UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootécnia

ESTUDIO DE LA PRUEBA DE ABSORCION DE COMPLEMENTO CONGLUTINANTE, PARA DETECTAR ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA EL VIRUS DEL COLERA PORCINO.

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a:

RAFAEL TELLEZ GIRON VILLANUEVA

MEXICO, D. F. **1964**

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.

A mi Madre (q. e. p. d.).

Dedico este trabajo a mi padre, Sr. Dr. Alfredo Téllez Girón Rode, como muestra del agradecimiento tan grande que le tengo por su colaboración y ejemplo -como padre, como maestro y como amigo- en todos los aspectos de mi vida.

Agradezco sinceramente a Pfizer de México S. A. el haberme permitido realizar parte de este trabajo en su Departamento de Investigación de la División Veterinaria.

A mi escuela.

A mis maestros, y de una manera muy especial a la Srita. M.V. Aurora Velázquez E.

A mis compañeros.

CONTENIDO.

I.- INTRODUCCION.

II.- MATERIAL Y METODOS DE TRABAJO.

III.- RESULTADOS.

IV.- DISCUSION.

V.- CONCLUSIONES.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO N°. I

I N T R O D U C C I O N

1.- Introducción.

2.- Antecedentes históricos.

3.- La Prueba de Absorción de Complemento Conglutinante (PACC) y su mecanismo.

4.- Características generales de los reactivos que intervienen en el fenómeno de la Conglutinación.

   a).- Antígeno celular (glóbulos rojos)
   b).- Anticuerpos naturales para los GRO.
   c).- Complemento (suero de caballo).
   d).- Conglutinina (suero bovino).

5.- Mecanismo del Complemento en la Con - glutinación.

   a).- Orden en que intervienen los componentes del Complemento.
   b).- Factores que inhiben la absorción del Complemento.

INTRODUCCION.

Los importantes progresos en el control y eventual erradi - cación de la enfermedad del Cólera porcino, han creado nuevos problemas que para su resolución, requieren mejor información específica a cerca del virus y de los fenómenos inmunológicos consecutivos a la infección. Uno de esos problemas es la falta de satisfactórios métodos serológicos de amplia aplicación al estudio de diversos aspectos inmunológicos y epizootiológicos que necesitan mayor atención.

Basándose en el conocimiento de que los cerdos sobrevivientes a la enfermedad adquirían sólida y duradera inmunidad, Dorset y - col. (1903) hicieron posible la producción industrial de un antisuero hiperinmune, la vacuna de suero y virus (método simultáneo) y, posteriormente, la vacuna inactivada por cristal violeta. La evidencia mostrada por diversos investigadores de que la infección experimental - por el virus de esta enfermedad (Tortor suis) también provocaba manifestaciones en otras espécies animales, permitió el desarrollo de nuevas vacunas preparadas con virus modificados por adaptación al conejo. El adelanto en la propagación de los virus en cultivo de tejido dió - lugar al uso práctico de otras nuevas vacunas preparadas por estas - técnicas. Recientemente, Sheffy y col. (1962) señalaron las relacio - nes entre el virus del Cólera porcino y el de la Diarrea de los bovinos, así como la protección que este virus confiere a los cerdos contra el Cólera experimental. Este ejemplo del uso de vacunas heterotípicas permite vislumbrar la erradicación del Cólera porcino, si am -

plias y minuciosas pruebas de campo confirman los excelentes resultados de las pruebas preliminares.

A causa de que en los comunes animales de laboratorio no se puede reproducir el Cólera porcino, las apreciaciones sobre el desarrollo, grado y duración de la inmunidad originada por los agentes inmunizantes depende exclusivamente del empleo de cerdos susceptibles a la infección natural o experimental. Indudablemente el valor de este procedimiento es el más seguro y definitivo, pero los elevados costos de las experimentaciones son obstáculos que imponen limitaciones y, aún así, llegan a ser insuperables para investigadores o instituciones con modestos recursos económicos. En los estudios de campo, la protección conferida por las vacunas sólo puede ser apreciada a través de complicadas comparaciones estadísticas de la morbilidad y mortalidad específica entre la población vacunada y la no tratada, en áreas enzoóticas. Para probar el grado y duración de la resistencia generalmente se recurre a la adquisición de animales considerados representativos de determinados grupos de campo, los cuales son expuestos a la infección experimental en locales especialmente acondicionados para tales pruebas. Además de estos problemas, existe otro que se relaciona con el grado de protección observado contra la infección natural o experimental. Las cepas de virus utilizables para estos fines, según Langer (1963), pueden ser ordenadas arbitrariamente en tres grupos: (I) las designadas "virus industriales" cuya elevada virulencia se ha mantenido por largo tiempo por pases consecutivos en cerdos para la producción del virus usado en el "método simultáneo" y como virus de exposición en

pruebas de potencia; (II) la cepa "A" - aceptada como variante - cuya pureza y virulencia es conservada por pases en cerdos acreditados de- estar libres de enfermedades y criados bajo la vigilancia de la Aso - ciación Nal. de Productores de Cerdos (EUA); (III) este tercer grupo- consiste de cepas recientemente aisladas en el campo. El primero y último tienen mayor trascendencia. Schwarte (1961) dice que en los EUA - las formas agudas septicémicas del Cólera porcino son menos prevalentes, en tanto que las infecciones menos severas y crónicas parecen ir en aumento. Los estudios de Baker y col; citados por Langer (1963), - confirman que en varias áreas de los EUA existe frecuentemente la forma crónica de la enfermedad a juzgar por la virulencia de las cepas - aisladas en los últimos años; de ocho, solamente una correspondia al- tipo representado por las cepas muy virulentas "Ames" o "Siux Falls" (grupo I de Langer).

Si la resistencia a la infección o la reinfección depende - de la inmunidad humoral congénita o adquirida por infecciones subclínicas o latentes, o por agentes inmunizantes, la concentración de anticuerpos específicos circulantes podría proporcionar datos a cerca - de la posible resistencia de los animales contra los diferentes tipos de cepas del virus del Cólera porcino y ser aprovechados en forma similar como se hace en otras enfermedades virales. También podría ser útil instrumento en el estudio de las revacunaciones cuando se trata de mantener altos niveles de anticuerpos en la población animal, especialmente cuando se trata de vacunas inactivadas o preparadas con virus avirulento, modificado o heterofílico, las cuales no originan tán

sólida y persistente inmunidad pero, en cambio, son inócuas o tienen menos riesgo que la antigua vacuna del "método simultáneo" o la misma enfermedad natural. Por lo menos, este procedimiento facilitaría muchos estudios sin tener que recurrir a pruebas de exposición con cepas muy virulentas que llevan consigo problemas en el manejo y control de los animales de prueba.

En cuanto al desarrollo de métodos serológicos seguros y fáciles para el diagnótico del Cólera del cerdo, tampoco ha sido afortunado. El diagnóstico clínico y anatomopatológico se ha considerado suficientemente práctico para identificar la enfermedad y para implantar inmediatamente el tratamiento específico y otras medidas sanitarias de control, de manera que, ante tal evidencia, los procedimientos de laboratorio propuestos para estos fines, se han juzgado casi innecesarios o poco aplicables por ser dilatados o muy complicados. No cabe duda de que los casos agúdos, típicos de la enfermedad, pueden ser identificados seguramente por las manifestaciones patológicas, pero ésto no es todo en el manejo de la enfermedad, la existencia de cepas menos virulentas y el aumento de casos crónicos requieren la ayuda de métodos de laboratorio.

Tomadas en conjunto las consideraciones anteriores y la evidente escacéz de referencias sobre el común empleo de métodos serológicos, parecen justificar el haber elegido como tema de tésis profesional el estudio de una prueba serológica que, según los investigadores, ha sido muy útil en muchas enfermedades infecciosas y que promete serlo en la lucha contra el Cólera porcino.

Anticipo que el trabajo que se presenta puede aparecer in-

completo en varios aspectos, por causas ajenas a mi voluntad. El tema que he elegido, no solo requiere conocimientos y experiencia que no - poseo, sino tambien largo tiempo, el cual no dispongo, para reprodu - cir gran número de pruebas y de diferentes casos que permitan sustentar conclusiones definitivas. Por lo tanto, este trabajo debe considerarse como un estudio preliminar orientado a explorar una de las potenciales aplicaciones de la Prueba de Absorción de Complemento Con - glutinante; en este caso a LA DETECCION DE ANTICUERPOS CIRCULANTES - CONTRA EL VIRUS DEL COLERA PORCINO.

Rafael Téllez Girón Villanueva.

ANTECEDENTES HISTORICOS.

La Prueba de Absorción de Complemento Conglutinante, se basa en el fenómeno primeramente observado por Ehrlich y Sachs (1902) y Muir y Browning (1906). Este fenómeno fué bautizado por Bordet y - - Streng, en 1909, con el término de "Conglutinación" para distinguirlo de la aglutinación en la cual no participa el complemento.

En un principio, el fenómeno de conglutinación creó seriascontroversias entre las escuelas francesa y alemana, a cerca de la interacción del complemento y anticuerpo o amboceptor. Según Bordet, representante principal de la escuela francesa, el complemento reaccionaba solamente con células sensibilizadas como un fenómeno de adsorción, mientras que la escuela alemana, representada por Ehrlich, sostenía que el complemento se combinaba químicamente a 37°C con el grupo complementófilo del amboceptor, previa combinación de éste con elantígeno de la célula.

De la controversia resultaron trabajos realmente interesantes que impulsaron el estudio del fenómeno de conglutinación. Después de varios trabajos publicados por ambas escuelas que sostenían sus puntos de vista, Muir y Browning (1909) publicaron sus observaciones sobre el comportamiento del suero fresco de bovino, demostrando claramente que este suero, en condiciones normales, contenía un complemento - "conglutinante" llamado primeramente "colloide de boeuf".

Trabajos posteriores demostraron que en el suero bovino normal existen dos substancias: (1) la llamada conglutinina, responsable-

de la acción de agrupamiento de las células; (2) y una auxilisina - (anticuerpo heterofílico que efectúa la hemólisis). Estas substan - cias, termoestables, no reaccionan con células sensibilizadas por el anticuerpo sino hasta después de haber absorbido el complemento.

Cuando Streng (1909) publicó sus experiencias sobre la con glutinación de bacterias en vez de glóbulos rojos, la controversia - tomó un nuevo sendero. El nuevo punto de discusión fué si la conglu- tinina era una substancia distinta que reaccionaba con el complemen- to una vez absorbido en las células sensibilizadas (Streng 1909) o si era simplemente una aglutinina ordinaria para las bacterias, posi blemente termolábil (Barkine, 1910). Esta discusión llegó virtualmen te a su fin cuando Streng (1910-1911), aprovechando que el complemen to era un componente esencial de la reacción de conglutinación, de - sarrolló la prueba de absorción de complemento conglutinante en una manera análoga a la prueba usual de fijación de complemento hemoliti co, quedando así demostrado, finalmente, la diferencia entre conglu- tinación y aglutinación.

Durante los siguientes años, varios investigadores estudia ron la aplicación de este fenómeno al serodiagnóstico de algunas en- fermedades infecciosas, pero posteriormente el interés declinó por - diversos motivos. Sin embargo, hace pocos años nuevamente empezó a - ocupar un lugar destacado en la investigación serológica contemporá- nea.

Según Coombs (1961), aún es válida la definición original de la conglutinación la cual, expresada en su forma más simple, es: La floculación o agrupamiento del complejo antígeno-anticuerpo-com-

plemento, por la conglutinina.

Existen dos pruebas de conglutinación: La Prueba de conglutinación directa y la Prueba de absorción de complemento conglutinante. La primera fué originalmente empleada para descubrir anticuerpos contra bacterias comunmente no aglutinables, pero se ha utilizado en el estudio de antígenos, anticuerpos, complementos, conglutininas e inmunoconglutininas, en los grupos sanguíneos humanos y animales, así como para detectar anticuerpos heterofílicos asociados con la helmintosis. Sin embargo, la más común e importante aplicación de la conglutinación, es su empleo como "Sistema indicador" en la segunda, o sea la Prueba de absorción de complemento conglutinante (PACC), que se ha aplicado en la investigación o al serodiagnóstico. Siendo numerosas las referencias de aplicaciones de la PACC, solamente se han seleccionado algunas para formar una corta lista que pueda dar idea de la utilidad de este método serológico en el estudio de las enfermedades infecciosas.

<u>En el serodiagnóstico de:</u>

Sífilis.-	Streng O., 1911; Wassermann A., 1912; Dellafavera G.B., 1912; Pfeiler W.,1917.
Muermo.-	Andersen C.W., 1913; Pfeiler W., 1914; Pfeiler y Werber G., 1915; Waldman O., 1917; Graub E., 1917; Schoening H.W.,- 1917; Poppe K., 1922; Coombs R.R.A. y Hole N.H., 1947.
Muermo en el hombre.-	Gildermeister E. y Jahn, 1915.
Durina.-	Wehrbein H., 1915.
Pleuroneumonía bovina.-	Helsop G.P., 1921; Walker J., 1923; Kolyakov Y.E. y Katyaeva K.A., 1933.
Tuberculosis bovina.-	Bracq-Rousseau, Urbain A. y Chauchemes, 1925.

Fiebre aftosa.-	Solovieff P., 1943 Norcross N.L. y Pappensick G.C., 1961.
Fiebre "Q", en bovino.-	Wolfe D.M. y Kornfeld L., 1948.
Influenza humana.-	Stoker M.G.P. y Marmion B.P., 1950.
Brucelosis bovina.-	Rice C.E., Boulanger P., Mackie C. y Moore T., 1952; Engelhard W.E. y Carlisle H.N., 1955.
Brucelosis en el hombre.-	Wiggin N.J.B., 1955.
Moquillo canino.-	Corvazier R. y Lasfargues E., 1952.

Investigaciones serológicas o inmunológicas en:

Tifoidea, Paratifoidea, Disentería y Cólera.	Luger A., 1912.
Vaccinia, Influenza y Linfogranuloma venéreo.	Stoker M.G.P., Coombs R.R.A. y Bedson S.P., 1950.
Poliomielitis (tipo Lansing).	Corvazier R., 1953.
Rabia.-	Grillo Torrado J.M. y Giacesa A.M., 1955.
Identificación de adenovirus.	Pier J.E. y Le Beau R.W., 1958.
Lupus eritematoso.-	Lachmann P.J., 1960.
Papiloma genital del cerdo.-	Parish W.E., 1961.
Cólera porcino.-	Millian S.J. y Englehard W.E., 1961.

LA PRUEBA DE ABSORCION DE COMPLEMENTO CONGLUTINANTE (PACC) Y SU MECANISMO.

La comparación entre la PACC y la más conocida prueba de fijación de complemento hemolítico de Bordet y Gengou (PFCH) servirá para hacer una descripción sencilla y comprensible de la primera. Ambos métodos serológicos, con los cuales pueden demostrarse anticuerpos específicos para antígenos solubles o particulados, dependen de la propiedad del anticuerpo para absorber o fijar el complemento cuando se haya combinado con su correspondiente antígeno, durante un determinado período de incubación. La absorción total o la presencia de complemento libre es revelada por la subsiguiente adición de un "Sistema indicador" que consiste de glóbulos rojos sensibilizados a la acción del complemento. En el caso de la prueba de conglutinación, los eritrocitos de ovino, en lugar de ser hemolizados, son fuertemente conglutinados como resultado de una serie de interacciones que serán señaladas en otra parte. Así pues, el sistema indicador funciona como una reacción directa de conglutinación o una reacción inmuno-hemolítica, según los reactivos que formen el sistema. Para producir conglutinación se necesitan cuatro reactivos: células, anticuerpo, complemento conglutinante y conglutinina. Mientras que para la inmuno-hemólisis solamente se requieren tres reactivos: células, anticuerpo y complemento hemolítico. Además, la conglutinación no ocurre inmediatamente después de haberse combinado los reactivos, como sucede con el sistema hemolítico. Para que se manifieste, las células de

ben establecer suficiente contacto entre sí por sedimentación natu - ral o acelerada por centrifugación, después de un período de incubación a 37°C. Entonces, la conglutinación puede ser visualizada agitando el sedimento celular, en cuyo caso, si las células son conglutinadas, se observa la formación de una gran masa o grumos irregulares - que se sedimentan rápidamente dejando un líquido sobrenadante completamente claro. Este resultado indica que, en la primera fase de la - prueba el complemento quedó libre al no formarse el complejo específico antígeno-anticuerpo. La ausencia de conglutinación es determinada por una franca resuspensión celular homogénea, lo cual indica que el complemento fué absorbido por el complejo previamente formado por los reactivos problema en la primera fase de la prueba.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS REACTIVOS QUE INTERVIENEN EN EL FENOMENO DE LA CONGLUTINACION.

Antigeno celular (glóbulos rojos de ovino).- En lo glóbulos rojos de ovino (GRO) se encuentran varios antígenos, entre ellos un complejo-polisacárido conocido como antígeno de Forssman, probablemente situado ligeramente abajo del margen superficial de la célula, como en una concavidad (Coombs, 1961). Consecuentemente, el anticuerpo, después de unirse al antígeno en ese sitio, es incapáz de formar un puente de unión con el antígeno similarmente situado en otra célula, de manera que no puede actuar como una aglutinina. Así pues, la admirable situación del antígeno de Forssman en los GRO es la causa de que sea el antígeno participante en la conglutinación. La sóla sensibilización por el anticuerpo no causa el agrupamiento de las células pero sí provoca la absorción del complemento para que el nuevo complejo formado sea afectado por la conglutinina.

Anticuerpos naturales para los GRO.- Por muchos años se ha utilizado el suero normal de bovino porque contiene un anticuerpo natural para los GRO, con la especificidad de un anticuerpo de Forssman, y actúa como pieza intermediaria en la absorción del complemento. Es difícil demostrar este anticuerpo para los GRO en el suero bovino por su gran adaptabilidad a la conglutinación . Si se intenta la reacción hemolítica, usando complemento de cuye, los resultados serán negativos, excepto cuando el anticuerpo está presente en elevadas cantida-

des. Así pues, se trata de un anticuerpo que no obstante ser deficiente para absorber el complemento de cuye y lisar los GRO, es capáz de absorber el complemento no hemolítico equino y producir conglutinación en presencia de la conglutinina.

El fraccionamiento del suero bovino, por diálisis contra agua destilada, ha demostrado que este anticuerpo se encuentra en la fracción pseudoglobulina, mientras que la conglutinina está presente en la fracción euglobulina. Otra prueba de la existencia separada de las dos substancias, es el hecho de que el anticuerpo puede ser retirado por absorción con GRO sin reducir el contenido de conglutinina del suero bovino inactivado por calor.

Por lo tanto, en el sistema indicador de la PACC, el más conveniente anticuerpo para los GRO es, precisamente, el que normalmente existe en el suero bovino y debe usarse en una concentración apropiada.

Complemento (suero de caballo).- En general, existen dos actividades características del complemento (C'): la absorción selectiva por los complejos antígeno-anticuerpo y la iniciación de alguna reacción, como por ejemplo, la conglutinación en presencia de la conglutinina. Los sueros frescos de caballo, gato y cerdo poseen gran capacidad para participar en este fenómeno. Sin embargo, las numerosas experiencias con la PACC han demostrado que el C' de equino ha sido bastante superior, no solamente para detectar anticuerpos en el suero de diferentes espécies animales sino, también, por las pequeñas diferencias que se notan entre el uso de un corto período de fijación a tempera-

tura ambiente y un prolongado período de fijación en frío.

También es incontrovertible la experimental evidencia universal de que el complemento de caballo es más sensitivo que el complemento hemolítico de cuye en la demostración de anticuerpos en el suero de hombre y de la mayoría de los animales. Precisamente es este hecho el que da a la PACC su potencial superioridad sobre la prueba de fijación de complemento hemolítico. A este respecto, Coombs - (1961) advierte que la mayor facilidad con que el C' de equino es absorbido constituye una arma de doble filo, pues puede ser más afectado que otros complementos por las absorciones "no específicas" o por la actividad anticomplementaria de alguno de los reactivos que forman el sistema de prueba.

Además, es un feliz hallazgo que el mejor C' sea el de caballo, porque el suero puede ser obtenido en gran cantidad y a poco costo.

Conglutinina (suero bovino).- Esta substancia, tan interesante a los serólogos por sus versátiles propiedades, se encuentra normalmente en el suero de varias especies animales, pero la de origen bovino resulta más conveniente porque en el mismo suero bovino, como se dijo antes, va incluído el anticuerpo necesario para el perfecto enlace de los reactivos del sistema indicador y resulte la floculación celular.

La reactividad serológica de la conglutinina bovina no se altera por calentamiento a 56°C por media hora. Este tratamiento causa la destrucción del complemento propio del suero bovino y es en es

te estado que debe usarse el suero bovino en la PACC. Un calentamiento a 62°C por media hora, tampoco destruye la conglutinina pero el suero se vuelve anticomplementario para el C' de caballo (Wiggin, 1955).

La concentración de conglutinina en el suero de bovinos adultos, normalmente varía entre títulos de 80 a 1280. Sin embargo, algunos investigadores han encontrado menores títulos en bovinos con padecimientos infecciosos agudos o crónicos, o que han sido sangrados repetidas veces.

MECANISMO DEL COMPLEMENTO EN LA CONGLUTINACION

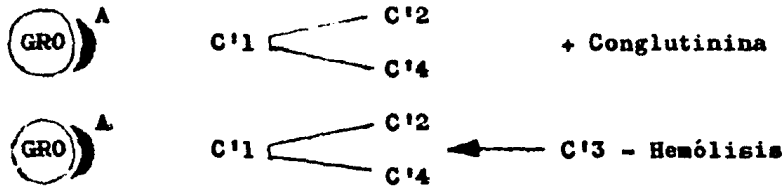
Las opiniones más generalizadas a cerca de la conglutinación de los GRO por el complemento equino, anticuerpo bovino y conglutinina, pueden ser resumidos de la manera siguiente: Los componentes termolábiles C'1 y C'2 del complemento son necesarios, pero el componente termoestable C'4 es esencial para la conglutinación y, en algunos aspectos, se le considera diferente del C'4 del complemento hemolítico del cobayo. En la reacción, el C'4 puede ser proporcionado por el suero equino y por el suero bovino calentado. En el suero equino, este componente se encuentra en bajo titulo (16-32) mientras que en el suero bovino, después del calentamiento, varía alrededor de 640. Por tal motivo, la titulación de la combinación C'1 y C'2 se mide en presencia de exceso del C'4 y la conglutinina contenida en el suero bovino. Por otra parte, no hay evidencia de que el componente C'3 desempeñe algún papel en la conglutinación.

Orden en que intervienen los componentes del complemento.- El C'1 es primeramente absorbido por las células sensibilizadas por el anticuerpo. Los componentes C 2 y C'4 reaccionan simultáneamente con las células persensibilizadas. Así pués, las células sensibilizadas que han absorbido C'1, C'2 y C'4 (alexinadas) pueden ser finalmente conglutinadas por la substancia conglutinina, la cual solo interacciona en ausencia de C'4 libre.

Experimentalmente no se ha demostrado reacción entre conglutinina y complemento mientras éste se encuentra en solución (libre).

Solamente cuando el complemento es absorbido por el complejo antígeno anticuerpo, o por otra superficie activa presente, se satisface la condición para la afinidad de la conglutinina. El desarrollo del estado característico de absorción, puede realizarse de tres maneras: (1) la absorción puede activar algún componente del complejo, como una pro-enzima, por ejemplo; (2) un nuevo complejo puede ser formado por las moléculas que estaban separadas en la solución; (3) la condición puede ser establecida por el desdoblamiento de la molécula durante la absorción (Coombs y Coombs, 1953), de tal manera que la conglutinina pueda unirse a otros puntos reactivos que presentan las moléculas desdobladas que se han fijado en distintas células.

La concatenación de las interacciones que causa conglutinación y hemólisis se presentan en el siguiente esquema propuesto por Coombs:



A.- Anticuerpo.
C'1, 2, 3 y 4.- Componentes del complemento.
En la hemólisis, C'1 y C'4 accionan juntos.

En cuanto al mecanismo de la PACC, puede ser fácilmente comprendido por el siguiente esquema:

(ANTIGENO + ANTICUERPO + COMPLEMENTO) + (GRO + Suero bovino calentado.) - NO AGLUTINACION.

Primer sistema (de prueba). Segundo sistema (indicador)

Factores que inhiben la absorción del complemento.- Una preparación de antígeno o antisuero que por sí mismos inhiben la actividad del complemento son calificados "anticomplementarios". Este efecto puede ser producido de maneras diferentes, pero suele ser imposible establecer claras diferencias entre la actividad anticomplementaria en su sentido estricto y los fenómenos de la fijación no específica del C'. En la práctica, ambos fenómenos son indeseables y deben emplearse métodos para controlarlos o eliminarlos sin interferir la reacción que se desea estudiar. Esto es de mayor importancia, pués si el complemento equino es más sensible a la absorción específica, tambien puede esperarse que sea mas susceptible a la absorción no específica o a la inhibición.

Las actividades anticomplementarias (AC') pueden agruparse en tres categorias (Coombs), para las cuales se dan algunos ejemplos:

I.- Efectos anticomplementarios debidos a la directa acción inhibitoria para la actividad del complemento.

Los antígenos o sueros pueden contener substancias inhibitorias como: amoniaco, aminas primarias, heparina, etc., que inhiben el C'1. Otras como: ácidos, álcalis y citratos que dañan al C'. Las elevadas concentraciones de las proteinas séricas pueden interferir la absorción y ser directamente responsables.

II.- Efectos anticomplementarios debidos a fijaciones no-específicas del C'. Algunas preparaciones de antígenos no purificados y sueros pueden contener bacterias u otras substancias extrañas que absorban C' en ausencia de anticuerpos del suero en estudio, pero en estos casos no siempre puede excluirse la presencia de anticuer

pos normales en el suero usado como fuente de complemento.

La desnaturalización de las suero-globulinas por calentamiento- puede originar una solución coloidal con gran capacidad absor - bente de C'. También los sueros envejecidos a temperaturas am - bientes suelen ser AC'.

III.- Efectos anticomplementarios debidos a fijaciones específicas - por sistemas secundarios antígeno-anticuerpo coexistentes.

Los antígenos heterófilos y antígenos solubles de grupos - sanguíneos contenidos en extractos de tejidos infectados usados como virus-antígeno y los anticuerpos que pudieran estar en los sueros usados como complemento, son claros ejemplos de este gru po.

Debe aclararse que, en ciertos casos, el efecto anticomple mentario de algunos sueros calentados se encuentra enmascarado por - un "efecto procomplementario" (PC'), debido a que contiene gran cantidad de anticuerpos de Forsmann.

También el efecto PC' debe ser controlado o eliminado en - la PACC porque es causa de falsos resultados negativos, en contraste del efecto AC' que da lugar a falsos resultados positivos.

CAPITULO N° II

M A T E R I A L Y M E T O D O S D E T R A B A J O

1.- Reactivos de la PACC.

a).- Suspensión de GRO.- Estandarización.
b).- Suero bovino.- Titulación de Conglutinina.
c).- Suero equino.- Titulación de Complemento.- Titulación en presencia de un antígeno.
d).- Antígeno.
e).- Sueros porcinos de prueba.
f).- Sueros porcinos normales.

2.- Tratamiento de los sueros porcinos para suprimir efectos complementarios que interfieren con la PACC.

3.- Procedimiento de la prueba de absorción de complemento conglutinante.

REACTIVOS DE LA PACC.

Suspensión de GRO.- La sangre es extraida asépticamente de la yugular e inmediatamente mezclada a partes iguales con solución de Alsever modificada. La mezcla es hecha en un frasco estéril que se cierra con tapón de hule y retapa de aluminio. Se conserva en refrigeración (5 - 8°C). En cada ocasión se extráe asépticamente una cantidad conveniente para preparar la suspensión.

Fórmula de la solución de Alsever modificada.- Dextrosa anhidra 10.25 grms.; Cloruro de sodio Q.P. 2.10 grms.; Citrato de sodio 4.00 grms.; Acido cítrico 0.275 grms. Los ingredientes se mezclan en el órden indicado y la solución se esteriliza a 110-115°C. por 10 minutos en autoclave.

En un tubo de centrífuga de 50 ml. se recojen 3-4 ml. de la sangre preservada que se ha filtrado por una delgada capa de algodón. Se agregan 25-30 ml. de solución salina al 0.85%, se agita y centrifuga a 1500 rpm. durante 5-7 minutos y luego se retira por succión el líquido. El sedimento es lavado 3 veces. Al final las células son resuspendidas con el mismo volumen de salina para su estandardización.

Estandardización.- En dos tubos de Hopking se depositan 1 y 0.5 ml. respectivamente de la suspensión, se completa el volumen a 10 ml. con solución salina. Se centrifugan 10 minutos a 1500 rpm. El volumen obtenido sirve para calcular la cantidad de solución salina que finalmente debe agregarse o substraerse para obtener una concentración de 0.25%.

Suero bovino (conglutinina).- Tres diferentes bovinos de abasto, raza Cebú-mestizo, fueron sangrados en el rastro de Ferreria, el suero separado naturalmente se clarifica por centrifugación y luego se ampolleta en cantidades de 3 a 4 ml. aproximadamente. El suero se inactiva en baño maría a 56°C durante 30 minutos y en seguida se congela por hielo seco para su almacenamiento a -15 - 20°C, hasta su uso.

Titulación de conglutinina.- El suero inactivado de bovino, diluido a 1:10, se coloca en una serie de tubos en cantidades variables de: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 y 0.35 ml. A cada tubo se añade complemento de equino diluido a 1:5 en cantidades de 0.4 ml., seguido por la adición de glóbulos rojos de ovino (GRO) al 0.25% en cantidades de 0.4 ml. Se añade sol. salina al 0.85% para acompletar volumen a 2 ml. Los tubos se incuban a 37°C durante 30 minutos y se centrifugan a 1000 rpm., durante 5 minutos. Para hacer la lectura se agitan los tubos.

SB	(1:10)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
GRO	(0.25%)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
SE	(1:5)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Sol. salina		1.15	1.10	1.05	1.00	0.95	0.90	0.85
RESULTADOS		-	-	2+	4+	4+	4+	4+
CONTROLES:		SB + GRO + sol. salina. SE + GRO + sol. salina. GRO + sol. salina.						

Tabla No. 1 Titulación de conglutinina.

La cantidad más pequeña de suero bovino que aglutine completamente los GRO, se considera como 1 unidad. En la prueba se incluyen los siguientes controles: Suero bovino + GRO; suero equino + GRO, GRO + sol. salina. Ninguno de los controles deberá mostrar evidencia de conglutinación. En la PACC se utilizarán 4 unidades de conglutinina contenidas en 0.4 ml.

Como ejemplo, en la tabla No. 1 se muestra una de las titulaciones de conglutinina que se practicaron.

Suero equino.- La sangre se obtuvo de tres equinos sacrificados en el rastro de Ixtapalapa. Inmediatamente la sangre se llevó al laboratorio procurando abatir la temperatura durante el transporte y la separación del suero por centrifugación. El suero se ampolletó en cantidades de 3 a 4 ml. y se congeló con hielo seco - alcohol, almacenándose hasta su uso a -15 -20°C.

Titulación del complemento.- El suero equino diluido a 1:10 se colocó en cantidades de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 y 0.35 ml. en una serie de 7 tubos. A cada uno de los tubos se añaden 4 unidades de conglutinina contenidas en 0.4 ml. y 0.4 ml. de GRO al 0.25%. Con solución salina se acompleta el volumen a 2 ml. Además de la serie de titulación se incluyen los controles apropiados. Los tubos son incubados a 37°C. por 30 minutos, centrifugados y agitados para registrar los resultados. La cantidad más pequeña de suero equino que cause completa conglutinación se tomó como 1 unidad de complemento. Tres o cuatro unidades de complemento contenidas en un volumen de 0.4 ml. se utilizaron en la PACC. En la tabla No. 2 se muestra uno de los resultados obtenidos:

SE	(1:10)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
GRO	(0.25%)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
SB	(1:5)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
sol. salina		1.15	1.10	1.05	1.00	0.95	0.90	0.85
RESULTADOS		+	3+	4+	4+	4+	4+	4+
CONTROLES:			SE + GRO + sol. salina. SB + GRO + sol. salina. GRO + sol. salina.					

.-La unidad de complemento fué 0.10 ml. del suero equino diluido a 1:10.

Tabla No. 2 Titulación de complemento.

Titulación del complemento en presencia del antígeno.- Una vacuna de - virus modificado contra el Cólera porcino de origen de conejo (ROVAC,- American Cyanamid Co.), fué reconstituida, inicialmente diluida a 1:10, y subsecuentemente diluida en pasos duplicados hasta 1:320. Cantidades variables de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 ml. de suero equino al 1:10 se añaden a 0.4 ml. de antígeno diluido. Los volumenes de los tubos de cada serie se completan a 1.2 ml. con solución salina y se incuban en- baño maría durante 30 minutos a 37°C. Durante este lapso de tiempo se prepara la mezcla de suero bovino al 1:5 y los GRO al 0.25% a partes - iguales y por separado se incuban a 37°C durante 15 minutos. Al terminar ambos tiempos de incubación, a cada tubo se anade 0.8 ml. de la - suspensión de GRO sensibilizados (sistema indicador). Los tubos se incuban nuevamente en baño maría a 37°C durante 30 minutos, después son- centrifugados y agitados pa m hacer la lectura. Este método tambien -

permite seleccionar la mayor concentración de antígeno que no sea anticomplementaria en relación con la menor cantidad de complemento. - Las titulaciones indicaron en este caso particular, que las diluciones del antígeno menores de 1:40 eran anticomplementarias, no así las diluciones de 1:80 o más con 0.10 ml. del suero equino diluido a 1:10. La dilución del antígeno más concentrada que no produce efecto anti - complementario representa la unidad. Una unidad de antígeno contenida en un volumen de 0.4 ml. fué utilizada en la PACC.

Los resultados de una de las titulaciones de complemento en presencia de antígeno, son mostradas en la tabla No. 3.

Dilución del antígeno (ROVAC)	Complemento de caballo diluido a 1:10				
	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
1:10	-	+	+	3+	3+
1:20	±	2+	4+	4+	4+
1:40	±	3+	4+	4+	4+
1:80	+	4+	4+	4+	4+
1:160	+	4+	4+	4+	4+
1:320	3+	4+	4+	4+	4+
CONTROLES:		GRO + SB + C' (4+) GRO + SB + sol. salina (-) GRO + sol. salina (-)			

Tabla No. 3 Titulación de complemento de caballo en presencia de virus de Cólera porcino de origen de conejo.

Antígeno.- Este material quedó definido en la titulación del complemento en presencia de antígeno. Aunque tambien se ensayaron otros antígenos comerciales como: Bufficine (Elanco), Norvac (Norden), y Swivax (Pitman Moore), los resultados no fueron mejores que los obtenidos con el antigeno "Rovac". Y para simplificar el estudio, se prefirió usar solamente este último antígeno, teniendo en consideración, además que los resultados podrían ser comparables con los de otros estudios realizados con este mismo antígeno.

Sueros porcinos de prueba.- Fueron obtenidos de cerdos adultos sacrificados en el rastro de Ferrería para abasto de la población, procedentes de granjas en las cuales la vacunación contra el Cólera porcino es rutinaria.

Se obtuvieron 30 muestras de sangre de diferentes animales elegidos al azar. El suero fué separado en forma natural y clarificado por centrifugación. Fracciones de cada suero se envasaron en frascos estériles, y se conservaron a temperatura de congelación hasta su uso.

Sueros porcinos normales.- Se sangraron asépticamente 4 cerdos de aproximadamente tres semanas de edad que no habian sido vacunados contra el Cólera porcino. Los sueros fueron preparados de la misma manera que los anteriores y almacenados en congelación hasta su uso.

TRATAMIENTO DE LOS SUEROS PORCINOS PARA SUPRIMIR EFECTOS COMPLEMENTARIOS QUE INTERFIEREN CON LA PACC.

Tratamiento por anhídrico carbónico.- El suero es diluido a 1:10 con agua destilada y se adicionan pequeños fragmentos de hielo seco (nieve carbónica) y se agita muy suavemente hasta que aparece intensa turbidéz (5 a 10 minutos). Se retira el precipitado por centrifugación a 1500 - 2000 rpm. durante 10 minutos y se añade NaCl al 8.5% en la proporción de una parte por 9 del líquido sobrenadante para restablecer su concentración fisiológica salina.

Tratamiento por recalcificación.- a 9 volumenes de suero se les añade un volumen de solución 0.02 M. de CaCl y la mezcla es incubada a 37°C. durante dos horas.

Tratamiento de formol.- Si los sueros frescos se han almacenado en congelación (-25°C.), es necesario centrifugarlos para retirar el precipitado que se haya formado. El suero se calienta a 56°C. durante 30 minutos y se le añade formalina (sol. 37 - 40%) en cantidad de 0.2 ml. de una dilución al 1:72 para cada mililitro de suero. Se incuba a 37°C. durante 45 minutos.

Tratamiento por peryodato potásico.- Existen variantes del procedimiento, las que se emplearon se designan "A" y "B".

Tratamiento "A" (rápido).- A un volumen de suero se añaden tres volumenes de solución M/90 de peryodato potásico. La mezcla se incuba a temperatura de laboratorio por lo menos durante 15 minutos y despues se añaden tres volumenes de glicerina al 1% en solución salina para neutralizar el exceso de peryodato. La solución de peryodato deberá -

usarse preparada recientemente y no haberse obtenido en caliente.

Tratamiento "B" (lento).- Un volúmen de suero se mezcla con dos volúmenes de solución M/90 de peryodato potásico y se mantiene a 4°C durante 18 horas. Entonces se añaden dos volúmenes de glicerina al 1 %.

Tratamiento por fenol .- Los sueros son primeramente inactivados a 56°C por 30 minutos y luego fenolados añadiendo solución de fenol al 5% en cantidad suficiente para concentración final de 0,5%. Se mantienen en refrigeración (5 - 9°C) durante una noche y, si es necesario, y se observa turbidez, se clarifican por centrifugación antes de ser usados.

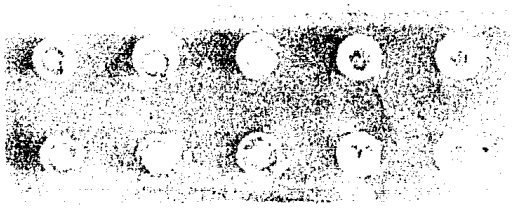


Fig. Nª 1 . - Antes de agitar los tubos para su lectura, en la Conglutinación, el fondo de ellos se observa de la siguiente manera : Los primeros 6 tubos (de izq. a der.) representan Conglutinación máxima, los dos siguientes, - Conglutinación mínima y los dos últimos No-Conglutinación.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE ABSORCION DE COMPLEMENTO CONGLUTINANTE.

Todos los sueros porcinos ensayados fueron tratados por -- uno o más de los métodos descritos para suprimir los efectos comple-- mentarios que interfieren en la conglutinación. Después del tratamiento, se hacen diluciones a: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512, que se usan en cantidades de 0.4 ml., en dos series de 7 tubos cada - una; una para titulación de anticuerpos y otra para el control de actividad anticomplementaria. A cada tubo de la primera serie se añaden - 0.4 ml. de antígeno (Rovac) previamente diluido a 1:40 y 0.4 ml. de - complemento a 1:10. A los tubos de la segunda serie, se les añade la- misma cantidad de complemento pero el antígeno es substituido por solución salina al 0.85%. Ambas series se incuban a 37°C durante 30 minutos en baño maria.

Inmediatamente después, se prepara el sistema indicador, - en cantidad suficiente, mezclando el suero bovino al 1:5 y suspensión de GRO al 0.25 %, a partes iguales, y se incuba por separado a 37°C - durante 15 minutos, procurando que este período de tiempo termine al- finalizar la incubación de las dos series de tubos.

A continuación a todos los tubos de ambas series se les añade 0.8 ml. del sistema indicador. Se incuban nuevamente por 30 minutos a 37°C. Al finalizar esta segunda incubación se centrifugan los - tubos a 1000 rpm. durante 5 minutos y se agitan para apreciar los resultados. En esta prueba se incluyen los siguientes controles: GRO -- sensibilizados + 4 unidades de complemento,,GRO sensibilizados + sol-

ción salina, antígeno + 4 unidades de complemento, antígeno + 2 unidades de complemento y GRO sensibilizados + 0.4 ml. de la menor dilución de suero porcino.

Lectura de resultados .-Inmediatamente después de la agitación manual de cada tubo, el grado de conglutinación es apreciado de la siguiente manera:

POSITIVA (+) .- Cuando las células han formado un gran grumo o varios grumos relativamente grandes que semejan coágulos y el medio permanece claro. Fig. Nª 3

PARCIAL O DUDOSA (±) .-Cuando se observan muy pequenos grumos y el líquido es turbio por las células no conglutinadas.

NEGATIVA (-) .- Cuando la resuspensión del sedimento forma suspensión homogénea de células libres. Fig. Nª 2

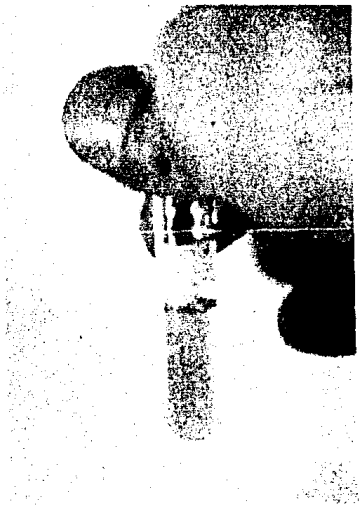


Fig. Nª 2

Fig. Nª 3

CAPITULO Nº III

R E S U L T A D O S

1.- Resultados comparativos de pruebas simultáneas con sueros tratados por peryodato potásico y fenol .- Resumen de resultados.

2.- Resultados de la PACC, empleando sueros porcinos tratados por fenol .- Resumen de resultados.

R E S U L T A D O S

En las primeras experiencias se ensayaron sueros hiperinmunes contra el Cólera porcino, comunes o concentrados, preparados comercialmente, pero estos sueros resultaron demasiado anticomplementarios para servir de controles positivos o como base comparativa en la titulación de sueros recientemente obtenidos.

Por otra parte, los estudios preliminares con algunos sueros porcinos, recientemente obtenidos e inactivados a 56°C, para comprobar su peculiar comportamiento hacia el sistema indicador conglutinante, en ausencia del antígeno y después de media hora de incubación a 37°C, revelaron que todos los sueros exhibían fuerte actividad procomplementaria aún en las diluciones de 1:32 y usando 1 - 2 unidades de complemento.

Estos problemas motivaron se consediera especial atención a la manera de controlar o suprimir esos efectos que adversamente influencían los resultados de la PACC. Con ese fin, se ensayaron los procedimientos descritos en el capítulo anterior que, además de ser sencillos, ofrecían mayores posibilidades por haber sido utilizados por varios investigadores en pruebas de fijación de complemento hemolítico, de inhibición específica de hemoaglutinación y aún en la misma PACC, en relación con otras enfermedades infecciosas y con el Cólera porcino.

El tratamiento por anhídrido carbónico, recomendado por el Comite de Expertos de la O.M.S. para los sueros antigripales en la --

prueba de inhibición de hemoaglutinación, dió resultados sorprendentes. El efecto anticomplementario anteriormente observado en los sueros comerciales, fué completamente nulificado, pero no pudieron detectarse anticuerpos específicos; posiblemente fueron también eliminados por este tratamiento.

Los tratamientos por recalcificación y por formol no fueron eficaces para eliminar los efectos procomplementarios de la mayoría de los sueros ensayados y tuvieron que abandonarse.

El tratamiento por peryodato potásico dió buenos resultados. Sin embargo, la variante "B" del procedimiento proporcionó mejores y más consistentes resultados, aunque unos sueros se mostraron anticomplementarios.

En cambio, el tratamiento por fenol se encontró ser el más satisfactorio de todos; regularmente eliminó el efecto complementario sin que aparecieran efectos anticomplementarios prácticamente. Infortunadamente, este tratamiento no pudo aplicarse a los sueros hiperinmunes comerciales por razones que más adelante serán discutidas.

La tabla N° 4 presenta los resultados de dos pruebas verificadas en distintas fechas, cada una con cinco sueros tratados simultáneamente para comparar el efecto del peryodato potásico (método "B") y el del fenol al 0.5 %. Por primera vez, en estas pruebas, se ensayó la modalidad de introducir, sistemáticamente, una serie completa de diluciones de cada suero para apreciar con seguridad el grado de actividad anticomplementaria (AC') y así, poder evitar falsas interpretaciones positivas por la absorción del complemento.

Sueros	Tratamiento.	Serie de prueba Diluciones (1/x). (con antígeno 1:40).							Serie de control AC' Diluciones (1/x). (sin antígeno).							Tit. Abs. (1)	Tit. AC' (2)
		8	16	32	64	128	256	512	8	16	32	64	128	256	512		
N° 1	KIO^4	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256	256
	Fenol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
N° 2	KIO^4	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	256	256
	Fenol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
N° 3	KIO^4	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	128	128
	Fenol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
N° 4	KIO^4	±	+	-	-	+	+	+	±	±	-	+	+	+	+	64	32
	Fenol	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	0
N° 5	KIO^4	+	+	±	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	256	128
	Fenol	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
N° 6	KIO^4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	256	128
	Fenol	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	128	64
N° 7	KIO^4	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	+	256	256
	Fenol	-	-	-	-	-	+	+	±	-	-	+	+	+	+	128	32
N° 8	KIO^4	±	-	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	+	+	128	128
	Fenol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
N° 9	KIO^4	±	-	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	+	+	128	128
	Fenol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
N° 10	KIO^4	-	-	-	-	+	+	+	±	-	±	+	+	+	+	64	16
	Fenol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
Normal (A)	KIO^4	+	±	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	128	64
	Fenol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
Normal (B)	KIO^4	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	8	8
	Fenol	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	0

(1) .- Título de absorción del complemento. Control antígeno 1:40 (no AC').
(2) .- Título de actividad anticomplementaria.

Tabla No. 4 Resultados comparativos de pruebas simultáneas con sueros tratados por peryodato potásico y fenol al 0.5 %.

RESUMEN DE RESULTADOS

Tratamiento por peryodato potásico (KIO^4).

De 10 sueros de prueba:

6 no pudieron ser titulados por tener iguales títulos de absorción y de actividad anticomplementaria (sueros N° 1, 2, 3, 7, 8 y 9).

4 tuvieron títulos de absorción mayores que los de actividad anticomplementaria, (sueros N° 4, 5, 6,y 10). Las diferencias variaron en una y dos diluciones (N° 10).

Tratamiento por fenol al 0.5 %.

De los 10 sueros de prueba, todos pudieron ser titulados. De estos:

8 no mostraron actividad anticomplementaria en ninguna de las diluciones. Sueros N° 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 y 10.

2 fueron anticomplementarios a las diluciones 64 y 32, pero en ambos el título de absorción fué de 128, sueros N° 6 y 7. Las diferencias fueron de 1 y 2 diluciones respectivamente.

En los dos sueros normales, el tratamiento por KIO^4 alteró el comportamiento del suero "A", pués resultó anticomplementario a la dilución de 64 y con un título de absorción de 128. En cambio, con el tratamiento por el fenol no fué anticomplementario y sólo absorbió el complemento en la primera dilución. En el suero normal "B", se registró absorción en la primera dilución pero no fué anticomplementario en ninguna dilución, con ambos tratamientos.

En cuanto al efecto procomplementario ("prozona"), después del tratamiento con:

Peryodato potásico .- Los sueros N° 1, 2, 4, 5, 8, 9 y Normal "A", fueron procomplementarios a las diluciones 16, 8, 16, 32, 8, 8 y 16 respectivamente.

Fenol al 0.5 %.- Los sueros N° 4 y 5 fueron los únicos que mostraron actividad procomplementaria, en la dilución 8 .

La experiencia adquirida durante esta parte del estudio determinó la conducta de practicar la PACC, solamente, con sueros previamente inactivados a 56°C. por media hora y tratados con fenol al - 0.5 %. La tabla N° 5 contiene los resultados finales obtenidos con 30 sueros de cerdos de abasto, procedentes de ganados vacunados pero sin que se haya podido precisar fechas y tipos de vacunas.

RESUMEN DE RESULTADOS

Todos los sueros de prueba absorbieron el complemento en - presencia de antígeno Rovac (dilución 1:40, no AC') y según el límite de absorción se agrupan de la siguiente manera:

1 (3.1 %) Suero con título de 32 No anticomplementario.

13 (40.6 %) Sueros con título de 64 De ellos:
10 no AC'
3 con título AC' de 16

13 (40.6 %) Sueros con título de 128 De ellos:
7 no AC'
2 con título AC' de 16
3 " " " " 32
1 " " " " 64

1 (3.1 %) Suero con título de 256 No anticomplementario.

2 (6.2 %) Sueros con título de 512 De ellos:
1 no AC'
1 con título AC' de 16

De los 10 sueros (N° 6, 7, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20 y 23) que causaron algún grado anticomplementario, solamente en el N°6 el título de absorción fué mayor en una dilución; en los restantes la diferencia fué mayor en dos o más diluciones. Con excepción de este único suero, todos los sueros fueron francamente titulables frente a las series de control AC'.

Suero N°	Titulación Diluciones del suero 8	16	32	64	128	256	512	Control AC' Diluciones del suero 8	16	32	64	128	256	512	Tit. Abs. (1)	Tit. AC' (2)
1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
4	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	0
5	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
6	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	128	64
7	-	-	-	-	-	+	+	±	+	-	+	+	+	+	128	32
8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
11	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	64	16
12	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	64	16
13	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
14	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	128	16
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	<512	16
16	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	128	32
17	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
18	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	128	32
19	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
20	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	64	16
21	+	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
22	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	256	0
23	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	128	16
24	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
25	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	64	0
26	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<512	0
27	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
28	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
29	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	0
30	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	0
SN	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	0
SN	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	0

Tabla N° 5 Resultados de la PACC, empleando sueros porcinos tratados -- por fenol al 0.5 %.

(1) .- Título de absorción del complemento.
(2) .- Título de actividad anticomplementaria.

Aunque el hecho tiene menos importancia, se hace notar que 7 sueros acusaron zona procomplementaria y de ellos, 5 en la dilución de 1:16 y 2 en la dilución de 1:32, pero el título de absorción sobrepasó en dos o más diluciones.

En los dos sueros normales de control, se registraron títulos de absorción a 1:16 y 1:8, pero ambos no fueron anticomplementarios.

CAPITULO N°. IV

D I S C U S I O N

D I S C U S I O N

En toda prueba serológica donde el complemento es elemento decisivo para visualizar la formación del complejo antígeno-anticuerpo que se trata de poner en evidencia, cualquier causa extraña que interfiera su avidéz por esos complejos, traera consigo inexactitudes en los resultados de la prueba.

Por los trabajos preliminares se concluyó que para aprovechar la mayor sensibilidad de la PACC, primero debería evitarse, en lo posible, las falsas reacciones positivas por efectos anticomplementarios (AC') y las falsas reacciones negativas por efectos procomplementarios (PC') para que los resultados fueran válidos. Aunque eso parece facilmente realizable, se tuvieron que confrontar problemas señalados por los investigadores y para los cuales no se tiene la solución práctica ideal. Coombs (1961) dice que si solamente el efecto AC' del suero porcino calentado para el complemento (C') de caballo pudiera ser evitado, entonces la PACC sería el más valioso método serológico para detectar anticuerpos fijadores del C' en los sueros de cerdo.

Es evidente la elevada frecuencia e intensidad del efecto PC' de los sueros porcinos en los sistemas conglutinante y hemolítico, despues del calentamiento para inactivar su propio complemento. La importancia de este factor fué señalada por Bankowski y col. (1953) como una propiedad de los sueros porcinos, normales e inmunes. Cross (1963) encontró incidencia de 89.5% en 200 sueros probados y que, por

lo menos, todos esos sueros duplicaban la actividad de la unidad hemolítica. Tambien Milliam y Englehard (1961), aplicando la PACC al sistema Cólera porcino, observaron marcado efecto "prozona" en la mayoría de los sueros calentados.

Para explicar el fenómeno procomplementario, en el sistema hemolítico, Bankowski y col. (1953) dicen que el factor responsable es el elevado contenido del tercer componente (C'3) del complemento de los sueros porcinos. En cambio, los estudios de Wiggin (1955) muestran que el fenómeno, en la reacción conglutinante, se debe a que los sueros porcinos son ricos en anticuerpos naturales (de Forssman) para los glóbulos rojos de ovino (GRO). Esta observación es confirmada, indirectamente, por los resultados de Rice y col. (1952) y Akao y col. (1962) en pruebas de fijación del C' hemolítico. Estos autores concluyen que la eliminación de los anticuerpos naturales por la absorción con GRO, reduce pero no suprime la actividad PC' del suero porcino y, por lo tanto, no podría ser explicada por la sóla presencia de los anticuerpos contra los GRO. También Akao y col. demostraron que la actividad PC' estaba asociada con el C'3 del complemento porcino porque la destrucción del C'4 por el amoniaco, tampoco la reducía. Luego entonces, se presenta la misma situación en el sistema conglutinante: la presencia de los anticuerpos naturales anti-GRO es uno de los factores y otro el componente termoestable C'4, el cual desempeña el mismo papel que tiene el C'3 en la reacción hemolítica, en la forma descrita al tratar del mecanismo de ambas reacciones.

Esos datos y los siguientes podrían explicar porqué el tra-

tamiento por el formol no dió los resultados esperados. Este tratamiento lo desarrolló Cowan (1961) para eliminar la actividad PC' del suero porcino en la prueba de fijación del complemento hemolítico con el virus de la Peste porcina africana, fundamentándose en que el formol a la dilución 1:72 destruía el C'3, y por consiguiente, no se incrementaba la actividad del complemento hemolitico del cuye. Sin embargo, tambien observó que algunos sueros tratados resultaban anticomplementarios. Así pues, la aplicación de este procedimiento al sistema conglutinante resultó inadecuado.

Pero el problema de los sueros es aún más complejo; no se circunscribe al efecto PC'. También Wiggin (1955) comprobó que los sueros absorbidos con GRO, no solamente pierden la actividad PC' sino que muestran propiedades anticomplementarias bien definidas, después del tratamiento. Coombs y col. (1961) explican que al eliminarse el factor PC' por medio de la absorción, queda desenmascarado el factor anticomplementario existente. Y según la hipótesis de Wiggin (1955) la actividad AC' dependería de la relación inversa entre las globulinas alfa-beta (2,1:1) del suero porcino y las del suero-complemento de caballo (1:1,07). Estas relaciones alfa-beta influenciarían la absorción del C'1 por el complejo antígeno-anticuerpo. Sea como fuere, es un hecho bien conocido que algunos sueros llegan a ser anticomplementarios después de cualquier tratamiento para suprimir el efecto PC'. Como muchos sueros calentados a 62°C son más AC', se ha sugerido el mecanismo de la formación de complejos o agregaciones de menor estabilidad pero con gran poder de absorción del C'. A este respecto, pueden citarse varios trabajos. Davis, Kabat,

Harris y Moor (1944) encontraron que las globulinas,aún aisladas - electroforéticamente, eran fuertemente anticomplementarias. Blomfield y col. (1950) demostraron que las fracciones gama-globulinas de los- antisueros eran muy AC'. E Ishisak y col. (1959) dicen haber comprobado que los agregados gama-globulinas, calentados, fijaron el complemento de manera indistinguible de cómo lo fijan los complejos antígeno-anticuerpo. Por lo tanto,las preparaciones de gama-globulina tienen propiedades AC' a causa de su contenido de agregados. Por estos- últimos datos podría explicarse porqué los preparados comerciales de antisueros "concentrados" contra el virus Cólera porcino resultaron- tan AC' que no fué posible utilizarlos como controles positivos en - la PACC.

En cuanto a los resultados negativos o positivos con otros métodos empleados, conviene hacer algunos comentarios porque repre-- sentan la experiencia lograda a través de este estudio.

La simplicidad del tratamiento por el anhídrido carbónico, en forma de hielo seco, recomendado por el Comité de Expertos de la O.M.S. (1959) para eliminar "inhibidores" de los antisueros de húron, conejo y gallo, que se destinan a la comparación o tipificación de - variedades de virus gripales, fué bastante sugestiva para intentar - su aplicación a los antisueros comerciales contra el Cólera porcino, con los resultados desalentadores antes mencionados. Los autores dicen que este tratamiento precipita los "inhibidores" no específicos de la hemoaglutinación pero no los anticuerpos. Aunque puede sospe-- charse de que el tratamiento dado a los sueros porcinos haya sido de

masiado enérgico y causó la precipitación de las gama-globulinas inmunes, también es probable que por el procedimiento industrial de preparación y la natural degradación del producto a través del tiempo, los anticuerpos hayan sufrido modificaciones en su estructura que favorecieron su precipitación por el CO^2.

El tratamiento por recalcificación fué sugerido por los estudios de Leon (1957) que demostraron que el Ca^{++} era necesario para la reacción de conglutinación. Se supuso que algunos sueros porcinos fueran deficientes en este elemento y la recalcificación, antes de hacer las diluciones, evitaría efectos desfavorables en la PACC. Pero los resultados mostraron que el tratamiento no modificaba las cualidades originales de los sueros previamente inactivados por calentamiento.

El tratamiento por peryodato potásico, con sus variantes, se ha experimentado ampliamente para eliminar inhibidores no específicos de la hemoaglutinación, así como para abolir la actividad PC' de los sueros de diversas especies animales y con distintos sistemas serológicos.

Otra vez, los estudios con la prueba de fijación de complemento hemolítico, realizados por Akao y col. (1962) son aquí interesantes. Comprobaron que la actividad PC' de los sueros porcinos, calentados, variaba bastante de uno a otro y que el tratamiento con peryodato potásico era efectivo para suprimir el efecto PC', empleando la dilución óptima que encontraron de M/100 y a la proporción de 2 volúmenes por 1 de suero, actuando una hora, sin afectar los anti

cuerpos específicos; pero que la concentración M/50 hizo que los sueros fueran ligeramente anticomplementarios. Anteriormente, Milliam - y Englehard (1961) habían empleado el peryodato potásico a la concentración M/90, durante 18 horas, para eliminar la actividad PC' de -- sueros normales e inmunes en la detección de anticuerpos contra el - Cólera porcino, observando algunas reacciones de prozona, pero sin - indicar haber tratado de comprobar si los sueros resultaron o no anticomplementarios en alguna dilución.

La información anterior explicaría por lo menos, en parte, lo que podría designarse como "zonas residuales pro-complementarias" en la PACC, con sueros porcinos tratados por peryodato. De los com-- ponentes termoestables del suero porcino, el C'4 parece ser resistente a la acción oxidante del peryodato y podría asumir el mismo papel que juega el C'3 en la fijación de complemento hemolítico, partici - pando con otros factores en el aumento de la sensibilización de los- GRO a la conglutinina, y en el supuesto de que algunos de estos últimos factores interfiriera la unión de los componentes C'1 - C'2. La extensión de la zona PC' dependería de la concentración de tales factores en el suero. Y al disminuir la cantidad de suero en las dilu - ciones, gradualmente se perdería su efecto.

En cambio, el tratamiento de los sueros con fenol a la concentración de 0.5 %, resultó más atinado. El método fué desarrollado por Cross y Clafin (1963) para suprimir la actividad PC' de los sueros normales de cerdo, en la prueba de fijación de complemento hemolítico de cuye. Los autores ensayaron concentraciones variables de - Fenol y en diferentes concentraciones, encontrando que la concentra-

ción de 0.5 % era crítica, pues las mayores concentraciones provoca - ban la aparición del efecto AC' y las menores solo reducían el efecto PC'. De 96 sueros que trataron, sólo uno llegó a ser anticomplementario. Esta información sirvió de base para ensayar la aplicación del método en la PACC.

Los resultados de pruebas comparativas con 10 sueros tratados por fenol y peryodato (ver Tabla N° 4), muestran claramente la- superioridad del primero. La eficacia de ambos métodos fué mejor a - apreciada cuando se utilizó, en cada suero y para cada tratamiento,- una serie igual de diluciones, pero sin antígeno, para poder descu - brir cualquier grado anticomplementario relacionado con uno u otro - de los tratamientos. La superioridad consistió en que todos los sueros fenolados pudieron ser titulados; de los 10 sueros, 8 no llega - ron a ser AC' en ninguna de las diluciones y solamente 2 fueron AC' en las diluciones 1:32 y 1:64, pero su título de absorción de C' -- frente al antígeno fué mayor en 1 y 2 diluciones. Por lo contrario, los mismos sueros tratados con peryodato, 6 no pudieron ser titula - dos por ser AC' a las mismas diluciones de la serie con antígeno; y- los 4 sueros restantes fueron AC' en diluciones de 16, 32 y 128, pero sus títulos de absorción con antígeno fueron mayores en 1 y 2 diluciones, habiendo correlación con los mismos sueros fenolados. Aún- más, en 6 sueros tratados con peryodato se observaron "zonas residuales pro-complementarias" y en mayor extensión que en los sueros fenolados, en los cuales fué mínima en los dos únicos casos observados.- Por otra parte, en los dos sueros normales, las discrepancias fueron

significativas. Con el peryodato, uno llegó a ser AC' y absorbió el C' en presencia del antígeno a la dilución 1:128. En cambio, este mismo - suero, fenolizado, no mostró tener anticuerpos para el antígeno, ni fué anticomplementario. A lo anterior puede agregarse otra ventaja práctica: la fenolización al 0.5% actúa como preservativo anti-bacteriano, - Algunos de estos sueros se probaron dos veces con intervalo de 7 días- de almacenamiento en refrigeración ordinaria, lográndose iguales resultados.

Sin embargo, se observó un hecho aparentemente paradójico: - los sueros hiperinmunes comerciales contra el Cólera porcino, que son- preservados con fenol al 0.5%, de acuerdo con los requerimientos oficiales del país exportador (USDA - AIQ, 1958. Part. 119) fueron demasiado anticomplementarios para poder titular su concentración en anticuerpos específicos. Es casi seguro que la condición AC' de estos sueros sea atribuible, principalmente, a la presencia de substancias usadas en el proceso de clarificación (extracto de frijol que aglutina - las células sanguíneas USDA - AIQ, 1958, 660.21) y a la formación de - grandes agregados moleculares de globulina a causa de la acción combinada del fenol, posiblemente en concentración ligeramente mayor que la óptima de 0.5%, y la natural degradación durante su almacenamiento. Ya se mencionó antes que el envejecimiento de los sueros, la presencia de substancias con acción directa inhibitoria de la actividad del C' y la formación de agregados que constituyen soluciones coloidades con gran- capacidad de absorción del C', son causas bien conocidas del estado anticomplementario. Por lo tanto, se considera inaplicable la PACC a los sueros que reunen esas condiciones adversas.

Apreciando todos estos problemas, en conjunto, puede decirse

que, en la realidad, el efecto PC' no reviste tanta importancia como la actividad AC', en cuanto se refiere a la interpretación final de- la PACC. La necesidad de eliminar el efecto PC' de los sueros calentados, radica en que la zona procomplementaria puede enmascarar la - presencia de anticuerpos específicos cuando existen en bajas concentraciones, limitando así la utilidad de la prueba en muchos casos. - Pero cuando el efecto es revasado por la zona de absorción específica, en dos o más diluciones, la interpretación no ofrece serias dificultades, siempre que se compruebe que esta absorción no es atribuible a la actividad AC' que pudiera tener el mismo suero.

En las pruebas finales, el empleo combinado del pretratamiento con fenol al 0.5% y la titulación de la actividad PC' de los- sueros, hizo posible detectar anticuerpos para el antígeno Cólera - porcino (Rovac) en 30 sueros de cerdos de abasto que procedían de ganados vacunados (ver Tabla No. 5). Todos los sueros tuvieron títulos positivos que variaron entre 32 y 512. La comparación individual entre el título de absorción con el antígeno y el título AC', proporcionan clara evidencia de la especificidad de la prueba. Puede observarse que de los 30 sueros probados, 20 no fueron anticomplementarios en ninguna de las diluciones, pero tuvieron títulos positivos - de absorción con el antígeno, distribuídos de la siguiente manera: - 1 suero de 32, 10 de 64, 7 de 128, 1 de 256 y otro de 512. En los 10 sueros restantes, la incidencia y variación de los títulos AC' fué:- 6 sueros de 16, 3 de 32 y uno de 64. Sin embargo, todos estos títulos fueron revasados en dos o más diluciones por el título de absorción con el antígeno, excepto en un caso en que la diferencia fué -

una dilución. Como el antígeno se utilizó a la dilución de 1:40 la - cual siempre se mostró no ser anticomplementaria, la absorción del - complemento en las diluciones no anticomplementarias sólo puede ser- atribuída a la formación del complejo antígeno-anticuerpo del siste- ma Cólera porcino. Esta interpretación también está apoyada por los- resultados de las pruebas de Milliam y Englehard (1961) con el mismo tipo de antígeno y sueros hiperinmunes experimentales. En cuanto a - las "zonas residuales procomplementarias", sólo se presentaron fran- camente en 5 sueros y en las diluciones 1:8 y 1:16, pero en todos - los casos fueron sobrepasadas por los títulos positivos de absorción con el antígeno y, por lo mismo, no alteran el resultado final de la prueba. Sin embargo, indican que algunos sueros tienen mayor activi- dad procomplementaria y que la fenolización no alcanzó a destruir to dos los factores o algunos no son susceptibles a la acción del fenol, pero con la dilución se perdió su efecto.

Los resultados de los 2 sueros normales son de interés por que en éllos se registró absorción del C' en presencia del antígeno- en las diluciones 1:8 y 1:16, en las cuales no fueron anticomplemen- tarios, en cambio, en pruebas anteriores, otros 2 sueros normales no dieron reacción positiva ni fueron anticomplementarios. Estos hallaz gos sugieren que los títulos a esos niveles deben considerarse como- reacciones no específicas o dudosas, en tanto no se disponga de mejor información experimental. Este criterio limitativo afectaría a las - reacciones específicas en bajos títulos pero ofrece mayor seguridad- en la interpretación de los resultados finales de la prueba.

CAPITULO N°. V

C O N C L U S I O N E S

C O N C L U S I O N E S

1 .- El pretratamiento de los sueros porcinos con fenol al 0.5%, al ser inactivado su complemento a 56°C., resultó el más sencillo y eficáz de los métodos ensayados para eliminar el efecto procomplementario sin provocar la aparición de la actividad anticomplementaria. Además se le reconoce la ventaja de actuar como preservativo de contaminiciones, haciendo posible hacer o repetir las pruebas después de algunos días.

2 .- El empleo de dos series de diluciones del mismo suero: una para determinar el título de absorción del complemento conglutinante en presencia del antígeno específico y la otra para conocer el título de actividad anticomplementaria, se considera necesario porque la comparación de ambos títulos permite interpretar con mayor seguridad los resultados finales de la prueba.

3 .- Las zonas residuales procomplementarias, cuando son ampliamente revasadas por el título de absorción del complemento en presencia del antígeno, carecen de interés práctico en la interpretación final de la prueba.

4 .- Los títulos positivos de absorción del complemento en presencia del antígeno, en las diluciones 1:8 o 1:16, son interpretados como reacciones no específicas o dudosas, porque pueden presentarse en el suero de cerdos normales sin historia de la enfermedad o de vacunación contra el Cólera porcino. En tanto no se disponga de mejor información experimental se considera-

juiciosa esta interpretación.

5 .- La prueba de absorción del complemento conglutinante, aplicada a los sueros de cerdo y empleando los métodos seleccionados - que se describen en este estudio, se encontró ser un instrumento eficáz y sensible para detectar anticuerpos circulantes contra el virus del Cólera porcino, exceptuando los preparados comercialmente con sueros hiperinmunes, simples o concentrados,- tal como son adquiridos en el mercado, a causa de sus propiedades anticomplementarias.

6 .- Además, se sugiere la aplicación de esta prueba serológica en- el estudio del desarrollo de la inmunidad humoral para valorar la eficacia de las vacunas sin recurrir a la exposición de los cerdos con virus virulento, para vigilar el proceso de hiperinmunización comercial y determinar el tiempo oportuno de sacrificio de los cerdos con la mayor producción de anticuerpos, para fijar las bases de una posible estandarización de in vitro de los preparados comerciales, con sueros hiperinmunes, así como en el estudio inmunológico de las variantes del virus del - Cólera porcino.

CAPITULO N°. VI

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

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

AKAO Y.- SANO R.- SEGIARA A. & SHIMOJO H.
"Procomplementary Activity of Swine and its Elimination with Periodate".
Jap. J. Med. Scie. 1962. 15:165/73.

ANDERSEN C. W.
"Ueber die Verwertung der Konglutinationsreaktion als - - - diagnostiche Probe beim Rotz".
Zbl. Backt. 1913. 72:394/98.

BANKOWSKI R. A.- WICKMANN R. & KIMMER M.
"A Complement-fixation test for identification and - - - - - differentiation of immunological types of the vesicular - - exanthema of swine".
Amer. J. Vet. Res. 1953. 14:145/49.

BANKOWSKI R. A. & KUMMER M.B.
"Vesicular Stomatitis and Vesicular Exanthema Differentiation by Complement Fixation".
Am. J. Vet. Res. 1955.- 16:374/76.

BLOMFIELD A.M.- COOMBS R.R.A and HOLE N.H.
"The conglutination Phenomenon VI. An experimental investigation of the factors determining the absorption of complement by antigen-antibody misture."
J. Hyg. Camb. 1950. 48:73/95.

BOULANGER P.
"A Preliminary Note on a Method of Inactivating a Substances - in Swine Serum that interfere with the Detection of Antibodies by Complement Fixation Test."
Canad. J. Comp. Med.- 1954.- 18:423/25.

BOULANGER P.
"Complement-fixation Test of Swine Serum".
I. In the Diagnosis of Vesicular Stomatitis.
Cand. J. Comp. Med. 1955. 19:37/47.

BORDET J. & STRENG O.
"Les phénomenes d'absoption et la conglutinine du sérum de - boeuf".
Zentralbl. f. Bakt.- 1909.- 49:260/76.

BROCQ-ROUSSEAU, URBAIN A & CAUCHEMEZ.
"La conglutination globulaire apliuée au diagnosis de certaines maladies microbiennes. Comparison avec la reaction de déviation du complement".
C. R. Soc. Biol. Paris. 1925. 92:326/28.

CARPENTER P. L.
"Immunology and Serology".
1956. Pub. W. B. Saunders Co.

COOMBS R. R. A. & HOLE N. H.
"The Conglutination Phenomenon IV.- The importance of the choise of complement-fixing of complement-absorbing antibodies."
J. Hyg. Camb.- 1948 46:296/310.

COOMBS R.R. A.- COOMBS A. M.- INGRAM D. G.
"The Serology of Conglutination and Relation to Disease".
First printed, 1961.- Printed in Great Britain by Adlard & Son - Ltd.- Bartholomew Press, Dorking.

CROSS R. F. & CLAFLIN R. M.
"The indicence and removal of Procomplementary Activity in - - Swine Serum."
Am. J. Vet. Res. 1963. 24:334/36.

CORVAZIER R.
"Un test in vitro applicable a l'étude de la poliomyélite: la - conglutination".
C. R. Soc. Biol. Paris. 1953. 147:49/51.

CORVAZIER R. & LASFARGUES E.
"La conglutination, méthode de detection du virus de Cerré".
C. R. Soc. Biol. Paris. 1952. 146:676/78.

COWAN K. W.
"Recherches Immunologiques sur le Virus de la Peste Porcine - - Africane: I. Elimination de Activite Procomplementaire du serum de Porc par le Formol."
J. Immunol 1961. 86:465/70.

DAVIS B. D.- KABAT E. A.- HARRIS A. & MOORE D. H.
"The anticomplementary activity of the serum gammaglobulina".
J. Immunol. 1944. 49:223/33.

DELLAFAVERA G. B.
"Sulla sierodiagnosi della sifilide per mezzo della reazione di conglutinazione (Metodo di Karvonen)".
Zbl. Bakt. Ref. 1912.- 55:621/22.

ENGLEHARD W. E. & CARLISLE H. N.
"Conglutination Complement-Absortion Test in Diagnosis of - Bovine Brucellosis".
Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.- 1955.- 88:670/73.

GILDERMEISTER E. &. JAHN.
"Beitrag zur Rotzdiagnose beim Menshem".
Berl. Klin. Wschr. 1915. 52:627/30.

GRAUB E.
"Uber die Verwertbarkeit det Ophthalmoreaktion und der - - Konglutination zur Rotzdiagnose".
Schveiz. Arch Tierheilk. 1917. 59:129/54.

GRILLO TORRADO J. M. - GIACESA A. M.
"La Prueba de Absorción del Complemento Conglutinante en la - Rabia y su comparación con la Prueba de Fijación de Complemento Hemolítico".
Rev. Med. Vet. Buenos Aires. 1955. 37:113/19.

GROSS R. F. OLAFEN RM. M.
"The incidance and removal of protocomplementary activity in - swine serum".
Am. J. Vet. Res.- 24:334.- marzo 1963.

HESLOP G. G.
"Researches into the serological diagnosis of contagious - - pleuroneumonia of cattle".
Proc. Roy. Soc. Vict. 1921. 33:160/211.

HOLE N. H.- & COOMBS RRA.
"The Conglutination Phenomenon. III. The Conglutinating - - Complement Absorption Test in Experimental Glanders".
J. Hyg.- 1947.- 45:497/503.

HOLE N. H. & COOMBS RRA.
"The Conglutination Phenomenon. I.- An Introduction to the - - Conglutination Phenomenon and and Account of the Observations and views of Previous Investigators".
J. Hyg.- 1947.- 45:480/89.

ISHIZACK
"Biological Activities of Aggregated Gamma Globulin".I .- Skin Reactive and Complement-Fixing properties of heat Denatured -- Gamma Globulin (25116).
Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med. 1959.- 101:845/50

KABAT E. A. & MAYER M. M.
"Experimental Immunochemistry".
Second Edition 1964. Pub. Charles C. Thomas, E.U.A.

KOLIAKOV Y. E. & KATYAEVA K. A.
"Reakcija konglutinacii pri peripnevmonii krupnogo rogatogo - skota.- The conglutination reaction in bovine pleuroneumonia".
Sovetsk. Veterinaria. 1933. 4:4/12.

LANGER P. H.
"Development of Heterotypic Bovine Virus Diarrhea (BVD) Vaccine Against Hog Cholera".
Proc 67th. Ann. Meet. U. S. Livestock Sant. Ass. 1963.-358/365.

LEON M. A.
"Role of cations in Conglutination and in formation of properdise zymposon complex from Bovine Serum" (23432).
Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med. 1957.- 96:202

LUGER A.
"Zur Verwertbarkeit der Konglutinationsreaktion".
Zbl. Bakt. 1912. 65:390/93.

MILLIAM S.J. & W.E. ENGLEHARD.
"Application of the Conglutination Complement Absortion Test to Detect Hog Cholera Antibodies" .- I .- The technique.
Am. J. Vet. Res.- 1961 .- Vol. XXII N° 88:396/400.

NORCROSS N. L. & PAPPENSICK G. C.
"Conglutinating Complement Adsortion Test as applied to Foot and Mouth Disease".
J. Bact. 81:478/81, 1961.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD.
Comite de Expertos en Virosis del aparato respiratorio. Primer Informe. Anexo 3. Técnicas serológicas y de diagnostico.
Org. Mund. Salud Ser. Inf. Téc.- 1959. 170:39/44.

PARISH W. E.
"A transmissable genital papilloma of the pig resembling the condyloma acuminatum of man".
J. Path. Bact. 1961.

PFEILER W. & WEBER G.
"Uber die Wirkung des Malleins bei gesunden Pferd und die - - Beddeutumg der Konglutinations-reaktion fur die Erkennung der - Rotzkrankheit."
Z. Infekt Kr. Haustiere. 1914, 15:209/227.

PFEILER W. & SCHEYER G.
"Uber die gleichzentige Verwendung des Hamolysins und Hemagglutinins als Indikatoren bei der Komplementablenkung reaktion zur Feststellumg der Syphilis".
Munch. Med. Washr. 1915. 62:393/95.

PIER J. E. & LE BEAU R.W.
"Studies on the serologic identification of the adenovirus". -- I .- Comparison of the haemagglutination, conglutinating complement absorption, and complement fixation test.
J. Lab. Clin. Med., 1958. 51:495/500.

POPPE K.
"Die Beddeuntung der Konglutinations und KH-Reaktion fur die - Serumdiagnose des Rotzes".
Zbl. Backt. 1922. 89:29/48.

RICE C. E. & EVERY RJ.
"Studies of the Conglutinating Complement Absorption Test".- - I .- With constant Complement.
Am. J. Vet. Res. 1950 11:98/104.

RICE C. E.- BOULANGER P.- MACKIE C.- & MOORE T.
"The conglutinating complement-fixation test as a supplementary method of detecting activity with brucella abortus antigenes".
Cand. J. Comp. Med. 1952 16:348/56.

SATO S. & FUNAKOSHI H.
"The effect of meta-periodate on Complement. A method for preparing the fourth component of complement".
J. Biochem. 1959. 46:281/92.

SCHWARTE L. H.
"Field Strains of Hog Cholera Virus".
Symposium of Hog Cholera. 1961. University of Minnesota.

SCHOENING H. W.
"Conglutination test for the diagnosis of glanders".
J. Agric. Res. 1917. 11:65/75.

SHEFFY B. E.- COGGINS L. & BAKER J. A.
"Protection of Pigs Against Hog Cholera with Virus Diarrhea. - Virus of Cattle".
U. S. Livestock Sant. Ass. 1961. 65:15/18.

SHEFFY B. E.- COGGINGS L. & BAKER J. A.
"Relationship between Hog Cholera Virus and Diarrhea Virus of - Cattle.
Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 1962. 109:349/52.

SOLOVIEFF P.
"Réaction de conglutination dans la févre aphteuse".
Rev. Zootec. Buenos Aires. 1943 30:19/26.

SOULSBY E. J. L.
"Studies on the Heterophile Antibodies associated with Helminth Infections: Heterophile Antibody in Ascaris Lumbricoides Infection in pigs"
J. Comp. Path. 1958. 68:345/51.

STOKER M. G. P. & MARMION B. P.
"A Comparison of the Complement-Absorption Test and Haemolytic Complement Fixation Test in the Serological Diagnosis of In - fluenza".
Brit. J. Exptl. Path. 1950. 31:332/37.

STOKER M. G. P. - COOMBS R. R. A. - & BEDSON S. P.
"The application of the conglutinating complement absorption - test to virus systems".
Brit. J. Exptl. Path. 1950. 31:217/32.

STRENG O.
"Die Konglutination und die Diagnose der Syphilis".
Beitr. Path. Anat. 1911. 51:279/95.

U. S. DEPART. OF AGRICULTURE.- AGRIC. RESEARCH SERVICE.- ANIMAL INSP. AND QUARANTINE.DIVISION.
"Bean Extract in the preparation of Clear Serum".
Memorandum 660.21 - AIQ. 1958.

U. S. DEPART. OF AGRICULTURE.- AGRIC. RESEARCH SERVICE.- ANIMAL INSP. AND QUARANTINE DIVISION.
"General Requirement for Anti-Hog Cholera Serum".
Part. 119. - 1958.

WALDMANN O.
"Die Bedeutung der neueren Komplementablekungsmethoden fur die Serodiagnose der Rotzkranheit".
Arch. wiss. prakt. Tierheilk. 1916. 42:194/222.

WALKER J.
"The application of the conglutination reaction to the serum - diagnosis of bovine pleuroneumonia (lungsickness)".
S. Afr. J. Sci. 1923. 20:406/31.

WASSERMANN A.
"Die Konglutination (nach Carvone) an Stelle der Hämolyse".
Berl. Klin. Waschr. 1912. 49:666.

WEHRBEIN H.
"Conglutination in the diagnosis of dourine (trypanosomiasis - of the horse)".
J. Infect. Dis. 1915. 16:461/65.

WIGGIN N. J. B.
"Studies on conglutination with special reference to complement, anti-complementary action and inmunoconglutinin".
Dissertation to the University of Cambridge for Ph. D. degree.

WOLF D. M. & KORNFELD L.
"Conglutinating Complement-Absorption Test Compared with Hemolytic Complement Fixation Test Reactions using Q Fever Inmune-Bovine Serum.
Proc. Soc. Exptl. Biol. 7 Med. 1948. 69:251/55.