



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

## Facultad de Química

"ESTUDIO DEL PODER INMUNOGENICO DE UNA VACUNA  
CONTRA EL COLERA PORCINO, UTILIZANDO LA TECNICA  
DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES (METODO INDIRECTO)."

**Javier Leopoldo Hernández Padilla**

Químico Farmacéutico Biólogo

M-21695

1980



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado originalmente

según el Tema

PRESIDENTE Profra. Magdalena Acosta S.

VOCAL Profra. Magdalena Oliva G.

SECRETARIO Profra. Ma. Dolores Lastra


1er. SUPLENTE Profr. Salvador Martín S.

2o. SUPLENTE Profr. Javier Lumbreras G.

Sitio donde se desarrolló el Tema:

SYNTEX LABORATORIOS, S.A.

Sustentante:  JAVIER LEOPOLDO HERNANDEZ PADILLA

Asesor del Tema: PROFRA. MAGDALENA ACOSTA S. 

A mis padres

A mi tía

A mi madrina y mi tío

A mis hermanos y primas

A mis maestros

A mis amigos del M. J. V. C.

Con cariño y mi más profundo agradecimiento para Ustedes, a quienes debo la vida, la educación y la formación profesional, pues llego a esta meta merced a sus ejemplos, consejos, esfuerzos y oraciones.

Gracias, Señor.

O B J E T I V O

La porcicultura ha adquirido gran importancia para nuestro país debido a que la demanda de carne aumenta día a día. Se cuenta con las condiciones necesarias para satisfacer esta demanda del mercado interno y aún para exportar. Según reportes de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en 1977 México poseía 11,986,000 cabezas de ganado porcino, siendo el 7° país productor entre los principales a nivel mundial. En el mismo año se produjeron 451,000 toneladas de carne de cerdo y se exportaron 1,649 toneladas, con lo que nuestro país ocupó el lugar No. 23 entre los productores y exportadores de carne de cerdo (7,9).

Sin embargo, existe un factor limitante para la productividad de nuestra industria porcícola: es la enfermedad del cólera porcino, que ataca a esta especie en cualquiera de sus razas y a cualquier edad, provo

cando una mortalidad del 95% al 100% en las piaras atacadas, lo cual ocasiona anualmente grandes pérdidas económicas (4,5,9,18).

Para proteger a los animales contra esta grave enfermedad se emplean diversas vacunas elaboradas a base de virus modificado mediante pases en su hospedador natural, en hospedadores no naturales, o en cultivos de células de cerdo, ya sea en forma independiente o alternada. Estos pases, en alto número, hacen que el microorganismo pierda su patogenicidad, conservando su poder inmunogénico (5,22).

Antes de salir al mercado, cada lote de vacuna es sometido a una serie de pruebas para garantizar la calidad y la efectividad del producto. La prueba más importante es la llamada prueba de potencia, que consiste en la inmunización de un lote de cerdos susceptibles al cólera porcino, con diluciones de la vacuna. Posteriormente estos cerdos se inoculan con virus patógeno, con el fin de comprobar que la vacuna contiene suficiente material antigénico para inducir un título de anticuerpos protector. Para la realización de esta prueba se requiere un mínimo de treinta

días y resulta costosa debido a los animales empleados, su alimentación, instalaciones y personal que los atiende. Además pueden presentarse variaciones en los resultados a causa del estado físico de los animales, como la existencia de infecciones secundarias, tensión (stress) por manejo, susceptibilidad de cada lote de cerdos, etc.. Finalmente presenta un grave riesgo de difundir el virus patógeno que se emplea en esta prueba.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar la posibilidad de introducir un nuevo método para garantizar la potencia de la vacuna contra el cólera porcino por medio de una prueba de laboratorio que es más rápida, más económica, igualmente confiable y que evita la diseminación de la enfermedad. Colateralmente se investigan los títulos de anticuerpos que es capaz de estimular la vacuna.



C A P I T U L O I

G E N E R A L I D A D E S

I.1. COLERA PORCINO

El cólera porcino es una enfermedad infecciosa aguda, específica del cerdo, altamente contagiosa y mortal en un elevado porcentaje, cercano al 100%. Las pérdidas que ocasiona a la porcicultura nacional se elevan anualmente al orden de miles de millones de pesos, por lo que se le considera el problema más grave en este campo (5,6,9,16).

Entre los nombres con que se conoce esta infección en otros países se encuentran el de "swine fever" (Inglaterra), "hog cholera" (E.E.U.U.), "peste du porc" (Francia), "peste suina" (Italia) y "schweinepest" (Alemania) (18,22).

La enfermedad no ha podido ser transmitida a otras especies animales y en el cerdo produce una septicemia generalizada acompañada de degeneración de las paredes de los vasos sanguíneos pequeños, lo que ocasiona la aparición de hemorragias en órganos y tejidos tales como nódulos linfáticos, pleura peritoneo, mucosa intestinal, laringe, tejido subcutáneo y piel. Son frecuentes las inflamaciones cardíacas y gástricas, infartos en la periferia del bazo y también leucopenia. Durante los períodos de epidemia se acompaña de muy alta mortalidad (5,8,20,22).

#### ETIOLOGIA

La enfermedad es causada por un virus clasificado dentro del grupo Mixovirus, mide 22-44 nanómetros de diámetro, posee simetría helicoidal, su nucleoide está compuesto por RNA y su cubierta es de lípidos. Fue demostrado por primera vez por Deschweinitz y Dorset en 1903 y se le incluyó en esa época en el grupo Tortor, con el nombre de Tortor suis. Este virus pasa fácilmente los filtros Berkefeld y Chamberland (5,8,20,22).

Los agentes físicos y químicos afec

tan al virus en la siguiente forma (4,16,20):

Temperatura.-

A bajas temperaturas el virus es muy estable:

a -40°C puede sobrevivir hasta 7 años.

a -11°C sobrevive durante 4 años.

El virus se inactiva a las siguientes temperaturas:

a 55°C en 30 minutos

a 60°C en 10 minutos

a 72°C en 60 minutos, en sangre seca.

pH.-

pH alcalinos inactivan fácilmente al virus

pH ácidos prolongan su actividad

pH de 1.4 o de 13 inactivan al virus en una hora

pH de 5.0 a 5.5 son los ideales para conservar su virulencia.

Desinfectantes.-

Cresol al 2% inactiva al virus en 60 minutos

Hidróxido de sodio al 3% en combinación con lechada de cal

al 2% lo inactivan en 25 minutos

Fenol al 0.5% preserva al virus por largos períodos.

Otros agentes.-

El encurtido de carnes en vinagres, el salado y el ahumado preservan al virus hasta por seis meses; la putrefacción lo destruye en cinco días, excepto al alojado en la médula ósea, donde puede sobrevivir hasta quince días. Los rayos solares lo destruyen rápidamente en condiciones naturales, mientras que los rayos ultravioleta producidos por lámpara lo inactivan después de un período más o menos largo. En condiciones naturales, en corrales abiertos, el virus sobrevive de dos a cuatro días.

El virus del cólera porcino es suceptible de variación tanto en su poder patogénico como en su poder antigénico, ya sea debido a métodos artificiales como la modificación en hospedadores no naturales o en cultivos de tejidos, o bien, debido a condiciones naturales en el campo.

TRANSMISION (5,6,16,20)

El virus se transmite fácilmente y con rapidez de dos maneras principalmente:

a).- Por contacto directo con secreciones nasales y oculares,

orina, heces y semen de animales enfermos.

- b).- Indirectamente, a través de ropa, zapatos, equipo, costales de alimento, parásitos, insectos, pájaros silvestres, vacunación inadecuada, contacto de susceptibles con animales recién vacunados, alimentación con escamocha, etc.

Experimentalmente el virus puede transmitirse a cerdos susceptibles por inyección parenteral de suspensiones de órganos triturados o sangre de animales enfermos.

#### VIAS DE ENTRADA (5,6,16)

Las vías de entrada para el virus del cólera porcino son el aparato respiratorio y el útero cuando las hembras gestantes se vacunan o exponen a un contagio.

#### PATOGENESIS (5,6,16)

El virus del cólera porcino es altamente invasivo y se localiza en la sangre a las 24 horas de

su entrada al organismo y se disemina al infectar los luecocitos circulantes. El máximo desarrollo se alcanza en 6-8 días y es en este período cuando se observan los primeros síntomas, aunque ésto es variable y depende de la virulencia de la cepa infectante y de la susceptibilidad de cada cerdo.

Este virus difiere de la mayoría de otros agentes infectantes en relación con los leucocitos circulantes, pues los destruye y detiene su producción, en contrándose cuentas bajas, menores de 7,000 leucocitos por milímetro cúbico. Esta característica puede emplearse como ayuda al diagnóstico, aunque no siempre es útil ya que si el animal está infectado por otro germen la cuenta será normal o alta.

Los primeros tejidos infectados y afectados son los del sistema reticuloendotelial: al necrosarse los capilares y haber extravasación de sangre se producen las hemorragias múltiples que se observan al examen postmortem.

El microorganismo es capaz de atravesar la barrera placentaria e infectar el nuevo organismo,

reproduciéndose libremente gracias al fenómeno de tolerancia inmunológica, originando diversos efectos prenatales como momificación, malformaciones, lesiones generalizadas, nacimientos prematuros, abortos y mortinatos.

SIGNOS CLINICOS (5,6,16)

Debido a los cuadros clínicos que caracterizan a esta enfermedad se reconocen dos tipos de cólera porcino:

- 1.- Cólera porcino clásico
- 2.- Cólera porcino atípico

- 1.- Cólera porcino clásico.

El cuadro incluye postración de los animales al iniciarse la enfermedad, seguida de falta de apetito, marcada elevación de la temperatura corporal, abundante secreción ocular y conjuntivitis. Se observa hiperemia de la piel con enrojecimiento de la trompa, orejas, abdomen y cara interna de los muslos.

Al principio de la enfermedad exis

te constipación, seguida de diarrea amarillo-grisácea y vómito. Al final, los animales muestran paso vacilante y paresia del tren posterior.

El cólera porcino típico es una enfermedad aguda con curso de 10 a 20 días en promedio, la morbilidad es muy alta y la mortalidad del 95% al 100%.

## 2.- Cólera porcino atípico.

Es producido por cepas víricas de baja virulencia que se han modificado en el campo o que son de origen vacunal y que han revertido a la virulencia. El cuadro es variable y puede observarse lo siguiente:

- a) Mioclonia congénita, conocida también como tremor congénito, "cerdos brincadores" o "cerdos bailarines". Se manifiesta en cerdos al nacimiento y se caracteriza por temblores generalizados, debilidad y pérdida del equilibrio.



Cuando durante la gestación se aplica una vacuna a base de virus modificado se observa momificación, micrognatia, ascitis y otras lesiones y deformidades.

- b) Cólera agudo en recién nacidos. Es común que los recién nacidos y madres no vacunadas mueran de cólera porcino asintomático agudo. Este problema se observa asociado a infecciones por cepas de baja virulencia de origen no vacunal que infectan a la madre. Los signos de la enfermedad se observan sólo en los lechones al realizar la necropsia.
- c) Cólera postvacunal de baja patogenicidad. Se presenta de 10 a 15 días después de inmunizar cerdos con vacunas obtenidas en cultivos celulares porcinos, manifestando signos de la enfermedad que se agrava por la existencia de infecciones bacterianas secundarias que responden favorablemente a la terapia antibiótica.

LESIONES MACROSCOPICAS (5,6,16)

El cuadro patológico del cólera por

cino es el de una enfermedad septicémica, caracterizado por hemorragias petequiales y equimosis de intensidad variable.

La severidad de las lesiones depende básicamente del curso de la enfermedad, la susceptibilidad de los cerdos, la fuente de infección, tipo de cepa vírica, vía de infección, época del año, condiciones de crianza de los animales, exposición a infecciones secundarias, etc.

Las lesiones encontradas en diversas estructuras son:

- En piel se aprecia eritema que se vuelve cianótico a medida que la circulación sanguínea se hace más lenta.
- Hay crecimiento y edema de los ganglios linfáticos. Posteriormente se presentan congestión y hemorragias periféricas. Los ganglios más frecuentemente afectados son los cervicales, los crurales y los inguinales.
- En las tonsilas existe agrandamiento, en los pulmones hay bronconeumonía o congestión y en ocasiones se observa pleuresía por infecciones secundarias y en epiglotis y laringe se observan escasas petequias.
- El corazón se encuentra blando, con congestión en miocardio

y hemorragias petequiales o equimosis. Con frecuencia hay hidropericardio.

- Las lesiones del riñón son la más características del cólera porcino y ocurren como hemorragias en forma de abundantes petequias localizadas en la superficie renal, dando la apariencia de "huevo de guajolote".
- El fundus del estómago puede estar marcadamente hemorrágico y congestionado. Los intestinos muestran enteritis catarral y en intestino grueso a la altura de la válvula ileocecal se encuentra la "úlcerá botonosa", que es elevada y formada de capas concéntricas; esta lesión es consecuencia de infartos y se considera de gran valor diagnóstico.
- Generalmente el hígado se observa congestionado y aumento de volumen. La vesícula biliar puede estar contraída o distendida y con una lesión similar a úlcera y en ocasiones presentar petequias.
- En bazo hay infarto o infartos en su borde, lo cual es casi patognómico del cólera porcino.
- Las lesiones en cerebro son congestión y hemorragias.
- Debido a un desequilibrio del metabolismo calcio-fósforo se interrumpe el crecimiento de los huesos, reflejándose en la línea de unión epifisiaria costocondral de las costillas quinta a novena. La lesión es un ensanchamiento de

la línea de unión entre el hueso y el cartílago, que es más marcada a medida que el proceso tiende a la cronicidad.

#### LESIONES MICROSCOPICAS (5,6,16)

La lesión primordial es producida en los endotelios vasculares y consiste en una degeneración hidrópica de las células endoteliales seguida de necrosis y hemorragias. La extravasación de sangre en áreas de degeneración vascular produce acúmulos de leucocitos y, eventualmente, infartos.

- En el cerebro hay lesiones de encefalitis no supurativa caracterizada por infiltración linfocitaria perivascular con gliosis focal o difusa. Las lesiones se localizan en médula, puente, cuerpos cuadrigéminos y tálamo.
- En la epífisis de las costillas se observa ensanchamiento del área de células maduras del cartílago. En el área cartilaginosa hay multiplicación celular y trabéculas óseas irregulares.

#### DIAGNOSTICO (5,6,16)

Existen algunas pruebas de laborao

torio que ayudan a establecer el diagnóstico del cólera porcino. La más usual es la cuenta leucocitaria: los valores normales de glóbulos blancos en cerdos varían de 14,000 a 18,000 por milímetro cúbico y en casos de cólera porcino el número baja a 10,000 o menos. Sin embargo, pueden darse casos que muestren cuentas normales o leucocitosis por infecciones bacterianas secundarias que estimulen la producción de leucocitos. Puede haber también casos de cerdos normales que muestren leucopenia, especialmente los menores de seis semanas de edad o en infecciones víricas como influenza y enfermedad de Aujeszky, en las que la cuenta leucocitaria desciende.

Una de las pruebas de diagnóstico más sensibles es la de inmunofluorescencia, que se realiza en tejido amigdalino obtenido por necropsia o por biopsia.

Se emplea también el estudio histopatológico del cerebro y la médula, en los cuales debe observarse panencefalitis no supurativa con infiltración linfocitaria perivascular y marcados cambios endoteliales. Estas lesiones se desarrollan cerca del décimo día de la enfermedad.

La prueba más efectiva, pero más costosa y tardada, se realiza en cerdos susceptibles al cólera porcino inoculándolos con el material infectante (homogeneizado de órganos o sangre) y a otro grupo de cerdos con el mismo material más suero inmune. En el caso de cólera porcino los animales del primer lote deben morir o enfermar y recuperarse, mientras que los del segundo grupo no deben enfermar. Estos últimos y los que se recuperen del primer grupo deben mostrar inmunidad al ser inoculados posteriormente con virus patógeno de cólera porcino.

En resumen, el diagnóstico del cólera porcino se integra con los datos obtenidos a partir de la historia clínica, los signos clínicos y las pruebas de laboratorio.

#### INMUNIDAD CONTRA EL COLERA PORCINO (3,4,5,6,9,16,17,18,20)

La prevención del cólera porcino se realiza mediante la inmunización con diferentes tipos de biológicos. La inmunidad contra el mal puede ser adquirida en forma pasiva o activa. Existe la resistencia natural a la enfermedad, pero desafortunadamente en un bajo porcentaje,

quizás menor a un 5%.

La inmunidad pasiva se logra mediante la aplicación de sueros hiperinmunes por vía parenteral o, en los lechones recién nacidos, por la ingestión de calostro procedente de madres inmunes. Por otro lado, la inmunidad activa se induce mediante la aplicación de vacunas como las de virus vivo modificado en cultivos celulares, en conejos, o las de virus inactivado.

La primera forma de protección contra el cólera porcino fue la aplicación de suero de cerdos hiperinmunizados; posteriormente se aplicó simultáneamente con virus patógeno y se encontró que este método confería inmunidad estable y duradera; sin embargo, este método fue abandonado porque al diseminarse el virus virulento ocasionaba brotes de cólera porcino.

Las vacunas de virus vivo atenuado por pases en conejos, o en conejos y cerdos alternadamente, se aplican con suero inmune y pueden inducir inmunidad hasta por uno o dos años, aunque tienen la desventaja de provocar reacciones postvacunales, en ocasiones severas; además dise

minan el virus poco atenuado y éste puede revertir a la viru  
lencia después de varios pases.

Se elaboran otras vacunas a partir  
de virus modificados por pases en cultivos celulares prove  
nientes de células de riñón de cerdo, de riñón bovino, de  
leucocitos de cerdo, etc.

Actualmente se utiliza también la  
vacuna de virus modificado por un alto número de pases en  
conejos, con resultados altamente satisfactorios ya que no  
se disemina el virus, pueden vacunarse hembras gestantes sin  
peligro para los fetos y se emplea sin necesidad de inocular  
suero inmune.

Las vacunas inactivadas tienen la  
ventaja de no diseminar el virus, pero pueden encontrarse  
lotes mal inactivados que llegan a ocasionar brotes de cóle  
ra porcino, ya que algunos laboratorios productores no reali  
zan pruebas de inactivación. Estas vacunas se elaboran a  
partir de material infectante (sangre u órganos triturados  
de animales enfermos, cultivos de virus patógeno en células)  
adicionado de inactivadores y estabilizadores como cristal



violeta, glicerina, eucaliptol, hidróxido de aluminio, formol, azul de toluidina.

La vacunación de hembras con virus inactivado puede realizarse en cualquier momento y no produce efectos adversos, excepto cuando se utilizan lotes de vacuna mal inactivados y que por lo tanto contienen virus patógeno, o lotes de vacuna con potencia no satisfactoria. Lo más adecuado para vacunar hembras gestantes es utilizar virus activo modificado por alto número de pases en conejos.

Es posible que algunas veces se presenten fallas de vacunación, ya sea a corto o largo plazo. Estas fallas pueden ocurrir debido a diversos motivos.

Las fallas a corto plazo se observan en los primeros días siguientes a la vacunación y pueden deberse a brotes de la enfermedad iniciados cuatro o más días antes de vacunar, o a la aplicación de vacunas atenuadas en combinación con dosis inadecuadas de suero, o a cepas de virus que regresan a la virulencia o que varían en su antigenicidad. La presencia de otras enfermedades o estados físicos que disminuyen la respuesta inmune como el "stress"

por manejo, la administración de corticosteroides, las infecciones por *Ascaris*, las infecciones por *Salmonellas*, *Erysipelothrix*, *Pasteurellas*, *Streptococcus*, *Clostridia*, *Lysteria*, etc. también afectan los resultados de la vacunación y pueden ocasionar fallas de la misma.

Las fallas a largo plazo pueden deberse a la utilización de sueros o vacunas sin la potencia necesaria, a la interferencia de la vacuna por el suero cuando la primera se aplica antes de que se haya eliminado éste, a la vacunación de lechones de cuatro o cinco semanas de edad y que aún posean anticuerpos maternos, a la aplicación de suero inmune en dosis mayores que las recomendadas, al empleo de vacunas que están próximas a expirar, mal manejadas por no conservarse a bajas temperaturas y sin proteger de la luz, al empleo de vacunas que han perdido el vacío, que han sido mal inactivadas o que se diluyen más de lo recomendado.

#### DATOS SOBRE LA VACUNA CON QUE SE TRABAJA (4)

Esta vacuna contra el cólera porcino se presenta en forma liofilizada y se elabora a partir de virus activo modificado y producido en cultivos celulares de

tejidos porcinos. Para su uso se rehidrata con una solución de fosfatos de pH 7.2-7.4 y se aplica en dosis de 2 ml por vía intramuscular o subcutánea. La inmunidad se desarrolla a partir del tercer día de la vacunación y es duradera hasta por un año; la aplicación simultánea de suero anticólera se deja al arbitrio del veterinario y la vacuna no es efectiva si se aplica a cerdos que hayan contraído la enfermedad antes de la inmunización.

El virus del cual se partió para obtener la cepa vacunal se aisló de la sangre de animales enfermos y se inculó a conejos, practicándose un mínimo de 147 pases sucesivos en esta especie, después de los cuales se comprobó que el virus había perdido su patogenicidad pero no su capacidad antigénica; el microorganismo se recobró por un pase en cultivos celulares de tejidos porcinos y en ellos se ha venido desarrollando para elaborar la vacuna.

Antes de salir a la venta cada lote de vacuna se somete a varias pruebas de control para comprobar su potencia, su esterilidad bacteriana y micótica, su inocuidad, su solubilidad y el vacío; se determina el contenido de humedad residual en el producto liofilizado y se mi

de el pH de la vacuna rehidratada.

La prueba más importante es la de potencia pues indica si el producto contiene suficiente material inmunogénico para proteger efectivamente contra la infección. Esta prueba consiste en inmunizar un lote de cerdos con diluciones 1:100 y 1:2000 de la vacuna rehidratada, para que a los catorce días se sometan a una infección de prueba o desaffo con una dosis letal de virus patógeno del cólera porcino; junto con estos animales inmunizados se infecta otro lote de cerdos sin inmunizar. Todos estos animales se observan durante un mínimo de catorce días después de la infección y para que la prueba se considere satisfactoria es necesario que al menos el 80% de los vacunados con la dilución 1:100 y el 50% de los inmunizados con la dilución 1:2000 deben sobrevivir y no mostrar signos de la enfermedad, mientras que los controles deben enfermar y morir de cólera porcino.

Debido al elevado costo de la prue y a que inicialmente se realizó una serie de las mismas con un número mayor de animales, actualmente se ha establecido, tomando en cuenta esos resultados iniciales, que para cada

lote de vacuna se utilicen cuatro animales para inmunizar con la dilución 1:100 y dos para inmunizar con la dilución 1:2000. Como cada lote de vacuna se divide en tres sublotes para su liofilización y cada uno se prueba individualmente, se ha visto que la prueba es representativa aún cuando está dísticamente tenga escaso valor.

Existen dos razones por las cuales la prueba de potencia se lleva a cabo precisamente con estas diluciones: la primera es la exigencia de las autoridades gubernamentales de que este tipo de vacunas contenga cantidades adecuadas de material inmunogénico para proteger a la dilución 1:100. La segunda es la norma interna del laboratorio productor que establece que esta vacuna debe contener 2,000 unidades protectoras para el cerdo (upc), las que se definen como la cantidad de partículas antigénicas capaz de proteger al 50% de los cerdos en una prueba de potencia; Por lo tanto, inmunizando con la dilución 1:2000 se comprueba que cada dosis de esa dilución es equivalente a una unidad de protección al cerdo y que la vacuna comercial contiene 2,000 unidades.

Esta prueba de protección presenta

ventajas indiscutibles como son el demostrar la inmunogenicidad del virus y la efectividad de la vacuna dada la alta cantidad de partículas virales que contiene, permitiendo observar los efectos posibles que tendrá su uso puesto que se lleva a cabo sobre organismos semejantes a aquéllos para los que está destinada. Sin embargo, también existen serias desventajas en este método y la primera es la utilización de cerdos que deben ser sanos, susceptibles a la infección y provenientes de madres no vacunadas; otras desventajas son la necesidad de contar con grandes áreas destinadas a su mantenimiento y con personal que los atienda. Ya en la prueba propiamente dicha, a menudo se presentan variaciones de resultados debidas al organismo de los animales en cuanto a su estado nutricional, grado de susceptibilidad, forma en que se manejan, etc. lo que constituye una grave dificultad, aunque la desventaja más importante la constituye el riesgo de diseminar el virus patógeno empleado en la infección de desafío y con ésto provocar brotes de la enfermedad.

Las desventajas mencionadas y la actual campaña de erradicación del cólera porcino motivaron la búsqueda de una prueba que disminuya los costos, el tiempo y los riesgos que involucra la de protección, tratando de

substituir la por una técnica "in vitro" que sea más económica, más rápida y más segura, por lo que aquí se propone el empleo de la inmunofluorescencia por el método indirecto.

## I.2. TÉCNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

La técnica de anticuerpos fluorescentes combina los métodos histoquímicos e inmunológicos para localizar complejos antígeno-anticuerpo específicos presentes en secciones de tejido o preparaciones de bacterias, protozoarios y otras células, o bien, componentes celulares como hormonas y enzimas, con ayuda de sustancias químicas introducidas en la estructura de la proteína anticuerpo de manera que se puede estudiar su especificidad inmunológica. Así se preparan anticuerpos purificados que se marcan con colorantes fluorescentes -fluorocromos- que se emplean en la técnica de Coons, quien introdujo el uso de derivados de la fluoresceína como fluorocromos para localizar los sitios en que se encuentra el antígeno observando el complejo antígeno-anticuerpo al microscopio de fluorescencia (2,9,11,12,13). Los derivados de la fluoresceína que más se han usado como fluorocromos son los compuestos en forma de isocianato e isotiocianato, siendo este último el que se emplea actual

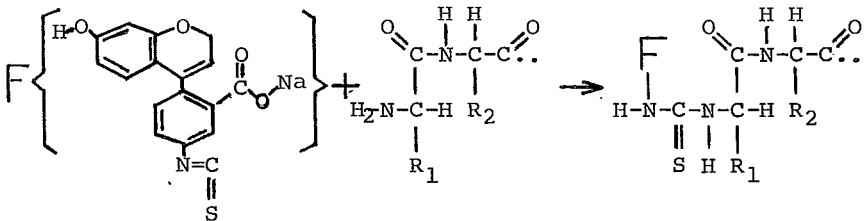
mente debido a la facilidad con que se conjuga a la globulina anticuerpo.

Fueron Coons y colaboradores (1941) los primeros en obtener resultados satisfactorios al localizar el antígeno polisacárido soluble de neumococos en secciones de tejido de ratón infectado utilizando un anticuerpo conjugado con fluoresceína. Más adelante (1958) emplearon isocianato de fluoresceína para marcar el anticuerpo y en ese mismo año Riggs y colaboradores sintetizaron el isotiocianato de fluoresceína (ITCF) que se conjuga mejor a la globulina y que se aplicó a esta técnica gracias a Marshall y colaboradores. Goldstein introdujo en 1960 la cromatografía en columna y la filtración en gel para la purificación del conjugado. Los laboratorios BBL han comercializado el isómero No. 1 del ITCF que es el más conveniente debido a su intensidad de fluorescencia, su estabilidad y su capacidad de combinación con la proteína. Este compuesto presenta fluorescencia verde-amarilla a la radiación ultravioleta y tiene un peso molecular de 389.4. Cuando el fluorocromo se hace reaccionar con una solución alcalina de proteína se forma un enlace tiocarbamida entre el radical  $\text{SCN}^-$  del primero y los grupos amino libres, especialmente del aminoácido



lisina de la proteína anticuerpo, quedando marcado el anti cuerpo. La experiencia indica que sólo un 15% de los restos lisina de la proteína se enlaza al fluorocromo (1,13,22,23).

ESQUEMA DE LA REACCION (10)



Isotiocianato de  
Fluoresceína (ITCF)

Gamma  
Globulina

Conjugado

El fluorocromo y la radiación ultra violeta son partes esenciales de la técnica de anticuerpos fluorescentes. El fluorocromo es aquella substancia que e mite luz de longitud de onda más larga que la de la radia ción de excitación. Si la emisión de luz existe únicamente mientras permanece la radiación de excitación, el fenómeno se llama fluorescencia; si continúa aún después de haber cesado la radiación excitante recibe el nombre de fosforescencia (13).

Las sustancias fluorescentes pueden ser conjugadas al anticuerpo sin interferir con la especificidad de éste ni con su capacidad para combinarse con su antígeno, siempre y cuando la sección de tejido o las células se preparen adecuadamente; el antígeno puede ser de origen exógeno al tejido o célula (por ejemplo un microorganismo) o bien, ser parte intrínseca de ese material y la localización del complejo antígeno-anticuerpo fluorescente puede servir para el diagnóstico o para establecer la posición exacta y/o el tiempo de aparición en la célula (por ejemplo el tiempo en que se detecta un virus después de infectar un organismo o una célula) (12,13).

#### METODOS DE LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

Existen cuatro métodos para el desarrollo de la técnica de anticuerpos fluorescentes, cada uno con sus aplicaciones y ventajas particulares. A continuación se describen brevemente y se muestran en la figura No. 1.

##### 1.- METODO DIRECTO (10,13)

Consiste en la reacción de un anti

cuerpo marcado con su antígeno correspondiente y específico. Se aplica a la búsqueda rápida de antígenos en secciones de tejidos u otras preparaciones.

2.- METODO INDIRECTO (12,13)

Es el más usado y conveniente y en él, el anticuerpo específico para el antígeno no se marca, pero después de formado el complejo antígeno-anticuerpo se hace reaccionar con un conjugado frente a la especie de que procede el primer anticuerpo. De esta manera es posible trabajar con anticuerpos obtenidos en conejo, específicos para una gran variedad de antígenos y usar un solo reactivo fluorescente, por ejemplo globulina de cabra anti gamma-globulina de conejo. Si se observa fluorescencia específica se tiene evidencia indirecta de la presencia del antígeno o del anticuerpo en el material que se estudia.

3.- METODO DEL COMPLEMENTO (10,13)

Este método utiliza la capacidad del antígeno y el complemento para unirse al anticuerpo.

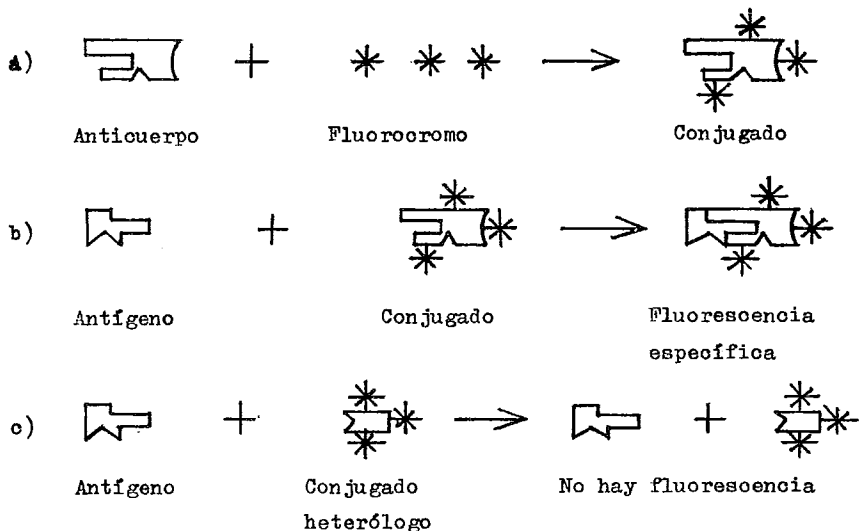
El complemento de cobayo se localiza con anticuerpos anticomplemento conjugados.

4.- METODO DE INHIBICION DE LA FLUORESCENCIA (1,8,13)

Consiste en el bloqueo de la reacción entre el conjugado y el antígeno por un anticuerpo no conjugado. El método asegura una gran especificidad y es muy usado en el diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias: un antígeno se hace reaccionar con el suero sospechoso de contener anticuerpos frente a ese antígeno, para formar un complejo antígeno-anticuerpo que a continuación se hace reaccionar con el anticuerpo, pero ahora conjugado. Si no existen anticuerpos en el suero se observará fluorescencia, mientras que si el suero contiene anticuerpos no habrá fluorescencia. Este método también se emplea para probar la especificidad de algunos conjugados antes de emplearlos.

Como puede apreciarse, la técnica de anticuerpos fluorescentes es muy versátil y puede aplicarse a la detección tanto de anticuerpos como de antígenos.

1.- METODO DIRECTO



2.- METODO INDIRECTO

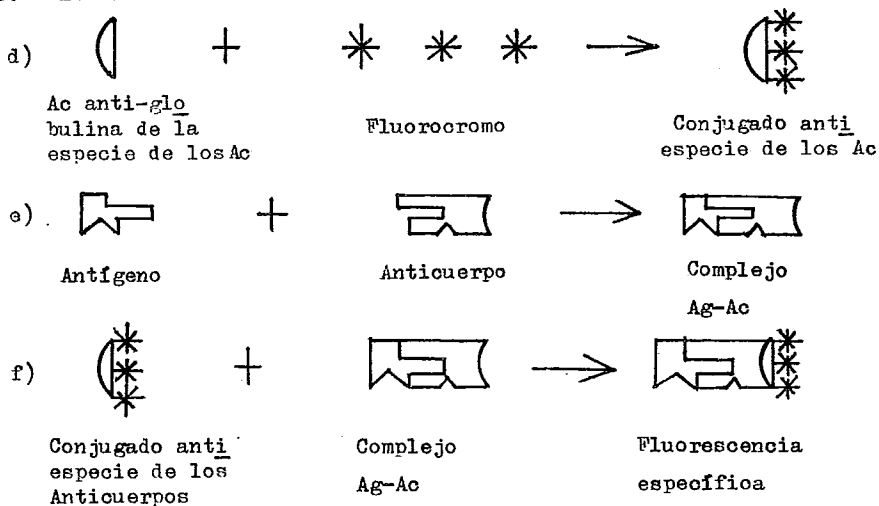
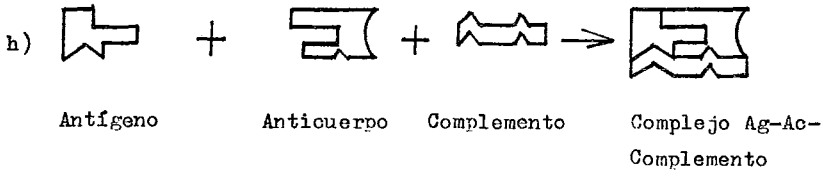
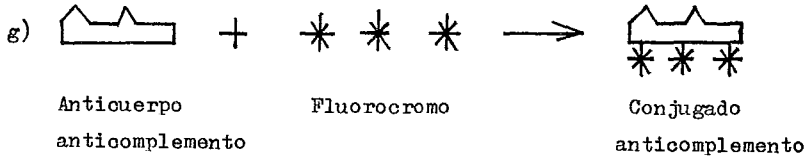
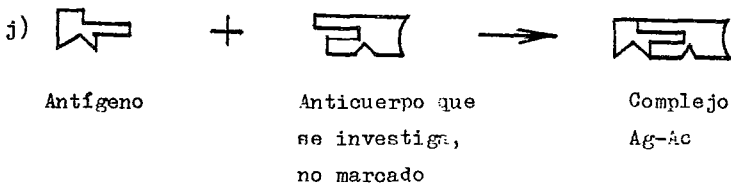


Fig. No. 1 TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

### 3.- METODO DEL COMPLEMENTO



### 4.- METODO DE INHIBICION DE LA FLUORESCENCIA



CARACTERISTICAS DE LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

Dadas las particularidades de esta técnica son notorias tres características importantes:

a) Especificidad (2,11,12,13)

El anticuerpo fluorescente es una proteína altamente específica y reacciona sólo con el antígeno para el que se preparó. Se utilizan sueros de altos títulos para que el conjugado resultante posea también un título alto de anticuerpos. La alta especificidad de la técnica se debe en parte al cuidado que debe tenerse en la preparación y purificación de los anticuerpos y en parte a la absorción del conjugado con polvo de órganos desecados con acetona. Generalmente se emplea polvo de hígado o de cerebro de ratón para la absorción del conjugado, pero es preferible utilizar polvo del substrato sobre el que se desarrolló -o del que se obtuvo- el antígeno, desecado con acetona.

b) Rapidez (6,8,13)

El procedimiento de tinción y obser

vación de fluorescencia puede completarse en una o dos horas, siempre y cuando se tenga la habilidad necesaria, por lo que la inmunofluorescencia es más rápida que las pruebas serológicas, el aislamiento de virus u otras pruebas, lo cual representa una clara ventaja cuando es urgente un diagnóstico rápido y seguro.

c) Sensibilidad (8,10,13)

La sensibilidad del método directo es muy similar a la de la prueba de fijación del complemento pero difiere de la de las pruebas de neutralización o hemaglutinación. Como no se puede medir la intensidad de la fluorescencia específica no es posible determinar la sensibilidad exacta del método, en el cual se emplea un exceso de anticuerpo marcado y la sensibilidad depende de la cantidad de antígeno presente.

La sensibilidad del método indirecto es de 5 a 10 veces mayor que la del directo, debido a que cada capa añadida se combina como un anticuerpo con un antígeno subyacente; además, puede hacerse semicuantitativo si se prueban diluciones del antígeno o del



anticuerpo problema. El método indirecto es muy conveniente cuando sólo se pueden obtener pequeñas cantidades de muestra.

#### REQUISITOS DE LA TECNICA

Antes de intentar llevar a cabo la técnica de anticuerpos fluorescentes deben tenerse en cuenta las condiciones necesarias para que se obtengan resultados satisfactorios, como la preparación del antígeno y del anticuerpo, el fluorocromo que debe emplearse y la forma de manejarlo, las condiciones de reacción, los testigos y la interpretación de la fluorescencia.

##### 1.- Antígeno (10,13)

En cuanto a la preparación del antígeno, este proceso debe llevarse a cabo de manera que no lo enmascare y dificulte su unión con el anticuerpo o que pierda su reactividad frente a dicho anticuerpo. El material que contiene al antígeno o al anticuerpo que se manejará como antígeno a su vez, se trata con acetona para adherirlo firmemente al portaobjetos y

para eliminar grasas y otras sustancias que puedan interferir con la reacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, en ocasiones la fijación con acetona puede aumentar la fluorescencia inespecífica o la autofluorescencia del material en estudio, por lo que no se somete a este tratamiento.

La concentración del antígeno en el material debe ser la adecuada como para que sea detectado por esta técnica.

## 2.- Anticuerpo (10,11,12,13)

La inmunización que se realiza para obtener el anticuerpo que se conjugará debe realizarse, siempre que sea posible, con el antígeno libre de substancias del tejido normal para evitar los anticuerpos contra éste. En todo caso, el suero y/o la solución de conjugado deben absorberse con una preparación del tejido o con polvo del mismo u otros órganos desecados con acetona, para evitar la fluorescencia inespecífica o extraña.

El suero inmune debe contener un alto título de anticuerpos, para que el conjugado que se prepare resulte potente. El proceso de conjugación debe llevarse a cabo de manera que permita al suero conservar su título original de anticuerpos o que al menos resulte muy próximo a él. El conjugado debe estar libre de albúminas y alfa y beta globulinas.

Es muy importante que se determine con exactitud la proporción fluorocromo-proteína, que debe ser 1:2 en relación molar, para evitar que el anticuerpo fluorescente adquiriera una fuerte carga negativa, la cual se incrementa si la proporción no es la adecuada, lo que causaría la aparición de fluorescencia inespecífica debido a la adsorción de las proteínas que acompañan al anticuerpo específico, pues la globulina no conjugada posee carga negativa más débil y reacciona más rápidamente que la marcada.

Una vez finalizada la conjugación, el exceso de fluorocromo se elimina por diálisis o por filtración en gel de dextrana.

3.- Fluorocromo (8,10,13,22,23)

Por lo que se refiere al fluorocromo, siempre se busca que sea fácilmente conjugable y que la unión fluorocromo-proteína sea estable. Así mismo, no deberá interferir con la reactividad del anticuerpo.

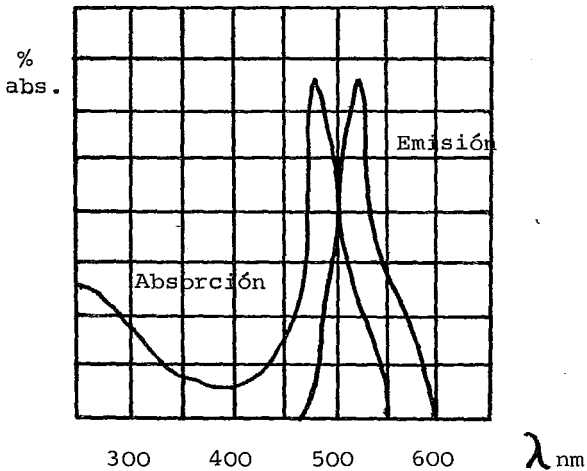


Fig. No. 2

Espectro de absorción-emisión del ITCF

Una característica esencial del fluorocromo debe ser la eficiencia de fluorescencia,

es decir, que emita luz de longitud de onda diferente a la de la radiación de excitación (sólo mientras exista ésta) y que tal diferencia sea lo más grande posible. El isotiocianato de fluoresceína absorbe luz a una longitud de onda de 490 nm y la emite a una longitud de 520 nm, la cual es visible en la región verde amarilla del espectro al microscopio de fluorescencia. En la figura No. 2 puede apreciarse el espectro de absorción-emisión del ITCF.

#### 4.- Condiciones de reacción (8,13,14)

Al momento de realizar la reacción antígeno-anticuerpo conjugado son necesarias las manipulaciones más cuidadosas para obtener resultados satisfactorios. En primer término debe establecerse la dilución óptima o título de trabajo del anticuerpo fluorescente, que se determina haciendo diluciones seriadas del conjugado y comparando los resultados con los de un antígeno o un anticuerpo estandarizados; deben controlarse el tiempo, la temperatura y la humedad de la atmósfera a las cuales se lleva a cabo la reacción, así como el pH de la solución salina amortiguada, tanto

para diluir el conjugado o el suero, como para lavar las preparaciones y la forma en que deben hacerse estos lavados.

5.- Controles (8,10,13,22)

Es indispensable incluir en la preparación y observaciones controles negativos y positivos para poder establecer si una imagen fluorescente es el resultado de la localización específica del anticuerpo conjugado a su antígeno. Los controles sirven para diferenciar la fluorescencia específica de la autofluorescencia y de la fluorescencia específica indeseable o extraña. Un primer control sería una sección del material en estudio sin reaccionar con el conjugado; otro control, el material tratado con suero o globulina homólogos sin conjugar; un tercer control sería un antígeno heterólogo tratado con el conjugado. Finalmente, debe correrse un testigo positivo que consistiría en el material antigénico tratado con un conjugado, de ser posible estandarizado.

Con estos controles se asegura la

especificidad de la reacción y el buen manejo de la técnica.

6.- Observación (8,13)

Para la observación de la fluorescencia al microscopio se utiliza una fuente de luz ultravioleta, que puede ser una lámpara de vapor de mercurio a presión, que requiere de ciertos cuidados especiales para su uso, o una lámpara de halógeno, que es más sencilla de manejar. La longitud de onda deseada se obtiene mediante filtros adecuados: filtro de excitación BG 12 o filtro de excitación FITC; filtros OG 1 o de 530 nm y filtro GG 9. Para eliminar las radiaciones peligrosas para el observador se emplean los filtros barrera en torreta que se localizan entre los filtros de excitación y el ocular. Se emplea también un condensador de campo oscuro.

INTERPRETACION DE LA FLUORESCENCIA (13,22)

Existen tres problemas típicos en la técnica de anticuerpos fluorescentes que es necesario

conocer para evitar confusiones y resultados falsos. Estos problemas son la autofluorescencia, la fluorescencia específica indeseable o extraña y la fluorescencia inespecífica.

- a) Autofluorescencia. Es la que presenta el material en estudio, por sí mismo, al recibir la radiación ultravioleta. Puede ser blanca o azul-violeta y se distingue fácilmente de la fluorescencia específica que es verde-amarilla. La autofluorescencia se incrementa por la fijación con formalina y la inclusión en parafina.
- b) La fluorescencia específica indeseable o extraña ocurre cuando el inmunógeno es impuro por la presencia de proteínas o antígenos heterólogos que no pueden eliminarse con la absorción en tejidos normales.
- c) La fluorescencia inespecífica puede deberse al fluorocromo mismo, a la alta concentración del conjugado o al exceso de fluorocromo sin conjugar; se ha visto que ocurre menos con isotiocianato que con isocianato de fluoresceína. Puede deberse también a la fuerte carga negativa del anticuerpo, a la fijación del material, o a la desecación de la preparación durante la reacción,



lo que favorece la formación de cristales fluorescentes. La posibilidad de que se presente este problema disminuye cuando las concentraciones de proteína y fluorocromo, el tiempo y la temperatura de reacción y la purificación del conjugado por filtración en gel de dextrana o por cromatografía de afinidad en el mismo material.

Por lo ya expuesto, para que una imagen fluorescente se tome como específica deben tomarse en cuenta las imágenes resultantes de los testigos positivos y negativos, la manera en que se manejaron las preparaciones y si el examen al microscopio ha sido correcto. Es necesario recordar que la intensidad de la fluorescencia depende de la cantidad del antígeno presente y que la fluorescencia específica no puede ser identificada o localizada a menos que haya una emisión suficiente de fluorescencia; la ausencia de fluorescencia no indica necesariamente ausencia de antígeno. Es claro que la experiencia en la observación de imágenes fluorescentes específicas es indispensable para dar por bueno un resultado.

INMUNOFLUORESCENCIA Y COLERA PORCINO

La aplicación de la técnica de anticuerpos fluorescentes en sus diferentes métodos es muy variada y día a día se encuentran nuevas adaptaciones en microbiología, inmunología, patología, histología, alergología, etc. Es muy útil para un diagnóstico rápido y seguro en muchas infecciones por virus, rickettsias, bacterias y protozoarios (10,11,12,13).

Por cuanto se refiere a la aplicación de esta técnica al problema del cólera porcino, es una de las más empleadas y confiables en el diagnóstico, debido a sus características de especificidad, rapidez y seguridad. Para ello se obtiene un corte de tejido del animal infectado (cerebro, tonsilas, bazo, nódulos linfáticos, etc.) y se trata con el conjugado correspondiente, obteniéndose el resultado en unas cuantas horas (5,6,13).

Recientemente se empezó a considerar la posibilidad de utilizar esta técnica de anticuerpos fluorescentes a la titulación de las vacunas contra la infección, utilizando el método directo, para lo cual se hacen dilucio

nes seriadas de la vacuna que se inoculan a cultivos de células PK-15 y se tratan con el conjugado específico. Se considera que una vacuna es suficientemente "potente" si contiene material antigénico correspondiente a un título de  $10^{3.0}$  dosis infectantes detectables por anticuerpos fluorescentes (DIAF) para el 50% de los cultivos con una tolerancia de 0.5 unidades de logaritmo, por dosis para cerdo, lo cual se expresa  $10^{3.0} \text{ DIAF}_{50\%} \pm 0.5 \text{ log}$ . Otro parámetro para considerar a una vacuna como satisfactoria titulándola en cultivos de tejidos resulta de contar un mínimo de 30 placas fluorescentes por tubo de cultivo, en la dilución  $10^{-7}$  (15,21).

Sin embargo, estos dos criterios no son aceptados como confiables por los laboratorios productores ya que consideran que carecen de apoyo en cuanto al número de datos obtenidos a partir de trabajos experimentales, porque esta técnica no es indicativa de la inmunogenicidad del virus y porque tiene varias desventajas con respecto a la prueba "in vivo", como son la necesidad de contar con personal capacitado para el manejo del método y la observación de la fluorescencia, el costo y las dificultades en la preparación del conjugado y cierta inespecificidad por la posibilidad de que el virus sufra variaciones.

Estas razones expuestas por los la boratorios y algunas autoridades involucradas en el control de biológicos veterinarios dejan entrever cierta indisposici ón y desconocimiento hacia los alcances y posibilidades de esta técnica, existiendo resistencia a preparar y capacita r personal, a desarrollar metodologías propias, a depender menos de la tecnología extranjera, desde luego sin olvidar las reglamentaciones nacional e internacional para cada caso.

Además, puesto que se trata de un conjugado específico sería posible detectar con esta técnica si una cepa vacunal ha sufrido alguna variación antigénica y, en tal caso, podría probarse su inmunogenicidad en animales titulando los anticuerpos en el suero, o bien, con una prueba de protección.

El interés que se ha manifestado por parte de algunos sectores para emplear la inmunofluorescencia como prueba rutinaria se debe en gran parte a la presente campaña de erradicación del cólera porcino, para la que se necesitan mayores cantidades de vacuna y los laboratorios necesitan acortar el tiempo de producción sin menoscabo de la calidad. Por otra parte, es necesario evitar la disemina

nación del virus patógeno utilizado hasta ahora en las pruebas de potencia. Con el fin de contribuir a poseer más datos que permitan implementar la técnica en los laboratorios productores y de constatación se pensó realizar este trabajo empleando el método indirecto, dada su alta sensibilidad, la dificultad de obtener grandes cantidades de suero porcino para conjugarlo y la conveniencia de utilizar suero anti gamma globulina porcina obtenido en conejo, del cual se purifican las gamma globulinas y se conjugan.

C A P I T U L O    I I

P A R T E    E X P E R I M E N T A L

En realidad fueron dos los aspectos que se estudiaron en este trabajo. El primero fue la titulación de anticuerpos en suero de cerdos inmunizados con la vacuna contra cólera porcino a las diluciones 1:100 y 1:2,000, para conocer el título de anticuerpos protector, ya que en la literatura consultada no se encontró este dato, para así conocer los títulos que la vacuna es capaz de estimular, lo que posteriormente serviría como dato complementario en la titulación de la misma.

La segunda parte consistió en la titulación de la vacuna contra cólera porcino en cultivos de tejidos por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes, por el método indirecto, para su aplicación rutinaria en las pruebas de control del producto y establecer la mínima con

centración de material antigénico que debe existir para aprobar un lote. A continuación se detalla la metodología de ambas partes del estudio. Los reactivos y la preparación de soluciones se encuentran en los apéndices al final de este trabajo (2,8,11,13,15,22).

## II.1. INMUNIZACION Y PRUEBA "IN VIVO"

Se inmunizaron 12 cerdos con tres diferentes lotes de vacuna diluída 1:100 administrando dosis de 2 ml por vía subcutánea en la región axilar derecha, que son la dosis y la vía recomendada por el laboratorio productor. Se inmunizaron seis cerdos más con la vacuna diluída 1:2,000, ya que son las diluciones que el laboratorio maneja para la prueba de potencia del producto. Los animales empleados fueron lechones sanos, susceptibles al cólera porcino, procedentes de madres no vacunadas, pesando alrededor de veinte kilogramos y de seis semanas de edad aproximadamente. A los catorce días de la inmunización se obtuvo el suero de cada animal, se identificó y guardó en congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de titularlos. Se obtuvo también el suero de cuatro animales no inmunizados para ser utilizados como controles negativos y el suero de dos cerdos hiperinmuniza

dos, que sirvió como control positivo.

Al siguiente día del sangrado los dieciocho cerdos inmunizados y los cuatro controles se inocu- laron con virus patógeno contenido en 2 ml de sangre de ani- males enfermos ( desafío, dosis o infección de prueba). Este lote de animales se observó durante catorce días, anotan- do los que enfermaron y murieron de cólera porcino y los que permanecieron sanos. El diagnóstico de cólera porcino en los casos de enfermos y muertos se hizo a partir de los da- tos clínicos y necropsias.

## RESULTADOS

Los animales inmunizados con el lote "R" de vacuna, diluída 1:100 fueron cuatro, dos de los cua- les murieron de cólera porcino; de los animales inmunizados con la dilución 1:2000 de la vacuna, uno murió de cólera por- cino. De acuerdo a las normas del laboratorio, este lote se sometió nuevamente a la prueba de potencia: después del desafío murió un cerdo de los cuatro vacunados con la dilu- ción 1:100 y uno de los inmunizados con la dilución 1:2,000 por lo que a este lote se le adjudicó una protección del 80%.



De los seis animales inmunizados con el lote "S" de vacuna, cinco sobrevivieron a la dosis de prueba sin mostrar signos de la enfermedad, muriendo uno de los vacunados con la dilución 1:100, quizá debido a un mal funcionamiento de su sistema inmunocompetente. Se calificó a este lote con un 90% de protección, según el protocolo del laboratorio productor.

Los seis animales inmunizados con el lote "T" de vacuna sobrevivieron a la infección de prueba sin mostrar signos de la enfermedad, por lo tanto, confirmó una protección del 100%.

En cuanto a los testigos, los cuatro murieron de cólera porcino entre el sexto y el noveno días. Todos estos resultados pueden observarse en la tabla No. 1, junto con los de la titulación de anticuerpos.

## II.2. TITULACION DE ANTICUERPOS POR INMUNOFLUORESCENCIA

El substrato sobre el que se llevó a cabo la reacción fue una preparación de virus vacunal desarrollado en un cultivo de células de médula ósea de le

chón. Se depositaron dos gotas del cultivo con una pipeta Pasteur sobre una serie de portaobjetos en los que se habían delineado con lápiz de diamante dos círculos. Se dejaron secar al aire y se fijaron en acetona durante diez minutos a temperatura ambiente.

Se hicieron diluciones seriadas de cada suero problema 1:2, 1:4, 1:8, hasta llegar a 1:2,048 utilizando solución salina amortiguada como diluyente. Cada preparación fijada se cubrió con dos gotas de la dilución de suero correspondiente, corriendo cada prueba por duplicado.

Para los controles, dos preparaciones fijadas se cubrieron con dos gotas de suero de lechón no vacunado, cuatro se cubrieron con solución salina amortiguada y cuatro con suero de animales inmunes.

Todos los portaobjetos se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C durante 30 minutos, al término de los cuales se lavaron sumergiéndolos cinco veces en solución salina amortiguada, se dejaron durante 10 minutos en solución amortiguada nueva y al fin se enjuagaron cinco veces en agua destilada.

El conjugado de globulina anti-porcina-fluorocromo a la dilución de trabajo se absorbió con polvo de médula ósea de cerdo desecada con acetona: se mezclaron 100 mg de polvo por cada mililitro de solución del conjugado, permaneciendo la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, al cabo de los cuales se centrifugó a 2,500-3,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se colectó con pipeta Pasteur cuidando que no se tocara el sedimento (13).

Después de lavar las preparaciones se cubrieron con dos gotas de conjugado absorbido y se incubó nuevamente a 37°C en atmósfera húmeda durante 30 minutos.

Las preparaciones que se dejaron para controles se trabajaron como sigue: las que en el paso anterior se cubrieron con suero de lechón no vacunado se hicieron reaccionar con el conjugado, lo mismo que dos de los tratados con solución salina amortiguada y dos de los que se trataron con suero inmune. Los otros dos controles que se cubrieron con solución salina amortiguada se cubrieron de nuevo con solución salina y los otros dos que habían sido cubiertos con suero inmune recibieron nuevo tratamiento con

más suero inmune. Estos controles se incubaron en la forma indicada.

Después de la incubación las preparaciones se lavaron como se describió anteriormente, se dejaron secar al aire y se cubrieron con una gota de medio de montaje (glicerina amortiguada) y luego se colocó un cubreobjetos sobre cada preparación.

Para la observación de la fluorescencia se utilizó un microscopio Reichert Immunopan con lámpara de halógeno de 12 volts y 100 watts, filtro de excitación FITC de 495 nm, filtros OG 1 (de 530 nm), EK 2A y GG 9.

## RESULTADOS

Los sueros que se titularon por el método descrito corresponden a los animales que se utilizaron en la prueba de protección ya descrita. Los animales vacunados con la dilución 1:100 del lote "R" de vacuna tuvieron títulos de 1:1,024, 1:512, 1:256, 1:1,024, sobreviviendo sanos los dos que mostraron títulos de 1:1,024 y muriendo los otros dos. De los vacunados con la dilución 1:2,000

uno tuvo un título de 1:512, resultando enfermo de cólera porcino y otro de 1:1,024, el cual sobrevivió sano a la prueba de protección.

Con respecto a los cerdos inmunizados con el lote "S", todos tuvieron títulos de 1:1,024 y sobrevivieron sanos, excepto uno de los vacunados con la dilución 1:100 cuyo título fue de 1:16 y que murió de cólera porcino.

Los animales vacunados con el lote "T" sobrevivieron todos, teniendo títulos de 1:1,024 y 1:2,048. Todos estos resultados se encuentran en la tabla No. 1, en la página 57.

### II.3. TITULACION DE LA VACUNA

La segunda parte de este estudio fue la titulación en cultivo de tejidos de la vacuna contra cólera porcino usando la técnica de anticuerpos fluorescentes por el método indirecto. A continuación se describe la metodología seguida (2,8,13,15).

TABLA No. 1

Resultados de la titulación de anticuerpos por inmunofluorescencia y de la prueba de protección "in vivo".

Lote de vacuna	Dilución	No. de muestra	Título de Ac	Resultado	Protección "in vivo"
R	1:100	1	1:1,024	Satisfac.	80%
		2	1:512	Muerto	
		3	1:256	Muerto	
		4	1:1,024	Satisfac.	
	1:2,000	5	1:512	Enfermo	
		6	1:1,024	Satisfac.	
S	1:100	7	1:16	Muerto	90%
		8	1:1,024	Satisfac.	
		9	1:1,024	"	
		10	1:1,024	"	
	1:2,000	11	1:1,024	"	
		12	1:1,024	"	
T	1:100	13	1:2,048	Satisfac.	100%
		14	1:1,024	"	
		15	1:2,048	"	
		16	1:1,024	"	
	1:2,000	17	1:1,024	"	
		18	1:1,024	"	

Se preparó un cultivo primario de células de médula ósea de lechón en botellas de Roux que se incubaron durante cinco días a 37°C, utilizando medio 199 adicionado de suero de caballo. Al finalizar el período de incubación se cosechó este cultivo celular, eliminando el medio de crecimiento y se agregó medio nuevo, agitando para resuspender las células. Se tomaron 2 ml de esta suspensión que se depositaron en tubos de Leighton que contenían una laminilla de vidrio del No. 2 y se incubaron a 37°C durante tres días.

Después se eliminó el medio de crecimiento de cada tubo evitando el deslizamiento de las células, ya que éstas no se adhieren a la superficie del vidrio. Se agregaron 1.8 ml de medio de crecimiento y 0.2 ml de una dilución de la vacuna preparada con el mismo medio. Las diluciones se hicieron de varios frascos de vacuna de los lotes "A", "B", "C", "D", "E", diluyendo desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ . Estos mismos lotes se sometieron a una prueba de protección en cerdos.

Se dejaron sin inocular con el virus vacunal ocho tubos de cultivo celular para utilizarlos como

testigos negativos de crecimiento viral y otros ocho se inocularon con virus patógeno contenido en sangre de cerdo enfermo de cólera porcino, para emplearlos como testigos positivos . El inóculo fue de 0.2 ml.

Todos los tubos se incubaron durante cinco días a 37°C y al finalizar este período se extrajeron las laminillas de vidrio de cada tubo de Leighton con ayuda de una espátula y se sujetaron a un aplicador de madera para fijarlas en acetona durante diez minutos a temperatura ambiente. El recipiente en que se fijaron contenía 40-50 ml de acetona para cuatro o cinco laminillas.

Cada preparación fijada se cubrió con dos gotas de suero anticólera porcino sin diluir y absorbido en polvo de médula ósea, luego se incubó y lavó en la forma antes indicada.

Cuatro de los controles negativos y cuatro de los positivos se trataron sólo con solución salina amortiguada y se incubaron y lavaron igual que las demás preparaciones. El resto de los controles se trató con el suero anticólera porcino.



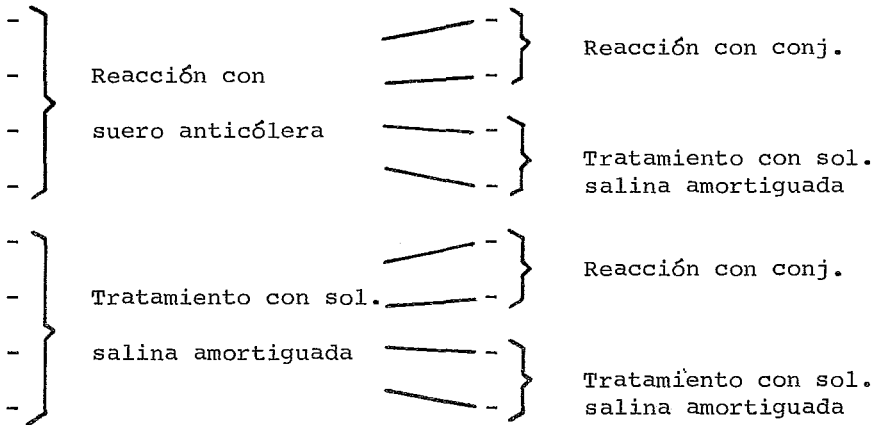
Después de lavar, cada preparación se cubrió con dos gotas de conjugado anti gamma globulina porcina a la dilución de trabajo y absorbido con polvo de médula ósea. De los cuatro controles negativos tratados con suero, dos se trataron con el conjugado y los otros dos con solución salina amortiguada. De los cuatro controles negativos tratados con solución salina amortiguada, dos se hicieron reaccionar con conjugado y dos con solución salina amortiguada. De los cuatro controles positivos tratados con suero anticólera porcino, dos se hicieron reaccionar con el conjugado y dos se cubrieron con solución salina. De los controles positivos tratados con solución salina, dos se cubrieron con solución salina amortiguada y dos se hicieron reaccionar con el conjugado. En la siguiente página se ofrece un esquema de la preparación de los controles.

Después de incubar y lavar las preparaciones se dejaron secar al aire y se cubrieron con una gota de medio de montaje; las laminillas se colocaron sobre portaobjetos de manera que las células quedaron entre las dos superficies. Las tres laminillas correspondientes a cada dilución se colocaron en un mismo portaobjetos. La observación de fluorescencia se hizo con el mismo equipo que en

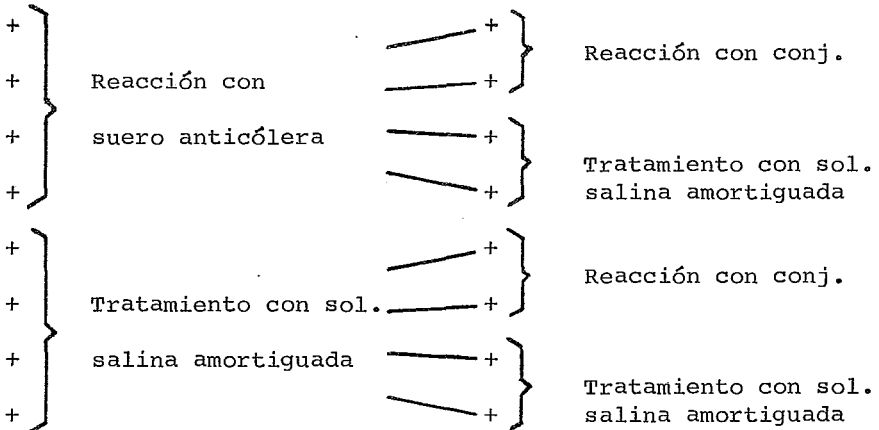
la titulación de anticuerpos.

Esquema de preparación de controles:

Ocho controles negativos (cultivo celular sin inocular)



Ocho controles positivos (cultivo celular inoculado)



## RESULTADOS

Todos los animales vacunados con los lotes "A", "B", "C", sobrevivieron sanos a la dosis de prueba, por lo que la protección con estos lotes fue de 100% y el título, es decir, la máxima dilución en que se observó fluorescencia debida al desarrollo del virus vacunal fue de  $10^{-10}$  con intensidad de dos cruces (++) en cuanto a fluorescencia. Las diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  mostraron intensidades de (++++) incluyendo las preparaciones inoculadas con la vacuna sin diluir.

Los lotes "D" y "E" protegieron al 80% de los animales en la prueba "in vivo" y tuvieron títulos de  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  respectivamente. En las diluciones  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$  de estos lotes no se observó fluorescencia. Estos resultados se muestran en la Tabla No. 2.

Resultados de la titulación de la vacuna contra cólera porci  
no por inmunofluorescencia y de la prueba de desafío.

Lote de vacuna	Dilución para inocular	Fluorescencia	Protección al desafío
A	$10^0-10^{-6}$	++++	100%
	$10^{-7}-10^{-9}$	+++	
	$10^{-10}$	++	
B	$10^0-10^{-6}$	++++	100%
	$10^{-7}-10^{-8}$	+++	
	$10^{-9}-10^{-10}$	++	
C	$10^0-10^{-6}$	++++	100%
	$10^{-7}-10^{-8}$	+++	
	$10^{-9}-10^{-10}$	++	
D	$10^0-10^{-6}$	++++	80%
	$10^{-7}$	+++	
	$10^{-8}$	++	
	$10^{-9}-10^{-10}$	--	
E	$10^0-10^{-6}$	++++	80%
	$10^{-7}$	+++	
	$10^{-8}-10^{-10}$	--	

C A P I T U L O    I I I

I N T E R P R E T A C I O N   D E   R E S U L T A D O S

Y   D I S C U S I O N

La primera parte de este estudio, ~~es~~ decir, la titulación de anticuerpos en el suero de animales inmunizados, permitió estimar cuál es el título de anticuerpos obtenido por estímulo con la vacuna que puede considerarse protector para el cerdo. Tal estimación se obtuvo comparando los resultados de esta titulación con los de la prueba de protección "in vivo". Como puede verse en la Tabla No. 1, página 57, los animales que desarrollaron títulos de 1:1,024 sobrevivieron a la infección de prueba sin mostrar síntomas de la enfermedad, mientras que los que murieron o enfermaron de cólera porcino tuvieron títulos de 1:512 o menores: dos cerdos desarrollaron títulos de 1:512, de los cuales uno murió y uno enfermó; otro cerdo desarrolló un tí

tulo de 1:256 y otro de 1:16, los cuales murieron. Dos cerdos mostraron títulos de 1:2,048 al ser inmunizados con el lote de vacuna que proporcionó protección del 100% -lote "T"- y ésto se debió quizá a su mejor estado nutricional y de salud.

Respecto a los resultados de la titulación de la vacuna se observó que las células inoculadas con el virus se aglomeraron formando acúmulos sobre las laminillas en que se multiplicaron, lo que parece ser un efecto del virus sobre ellas. En los casos en que no se inoculó virus el desarrollo fue homogéneo sobre la superficie del vidrio. El título fue la última dilución que aún produce fluorescencia, esto es, en la que aún existen partículas virales capaces de infectar a las células y multiplicarse, detectables por inmunofluorescencia.

Se observaron abundantes acúmulos fuertemente fluorescentes (++++) en las preparaciones inoculadas con las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  de todos los lotes de vacuna, encontrándose una disminución de la fluorescencia (+++) en las diluciones  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ . Para los lotes que protegieron al 100% de los animales en la prueba de protección la fluorescencia fue de (++) en la dilución  $10^{-10}$ , mientras

que los lotes que sólo protegieron al 80% tuvieron fluorescencia (++) hasta la dilución  $10^{-8}$ .

Las unidades de fluorescencia (+) se consideraron de acuerdo a la cantidad aparente de acúmulos fluorescentes en cada laminilla y la intensidad de la fluorescencia en comparación con los testigos. Estos resultados se muestran en la Tabla No. 2 en la página 63.

De acuerdo con los datos encontrados en la literatura se observó el desarrollo viral intraplasmático, pues la fluorescencia se manifestó en el citoplasma mientras que el núcleo permaneció opaco (4,5).

#### COMENTARIOS Y DISCUSION

Ante todo es necesario hacer notar que el tamaño de la muestra con que se trabajó fue pequeña y por lo mismo los resultados obtenidos no pueden tomarse como definitivos, pero sí ayudan a conocer la forma en que trabaja el método indirecto de la inmunofluorescencia aplicado a la titulación de la vacuna contra cólera porcino; de aquí que es posible decir que este método es útil como prue

ba auxiliar para el control del producto, ya que ofrece pre  
cisión, alta sensibilidad y rapidez. Sus desventajas serían  
el equipo requerido y el personal adiestrado en su manejo y  
en la observación de la fluorescencia.

Aunque el título de anticuerpos que  
se estimó como protector fue de 1:1,024, existe la posibili  
dad de que el título real se encuentre entre 1:512 y 1:1,024,  
por lo que habría que probar diluciones intermedias. Los tí  
tulos de 1:512 o menores protegen parcialmente o carecen de  
papel protector, como se observó con cerdos cuyo suero tuvo  
estos títulos y que enfermaron o murieron de cólera porcino.

La titulación de anticuerpos es ade  
más aplicable en el caso de que se vayan a transportar anima  
les sospechosos de haber estado o estar infectados o vacuna  
dos a una zona exenta del mal o en el caso de exportar anima  
les a países libres de cólera porcino en los que no se admi  
ten cerdos vacunados. Otra aplicación sería en los laborato  
rios productores que necesitan animales susceptibles y prove  
nientes de madres no vacunadas. La prueba serviría para acep  
tar o rechazar los animales que lleguen al laboratorio.



Sin embargo, la aplicación más importante y de la que se obtendría más provecho es la que se refiere a la prueba de potencia de la vacuna, inmunizando cerdos con diluciones de la vacuna e investigando el título de anticuerpos que es capaz de estimular. Si la vacuna es suficientemente inmunogénica estimulará un alto título, ocurriendo lo contrario si no contiene suficiente material inmunógeno o de que el virus se haya inactivado en algún paso de la producción. Como antígeno para esta prueba puede emplearse el cultivo celular inoculado con virus vacunal que se utiliza normalmente en la producción de la vacuna, del que se necesitarían sólo unos mililitros pues se emplean únicamente dos gotas en cada portaobjetos que sirve para una dilución.

Sobre la titulación de la vacuna debe decirse que los resultados obtenidos indican que existe la posibilidad de adoptar este método como prueba rutinaria para la potencia del producto pues hay correspondencia entre los datos obtenidos en la prueba "in vivo" y la titulación por anticuerpos fluorescentes, que es una cuantificación del material inmunógeno que contiene la vacuna. Los resultados de la prueba de protección se dan como porcentaje de animales que sobreviven a la dosis de prueba considerando las di

luciones hechas a la vacuna de 1:100 y 1:2,000. Los lotes que mostraron disminución en su poder inmunogénico por esta prueba también se detectaron por la técnica de anticuerpos fluorescentes, ya que estos lotes produjeron fluorescencia hasta la dilución  $10^{-8}$ .

Los títulos de la vacuna que aquí se reportan son particulares para el producto con que se trabajó y no pueden tomarse como parámetro para otros similares pues las autoridades exigen que las vacunas de este tipo protejan en la dilución 1:100 mientras que el laboratorio productor cuya vacuna se tituló por inmunofluorescencia garantiza que protege aún a la dilución de 1:2,000; cabe esperar que otros laboratorios produzcan una vacuna con títulos más bajos pero suficientemente protectores. A fin de reglamentar el título mínimo para esta vacuna es necesario hacer un estudio con todas las vacunas que existen actualmente en el mercado. Aún más, para este mismo producto deben verificarse los resultados con una muestra mayor, tanto de lotes de vacuna como de animales inoculados con cada uno de ellos y con cada dilución para determinar los parámetros definitivos.

Con respecto a las células con que

se trabajó, éstas se desarrollan sobre la superficie del vi  
drio pero sin adherirse a ella, por lo que debe tenerse cui  
dado al momento de extraer la laminilla del tubo evitando  
que se pierdan células por desplazamiento antes de fijarlas  
con acetona.

Para obtener resultados consisten  
tes la vacuna debe rehidratarse y hacer las diluciones lo  
más rápido posible para que la inoculación de los cultivos  
celulares se haga dentro de los siguientes 60 minutos a la  
rehidratación, además de que la vacuna y las diluciones de  
ben mantenerse a baja temperatura (2°C a 4°C) pues de lo  
contrario el virus se inactiva.

Las preparaciones que no vayan a  
observarse inmediatamente después de reaccionar con el con  
jugado deben envolverse en papel aluminio y conservarse en  
refrigeración o congelación para conservar la intensidad de  
la fluorescencia (15).

Aunque no se reporta, se hizo una  
prueba de titulación de la vacuna utilizando las células del  
cultivo de tejidos en suspensión en lugar del desarrollo ce

lular sobre la laminilla. Se encontró que esta modificación es inadecuada debido a que al depositar una gota de la suspensión sobre el portaobjetos se forman conglomerados celulares en forma de racimos y no en un solo plano, lo que impide que se determine con certeza qué células se tiñeron específicamente pues existen células en el interior del conglomerado que no se infectaron por el virus y sin embargo se observan fluorescentes por la cercanía de las positivas. Tales conglomerados se encuentran dispersos por el campo microscópico presentándose irregularidades muy marcadas en la intensidad de la fluorescencia, por lo que es difícil decidir si la misma es adecuada o no.

Debe resaltarse la importancia que tiene el utilizar suero de caballo como enriquecedor del medio en lugar de suero fetal de ternera, que aumenta la fluorescencia inespecífica. Con el uso del primero se logró una mejora en la aplicación de la técnica de anticuerpos fluorescentes a nuestro objetivo (18).

Puede considerarse que utilizando el método indirecto de la inmunofluorescencia en la titulación de la vacuna contra cólera porcino se tiene una alta

especificidad y confiabilidad que en gran parte se basa en el hecho de que suero y conjugado se absorben en el polvo del substrato sobre el que se desarrolla el virus, disminuyendo casi totalmente la fluorescencia específica extraña. Por este método se estima la cantidad de partículas virales que contiene cada frasco de vacuna y por la titulación de anticuerpos se conoce la capacidad inmunogénica del producto. Si se conjugan ambos procedimientos en el control de los lotes de vacuna se garantizará de manera más confiable la calidad de los mismos y en un futuro más o menos cercano y con un mayor número de datos podría substituirse la prueba de protección.

C A P I T U L O   I   V

R E S U M E N   Y   C O N C L U S I O N E S

IV.1.    RESUMEN

Se aplicó la técnica de anticuerpos fluorescentes, por el método indirecto, a dos titulaciones: La titulación de anticuerpos contra cólera porcino estimulados por una vacuna comercial y la titulación del material inmunógeno de la misma en cultivos celulares.

Para la titulación de los anticuerpos se inmunizó un lote de animales con diluciones 1:100 y 1:2,000 de la vacuna, se obtuvo el suero de cada cerdo y se diluyó progresivamente desde 1:2 hasta 1:2,048; con cada dilución se cubrió una serie de preparaciones fijadas con acetona, de virus de cólera porcino desarrollado en cultivos celulares. Se incubó a 37°C durante treinta minutos en atmós

fera húmeda y se lavó con solución salina amortiguada; a continuación cada preparación se hizo reaccionar con un conjugado de globulina anti gamma globulina porcina obtenida en conejo y marcada con isotiocianato de fluoresceína. Nuevamente se incubó y lavó y luego se colocaron una gota de medio de montaje y un cubreobjetos sobre cada preparación para observarlas al microscopio de luz ultravioleta. Se encontró que el título de anticuerpos suficiente para proteger a los cerdos contra el cólera porcino es de 1:1,024 y que a títulos de 1:512 los animales empiezan a mostrar síntomas de la enfermedad y a títulos menores mueren después de una infección de prueba. La observación se hizo en comparación con controles negativos y positivos y los resultados con referencia a los de la prueba de desafío.

Para la titulación de la vacuna se prepararon cultivos de médula ósea de lechón que se inocularon con diluciones seriadas de la vacuna desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ . Al sexto día de incubar se fijó cada preparación con acetona y se cubrió con suero de cerdo absorbido en polvo de médula ósea desecada con acetona; se incubó en atmósfera húmeda a  $37^{\circ}\text{C}$  durante treinta minutos y luego se lavó con solución salina amortiguada para hacerlas reaccionar con el con

jugado antiporcino absorbido en polvo de médula ósea. Nuevamente se incubó y lavó y después se agregó una gota de medio de montaje sobre cada preparación. Estas se colocaron sobre un portaobjetos para observarlas al microscopio de fluorescencia. Los resultados indicaron que la vacuna estudiada debe contener material inmunógeno a título de  $10^{-10}$  para considerarla como "potente", es decir, que protegerá al 100% de los animales inmunizados con diluciones 1:100 y 1:2,000 en una prueba de potencia.

Los resultados de las dos titulaciones se compararon con los de las pruebas de desaño realizadas con los mismos lotes que se estudiaron en este trabajo.

#### IV.2. CONCLUSIONES

De lo aquí reportado se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1.- Es posible aplicar la técnica de anticuerpos fluorescentes a la titulación de la vacuna contra cólera porcino en cultivos de tejidos como prueba de cuenta indirecta de partículas viables y evitar así el empleo de animales.



- 2.- La vacuna debe contener material inmunogénico a título de  $10^{-10}$  que corresponde al 100% de protección en la prueba de protección, para que se considere satisfactoria en cuanto a potencia; sin embargo, este método no mide la inmunogenicidad del producto.
- 3.- También es posible la titulación de anticuerpos como prueba de inmunogenicidad. De acuerdo a esta prueba piloto si el título es de 1:1,024 o más, la vacuna confiere protección (Tabla No. 1).
- 4.- Para que estas técnicas de titulación del virus y de anticuerpos por inmunofluorescencia se apliquen rutina riamente es necesario que durante un tiempo se corran simultáneamente con la prueba de protección a fin de obtener un número suficiente de datos que permitan su uso en substitución de dicha prueba.
- 5.- Por su naturaleza, el mejor método para garantizar la calidad de este producto es la titulación de anticuerpos en animales inmunizados; puesto que da una idea clara de la forma en que se comportará en los cerdos al ser usada en el campo.

6.- El empleo de la técnica de inmunofluorescencia en las pruebas de potencia evita la diseminación del virus patógeno que se utiliza en la prueba de desafío.

A P E N D I C E S

APENDICE I

Reactivos y preparación de soluciones (2,13,14)

1.- Solución saturada de sulfato de amonio.

Disolver alrededor de 400 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en 500 ml de agua destilada y a  $70^\circ\text{-}80^\circ\text{C}$ . Agitar hasta disolución completa y dejar enfriar. Filtrar antes de usar.

2.- Solución 2 mol/l de hidróxido de sodio.

Disolver 40 g de NaOH en lentejas en 300 ml de agua destilada agitando hasta su disolución. Dejar enfriar y aforar a 500 ml con agua destilada.

3.- Solución salina isotónica.

Disolver 8.5 g de NaCl en 500 ml de agua destilada y aforar a 1,000 ml con agua destilada.

4.- Amortiguador de boratos, pH 8.4-8.5

Disolver en aproximadamente 300 ml de agua destilada:

Acido bórico ( $H_3BO_3$ )            6.184 g

Bórax ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ )        9.536 g

Cloruro de sodio ( $NaCl$ )        4.384 g

Aforar a 1,000 ml con agua destilada.

5.- Solución salina amortiguada con boratos, pH 8.4-8.5

Mezclar 400 ml del amortiguador de boratos con 8,000 ml de solución salina isotónica. Esta solución se utiliza en la diálisis de las gamma globulinas.

6.- Amortiguador de fosfatos, pH 7.5

Solución amortiguadora de fosfatos 0.10 mol/l

A) Solución 1 mol/l de fosfato monobásico:

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$             13.7998 g

$H_2O$  c.b.p.                100      ml

B) Solución 1 mol/l de fosfato dibásico:

$Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$         26.8077 g

$H_2O$  c.b.p.                100      ml

7.- Solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.5

Solución A                    16.00    ml



Solución B	84.00	ml
NaCl	8.7	g
H <sub>2</sub> O c.b.p.	10,000	ml

8.- Solución de cloruro de bario al 10%.

BaCl	5.0	g
H <sub>2</sub> O c.b.p.	5.0	ml

9.- Medio de montaje.

Glicerina grado reactivo	90.0	ml
Amortiguador de carbonatos, pH 9.5	10.0	ml

Se mezclan ambos reactivos y se agitan durante 16 horas en agitador magnético. pH final: 8.5

10.- Amortiguador de carbonatos, pH 9.5

Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	10.6	g
Bicarbonato de sodio (NHCO <sub>3</sub> )	25.2	g

Disolver el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 80 ml de agua destilada y agregar el NaHCO<sub>3</sub>; agitar hasta disolución y aforar a 100 ml con agua destilada.

11.- Adyuvante coloidal de fosfato de calcio e hidróxido de aluminio.

A)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9.3	g
	$\text{H}_2\text{O}$ c.b.p.	100	ml
B)	$\text{Al}(\text{OH})_3$	1.56	g
	$\text{H}_2\text{O}$ c.b.p.	100	ml

Mezclar 90 ml de la solución B con 10 ml de la solución A. Esterilizar a 15 libras de presión durante treinta minutos.

12.- Acetona grado reactivo.

13.- Cultivo celular de médula ósea de lechón \*\*

14.- Medio 199 con enriquecedores \*\*

\*\* Por ser fórmulas propiedad del laboratorio productor no es posible su descripción aquí.

APENDICE I I

Preparación de gamma globulinas de cerdo para la inmunización de conejos (2,7,12,13,14).

- 1.- Se sangraron dos cerdos extrayendo 20 ml de sangre de cada uno; se separó el suero y se obtuvieron 20 ml.
- 2.- En un vaso de precipitados se colocaron los 20 ml de suero y se agregaron, gota a gota, 10 ml de solución saturada de sulfato de amonio, agitando sobre un agitador magnético.
- 3.- Se ajustó el pH de la solución a 7.8 con solución 2 mol/l de hidróxido de sodio y se continuó agitando durante dos horas.
- 4.- Se centrifugó a temperatura ambiente durante treinta minutos a 3,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 20 ml de solución salina isotónica.
- 5.- Se repitieron dos veces los pasos 1 a 5 y una vez más

del 1 al 4. Este precipitado se disolvió en 10 ml de solución salina amortiguada con boratos.

- 6.- Se dializó en tubo de celofán contra una solución salina amortiguada con boratos (450 ml) para eliminar el sulfato de amonio. La solución se cambió cuatro veces: la primera a las dos horas, la segunda después de cuatro horas y las otras dos cada doce horas. La diálisis se realizó a 4°C. Al final se comprobó la ausencia total de iones sulfato mediante la reacción con cloruro de bario al 10%.
- 7.- Se centrifugó el dializado durante treinta minutos a 3,000 rpm a 4°C. El precipitado se disolvió en 10 ml de solución salina isotónica.
- 8.- Se esterilizó por filtración a través de membrana y se almacenó en refrigeración.



APENDICE I I I

Obtención del suero anti gamma globulina porcina y purificación de esta gamma globulina.

Se utilizaron dos conejos de 2.5 Kg de peso, de los cuales uno murió al 15° día de la inmunización.

Esquema de inmunización.

- 1er día. Inyección intramuscular en el cojincillo plantar: 0.5 ml de gamma globulina porcina (Ap. II)  
0.5 ml de adyuvante (Ap. I, No. 12)
- 8° día. Inyección en el cojincillo plantar  
1.0 ml de gamma globulina porcina  
1.0 ml de adyuvante
- 15° día. Inoculación en la vena marginal de la oreja.  
0.2 ml de gamma globulina diluida 1:10
- 16° día. 0.5 ml de gamma globulina diluida 1:10
- 17° día. 1.0 ml de gamma globulina diluida 1:10
- 18° día. 0.2 ml de gamma globulina
- 19° día. 0.5 ml de gamma globulina
- 20° día. 1.0 ml de gamma globulina

Se dejó descansar al animal durante una semana y se aplicó una inyección de refuerzo de 1.0 ml de gamma globulina. Una semana después se sangró al conejo por punción cardíaca, se separó el suero y se purificaron las gamma globulinas. La concentración de proteína en esta solución se determinó por el método del Biuret y resultó ser de 1.25 g/100 ml.

APENDICE I V

Preparación del conjugado de gamma globulina de conejo-iso  
tiocianato de fluoresceína (2,8,13,14,23).

La relación entre las concentraciones de globulina y fluoro  
cromo se determinó por los siguientes cálculos:

Solución de proteína            A mg/ml,    B ml

Proteína total                    A x B = C mg

Volumen de solución de  
proteína al 2%                    C/20 = D ml

Cantidad de fluorocromo        C/100 = E mg

Volumen de amortiguador  
de carbonatos                    D/10 = F ml

Volumen de sol. salina  
para añadirse a la sol.  
de proteína                      D - (B + F) = G ml

$$A = 1.25 \text{ g/100 ml} = 12.5 \text{ mg/ml}$$

$$B = 10 \text{ ml}$$

$$C = 125 \text{ mg}$$

$$D = 10 \text{ ml} \text{ (como la concentración de la solución de}$$

de anticuerpos fue menor al 2%, D se con  
deró igual a B).

E = 2 mg (igual que en D)

F = 1 ml

G = 0 ml

- 1.- Se disolvió el fluorocromo en amortiguador de carbonautos evitando la formación de espuma.
- 2.- Esta solución y la de gamma globulinas de conejo se manutuvieron a 2°C por dos horas y después se agregó la solución de ITCF a la de proteína y se continuó la agitaución durante seis horas.
- 3.- El fluorocromo que no reaccionó se eliminó por filtraución sobre gel de dextrana Sephadex G-25 en una columna de vidrio de 40 cm a temperatura de 2°-4°C. Se equiliubró el gel con amortiguador de fosfatos de pH 7.0 y se vertió en la columna, en cuyo fondo se colocó un trozo de algodón. Se evitó la formación de burbujas de aire o grietas en la columna de gel. El nivel de amortiguaudor rebasó un tapón de algodón en 3-4 cm. Se eluyó con este amortiguador durante 24 horas, al término de las cuau

les la separación de las fracciones fue clara: la zona más baja correspondió a la proteína conjugada, la intermedia al amortiguador de carbonatos y la superior al fluorocromo libre.

- 4.- Se esterilizó la solución filtrando por membrana y se almacenó a 2°C.
  
- 5.- Se hicieron diluciones seriadas y se hicieron reaccionar con su antígeno para establecer la dilución de trabajo. Después se diluyó hasta esa dilución y se envasó en ampolletas selladas en volúmenes de 0.5 ml, conservándolas en congelación.

APENDICE V

Preparación del polvo de tejidos desecados con acetona para la absorción del suero y el conjugado.

- 1.- Se colectó la médula ósea de lechón de los huesos fémur y húmero. Se dividió en pequeños trozos de 1-2 mm de diámetro. Se lavó varias veces en agua destilada y se homogeneizó con un volumen igual de solución salina (p/v).
  
- 2.- El homogeneizado se vertió en un vaso de precipitados y se añadieron 8 volúmenes de acetona (8 x ml) agitando. Se colectó el precipitado por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió en 4 volúmenes (4 x ml) de solución salina. Se dejó reposar toda la noche en refrigeración.
  
- 3.- Se colectaron los sedimentos por centrifugación y se suspendieron en un volumen de solución salina. Nuevamente se adicionaron 8 volúmenes de acetona y se colegtaron los precipitados en la forma descrita. La suspención en solución salina y el tratamiento con ocho volúl

menes de acetona se repitieron hasta que el sobrenadante se observó transparente e incoloro.

- 4.- Después de lavar se añadieron 4 volúmenes de acetona al sedimento final, se dejó en reposo por treinta minutos, se agitó y eliminó el sobrenadante. Esta operación se repitió una vez más y luego se lavó el sedimento con acetona, sobre un embudo. La acetona se eliminó extendiendo el material sobre un papel filtro que se colocó en una estufa a 37°C. El rendimiento fue de aproximadamente una vigésima parte del peso inicial del material.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Becton Dickinson de México: "Manual de procedimientos de laboratorio y productos BBL" México. (1974)
- 2.- Campbell, D.H., Garvey S., Cremer E. and Sussdorf D.: "Methods in Immunology" 2nd. ed. W. A. Benjamin Inc. N. Y., U. S. A. (1970) 113, 160, 189, 349.
- 3.- Correa, G. P.: "Potencia de sueros y vacunas comerciales contra cólera porcino". Simposio sobre cólera porcino, Instituto Syntex, México. (1977)
- 4.- Diamond Laboratories de México: "Manual técnico" México. (1975)
- 5.- Dunne, H. W. and Leman A. D.: "Diseases of swine" 4th. ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. (1975) 170.



- 6.- Esparza, B. H.: "Patología y diagnóstico del cólera porcino". Simposio sobre cólera porcino, Instituto Syntex, México. (1977)
- 7.- F. A. O. Anuarios de producción y comercio, 31. Roma, Italia. (1978) 200, 215, 47, 57.
- 8.- Frankel, S. R., Reiteman S., Sonen W. and Aley C.: "Gradwohl's Clinical Methods and Diagnosis" 7th. ed. The C. V. Mosby Company, St. Louis, U. S. A. (1970) 1060.
- 9.- Guzmán de las Casas, M.: "Cólera porcino, freno a las exportaciones mexicanas de carne de cerdo". Simposio sobre cólera porcino, Instituto Syntex, México. (1977)
- 10.- Humphrey, J. H. and White R. G.: "Immunology for Medicine students" 3rd. ed. Blackwell Scientific Publications, Bristol, England. (1973) 389.
- 11.- Kabat, E. A.: "Inmunoquímica experimental" 1a. ed. La Prensa Médica Mexicana, México. (1968) 24, 74, 750.
- 12.- Kabat, E. A.: "Structural concepts in Immunology and

Immunochemistry" 2nd. ed. Reinhart and Wiston, N. Y.,  
U. S. A. (1976) 30, 89, 750, 766

- 13.- Kawamura, A.: "Fluorescent Antibody Techniques and their Applications" University of Tokyo Press, Tokyo, Japan. (1969)
- 14.- Kwapinski, J. B. G.: "Research in Immunochemistry and Immunobiology" United Park Press, N. Y. U. S. A. (1972) 137.
- 15.- Madrid, J. A.: Comunicación personal. I. N. I. P.
- 16.- Ramírez, N. R.: "Diagnóstico en campo de los diversos cuadros clínicos del cólera porcino". Simposio sobre cólera porcino, Instituto Syntex, México. (1977)
- 17.- Sánchez, B.G.: "Contribución al estudio de la sanidad animal en climas tropicales: valoración de los diferentes tipos de vacunas contra cólera porcino en Iguala, Gro." Tesis de licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot. U. N. A. M., México. (1964)

- 18.- Syntex Laboratorios: "Manual Técnico" México. (1974)
- 19.- Téllez-Girón, R.: Comunicación personal. F. M. V. Z.
- 20.- U. S. Department of Agriculture: "Animal Diseases"  
Washington, D. C., U. S. A. (1956) 354.
- 21.- U. S. Department of Agriculture: "Standard Requirements for hog cholera vaccine, modified virus" V-6,  
June 15, Washington, D. C., U. S. A. (1966)
- 22.- Weir, D. M.: "Handbook of experimental Immunology"  
2nd. ed. Blackwell, Bristol, England. (1973) 14.
- 23.- Wilson, G. S. and Ashley M.A.: "Topley and Wilson's  
principles of Bacteriology and Immunity" 5th. ed.  
vol. II, The Williams & Wilkins Company, Baltimore,  
G. B. (1968) 2429.

## I N D I C E

OBJETIVO	Pág.	1
I GENERALIDADES		
I.1 Cólera porcino		4
I.2 Técnica de anticuerpos fluorescentes		26
II PARTE EXPERIMENTAL		49
II.1 Inmunización y prueba "in vivo"		50
II.2 Titulación de anticuerpos		52
II.3 Titulación de la vacuna		56
III INTERPRETACION DE RESULTADOS Y DISCUSION		64
IV RESUMEN Y CONCLUSIONES		
IV.1 Resumen		73
IV.2 Conclusiones		75
APENDICES		78
BIBLIOGRAFIA		91