UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

APLICACION DE LA TECNICA DE PRECIPITACION POR DIFUSION EN AGAR EN EL ESTUDIO DE DIFERENTES CEPAS DE *Tortor furens*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

RAQUEL GONZALEZ GUTIERREZ.

MEXICO, D. F. 1962

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

González Gutiérrez
1962

TESIS PROFESIONAL

37665

A mis padres:
Sr. Rafael González M.
y
Sra. Simitria G. de González
Con todo cariño y gratitud.

A mis hermanos.

Con respeto al H. jurado
M. V. Alfonso Alexander H.
M. V. Fernando Días Muñoz
M. V. Guillermo Pérez Calva
M. V. Manuel Hernández Ruiz
M. V. Gustavo Franco Fragoso

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, *bajo la dirección de la Señorita M. V.* Aurora Velázquez Echegaray *a quien agradezco su valiosa ayuda.*

CONTENIDO

1.- I N T R O D U C C I O N

2.- M A T E R I A L Y M E T O D O S

3.- R E S U L T A D O S

4.- D I S C U S I O N

5.- C O N C L U S I O N E S

6.- B I B L I O G R A F I A

INTRODUCCION

La prueba de difusión por presipitación en gel descrita originalmente por Oudin en 1946 (1) ha estimulado el estudio de las reacciones antígeno anticuerpo por este método en los virus. Esta prueba, en la que un antígeno y un anticuerpo se difunden y reaccionan a través de un medio semisólido, puede efectuarse en dos formas :

a) Por el método de simple difusión, en el que uno de los reactivos se ditunden en una mezcla de agar con otro reactivo.

b) Por el método de doble difusión, elaborado por Ouchterlony en 1947 (2), en el cual ambos reactores difunden en el agar por recipientes separados. Dicha difusión entre antígeno y anticuerpo a través de los medios simisólidos es semejante a las leyes de difusión de los gases (3). Para este trabajo se escogió la prueba de doble difusión, ya que el anticuerpo y el antígeno son suministrados en una zona para que reaccionen en condiciones y proporciones ideales a fín de producir una banda estable, resistente é inmóvil. Este hecho hace al método de doble difusión cualitativamente superior y además tiene la ventaja de no formar precitados secundarios por los cambios en la concentración del reactivo (4).

No haré una descripción de la gran cantidad de técnicas de inmunodifusión que existen, ya que el fin que se pretende es fijar la atención sobre los antígenos presentes en las diferentes cepas de virus de "Tortofurens".

MATERIAL Y METODOS

Los antígenos usados en estas pruebas fueron obtenidos del líquido amniolantoideo de embriones de pollo inoculados con las diferentes cepas de "Torlor furens" que a continuación se señalan:

Cepa # 1 "Chiconautla" aislada por el M.V. F. Vázquez el 18 de Enero de 1960.

Cepa # 2 "Ixtapalapa" aislada por el Dr. Bankowski en Palo Alto en 1946.

Cepa # 3 "Tulyehualco" aislada por el M.V. F. Vázquez en Junio de 1961.

Cepa # 5 "Queretaro" aislada por el M.V. M. Ramírez V. en Palo Alto en 1950.

Cepa # 6 "Norte del D.F." aislada por el M.V. F. Vázquez en Marzo de 1961.

Cepa # 7 "Guadalajara" aislada por el M.V. F. Vázquez el 18 de Enero de 1960.

Cepa # 8 "Tacuba" aislada por el M.V. F. Vázquez el 19 de Abril de 1960.

Cepa # 9 "Zamora" aislada por el Instituto Behring en 1956.

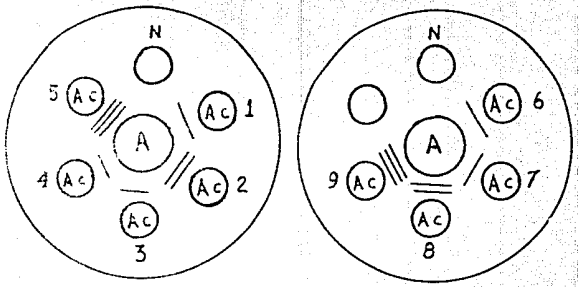
Los antisueros, fueron preparados inyectando repetidas veces conejos adultos, primero por vía subcutánea y después por vía endovenosa con líquido amnioalantoideo de embrión de pollo-

infectado de virus. Después de completar el tiempo de inmunización, los conejos fueron sangrados y separados los sueros se - almacenaron a 9° C.

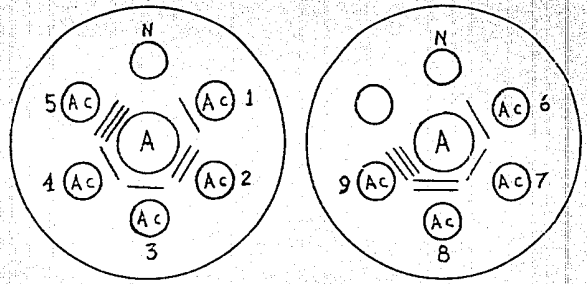
La prueba se llevó a cabo sobre cajas de petri de 10 por 100 mm. y de 15 por 60 mm. preparadas con 20 ml. y 7 ml. respectivamente del filtrado de agar al 0.75% (Bacto Agar Diffco) y con una concentración de Merthiolate al 1 por 10.000 y ajustado a un p.H. de 7 a 7.2, se conservaron 24 horas a temperatura ambiente para que solidificaran, Las tazas o bocados se hicieron de 10 mm. de diámetro para el antígeno, y de 6 mm. para el antisuero con una separación de 5 mm entre uno y otro, luego de montada la prueba se dejó a temperatura del laboratorio- (21° C.), con una variación que no excedía más o menos de un - grado centígrado.

Durante el período de desarrollo de la prueba las cajas - fueron inspeccionadas a intervalos de 24 horas tomando nota de los hallazgos correspondientes. La inspección visual fué hecha sosteniendo la caja horizontalmente sobre una lámpara de microscopio con un ángulo de incidencia luminosa de 45° aproximadamente, todas las cajas fueron fotografiadas a la terminación del - experimento.

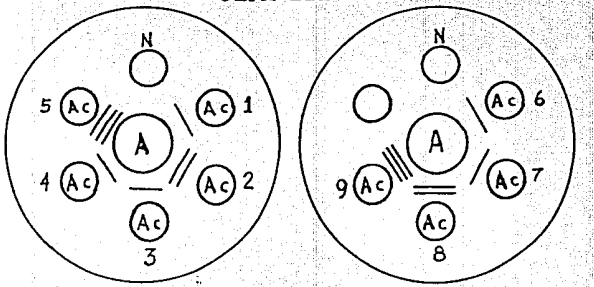
CEPA I



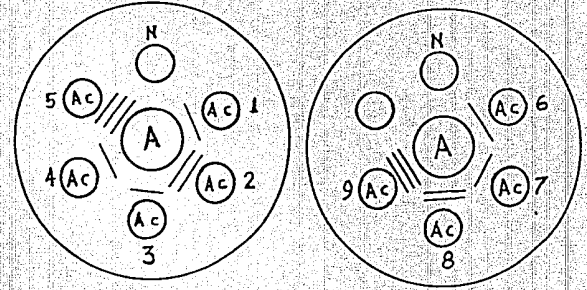
CEPA II



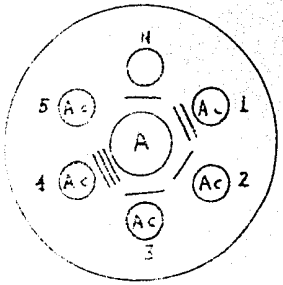
CEPA III

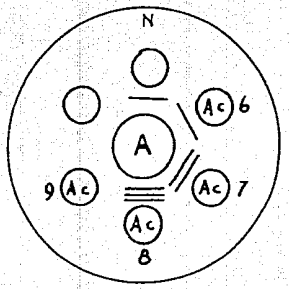


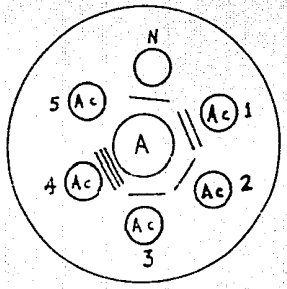
CEPA IV

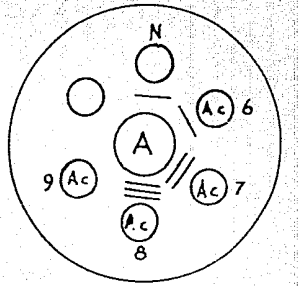


CEPA V

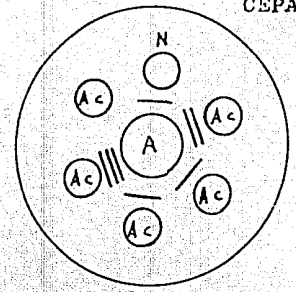


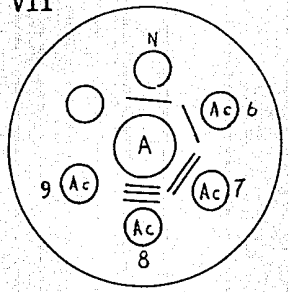




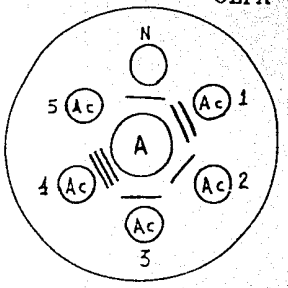


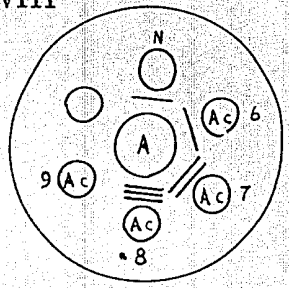
CEPA VII



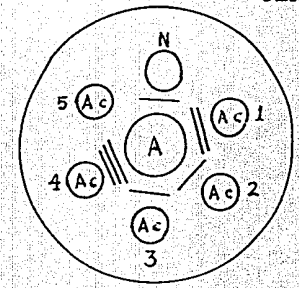


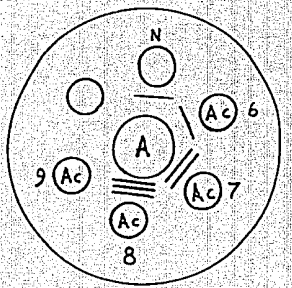
CEPA VIII





CEPA IX





En los esquemas anteriores vemos que :

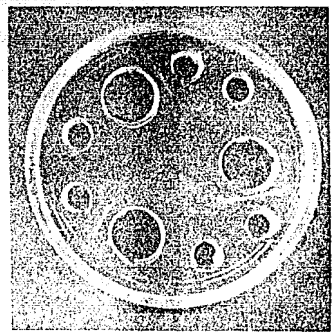
La cepa # 1 al ponerla a reaccionar con los antisueros 1, 3, 4, 6, y 7 forma una banda; con los antisueros 2 y 8 formados bandas; con los antisueros 5 y 9 forma tres bandas y con el suero normal no hay reacción.

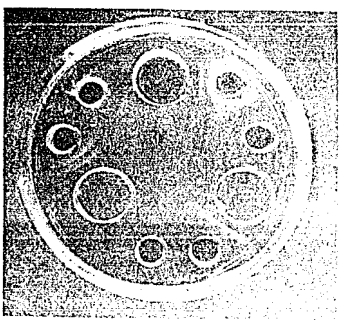
Esta reacción es igual en las cepas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 al ponerlas frente a los distintos antisueros.

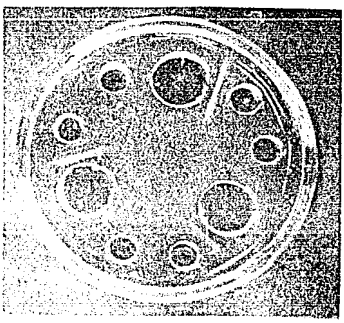
A.- Antígeno

Ac.- Anticuerpo

N.- Suero normal.







DISCUSION

La simplicidad de la prueba y la facilidad de leer los resultados sugiere que este método es de considerable valor para el estudio de antígenos y anticuerpos de diferentes virus.

La precipitación específica se presenta en dos etapas (5-6) en la primera el antígeno y el anticuerpo se combinan específica e instantáneamente al mezclarse; en la segunda, lentamente los complejos originales del antígeno y anticuerpo se unen para integrar un precipitado visible. Parece que hay dos tipos distintos de anticuerpos de precipitación los cuales se clasifican según la clase de precipitado específico que formen y las proporciones de antígeno con las que reaccionen (5, 7). - Uno de ellos conocido comunmente como anticuerpo de "Precipitación" el cual se produce principalmente en los conejos; de aquí que se le denomine anticuerpo "R" (Rabbit: conejo). El otro es el anticuerpo de "Floculación" o anticuerpo "H" (Horse caballo). Puesto que se forma más rápidamente en los caballos- El anticuerpo "R" forma complejos de antígeno anticuerpo en una amplia variedad de proporciones de reactivo. Su precipitado es insoluble en un exceso de antígeno. De aquí que los conejos fueran escogidos para este trabajo.

Se pudo observar que las cepas 5 y 9 poseen un antígeno con tres grupos determinantes ya que al ponerlos en contacto con su anti-- suero producen tres bandas de precipitado; las cepas 2 y 8 poseen un antígeno con dos grupos determinantes y al hacer la unión con- su antisuero producen dos bandas de precipitación, las cepas 1, 3, 4, 6 y 7 al ponerlas frente a sus antisueros aparece sólo una banda. Esto nos demuestra que las cepas 5 y 9 poseen tres antígenos - mayores y sus antisueros tres anticuerpos, cuando se ponen en contacto estos antisueros con las cepas 1, 3, 4, 6 y 7 que con sus -- respectivos antisueros forman sólo una banda se forman tres bandas ; lo mismo sucede con las cepas 2 y 8 que tienen dos antígenos mayores y su antisuero dos anticuerpos, seguramente que las cepas 1, 3, 4, 6 y 7 que con sus respectivos antisueros forman una banda, - sea debido al anticuerpo que llega primero a las proporciones óptimas con un grupo determinante en las moléculas del antígeno, el -- cual precipita al antígeno, e impide su movimiento hacia una zona- en donde su proporción entre el anticuerpo y el segundo y tercer - determinante pueda ser compatible con la precipitación (8). Así -- pues en este caso aunque el anticuerpo para el segundo y tercer determinante pueda difundirse por el precipitado que se forma con el primero, sería demasiado diluído y su antígeno demasiado fuerte -- en ese lado del precipitado ya existente para precipitar por sí solo cualquier antígeno.

La formación de bandas para los grupos determinantes es una - función de sus respectivas concentraciones, estas determinarán hasta que grado las bandas se superpondrán a sus diferencias de densi

dad serán o no suficientemente pronunciadas para permitir el reconocimiento individual de las bandas superpuestas.. El número de días durante los cuales una banda podía ser observada, representa solamente valores aproximados ya que el tiempo exacto en que una banda de precipitadio aparece o desaparece no puede ser determinada con precisión. En nuestra prueba la cepa 5 aparecía la primera de sus bandas dentro de las 16 horas siguientes a su iniciación.

El estudio de las diferencias antigénicas de las cepas del virus "torter furens por las pruebas de inmunodifusión han revelado diferencias de importancia diagnóstica.

Las interacciones que surgen entre los reactores y el medio de sustentación con las substancias "Inertes" que las acompañan en solución, los efectos de varias substancias sobre las reacciones de antígeno anticuerpo, pueden considerarse en su totalidad como complicaciones potenciales en la interpretación de los resultados de la inmunodifusión. Para eliminar este tipo de falsas reacciones se hizo la prueba con virus purificado. La purificación de los antígenos se hizo con alcohol, éter y cloroformo, agitando las mezclas durante 10 minutos, después se centrifugaron a 3800 r.p.m. durante 25 minutos (9).

Al final de la prueba se observó que las líneas no variaban en su tamaño y número pero sí en su intensidad.

También se hicieron pruebas de adsorción empleando las cepas citadas y los sueros inmunes preparados en conejos.

Las mezclas de virus y suero se hicieron empleando la dilu-- sión 1:4. Las proporciones de antígeno anticuerpo se determinó en pruebas previas, encontrando que la relación óptima es la mencionada.

Los resultados obtenidos en esta prueba se indican en los -- cuadros siguientes.

CUADRO # I

Adsorción de las cepas con su antisuero específico.

		CEPAS								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
SUEROS	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Como podemos ver en el primer cuadro todas las bandas son adsorbidas.

CUADRO # II

Adsorción de las diferentes cepas, cada una con los nueve diferentes antisueros.

		C E P A S								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
S U E R O S	1	0	1	0	1	2	1	0	1	2
	2	0	0	0	2	1	2	0	0	1
	3	0	1	0	1	2	1	0	1	2
	4	1	2	1	0	2	0	1	2	2
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	2	1	0	2	0	1	2	2
	7	0	1	0	1	2	1	0	1	2
	8	0	0	0	2	1	2	0	0	1
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En el segundo cuadro observamos que al hacer la adsorción de las cepas con los antisueros 1, 3 y 7 desaparecen una banda de las obtenidas en la prueba de inmunodifusión de los antígenos 1, 2, 3, 5, 7, 8 y 9; cuando la adsorción se hace con los antisueros 4 y 6 desaparece una banda de los antígenos 4, 5, 6 y 9; al hacer la adsorción con los antisueros 2 y 8 desaparece una banda de los antígenos 1, 3 y 7 y dos bandas de los antígenos 2, 5, 8 y 9; y finalmente cuando la adsorción se hace con los antisueros 5 y 9 desaparecen todas las bandas.

CONCLUSIONES

I.- Por las pruebas de inmunodifusión podemos demostrar que los antígenos presentes en las cepas estudiadas poseen en general la misma composición antigénica, variando cuantitativamente.

2.- Las reacciones pueden ser debidas a antígenos solubles o a partículas completas del virus.

3.- En las cepas 5 y 9 se demostró por esta prueba que contienen - en mayor proporción las tres fracciones antigénicas demostrables - para este virus.

4.- Las cepas estudiadas se pueden agrupar por las características aparentes de sus líneas de precipitación en los siguientes grupos:

a).- Chiconautla, Tulyehualco y Guadalajara

b).- Ixtapalapa y Tacuba

c).- Distrito Federal y Norte del Distrito Federal

d).- Querétaro y Zamora.

5.- Es característica que las líneas de precipitación para cada - una de las cepas estudiadas por esta prueba fué siempre constante.

6.- Se sugiere la posibilidad de emplear esta técnica en el estudio inmunogénico de las cepas usadas para la producción de vacunas.

BIBLIOGRAFIA

1.- Oudin, J., Methods in Med. Research, 5, 335 - 78 (1952).

2.- Ouchterlony, O., Progr. Allergy, 5; 1 - 78 (1958)

3.- Alfred. J. Crowle. Anual Review of microbiology. 14 ; - 161 - 174 (1960).

4.- Wilson M. W., J. Immunology, 81, 4, 317 - 330 (1958).

5.- Boyd W.C., Fundamentls of Immunology, 265-351 (Interscience Publishers, Inc., New York. 776, pp., (1956).

6.- Sälvinien.., J., Bull. soc. chim. biol., 39, Sippl. 1. 11 14 (1957)

7.- Augustin, R., Intern. Arch. Allergi Appl. Immunology, 11; 69 - 153 (1957)

8.- Richter, M. Rose, B. , and Sehn, A. H., Can. J. Biochem. and Physiol. , 36; 13- 1105 (1958).

9.- Comunicación personal del MV. Miguel Huerta H.

10.- W, Mansi, J. Comp. Path. and Therap., 67; 297 - 303 (1957)

11.- Gispen R., J. Immunology., 74; 134 - 141 (1955).

12.- Jensen, K. E. , and Francis, T., J. Immunology., 70; 321-324 (1953).