

8320



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mi padre, cuyo tesón, constancia y esfuerzo tenaz en las acciones emprendidas, ha sido ejemplo constante para sus hijos, a él, infinitas gracias.

A mi madre, por su gran amor, por su confianza, por su esfuerzo desmedido, gracias.

A mis hermanos, Gerardo, Salomé, Araceli, Beatriz, Alejandro, Juan Manuel, Roberto y Ricardo, por su comprensión.

A mis familiares y amigos.

A la memoria de mi abuelita Juanita, quien estaría muy contenta con este acontecimiento.

A la Dra. Aurora Velázquez, maestra y asesora, por su apoyo incondicional, gracias también.

Al Sr. Manuel Gay, por su valiosa ayuda.

A mis asesores, por sus acertadas orientaciones.

A mis compañeros que laboran en el Departamento de Inmunología y Virología.

Al Sr. Robert Morris, por su gentileza.

A mi honorable Jurado.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM

UNAY
1983
17632
el. a
Pt 83-42

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	9
INTRODUCCION	13
OBJETIVO	19
HIPOTESIS	23
MATERIAL Y METODOS	27
RESULTADOS	33
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA	45

RESUMEN

RESUMEN

Debido a que la mayoría de las cepas del virus de cólera porcino no produce efecto citopatogénico en los cultivos celulares donde se replica, la detección en los mismos ha planteado algunas dificultades. Por lo anterior, se implementó una técnica en la que se adhirieron en forma pasiva anticuerpos anticólera a la membrana de glóbulos rojos, en un proceso denominado sensibilización, una vez sensibilizados, estos eritrocitos fueron vertidos en cultivos celulares de la línea PK-15 infectados con el virus de cólera porcino, con objeto de realizar en la superficie celular una reacción antígeno-anticuerpo y visualizarlo mediante una Hemoadsorción pasiva para comprobar de esta manera la presencia del virus en el cultivo.

Utilizando las pruebas de Inmunofluorescencia directa (IFD), Inmunofluorescencia indirecta (IFI), exaltación con el virus de la enfermedad de Newcastle (END) y Hemoadsorción Pasiva (Had P.) se titularon diferentes lotes de vacunas contra el Cólera Porcino, encontrando que en las diluciones bajas la sensibilidad de la prueba de Had P. fue similar a las otras tres técnicas, sin embargo, en las diluciones altas fue difícil apreciar el crecimiento viral tanto con las pruebas de END y Had P., no así con las técnicas de IFD e IFI. Como consecuencia se encontró que las pruebas de anticuerpos fluorescentes detectaron un logaritmo más en cada una de las vacunas estudiadas.

Se sugieren una serie de modificaciones a la técnica aquí descrita, para poder incrementar su sensibilidad.

INTRODUCCION

DETECCION DEL VIRUS DE COLERA PORCINO EN CULTIVOS CELULARES .MEDIANTE LA PRUEBA DE HEMOADSORCION PASIVA

Introducción.

El Cólera Porcino, conocido también como Fiebre Porcina o Peste Porcina Clásica (11,43), es una enfermedad viral altamente contagiosa, de curso agudo o crónico, afecta al cerdo doméstico y se caracteriza por un cuadro febril, hemorrágico y encefálico (1, 8, 11).

El agente causal es un virus que pertenece a la familia Togaviridae género Pestivirus, se caracteriza por tener un tamaño aproximado a los 40 nanómetros, su genóma está constituido por ácido ribonucleico (ARN) en forma de banda simple y con simetría helicoidal, es envuelto, sensible a la tripsina (1, 8, 43), destruido por el fenol al 5%, inactivado con cristal violeta 1/2000 (1), no tiene propiedades hemoaglutinantes ni hemoadsorbentes (43).

En forma natural se replica solo en el cerdo doméstico (7, 11, 43), en forma artificial se ha logrado la infección del conejo, borrego, becerro, pecarí, cabra, gato y mono (7).

El virus de Cólera Porcino puede replicarse en diferentes cultivos celulares, tanto primarios como células de línea.

Los cultivos primarios susceptibles, se originan principalmente de riñón de animales como bovino, ovino, venado, mofeta, tejón, zorro, conejo doméstico, cuye y principalmente cerdo. Cultivos primarios de testículo, ovario, bazo y leucocitos de cerdo son también susceptibles (1, 7, 43).

Algunas de las líneas celulares capaces de infectarse con el virus son, piel de embrión del bovino, testículo de delfín común, piel de conejo, testículo de cerdo, ovario de cerda y algunas líneas derivadas del riñón de cerdo, cuye, bovino y perro (7, 15).

El virus de Cólera Porcino replicado en cultivos celulares por lo general y en el mayor número de los casos no produce efecto citopatogénico (8, 43), no obstante se han reportado cepas virales capaces de producir dicho efecto, siempre y cuando existan condiciones especiales en cuanto a la incubación o bien bajo la adición de nutrientes especiales al medio de cultivo (5, 46). Asimismo, existen cepas que producen ligeros cambios en las estructuras celulares, los cuales son visibles únicamente con el microscopio de contraste de fases o bien con el electrónico (10, 25, 30, 33).

Dado que la mayoría de cepas del virus de Cólera Porcino no producen efecto citopático en las células donde se replica, su detección en los cultivos celulares

plantea ciertas dificultades. Por esta razón se han implementado diferentes métodos que se han utilizado con dicho fin.

1) Prueba de Inhibición Metabólica. Es una técnica indirecta, se basa en que algunas cepas del virus disminuyen notablemente el metabolismo de las células en que replican, de tal manera que estas no acidifican el medio de cultivo con la rapidez de las células no infectadas, esto se visualiza mediante la adición al medio de cultivo de un indicador de pH (6). Esta prueba más que cuantitativa es cualitativa y tiene la desventaja de su poca especificidad.

2) Prueba directa de Anticuerpos Fluorescentes. En esta técnica se emplea un conjugado anticólera, el cual es colocado sobre células sospechosas de estar infectadas con el virus, al ser observadas con el microscopio de fluorescencia, las preparaciones que contienen células infectadas presentan fluorescencia, no así las células sin infectar (3, 4, 9, 27, 35, 39, 40, 49).

3) Prueba indirecta de Anticuerpos Fluorescentes. En esta técnica a los cultivos sospechosos, se les adiciona un suero positivo a cólera, posteriormente se coloca conjugado antigammaglobulina. La observación de fluorescencia específica nos indica la presencia de complejos antígeno-anticuerpo y con ello la presencia del virus en el cultivo (47). Para la realización de las técnicas de fluorescencia, es necesaria la utilización de cubreobjetos dentro de los cultivos, en los cuales se desarrollan las células, posteriormente se extraen para la realización de las pruebas, el exceso en la manipulación, aunado a la fragilidad celular dificulta el desarrollo de las pruebas, por lo que la interpretación puede verse afectada. Igualmente la fluorescencia inespecífica llega a ocasionar problemas en la lectura, no obstante son pruebas bastante sensibles, específicas y rápidas.

4) Pruebas de Interacción Viral. Una forma no menos importante para la detección del virus de Cólera Porcino en cultivos celulares es mediante la interacción que este tiene, cuando es cultivado junto con otro virus de marcado efecto citopático.

Esto trae como resultado dos acciones que pueden ser:

- a) La exaltación o incremento del efecto citopático del segundo virus.
- b) La inhibición de dicho efecto debido al fenómeno conocido como interferencia.

a) La prueba de Exaltación con el virus de la enfermedad de Newcastle (END), utiliza una cepa lentogénica o mesogénica del virus de Newcastle, el cual se inocula de 4 a 6 días después del virus de Cólera Porcino, en este caso el efecto citopático del segundo virus se incrementa y el tiempo en aparecer se acorta en comparación con cultivos inoculados únicamente con el virus de Newcastle (14, 20, 21, 22, 23, 28, 32). Esta prueba es sensible y específica con

el inconveniente de que para su realización se requiere de la presencia en el medio de cultivo de porcentaje elevado de suero sanguíneo y este deberá ser específico (18, 28).

La prueba de Exaltación con el virus de la enfermedad de Teshen (ETV), es similar a la prueba de END en cuanto a su desarrollo e interpretación (38).

En ambas pruebas se presenta cierta dificultad en la interpretación, ya que no existe un parámetro de lectura como referencia, por lo que puede haber diferencias de interpretación entre un observador y otro (18).

b) En la segunda variante de las pruebas de interacción viral, el efecto citopático del segundo virus es inhibido en las células infectadas por el virus de Cólera Porcino debido al fenómeno conocido como "interferencia viral", habiéndose empleado virus como el de la Encefalitis Equina de Oeste (15), Influenza Humana (16, 45), Fiebre Aftosa (31), Parainfluenza III (12, 31), Estomatitis Vesicular (31), Poliomiелitis y virus hemoaglutinante del Japón (45).

Se ha reportado también que algunas cepas del virus de Cólera Porcino inducen interferencia con el virus de Newcastle y con ello la inhibición del efecto citopático (17, 31, 42, 44, 51).

5) Prueba de la Inmunoperoxidasa Indirecta. En esta técnica, a los cultivos sospechosos se les coloca suero positivo a Cólera Porcino, posteriormente se agrega antigammaglobulina conjugada con peroxidasa, por último se coloca el sustrato constituido de peróxido de hidrógeno y un precolorante. La presencia del virus en el cultivo se deduce por la tinción del cultivo, debida, a la aparición del colorante como resultado del desdoblamiento del peróxido de hidrógeno (48).

6) La observación del cultivo celular al microscopio electrónico es otra posibilidad para comprobar el crecimiento del virus en las células, pero la compleja técnica de preparación de la muestra para la observación, el tiempo requerido para ello, además del alto costo del material y equipo, hacen difícil el empleo rutinario de esta prueba (25, 29, 37).

OBJETIVO

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue la implementación de una técnica sencilla, fácil de realizar e interpretar y que permitiera con seguridad detectar al virus de Cólera Porcino cuando se replica en cultivos celulares, buscando igualmente una sensibilidad y especificidad adecuada.

Complementariamente, comparar la técnica desarrollada con las pruebas que se utilizan en forma rutinaria con el mismo fin y que son: Inmunofluorescencia Directa (IFD), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y prueba de Exaltación con el virus de la enfermedad de Newcastle (END).

HIPOTESIS

HIPOTESIS

Aprovechando la capacidad que tienen ciertas partículas inertes y algunas células animales como los glóbulos rojos, de adherir a su superficie una gran cantidad de sustancias químicas, se utilizaron anticuerpos anticólera, los cuales fueron adheridos pasivamente a la superficie de eritrocitos tanizados en un proceso denominado sensibilización. Al vertir estos glóbulos rojos sensibilizados a cultivos celulares infectados con el virus de Cólera Porcino, se realiza en la superficie celular una reacción antígeno-anticuerpo, la cual es visualizada por la adhesión del eritrocito a la superficie celular en un fenómeno denominado Hemoadsorción Pasiva, con lo cual se comprueba la presencia del virus en el cultivo.

**MATERIAL
Y
METODOS**

MATERIAL Y METODOS

Cultivos celulares. Células PK-15*, cultivadas en cajas de plástico de 25 cm² fueron removidas con una solución de tripsina al 0.25 y 0.22% de EDTA, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos, suspendidas en medio de Eagle de crecimiento a razón de 15,000 células por mililitro, sembradas en tubos de Leighton e incubadas a 37 C.

Medio de cultivo. Se utilizó medio de Eagle, adicionado con 0.03% de glutamina, bicarbonato de sodio, 10% de suero fetal bovino en el medio de crecimiento y de 3% en el mantenimiento, conteniendo además 100 UI de penicilina y 1 mg de estreptomina por ml.

Obtención y Fijación de glóbulos rojos. Se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Leslie (26) utilizando glóbulos rojos de bovino.

Polvo de riñón. Se preparó siguiendo el procedimiento descrito por Larghi (24) en el anexo IV de la nota técnica No. 8 del Centro Panamericano de Zoonosis, la única variante fue el reemplazo de los hígados de ratón por corteza de riñón de cerdo.

Preparación de suero hiperinmune

1. Un cerdo de tres meses de edad clínicamente sano fue inoculado 5 veces a intervalos de una semana, con la cepa vacunal de Cólera Porcino PAV-250**, siguiendo las especificaciones del laboratorio productor.

2. Posteriormente se realizaron 3 inoculaciones a intervalos de una semana con la cepa patógena de Cólera Porcino AMES*, sangrándose 7 días después de la última inoculación.

3. Se obtuvo la fracción sérica y con una muestra se realizó una prueba de electroforesis en acetato de celulosa, verificándose así la presencia de una cantidad adecuada de gamma globulinas, el suero restante se guardó a -20 C hasta su utilización.

Gammaglobulinas anticólera. Se realizó siguiendo los pasos 1 al 9 del Método de Conjugación, descrito por Larhgi (24) en la nota técnica No. 8 del Centro Panamericano de Zoonosis, utilizando para ello, sueros hiperinmune contra Cólera Porcino.

Adsorción de anticuerpos no específicos

1. Se preparó una suspensión al 20% de polvo de riñón utilizando como disolvente medio de Eagle de crecimiento.

*Proporcionado por el Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

**Proporcionado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE).

2. Se mezclaron partes iguales de esta suspensión y de gammaglobulinas, incubándose a 37 C durante 30 minutos.

3. Se centrifugó a 1,500 rpm durante 15 minutos y a 4C, el sobrenadante considerado libre de anticuerpos no específicos, fue fraccionado en volúmenes de 1 ml y guardado a -70 C hasta su utilización.

Sensibilización de Glóbulos Rojos

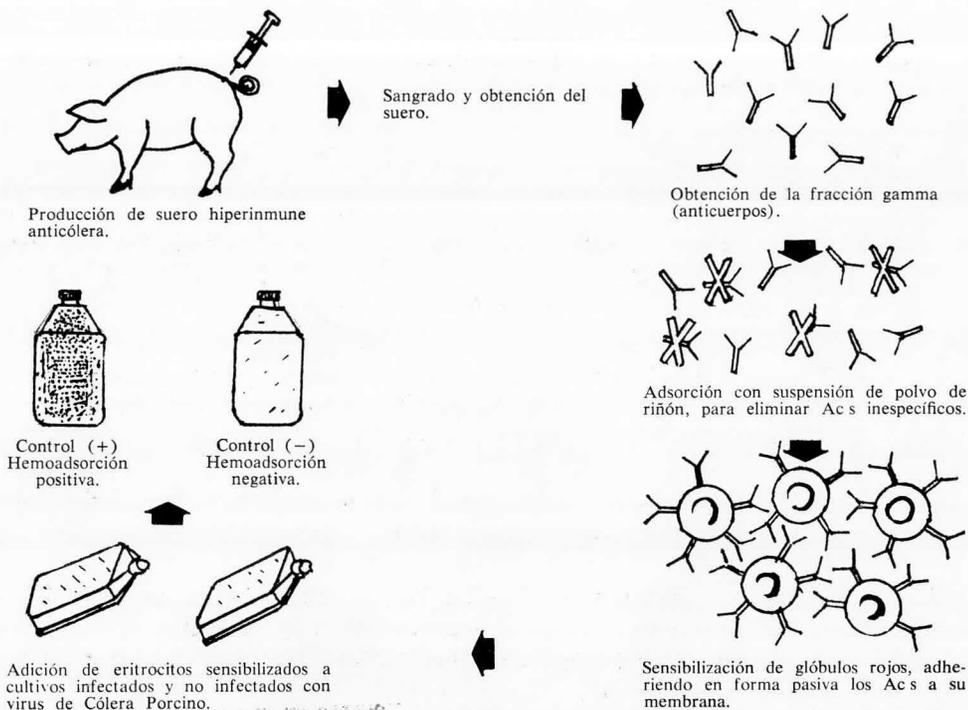
Hicc

Con objeto de encontrar el óptimo de sensibilización se realizó una prueba de titulación de gammaglobulinas, para lo cual:

- 1) Se realizaron 5 diluciones de base 2 con las gammaglobulinas adsorvidas.
- 2) Con cada una de estas diluciones se sensibilizaron 0.5 ml de glóbulos rojos tanizados, como indica Leslie (26) y utilizando gammaglobulinas adsorvidas.
3. Se resuspendieron al 1% en solución buffer de fosfatos (PBS) y se adicionaron a cultivos celulares de la línea PK-15 infectados con 100 dosis infectantes de cultivo celular (DICC) 50% del virus de Cólera Porcino cepa PAV-250, así como a cultivos sin infectar.

Los procedimientos anteriores se ilustran en la figura No. 1.

FIGURA 1. Esquematación del método.



El punto final de sensibilización fue considerado como la máxima dilución de gammaglobulinas, capaz de sensibilizar a los glóbulos rojos tanzados, manifestándose por una hemoadsorción del 50% o más, se determinó también que en el punto final existe una unidad sensibilizante (US).

Una vez comprobado el fenómeno de hemoadsorción en la prueba de titulación de gammaglobulinas, se realizó un análisis comparativo de la prueba de hemoadsorción pasiva, con algunas de las pruebas que se emplean en forma rutinaria en la detección del virus de Cólera Porcino en cultivos celulares, y que son: Inmunofluorescencia Directa (IFD), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Exaltación con el virus de la enfermedad de Newcastle de la enfermedad de Newcastle (END).

1. Se utilizó virus proveniente de 12 vacunas comerciales contra el Cólera Porcino, con el cual se realizaron diluciones décuples.
2. Estas diluciones fueron inoculadas a cultivos celulares desarrollados en tubos de Leighton, algunos de los cuales, (los utilizados para las pruebas de IF e IFI), contenían en su interior un cubreobjetos, con el objeto de que una vez desarrolladas las células sobre ellos, extraerlos para la realización de las pruebas.
3. Se contó también con cultivos no infectados, como controles negativos.
4. Se incubaron a 37 C.
 - a) A las 48 hrs. de incubación se analizaron por la prueba de IFD, según el procedimiento de Mengeling (35).
 - b) Igualmente a las 48 horas se realizó la prueba de IFI, utilizando la técnica de Terpstra (48).
 - c) Para la prueba de END, a las 96 horas de incubación se inoculó a cada tubo 100 DICC 50% del virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Lasota, realizando la interpretación 48 horas después.
 - d) Para la prueba de hemoadsorción, cumplidas 96 horas de incubación y después de enjuagar los cultivos con PBS, se agregó a cada tubo 1 ml de una suspensión al 1% de glóbulos rojos sensibilizados con 4 US.

Para determinar la prontitud en la obtención de los resultados por las diferentes técnicas, se realizó la siguiente comparación.

- 1) Con 100 DICC 50% del virus de Cólera Porcino, se infectaron células PK-15 en suspensión (recientemente tripsinizadas), ya que según Aynaud (2) son así más susceptibles a la adsorción viral y por otra parte, el resultado se obtiene con mayor rapidez.

- 2) Las células infectadas, fueron desarrolladas en tubos de Leighton, algunos de los cuales contenían un cubreobjetos para realizar en ellos las pruebas de Inmunofluorescencia, se contó también con células sin inocular como controles.
- 3) Los cultivos fueron incubados a 37 C y analizados por las técnicas de IFD, IFI, END y Hemoadsorción Pasiva a las 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y para la prueba de END se prosiguió hasta las 168 horas.

Inhibición de la Hemoadsorción

Con objeto de constatar la especificidad de la prueba de Hemoadsorción Pasiva, se realizó una prueba de Inhibición, en la que se pretendía inhibir al virus mediante anticuerpos específicos para evitar la replicación y con ello inhibir la Hemoadsorción para lo cual:

- 1) Diluciones de base 5 de un suero positivo a Cólera Porcino, fueron enfrentados "in vitro" a 200 DICC 50% del virus de Cólera Porcino cepa PAV-250 e incubada a 37 C durante 30 minutos.
- 2) La mezcla suero-virus fue inoculada a cultivos celulares de la línea PK-15, incubándose estos durante 5 días.
- 3) Se realizó la prueba de Hemoadsorción con glóbulos rojos sensibilizados con 4 US.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el análisis comparativo, se resumen en los cuadros 1 y 2.

Cuadro No. 1. Títulos obtenidos en el análisis comparativo a diferentes lotes de vacunas contra el Cólera Porcino.

Muestra	Técnica utilizada			Had. P.
	IFD	IFI	END	
1	ξ	ξ	2.97	3.0
2	ξ	ξ	3.25	3.0
3	ξ	ξ	3.15	3.0
4	ξ	ξ	3.76	3.5
5	5.0	4.0	3.5	3.5
6	5.5	4.0	3.5	3.5
7	4.5	4.0	3.47	3.5
8	4.0	4.0	3.35	3.0
9	4.5	4.0	3.47	3.5
10	5.0	4.5	3.47	3.5
11	3.0	3.0	2.35	2.5
12	2.0	2.0	1.47	1.5

Los valores anteriores, son exponentes de logaritmo de base 10 y representan los títulos obtenidos por esa técnica.

ξ=No se analizó por esa técnica.

IFD=Inmunofluorescencia Directa.

IFI=Inmunofluorescencia Indirecta.

END=Exaltación con el virus de la enfermedad de Newcastle.

Had P.=Hemoadsorción pasiva.

En el cuadro 1 se expresan los títulos obtenidos por las diferentes técnicas, encontrándose que los títulos obtenidos por la prueba de Had. P. no fueron superiores a $10^{3.5}$, resultando muy similares a los obtenidos por END, e inferiores a los obtenidos por el IFD e IFI en aproximadamente un logaritmo.

Cuadro 2. Precocidad en la obtención de resultados por las diferentes técnicas.

Horas	Técnica utilizada			
	IFD	IFI	END	HAD. P.
12	-	-	-	-
24	++	+	-	+
48	+++	+++	-	+
72	+++	+++	-	+
96	+++	+++	+	++
120	+++	+++	++	+++
144	+++	+++	+++	+++
168			++++?	

++++ = 100% de células infectadas
 +++ = ± 75% " "
 ++ = ± 50% " "
 + = ± 25% " "
 = = negativo.

El cuadro 2 ilustra la precocidad con que se obtuvieron resultados por las diferentes técnicas, observándose que a las 12 horas no se detectó virus por ninguna de las técnicas.

Las técnicas de IFD y IFI detectaron a las 24 horas de un 25 a 50% de células infectadas, a las 48 horas más de un 75% y en adelante la lectura fue siempre de más del 90%.

La prueba de Had P. fue observada débilmente, a las 24 y 48 horas y visible únicamente con el microscopio de campo claro, a las 72 horas, se observó menos de un 50% de hemoadsorción y a partir de las 96 horas la lectura fue óptima.

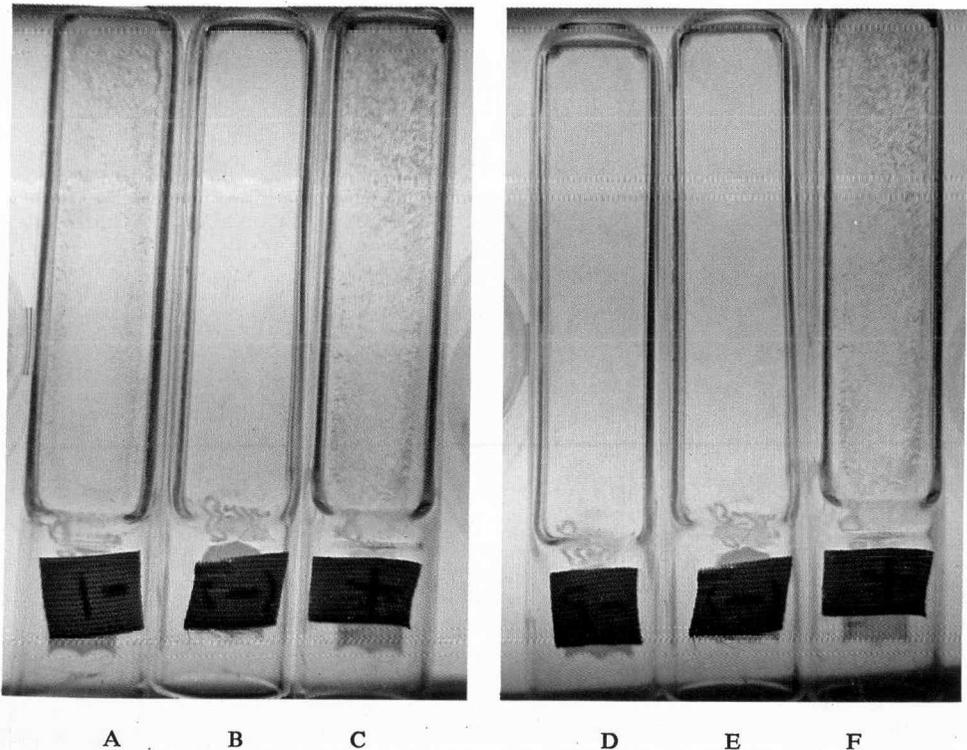
DISCUSSION

DISCUSION

En este trabajo se realizaron las diferentes técnicas de detección ante el mismo tipo de virus y en igualdad de circunstancias, observándose que la prueba de Had P. al igual que las demás, logró determinar la presencia del virus en el cultivo, por lo que es factible señalar que en el aspecto cualitativo, la sensibilidad es similar en las 4 técnicas. No obstante la prueba de Had P. tiene la ventaja por sobre las técnicas de IFD, IFI, END en la facilidad para realizar la interpretación, ya que no es necesaria la utilización de instrumentos sofisticados, ni personal altamente capacitado para ello ya que la lectura se hace a simple vista (figura 2).

Los títulos obtenidos por la prueba de IFD, fueron los más altos en este trabajo y no difieren o son ligeramente más bajos a los reportados por otros autores (4, 24). Por otra parte, pudo hacerse la lectura en 24 horas aunque óptimamente a las 48, corroborando así lo expresado por Mengeling (34, 35), Roberts

Figura No. 2



- C y F. Controles positivos, hemoadsorción clara.
B y E. Controles negativos, ausencia de hemoadsorción.
A. Dilución 10^{-1} del virus de Cólera, hemoadsorción(+).
D. Dilución 10^{-5} del virus de Cólera, hemoadsorción(-).

(39), Rossi (40) y Valenack (49). Sin embargo no fue posible corroborar en este trabajo lo citado por Muñoz (36), en el sentido de que a las 12 horas postinoculación, más del 90% de las células contienen el antígeno viral, ya que como se observa en el cuadro 2, ninguna prueba resultó positiva a las 12 horas.

Con la prueba de IFI, los resultados obtenidos fueron similares en el aspecto precocidad a la prueba de IFD, sin embargo los títulos fueron relativamente menores, aspecto que carece de importancia ya que la prueba de IFI se enfoca más a la detección de anticuerpos anticólera que hacia el antígeno viral (48).

La prueba de END, obtuvo títulos superiores a $3.5 \log_{10}$, superando con mucho, el $1.7 \log_{10}$ obtenido por Matumoeto (32) y siendo similares a los obtenidos por Loan (28), se encontró además que el tiempo mínimo para realizar la lectura es de 6 días, ya que es necesaria la incubación un mínimo de 4 días al virus de Cólera Porcino y 2 más al de Newcastle, aunque lo óptimo según Kumagai (21) son 5 días al de Cólera y 3 para el de Newcastle.

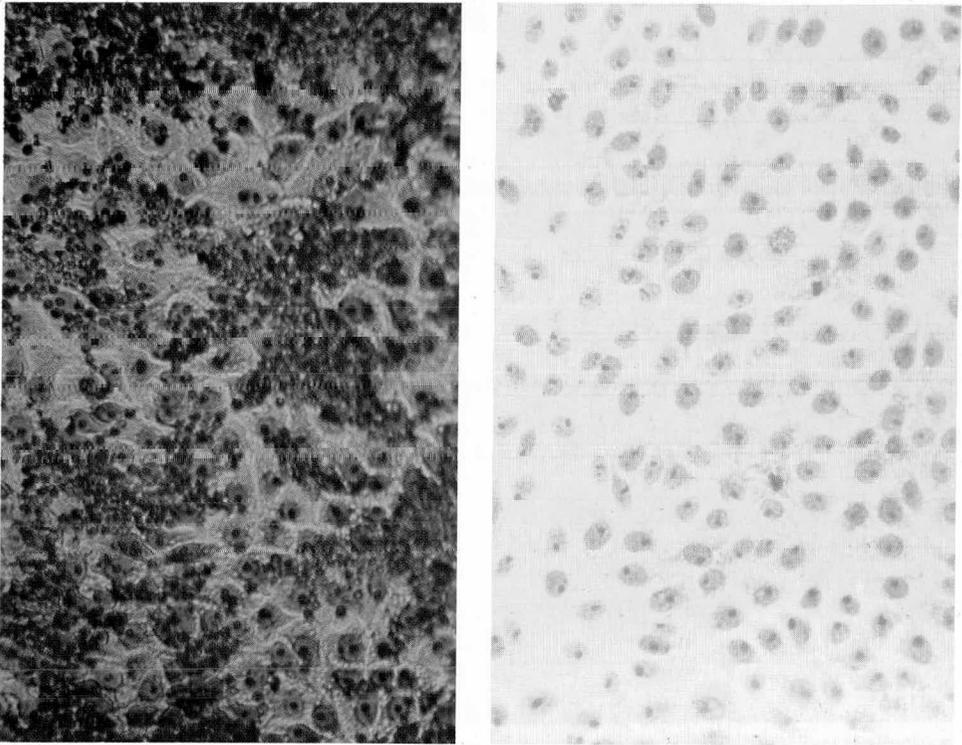
Con objeto de incrementar la sensibilidad de la prueba de END, Loan (28) prolonga el período de incubación del virus de cólera a 7 días (168 horas). Al ensayar esta variante, se encontró que la lectura ya de por sí difícil, se dificulta aún más al confundirse el fenómeno de exaltación del efecto citopático, con la degeneración normal que sufren las células a partir del octavo día de edad.

Por lo que respecta a la prueba de hemoadsorción pasiva, los títulos obtenidos fueron similares a los de END, obteniéndose los mejores resultados a las 96 horas postinoculación, no obstante se pudo observar una tenue hemoadsorción a las 24 y 48 horas, la cual fue visible solo con el microscopio de campo claro, a las 72 horas fue observable a simple vista aunque no abarcó al 50% de las células (figura 3), se sugiere que en términos cualitativos la interpretación se puede realizar a las 72 horas.

Estando perfectamente uniformadas las pruebas de Inmunofluorescencia, se comprende que los títulos obtenidos sean mayores que con la prueba de Hemoadsorción, por lo que estudios posteriores deberán encaminarse a una mejor estandarización de la prueba con objeto de mejorarla, bien variando el tipo de glóbulo rojo empleando como portador o bien ensayando con partículas inertes que tengan el mismo fin, para encontrar así el portador más adecuado. De la misma manera comparar diferentes técnicas de sensibilización, variando el tipo de fijador empleado en la sensibilización.

Por otra parte, las inmunoglobulinas empleadas en la sensibilización, deberán ser obtenidas encaminándose no solo a la fracción gamma, sino a la selección de una inmunoglobulina en especial es decir a la Ig, ya que en el suero normal es esta la que más predomina y por otra parte la respuesta secundaria es principalmente por Ig, amén de que en el cerdo hay tendencia mayor a la producción de esta Inmunoglobulina.

Figura No. 3



Izquierda, hemoadsorción, 72 horas después de inoculado el virus de Cólera, derecha control negativo, Tinción GIEMSA (X 170).

En la prueba de detección de anticuerpos neutralizantes, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, la hemoadsorción fue apenas perceptible y poco clara aun en los cultivos controles positivos en los que sólo se inoculó virus de Cólera Porcino. Estos resultados obedecen quizá a la extrema labilidad del virus, ya que es posible que una gran parte del virus se inactive no por la acción de los anticuerpos, sino por el calor a que es sometido durante la incubación. Por esta razón es necesario aumentar la cantidad del virus de cólera en las pruebas de inhibición, digamos a 1000 DICC 50%. Este aumento resulta problemático si se consideran los bajos títulos que resultan en la titulación del virus. Por lo anterior es necesario que en trabajos posteriores se logre un incremento en el título del virus, para lo cual se tienen las siguientes alternativas:

Haciendo pases seriados a células infectadas (15).

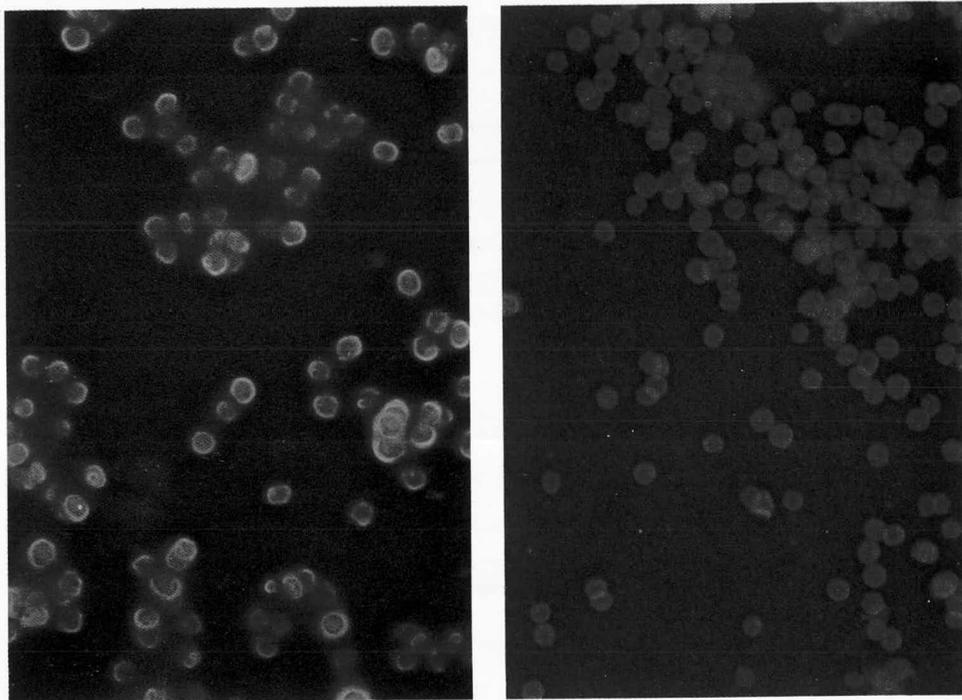
Hacer pases sucesivos del virus, utilizando virus extracelular que se encuentra en el medio de cultivo (15).

Otra posibilidad consiste en la infección de células en suspensión con el virus de Cólera y vertirlas una vez infectadas a monoestratos celulares con un desa-

rrollo del 50%, al término de la formación del monoestrato, la totalidad de las células estarán infectadas (15).

Realizando una prueba de Inmunofluorescencia a glóbulos rojos sensibilizados, utilizando conjugado antigammaglobulina, se encontró fluorescencia específica en los sensibilizados y ausencia de fluorescencia en los no sensibilizados, esta prueba corrobora la adhesión de los anticuerpos a la membrana de los eritrocitos (figura 4), por lo cual podemos presumir que la especificidad de la prueba de hemoadsorción es adecuada.

Figura No. 4



Izquierda G.R. sensibilizados con Ac s anticólera más conjugado antigammaglobulina, observándose IF. positiva, derecha G.R. sin sensibilizar más conjugado antigammaglobulina, I.F. negativa (X 500).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La prueba de Hemoadsorción Pasiva resultó fácil de realizar, con una buena sensibilidad y aceptable especificidad, siendo su principal ventaja la facilidad para realizar su interpretación, ya que esta se hace a simple vista.

La prueba de Hemoadsorción Pasiva resulta una excelente opción, cuando por razones de orden técnico o económico, no se cuenta con las pruebas de Inmunofluorescencia, las cuales son hasta el momento, la elección más conveniente en la detección del virus de Cólera Porcino en cultivos celulares.

LITERATURA CITADA

LITERATURA CITADA

1. Andrews C., Pereira N.G., Wildy P. *Viruses of vertebrates*. Fourth edition. Bailliere, Tindall and Cassell. 101-103 (1978).
2. Aynaud J.M. and Larenaudie B. *Diagnosis of subclinical or atypical forms of swine fever. Demonstration of low virulent strains in tissue culture and detection of neutralizing antibodies. Seminar on diagnosis and epizootiology of classical swine fever April 30th-May 2nd*. Amsterdam The Netherlands, (1975).
3. Carbrey E.A. *Routine laboratory diagnosis of cholera employing the fluorescent antibody tissue culture technique*. Proc. FAO OIE Inter. Meeting Hog Cholera and African Swine Fever, Rome, Italy May 31-June 5 (1965).
4. Corthier G. *Comparison de deux méthodes in vitro de titrage des anticorps neutralisant le virus de la peste porcine classique*. Ann. Reech. vétér. 7, 4 349-360 (1976).
5. Crawford J.G., Dayhuff T.R. and Gallian M.J. *Hog cholera: Replication of hog cholera virus in tissue culture with cytopathic effect*. Am. J. Vet. Res. 29: 1749 (1968).
6. Dale C.N., Songer J.N. *In vitro propagation of hog cholera virus*. I. Method of cultivation and observation on color changes in the medium. Am. Jour. Vet. Res. 18: 362-368 (1957).
7. Dunne H.W., Leman A.D. *Diseases of Swine. Fourth edition*. The Iowa State University Press. 189-237 (1975).
8. Fenner F.B.R., McAuslan B.R., Mims C.A., Sambrook J., White O.D. *The biology of animal viruses. Second edition*. Academic Press Inc. (London) 106-111 (1974).
9. Fetecanu A., Birnaure G. *Fluorescence and immunofluorescence identification of swine fever virus in cell cultures and organs of infected pigs*. Abstr. Vet. Bull. 42: 774 (1972).
10. Guillespie J.H., Sheffy B.E., Baker J.A. *Propagation of hog cholera virus in tissue culture*. Procc. Soc. Exp. Biol. Med. 105: 679 681 (1960).
11. Hagan W.A., Bruner D.W., Guillespie *imals. Seventh edition*. Cornell University Press. 665-676 (1981).
12. Hermodsson S. *Inhibition of interferon by an infection with Parainfluenza virus type 3 (Ply-3)*. Virology 20; 333-343 (1960).
13. Hernández B.E. *El virus rábico y su multiplicación*. Infectología 5; 353-363 (1982).
14. Ikeda S., Kumagai T., Shimizu T., Sassahara J., Matumoto M. *Immunological response of animal to active and inactivated hog cholera virus as studied by the END neutralization test*. Nat. Inst. Animal. Health. Quart. 3: 169. (1963).
15. Isawa H., Matsumoto K., Sagawa M., Iwabuchi H., Soekawa M. *Attenuation of hog cholera virus carried by a pig kidney cell line: Further comparison of virulence of the virus obtained at different stages of cell cultivation*. Am. J. Vet. Res. 30: 1155-1160 (1969).
16. Janowska I. *Comparison de deux souches de peste porcine au mayen de interference avec le virus grippal en cultures cellulaires*. Ann. Inst. Pasteur. 99: 792-798 (1960).
17. Joshi D.V., Sing I.P. *Inhibition of cytopathic effect of Newcastle disease virus by the swine fever virus in pig kidney cell culture*. J. Res. Ludhiana 6: 138-143 (1969).
18. Kaaden O.R., Witleman E. *Critical observations on the suitability of the END method for detecting swine fever virus in tissue cultures*. Arch. Exp. Vet. 21: 1199-1208 (1967).
19. Karasszon D., Bodon L. *Demonstration of the swine fever virus in tissue cultures by immunofluorescence*. Abstr. Vet. Bull. 34: 402 (1963).
20. Kumagai T., Shimizu T., Matumoto M. *Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture*. Science. 128: 366 (1958).
21. Kumagai T., Shimizu T., Ikeda S., Matumoto M. *A new method (END) for detection and measurement of hog cholera virus in swine tissue culture*. I. Establishment of standard procedure.

- J. Immunol. 87: 245-256 (1961).
22. Kumagai T., Shimizu T., Ikeda S., Matumoto M. *A new method for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody means of effect of hog cholera virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. IV. Reappraisal of serum in culture medium and tiem of challenge with N.D. virus.* Natl. Inst. Healt. Quart. 4: 136 (1964).
 23. Kumagai T., Shimizu T. *Technical improvement of the END method (brief report).* Arch. Ges. Virusforsch. 14: 697-699 (1964).
 24. Larghi O.P. *Nota técnica No. 8.* Centro Panamericano de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina (1978).
 25. Lee R.T.C. *An electron microscope study of the cytopathologic changes in cells infected with hog cholera virus and grown in vitro.* Cornell Vet. 52: 41 (1962).
 26. Leslie H.F., Frank C.H. *Inmunologia Práctica.* JIMS Barcelona, España. 141-143 (1979).
 27. Lin T.C., Kang B.J., Shimizu Y., Kumagai T., Sassahara J. *Evaluation of the fluorescent antibody cell culture test for detection and titration of the hog cholera virus.* Natl. Inst. Animal Healt. Quart. 9: 10 (1969).
 28. Loan R.W. *Increased sensitivity of the END (Exaltation of Newcastle disease virus) test for hog cholera virus.* Am. J. Vet. Res. 26: 1110-1113 (1965).
 29. Mahnel H. *Virus like particles from hog cholera infected tissue cultures demostrated in the electron microscope.* Proc. FAO-OIE Inter. Meeting Hog Cholera and African Swine Fever, Rome, Italy. May 31-June 5 (1966).
 30. Manhel H., Mayr A., Bibrak B. *Cultivation of swine fever with cytopathic effect in cultures of piglet testicular cells.* Abstr. Vet. Bull. 36: 731 (1966).
 31. Mateva V. *Interference in tissue culture between swine fever virus and certain heterologus viruses.* Vet. Med. Nauki. 1: 23-32 (1968).
 32. Matumoto M., Kumagai T., Zhimizu T., Ikeda S. *A new method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of H.C. virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. II. Some characteristics of END method.* J. Immunol. 87: 257-268 (1961).
 33. Mayr A., Mahnel H. *Further studies on the propagation in cell cultures of swine fever virus having a cytopathic action.* Abstr. Vet. Bull. 36: 730 (1966).
 34. Mengeling W.L. *Field evaluation of the fluoescent antibody tissue culture test for cholera diagnosis.* Proc. Am. Vet. Assoc. 101-274 (1964).
 35. Mengeling W.L. *Evaluation of the fluorescent antibody cell culture test for cholera diagnosis.* Am. J. Vet. Res. 128: 1653 (1967).
 36. Muñoz M.J. *Cultivo del virus de Cólera Porcino.* International pig veterinary society congress. July 26-31, pp. 131. México, D.F. (1982).
 37. Reagan R.L., Brueckner A.L., Poelma L.J. *Morfologic studies of hog cholera virus by electron microscopy.* Am. J. Vet. Res. 12: 116 (1951).
 38. Ressang A.A., Bool P.H. *Varkenspestdiagnostiek met behulp van de ETV-END en de immunofluorescencietechnieken.* Tijdschr Diergeesk. 91: 1148 (1966).
 39. Roberts D.H. *Diagnosis of classical swine fever in the United Kingdom. Seminar on diagnosis and epizootiology of classical swine fever.* April 30th-May 2nd. Amsterdam, the Netherlands, (1975).
 40. Rossi G. *Laboratory diagnosis and control of classical Swine Fever. Seminar on diagnosis and epizootiology of clasical swine fever.* April 30th-May 2nd. Amsterdam, the Netherlands, (1975).
 42. Sato U., Hanaki T., Nobuto K. *Attenuation of the hog cholera virus by continuous cell-virus propagation. III. Growth interference of Newcastle disease virus by attenuated hog cholera virus and its application to virus titration and the neutralization test.* Abstr. Vet. Bull. 39: 418 (1969).
 43. Shashi B.M., Sukanata K.D. *Veterinary Virology.* Lea & Febiger. Philadelphia, 198-200 (1981).
 44. Shimizu Y., Furuchi S., Kumagai T., Sashahara J. *A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine*

- testicle cell cultures*. Am. J. Vet. Res. 31: 1787 (1970).
45. Sorvachev E.V. *Interference between swine fever and others viruses in tissue culture. I Range of interference. II Especificity of the interfering virus*. Veterinariya Moscow. 41: (II), 16-21 y 42: (I), 21-25 (1964-65).
 46. Teryukhanov A.B. *Concerning the cytophatic action of swine fever virus in tissue culture*. Abstr. Vet. Bull. 36: 423 (1969).
 47. Terpstra C., Van Oirschot J. *Microindirect I.F.T. for diagnosis of Swine Fever*. Seminar on diagnosis and epizootiology of classical swine fever. April 30th-May 8nd, 201-202, Amsterdam the Netherlands (1975).
 48. Terpstra C., Van Oirschot J. *Indirect immunoperoxidase technique for detecting swine fever antigen*. Seminar of diagnosis and epizootiology of classical swine fever. April 30th-May 2nd, 200, Amsterdam the Netherlands (1975).
 49. Valenacak Z., Grom J., Zelenik Z. *Control and laboratory diagnosis of classical swine fever in Slovenia*. International Pig Veterinary Society Congress. July 26-31, 128, México, D.F. (1982).

