

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

APLICACION DEL METODO DE INMUNODIFUSION EN EL
ESTUDIO DE LAS POSIBLES DIFERENCIAS ANTIGENI-
CAS ENTRE TRES CEPAS DEL VIRUS TORTOR suis -
EMPLEADAS PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS - -
COMERCIALES

TESIS

que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

presenta:

MANUEL SALVADOR ALVAREZ LOPEZ

México, D.F.

1962



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

APLICACION DEL METODO DE INMUNODIFUSION EN EL ESTUDIO
DE LAS POSIBLES DIFERENCIAS ANTIGENICAS ENTRE TRES
CEPAS DEL VIRUS TORTOR *suis* EMPLEADAS PARA LA
PRODUCCION DE VACUNAS COMERCIALES

T E S I S

Que para obtener el título de

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

Presenta

MANUEL SALVADOR ALVAREZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

1 9 6 2

A mis padres:

Sr. Manuel Salvador Alvarez C.

Sra. Rosada López de Alvarez.

A mis hermanos:

Iván Ernesto

César Enrique

Héctor Rubén

Ramón Ezequiel

Al Servicio Interamericano de Cooperación
Agrícola en Panamá. En especial a su Di-
rector Asociado, Doctor Menalco Solís.

A la familia Herrera Amaya.

A Sonia

**A los Honorables Miembros
del Jurado**

**A la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria
y Zootecnia**

A México y Panamá

Este trabajo se realizó en -
el Laboratorio de Virología
de la Escuela Nacional de -
Medicina Veterinaria y Zoo -
tecnia, bajo la dirección -
de la Srta. M.V. Aurora Ve -
lázquez Echegaray, a quien -
agradezco su ayuda.

C O N T E N I D O

- 1.- INTRODUCCION**
- 2.- MATERIAL Y METODOS**
- 3.- RESULTADOS**
- 4.- DISCUSIONES**
- 5.- CONCLUSIONES**
- 6.- BIBLIOGRAFIA**

INTRODUCCION

El valor de una vacuna radica fundamentalmente en la protección que proporcione a los animales en los cuales se emplea. Tanto más protección puede ofrecer cuanto mayor sea su capacidad antigénica.

Existen factores que interfieren de modo muy especial en las propiedades antigénicas de una vacuna, y entre éstos cabe mencionar el agente químico empleado en la inactivación de la misma. Cuando un virus recibe la acción de agentes físicos o químicos, se trata en todo caso de retener la antigenicidad máxima, procurando al mismo tiempo que este virus resulte inofensivo. No obstante, muchas veces su estructura antigénica sufre alteraciones. Tal es el caso de los virus en cuya inactivación ha sido utilizado el fenol, el formol, etc.; en éstos ocurren alteraciones muy marcadas que se manifiestan en el descenso de su poder antigénico. (4-11)

El presente trabajo analiza las diferencias antigénicas entre tres tipos de vacunas comerciales comúnmente usadas contra el cólera porcino. Conviene aclarar que estas vacunas fueron investigadas bajo condiciones idénti-

cas.

En este estudio se utilizó la prueba de doble difusión por precipitación en gel, (8-9) que por cierto ha dado resultados óptimos en investigaciones de esta naturaleza. Esta prueba, creada por Ouchterlony en 1947, tiene por principio la difusión y reacción de un antígeno y un anticuerpo a través de un medio semisólido de recipientes independientes.

MATERIAL Y METODOS

1.- Preparación de los antisueros:

En el presente trabajo fueron empleados los tipos de vacunas comerciales siguientes:

- 1.- Vacuna tipo cristal violeta.
- 2.- Vacuna tipo Boynton.
- 3.- Vacuna tipo virus vivo modificado.

El primer y segundo tipo de vacunas, fueron escogidos de cuatro casas comerciales diferentes, cada uno de ellos. Del tercer tipo, se probaron cuatro lotes distintos, pero de una misma casa comercial.

Se escogieron tres grupos de conejos, de igual edad y aproximadamente el mismo peso, y se le inyectó a cada grupo, por vía parenteral, un tipo de vacuna diferente, a razón de 1 ml. cada dos días, hasta completar cinco inoculaciones; esto indica que cada grupo de conejos había recibido al término de las vacunaciones, una dosis total de 10 ml. de vacuna. Inmediatamente después, se dejaron estos animales en reposo durante diez días, al cabo de los cuales se les extrajeron 5 ml. de sangre, con el objeto de probar el título de anticuerpos existentes en el suero de -

la misma. Como en esta prueba el título de anticuerpos resultara muy bajo, se procedió a la revacunación de los conejos en la misma forma.

2.- Obtención y preparación de los antisueros:

Se efectúa el sangrado del corazón mediante una jeringa y se deposita la sangre en tubos; se deja reposar por 24 horas en refrigeración para incrementar la cantidad de antisuero. Se centrifuga éste y se le agrega Merthiolate 1:10.000 para su conservación. Finalmente se tyndaliza por 30 minutos en baño María.

3.- Preparación del medio:

Las pruebas se realizaron en cajas de Petri pequeñas, de 15 por 60 m.m., a las que se les vació 7 ml. de filtrado de agar al 0.75% (Bacto Agar Diff-co) con una concentración de Merthiolate 1:10.000 y ajustado a un p.H. de 7 a 7.2. Las cajas fueron guardadas a la temperatura ambiente por 24 horas para que el medio se solidificara.

Los recipientes o bocados se hicieron de 10 m.m. de

diámetro para el antígeno y de 6 m.m. para el anti_suero, con una separación de 5 m.m. entre uno y otro, formando un pentágono.

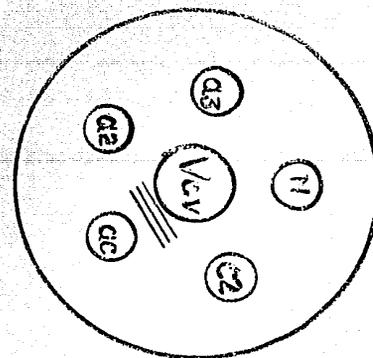
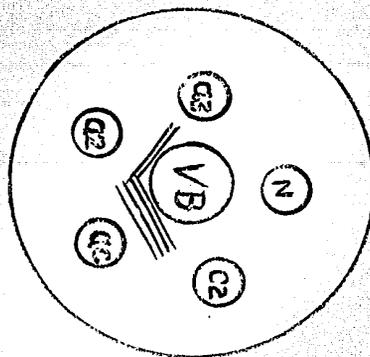
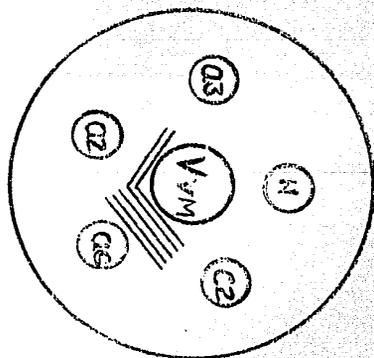
Durante las pruebas, las cajas fueron observadas cada 24 horas, tomando nota de los resultados. La observación visual fué realizada sosteniendo la caja horizontalmente sobre una lámpara de microscopio, con un ángulo de incidencia luminosa de 45 grados aproximadamente.

4.- Técnica de la prueba de Ouchterlony:

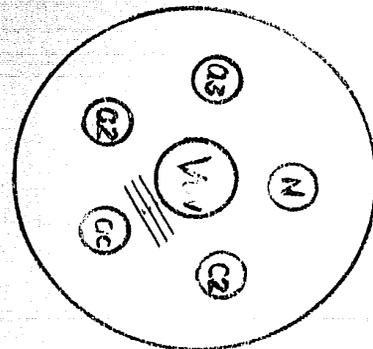
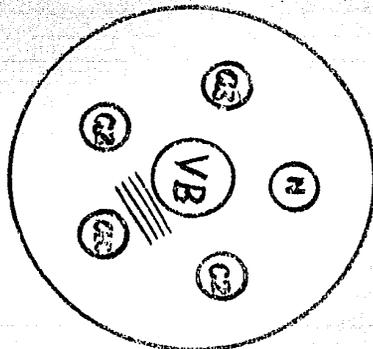
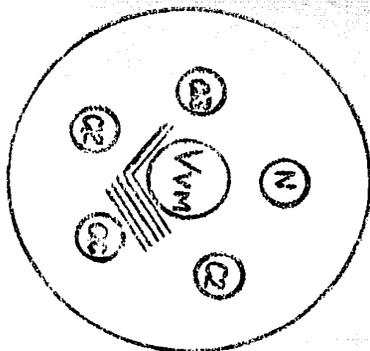
- a.- Con una pipeta de 1 ml. se coloca el antígeno en el recipiente central hasta llenarlo.
- b.- En uno de los recipientes más pequeños se coloca suero normal como prueba control.
- c.- En los cuatro recipientes restantes se coloca el antisuero.
- d.- Las cajas se dejan a la temperatura ambiente (20 a 21 grados centígrados) durante 24 horas.
- e.- Las lecturas se realizan cada 24 horas.

FORMACION DE BANDAS DE PRECIPITACION EN AGAR

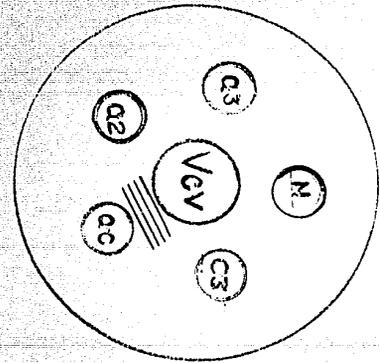
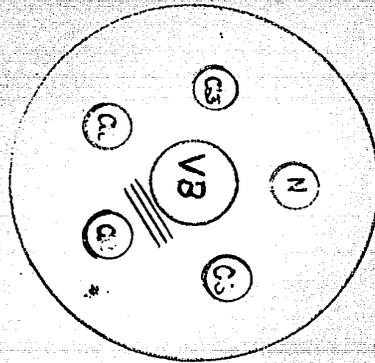
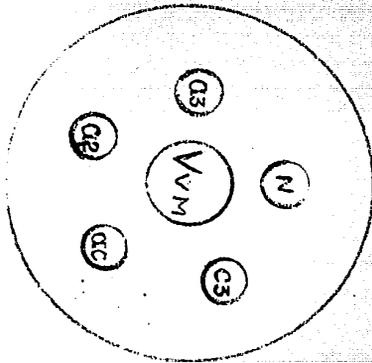
PRUEBA "A"



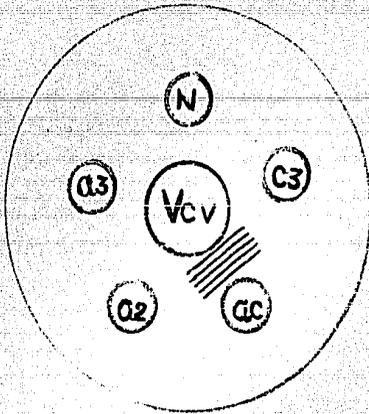
PRUEBA "B"



PRUEBA "C"



PRUEBA "D"

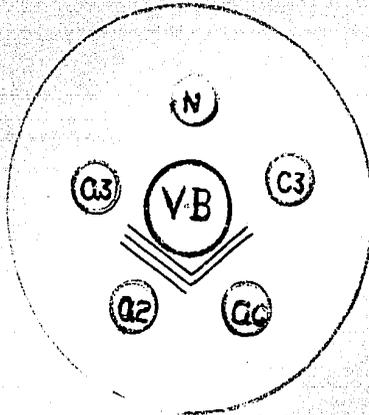


N.- Suero normal

Vcv.- Vacuna tipo cris
tal violeta

VB.- Vacuna tipo Boyn
ton.

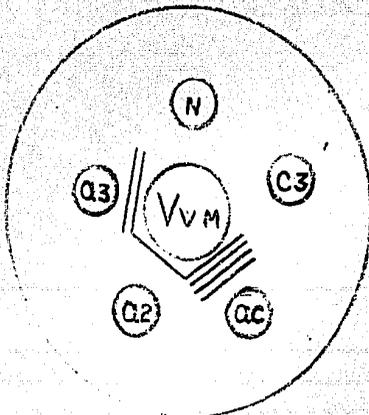
Vvm.- Vacuna tipo vi-
rus vivo modifi
cado.



ac.- Antisuero cris-
tal violeta

a2.- Antisuero Boynton

a3.- Antisuero vivo
modificado



C2.- Suero comercial 2

C3.- Suero comercial 3

RESULTADOS

Interpretación de los esquemas anteriores:

Prueba "A"

1.- Vacuna cristal violeta: # de bandas

Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	3
Antisuero 2.....	-
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 2.....	-

2.- Vacuna tipo Boynton:

Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	4
Antisuero 2.....	2
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 2.....	-

3.- Vacuna virus vivo

modificado:

Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	5
Antisuero 2.....	2
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 2.....	-

Prueba "B"

1.- Vacuna cristal violeta: # de bandas

Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	3
Antisuero 2.....	-
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 2.....	-

2.- Vacuna tipo Boynton:

Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	4
Antisuero 2.....	-
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 2.....	-

3.- Vacuna virus vivo

modificado:

Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	5
Antisuero 2.....	2
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 2.....	-

Prueba "C"

1.- <u>Vacuna cristal violeta:</u>	<u># de bandas</u>
Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	4
Antisuero 2.....	-
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 3.....	-
2.- <u>Vacuna tipo Boynton:</u>	
Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	3
Antisuero 2.....	-
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 3.....	-
3.- <u>Vacuna virus vivo</u>	
<u>modificado:</u>	
Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	-
Antisuero 2.....	-
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 3.....	-

Prueba "D"

1.- <u>Vacuna cristal violeta:</u>	<u># de bandas</u>
Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	5
Antisuero 2.....	-
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 3.....	-
2.- <u>Vacuna tipo Boynton:</u>	
Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	2
Antisuero 2.....	3
Antisuero 3.....	-
Suero comercial 3.....	-
3.- <u>Vacuna virus vivo</u>	
<u>modificado:</u>	
Suero normal.....	-
Antisuero cristal violeta	4
Antisuero 2.....	1
Antisuero 3.....	2
Suero comercial 3.....	-

DISCUSIONES

Durante el proceso de inactivación de una vacuna, - toda la inmunogenicidad posible debe ser retenida, pero - asegurando simultáneamente la no infectividad del virus. La realización de este doble propósito, aunque en teoría parezca sencilla, en la práctica de elaboración de vacu_ nas es con frecuencia difícil. (4) Ello no sólo depende - del tipo de agente químico o físico empleado para la - inactivación de la vacuna; la cantidad de substancia quí_ mica utilizada, la temperatura de la estufa, el tiempo - de inactivación, las posteriores condiciones de almacena_ je y otros diversos factores, son capaces de alterar tam_ bién la estructura antigénica del virus con el cual se - produce la vacuna.

Wesslén y Dinter han comprobado, por ejemplo, que - la vacuna formolizada es inferior a aquélla en que se - usa acetilenimina, porque en el primer caso, la estructu_ ra del virus se altera antigénicamente. (11) Recientes - trabajos han demostrado que la infectividad del virus de_ pende del ácido nucleico que forma parte de su estructu_ ra química, y si se emplea una substancia que tenga gran

afinidad por éste, como la acetilenimina, los resultados son explicables. (4)

Aparentemente existen dos clases distintas de anticuerpos de precipitación, reconocibles por el tipo de precipitado que formen y por las cantidades de antígeno con las cuales reaccionen. (1-2) Uno de éstos se denomina anticuerpo de "Floculación" o anticuerpo "H" (de Horse: caballo) porque se forma más rápidamente en los caballos. El otro es el anticuerpo de "Precipitación", llamado también anticuerpo "R" (de Rabbit: conejo) por producirse especialmente en estos animales.

En las pruebas realizadas, el proceso de precipitación ocurre en dos fases. Durante la primera fase, el antígeno y el anticuerpo se van uniendo específica e inmediatamente. En la segunda fase, los complejos que forman el antígeno y el anticuerpo se combinan paulatinamente hasta constituir un precipitado inmóvil en forma de banda que se aprecia a simple vista. (2-5-8-10)

La prueba de Ouchterlony, aunque simple en su técnica, proporciona resultados satisfactorios. En realidad, esta prueba es una modificación a la creada por Oudin en 1946. En esta última se utilizan tubos en vez de cajas -

de Petri y además, las reacciones no se realizan desde recipientes independientes, sino que el antígeno y el anticuerpo se ponen en contacto directo y desde el principio en el interior del tubo.(8-9)

A continuación se expondrá el análisis de las distintas pruebas que se llevaron a efecto.

En la prueba "A", una vacuna cristal violeta reaccionó con su antisuero formando 3 bandas. En la prueba "B", otra vacuna cristal violeta reaccionó con el mismo antisuero empleado en la prueba "A", formando también 3 bandas. En las pruebas "C" y "D" se formaron 4 y 5 bandas respectivamente cuando se probaron dos vacunas tipo cristal violeta de otras dos casas comerciales distintas, con el mismo antisuero usado en las pruebas anteriores. La diferencia en el número de bandas entre las reacciones descritas obedece probablemente al tiempo empleado en la inactivación del virus, a la clase o cantidad del agente químico usado en este tratamiento, a la temperatura de la estufa u otros factores que pudieron variar de un laboratorio a otro durante la fabricación de las vacunas. Si se considera además, que la vacuna cristal violeta está elaborada a base de sangre,(6-7) ésta puede contener fraccio

nes antigénicas, que aunque no son específicas, son susceptibles de reaccionar formando bandas estables. Esta reacción es evidente cuando, el tipo de sangre con la que fué hecha la vacuna, corresponde al tipo de sangre de la vacuna con la cual se produjo el antisuero.

En el estudio de las vacunas tipo Boynton se siguió el mismo procedimiento que para las del tipo cristal violeta; es decir, que se tomaron cuatro vacunas de diversas casas comerciales y todas fueron probadas con el antisuero producido por una de estas vacunas. Se observó que en las pruebas "A" y "D" se formaron 2 y 3 bandas respectivamente, mientras que en las pruebas "B" y "C" no se apreció ninguna reacción. Sin embargo, en las pruebas "A", "B", "C" y "D", colocadas las mencionadas vacunas frente al antisuero cristal violeta, formaron 4, 4, 3 y 2 bandas respectivamente.

Para investigar la vacuna tipo virus vivo modificado, se utilizaron cuatro lotes diferentes de vacunas de una misma casa comercial, y todos fueron probados con el antisuero producido por uno de los lotes. En estas condiciones, sólo hubo reacción en la prueba "D", en la que se apreciaron 2 bandas. En las pruebas "A", "B" y "D" hu

bo reacción entre las vacunas en estudio y los antisue-
ros cristal violeta y Boynton, formándose 5 y 2, 5 y 2 y
4 y 1 bandas respectivamente. En la prueba "C" no hubo
reacción de ninguna clase.

La posible existencia de fracciones antigénicas afi-
nes entre las vacunas de tipo Boynton y de virus vivo modi-
ficado y el antisuero cristal violeta, podría ser la causa
lógica en la formación de las bandas observadas. Las di-
ferencias cuantitativas en la formación de bandas, e in-
clusive, la ausencia de las mismas, como sucedió en la
prueba "C" de la vacuna virus vivo modificado, probable-
mente se deban a la intervención de los factores expues-
tos al principio, y que como se ha dicho, han tenido tam-
bién quizás una significativa importancia en los resulta-
dos obtenidos con la vacuna cristal violeta. Se ha visto
que los sueros comerciales no reaccionaron en ninguna de
las pruebas; ello puede deberse a que estos sueros posi-
blemente requieren para su estudio de condiciones espe-
ciales, como en el caso de los sueros de las aves, a los
cuales hay que elevar hasta diez veces más su concentra-
ción de hidrogeniones para que puedan reaccionar.

Como era de esperarse, el suero normal no dió reac-

ción por su total carencia de anticuerpos.

La disposición en espolón que han adoptado algunas bandas y que puede ser apreciada en los esquemas contenidos en este trabajo, es clásica cuando hay presencia de antígenos iguales.

En estas pruebas no fueron observadas las llamadas bandas o líneas de Liesegang, caracterizadas por su movilidad y porque tienden a desaparecer rápidamente. Por el contrario, el examen de las bandas que se formaron - en las pruebas anteriores demostró que eran inmóviles e irreversibles y que permanecieron por 25 o más días perfectamente visibles.

CONCLUSIONES

- 1.- Las vacunas que se analizaron en el presente trabajo, según los protocolos, han sido elaboradas en las casas comerciales bajo condiciones similares. No obstante, en base de los datos resultantes por las pruebas llevadas a efecto, estas vacunas no presentan la misma composición antigénica.
- 2.- En vista de que en este trabajo solamente han sido definidas las diferencias antigénicas entre las vacunas comerciales estudiadas, se sugiere que se continúen estas investigaciones in vitro para determinar qué grado de inmunidad podrían ofrecer estas diferencias cuando son inoculados animales susceptibles con las vacunas mencionadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Augustin, R.- Intern. Arch. Allergi Appl. Immunology.- 11., 69-153 (1957)
- 2.- Boyd, W.C.- Fundamentals of immunology., Interscience Publishers Inc., New York., 265-351 (1956)
- 3.- Dunne, H.W.- Diseases of Swine.- 48 authors., - The Iowa State University Press., Ames, Iowa, - U.S.A. 136-137 (1959)
- 4.- F. Brown and Joan Crick.- J. Immunology., 85., - 17., 444-447 (1959)
- 5.- Gispén, R.- J. Immunology., 74., 134-141 (1955)
- 6.- Hutyra Franz, Marek Josef, Maninnger Rudolf.- - Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos., Editorial Labor, S.A., Tercera Edición., Madrid, España., Tomo Primero., 304-200 (1953)
- 7.- Merchant and Packer.- Veterinary Bacteriology and Virology. The Iowa State University Press., - Ames, Iowa, U.S.A., Fifth edition., 784-785 (1956)
- 8.- Ouchterlony, O.- Progr. Allergy., 5., 1., 78 (1958)
- 9.- Oudin, J.- Methods in Med. Research., 5., 335-78 (1958)
- 10.- Salvinien.- J. Bull. soc. chim. biol., 39., suppl. 1., 11. 14 (1957)
- 11.- Wesslén, T. and Dinter.- Z. Arch. Virusforsch., 7: 394 (1957)
- 12.- Wilson, M.W.- J. Immunology., 81., 4., 317-330 (1958)