agar	<u>4,8907</u>	1,8843

Virus tipo "C"

100 % H - 50 % H	0,0175	0,4129
100 % H - Látex	0,5178	0,0124
100 % H - Colodio	2,0804	0,1750
100 % H - Dif. Agar	<u>11,2176</u>	0,1750

Se han tomado como valores de $(\chi c)^2$ con diferencias significativas aquellos que excedieron el valor 3,8410, correspondientes a un nivel del 5 %, para un grado de libertad. Como diferencias muy significativas los valores de $(\chi c)^2$ que excedieron el valor 6,6350 para un nivel del 1% y un grado de libertad.

Se han tomado como valores de $(\chi c)^2$ sin diferencias significativas los menores de 3,8410 para un nivel mayor del 5 % y un grado de libertad.

CONCLUSIONES

- 1) Las pruebas de fijación del complemento son las que, porcentualmente, dan mayor número de reacciones positivas, en la tipificación de los virus aftosos. Con la técnica del 50 % de H. se obtiene una sensibilidad superior a la de cualquiera de los otros métodos, tanto en la titulación de los antisueros como en la de los virus. Tienen, como única limitación, ser técnicas que exigen un riguroso "modus operandi", especialmente la del 50 % H cuyo empleo se encuentra limitado a las tareas de investigación.
- 2) Las pruebas de aglutinación de partículas de látex y de colodio sensibilizadas son promisorias como un procedimiento rápido y sencillo, fácil de adaptar a las tareas de rutina y adecuado como prueba tamiz en las encuestas epidemiológicas. Ofrecen una positividad y sensibilidad, comparables a las de la técnica clásica de fijación del complemento 100 % H.
- 3) Las pruebas de difusión en agar, proporcionan una buena especificidad; su empleo no es adecuado para la tipificación de los virus aftosos, por requerir la concentración previa de los virus y un tiempo de -- reacción que, en algunos casos, llega a los siete días. Este procedimiento, en cambio, es adecuado para el estudio del mosaico antigénico de los virus aftosos.-
- 4) De acuerdo al cálculo estadístico el valor de $(\chi^2 c)^2$ indica diferencias significativas entre el método de fijación del complemento 100 % H. y la prueba de difusión en agar; también entre la técnica del 100 % de H. y la del látex, para el virus tipo "0" de cultivo, en los demás casos, los valores de $(\chi^2 c)^2$ no muestran diferencias significativas.

R E C O N O C I M I E N T O :

La autora desea expresar su especial agradecimiento al señor Prof. Dr. E. Savino, al señor Director del Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán", doctor A.M. Vilches, al señor Profesor de Serología e Inmunología de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Bioquímica, doctor R.A. Margni, al señor Director de los Laboratorios de la Comisión Asesora Nacional para la Erradicación de la Fiebre Aftosa, doctor A.J. García Pirazzi, al señor Director del Instituto Nacional de la Fiebre Aftosa, doctor S. Rivenson y al señor Jefe de la División Fotografía del Instituto Nacional de Microbiología, doctor Bozzini, quienes por la valiosa cooperación prestada, hicieron posible la realización de este trabajo.