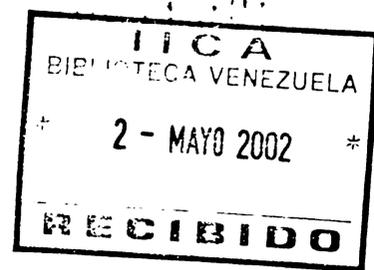


IICA
INSTITUTO VENEZUELA
2 - MAYO 2002
RECIBIDO

A)





MANUAL DE TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO EN SALUD ANIMAL

Tomo II

**Asunción, Paraguay
Setiembre, 2001**

**SERVICIO NACIONAL DE SALUD ANIMAL (SENACSA)
Laboratorio del SENACSA**

**INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA (IICA)
AGENCIA DE COOPERACIÓN EN PARAGUAY
DIRECCION REGIONAL SUR**

00007232

P R O L O G O

El Manual de Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico en Salud Animal que con satisfacción prologamos, es producto del esfuerzo conjunto realizado por el Laboratorio del Servicio Nacional de Salud Animal (SENACSA) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), en el marco del Acuerdo de Cooperación entre ambas instituciones.

El Paraguay, a través del SENACSA, está implementando un Plan Nacional de Salud Animal y Emergencia Sanitaria, cuyo propósito es mejorar la situación zoonosanitaria nacional fortaleciendo los programas de control y erradicación de enfermedades, para declarar al país libre de las que afectan a la ganadería nacional y que constituyen una barrera no arancelaria en el comercio internacional de productos y subproductos de origen animal.

Disponer de información completa y actualizada de las técnicas de laboratorio, facilitará un mejor diagnóstico de las enfermedades de los animales y permitirá ejecutar adecuadamente las campañas nacionales de salud animal. De esta manera se cumplirá cabalmente con las exigencias internacionales, en especial con las recomendaciones de la Oficina Internacional de Epizootias, OIE en ésta materia

Este Manual que fue preparado por los profesionales de las diferentes dependencias que componen el Laboratorio del SENACSA y contó con el apoyo técnico de la Agencia de Cooperación del IICA en el Paraguay, es un instrumento que permitirá a los técnicos del SENACSA y sector privado a desempeñar sus funciones con mayor eficacia y eficiencia, facilitando el comercio de productos y subproductos pecuarios y la inserción competitiva del país en los mercados mundiales.

Dr. Luis A. Acuña
Presidente del SENACSA

Ing. Agr. Roberto Casás
Representante del IICA en Paraguay



P R E S E N T A C I O N

El Servicio Nacional de Salud Animal, SENACSA, es una institución autónoma que tiene como objetivo organizar y ejecutar el Plan Nacional de Salud Animal mediante campañas nacionales de sanidad animal, principalmente de lucha contra las principales enfermedades tales como: Fiebre Aftosa, Brucelosis, Rabia Bovina, Tuberculosis Bovina, Anemia Infecciosa Equina, Peste Porcina Clásica y Enfermedad de Newcastle así como también la producción y control de productos biológicos destinados a la inmunización y el diagnóstico de las enfermedades en campaña.

Para cumplir con sus objetivos es de primordial importancia que el SENACSA disponga de laboratorios que realicen técnicas de diagnósticos vigentes y acordes con las establecidas por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) como un organismo oficial de referencia en materia de salud animal para el comercio internacional.

Presentamos este Manual como una herramienta de gran utilidad y un medio de consulta permanente para los técnicos del sector público y privado que desarrollan labores en el área del diagnóstico laboratorial de las enfermedades de importancia económica de la pecuaria nacional.

Es valioso destacar la labor realizada por los técnicos del SENACSA en la recopilación y ordenamiento de las técnicas descritas en el presente Manual y la abnegada dedicación de la Dra. Nelly Ortiz en la elaboración de dicho texto y un especial reconocimiento a la Lic. Gloria Gauto y Lic. Vanessa Doria por la transcripción y adecuación para el formato del texto.

Por lo extenso del Manual y una mejor comprensión, el documento se ha dividido en dos tomos: Tomo I que contiene Anemia Infecciosa Equina, Brucelosis, Enfermedad de Newcastle y Tomo II que incluye Fiebre Aftosa, Peste Porcina Clásica, Rabia Bovina y Tuberculosis Bovina.

Cabe resaltar que la elaboración y edición de este Manual contó con el apoyo técnico y financiero del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA, por lo que expresamos nuestro mayor reconocimiento y agradecimiento a la Agencia en el Paraguay.

Dra. Natalia de Vergara
Vice-Directora de Laboratorio
SENACSA

Dr. Santiago González Patiño
Director de Laboratorio
SENACSA

CONTENIDO

	Pag.
PROLOGO	
PRESENTACION	
I. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	
1. DIAGNOSTICO	1
1.1 Método de Inmunodifusión en Gel de Agar (AGID).....	1
1.1.1 <i>Materiales, reactivos y medios</i>	1
1.1.2 <i>Procedimiento</i>	1
1.1.3 <i>Lectura e interpretación de los resultados</i>	2
1.1.4 <i>Otras pruebas</i>	5
2. PRODUCCION DE ANTIGENO A PARTIR DE BAZO EQUINO.....	5
PARA LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN GEL DE AGAR	
2.1 <i>Materiales y reactivos</i>	5
2.2 <i>Procedimiento</i>	6
2.2.1 Inoculación del animal.....	6
2.2.1. Purificación del antígeno	6
2.2.2. Preparación de gamma globulina purificada.....	8
2.2.3. Titulación del antígeno.....	8
2.2.4. Control de calidad del antígeno	8
3. LITERATURA CONSULTADA.....	9
II. BRUCELOSIS	
1. DIAGNOSTICO	10
1.1 Diagnóstico Serológico.....	10
1.1.1 Prueba Lenta en Tubo o prueba de Wright.....	10
1.1.1.1 <i>Materiales y reactivos</i>	10
1.1.1.2 <i>Procedimiento</i>	10
1.1.1.3 <i>Lectura e interpretación</i>	12
1.1.2 Prueba en Placa o Prueba de Hudlesson.....	13
1.1.2.1 <i>Materiales y reactivos</i>	13
1.1.2.2 <i>Procedimiento</i>	13
1.1.2.3 <i>Lectura e interpretación</i>	14

1.1.3	Prueba del Rosa de Bengala o Prueba de la Tarjeta o Card..... Test	18
1.1.3.1	<i>Materiales y reactivos</i>	19
1.1.3.2	<i>Procedimiento</i>	19
1.1.3.3	<i>Lectura e interpretación</i>	19
1.1.4	Prueba del Mercaptoetanol.....	20
1.1.4.1	<i>Materiales y reactivos</i>	20
1.1.4.2	<i>Procedimiento</i>	20
1.1.4.3	<i>Lectura e interpretación</i>	21
1.1.5	Prueba del Rivanol.....	22
1.1.5.1	<i>Materiales y reactivos</i>	22
1.1.5.2	<i>Procedimiento</i>	23
1.1.5.3	<i>Lectura e interpretación</i>	23
1.1.6	Prueba de la Antiglobulina o de Coombs.....	24
1.1.6.1	<i>Materiales y reactivos</i>	24
1.1.6.2	<i>Lectura e interpretación</i>	27
1.1.7	Prueba del Anillo en la Leche (PAL) o Milk Ring Test (MRT)	28
1.1.7.1	<i>Materiales y reactivos</i>	29
1.1.7.2	<i>Procedimiento</i>	29
1.1.7.3	<i>Lectura e interpretación</i>	29
1.1.8	Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar.....	31
1.1.8.1	<i>Materiales, reactivos y medios</i>	31
1.1.8.2	<i>Procedimiento</i>	32
1.1.8.3	<i>Lectura e interpretación</i>	33
1.1.9	Fijación de Complemento.....	33
1.1.9.1	<i>Estandarización de los reactivos</i>	34
1.1.9.2	<i>Procedimiento</i>	42
1.1.9.3	<i>Resultado</i>	43
1.2	Diagnóstico Bacteriológico	46
1.2.1	Aislamiento.....	46
1.2.1.1	<i>Medios básicos</i>	46
1.2.1.2	<i>Medios selectivos</i>	46
1.2.1.3	<i>Medios para hemocultivos</i>	46
1.2.1.4	<i>Cultivo de muestras</i>	47
1.2.2	Identificación de las Brucelas.....	47
1.2.2.1	<i>Características de los cultivos</i>	47
1.2.2.2	<i>Métodos de tinción</i>	50
1.2.2.3	<i>Necesidades de anhídrido carbónico</i>	52
1.2.2.4	<i>Proliferación en presencia de colorantes</i>	52
1.2.2.5	<i>Producción de ácido sulfhídrico</i>	53



1.2.2.6	Prueba de la ureasa.....	54
1.2.2.7	Aglutinación con sueros monoespecíficos.....	55
1.2.2.8	Sensibilidad a fagos antibrucelares.....	56
2.	ELABORACION Y NORMALIZACION DE ANTIGENOS.....	60
2.1	Elaboración de la Suspensión Madre.....	60
2.1.1	Medios de cultivo	60
2.1.2	Mantenimiento de <i>Brucella abortus</i> cepa 1119-3.....	61
2.1.2.1	Cultivos para semilla, siembra e incubación.....	62
2.1.3	Recolección.....	62
2.1.4	Prueba de esterilidad.....	63
2.1.5	Prueba de pureza.....	64
2.2	Elaboración del Antígeno para la Prueba en Tubos.....	64
2.2.1	Dilución de la suspensión madre.....	64
2.2.2	Normalización del antígeno.....	65
2.2.2.1	Determinación del volumen celular.....	65
2.2.2.2	Prueba de sensibilidad.....	65
2.2.2.3	Examen de pureza y esterilidad.....	66
2.2.2.4	Envase.....	66
2.3	Elaboración de Antígeno para la Prueba en Placa.....	67
2.3.1	Dilución de la suspensión madre.....	67
2.3.2	Normalización del antígeno.....	67
2.3.2.1	Determinación del volumen celular.....	67
2.3.2.2	Prueba de sensibilidad.....	68
2.3.2.3	Examen de pureza y esterilidad.....	68
2.3.2.4	Envase	68
2.4	Elaboración del Antígeno para la Prueba del Rosa de Bengala.....	69
2.4.1	Dilución y coloración de la suspensión madre.....	69
2.4.2	Normalización del antígeno.....	70
2.4.2.1	Determinación del Volumen celular.....	70
2.4.2.2	pH del Antígeno.....	70
2.4.2.3	Sensibilidad.....	70
2.4.2.4	Envase	70
2.5	Preparación del Antígeno para la Prueba del Rivanol.....	71
2.5.1	Dilución de la suspensión madre y tinción.....	71
2.5.2	Normalización del antígeno.....	72
2.5.3	Prueba de sensibilidad.....	72
2.5.4	Prueba de pureza.....	73
2.5.5	Prueba de esterilidad.....	73
2.5.6	Solución de rivanol.....	73
2.6	Producción del Antígeno para la Prueba del Anillo en Leche.....	73

2.6.1	Reactivos.....	73
2.6.2	Normalización del antígeno.....	75
2.6.2.1	<i>pH del antígeno</i>	76
2.6.2.2	<i>Volumen celular</i>	76
2.6.2.3	<i>Sensibilidad</i>	76
2.6.2.4	<i>Envase</i>	76
2.7	Antígeno para la Prueba de Difusión en Gel de Agar.....	77
2.7.1	Materiales, reactivos y medios.....	77
2.7.2	Procedimiento de elaboración	77
2.7.3	Titulación.....	80
3.	CONTROL DE CALIDAD DE VACUNA	80
3.1	Vacuna <i>Brucella abortus</i> Cepa 19.....	80
3.1.1	Requerimientos mínimos.....	80
3.1.2	Técnica para el recuento viable de la vacuna <i>Brucella abortus</i> cepa 19	81
3.1.3	Pruebas de control.....	83
3.2	Vacuna <i>Brucella abortus</i> Cepa RB 51	84
4.	LITERATURA CONSULTADA.....	85

III. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

1.	INTRODUCCION.....	87
2.	DIAGNOSTICO.....	87
2.1	Muestras.....	87
2.2	Tratamiento de las muestras.....	88
2.3	Medio con antibióticos.....	88
2.4	Aislamiento del virus en huevos embrionados SPF.....	88
2.5	Diagnóstico diferencial.....	89
2.5.1	Diferenciación preliminar.....	89
2.5.2	Confirmación.....	89
2.6	Detección de anticuerpos en aves no vacunadas. Serología.....	90
2.7	Prueba de la Hemoaglutinación (HA)	90
2.7.1	Reactivos.....	90
2.7.2	Procedimiento.....	90
2.8	Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI)	91
2.8.1	Reactivos.....	91
2.8.2	Procedimiento	91
2.9	Índice de Patogenicidad Intracerebral (ICPI).....	92
3.	CONTROL DE VACUNAS.....	93

3.1	Retiro de Muestras.....	93
3.2	Control de Calidad.....	93
3.2.1	Prueba de Esterilidad.....	93
3.2.1.1	<i>Etapas de la Prueba.....</i>	94
3.2.2	Test de Salmonella.....	96
3.2.3	Test de micoplasmosis.....	96
3.3	Control de Título de las Vacunas.....	97
3.3.1	Consideraciones Generales.....	98
4.	LITERATURA CONSULTADA.....	102

IV. FIEBRE AFTOSA

1.	CONSIDERACIONES GENERALES.....	103
2.	DIAGNOSTICO.....	105
2.1	Antígeno Asociado a Infección Viral (VIA)	106
2.1.1	Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)	106
2.1.1.1	<i>Materiales y reactivos.....</i>	106
2.1.1.2	<i>Procedimiento.....</i>	109
2.1.1.2.1	<i>Determinación de anticuerpos anti-VIA en sueros... de animales</i>	109
2.1.1.2.2	<i>Cuantificación de anticuerpos VIA por titulación... en IDGA</i>	109
2.1.1.3	<i>Lectura e interpretación de resultados.....</i>	109
2.1.2	Prueba de Fijación de Complemento.....	112
2.1.2.1	<i>Sistema hemolítico.....</i>	112
2.1.2.1.1	<i>Preparación de reactivos.....</i>	112
2.1.2.1.2	<i>Preparación de los glóbulos rojos.....</i>	113
2.1.2.1.3	<i>Titulación de hemolisina.....</i>	115
2.1.2.1.4	<i>Preparación del sistema hemolítico.....</i>	117
2.1.2.2	<i>Complemento.....</i>	118
2.1.2.3	<i>Preparación de antígenos.....</i>	128
2.1.3	ELISA (Ensayo Inmunoenzimático) para el diagnóstico..... de la Fiebre Aftosa - ELISA 3 ABC	131
2.1.3.1	<i>Materiales y reactivos.....</i>	131
2.1.3.2	<i>Procedimiento.....</i>	134
2.1.3.3	<i>Lectura e interpretación.....</i>	136
2.1.4	Prueba de ELISA Sandwich Indirecta.....	136
2.1.4.1	<i>Materiales y reactivos.....</i>	136
2.1.4.2	<i>Procedimiento.....</i>	137

2.1.4.3	<i>Interpretación de la lectura de tipificación de virus de Fiebre Aftosa</i>	140
2.1.5	Identificación y Titulación de anticuerpos de la Fiebre Aftosa..	140
2.1.5.1	<i>Fase sólida (FS)</i>	140
2.1.5.2	<i>Identificación de anticuerpos de la Fiebre Aftosa (Prueba de “screening”)</i>	142
2.1.5.3	<i>Titulación de anticuerpos de la fiebre aftosa (Fase líquida y contacto con la fase sólida)</i>	144
2.1.6	Ensayo Inmunoenzimático de Electrotransferencia (EITB).....	148
2.1.6.1	<i>Materiales y reactivos</i>	148
2.1.6.2	<i>Procedimiento</i>	149
2.1.7	Investigación de Portadores Sanos Aislamiento de Virus Aftoso de Líquido Esofago-Faríngeo – OP.....	150
2.1.7.1	<i>Instrucciones para la toma de liquido Esófago-Faríngeo (LEF) y procedimiento</i>	150
2.1.7.2	<i>Instrucciones para el procesamiento de muestras de líquido Esófago – Faríngeo (LEF)</i>	152
2.1.7.3	<i>Inoculación en cultivos celulares</i>	152
3.	CONTROL DE VACUNAS	154
3.1	Desarrollo de un ELISA para identificar y cuantificar anticuerpos de Fiebre Aftosa.....	154
3.2	Materiales y reactivos.....	155
3.3	Fase sólida.....	157
3.4	Fase líquida y contacto con la fase sólida.....	157
4.	LITERATURA CONSULTADA	161

V. PESTE PORCINA CLÁSICA

1.	INTRODUCCION	162
2.	DIAGNOSTICO.....	162
2.1	Método de ELISA (Inmunoensayo Ligado a Enzimas)	162
2.1.1	Materiales y reactivos.....	162
2.1.1.1	<i>Antígeno</i>	162
2.1.1.2	<i>Conjugado</i>	163
2.1.1.3	<i>Lavado</i>	163
2.1.1.4	<i>Almacenamiento de los reactivos. Condiciones</i>	163
2.1.2	Procedimiento.....	164
2.1.2.1	<i>Incubación de suero, antígeno y conjugado</i>	164
2.1.2.2	<i>Incubación con solución sustrato – cromógeno</i>	164

2.1.3	Lectura e interpretación de los resultados.....	164
2.2	Identificación del Agente.....	165
2.2.1	Método de inmunofluorescencia.....	165
2.2.1.1	<i>Materiales y reactivos</i>	165
2.2.1.2	<i>Procedimiento</i>	166
2.2.1.3	<i>Lectura e interpretación de los resultados</i>	166
2.	LITERATURA CONSULTADA.....	167

VI. RABIA BOVINA

1.	CONSIDERACIONES GENERALES.....	168
1.1	Muestras, envío, empaquetado.....	168
1.2	Medidas de seguridad para extracción de muestras.....	168
1.3	Desinfectantes que inactivan el virus en un minuto.....	168
2.	PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS PARA 169	
	CONTROL DE CALIDAD DE VACUNAS ANTIRRÁBICAS, DIAGNÓSTICO Y DOSAJE DE ANTICUERPOS ANTIRRÁBICOS	
2.1	Producción de virus rábico semilla en ratones.....	169
2.1.1	Técnica.....	169
2.1.2	Controles.....	169
2.1.2.1	<i>Esterilidad</i>	169
2.1.2.2	<i>Identidad</i>	170
2.1.2.3	<i>Virulencia</i>	170
2.2	Producción de virus trabajo.....	170
2.3	Producción de reactivos.....	170
2.3.1	Solución de antibióticos.....	170
2.3.2	Diluyentes suero equino al 2%.....	170
2.3.3	Solución Salina Tamponada con Fosfatos 0.01 M (S.S.T.).....	171
2.3.4	Glicerina tamponada.....	171
2.3.5	Suspensión de Cerebro de Ratón Normal (C.R.N)	171
2.3.6	Diluyente agua – sacarosa – gelatina.....	171
2.4	Preparación de láminas testigos positivas.....	172
2.5	Láminas testigos negativas	172
3.	DIAGNOSTICO.....	172
3.1	Prueba de Inmunofluorescencia Directa.....	172
3.1.1	Procedimiento.....	172
3.1.2	Lectura e interpretación	173
3.1.3	Titulación de conjugado antirrábico.....	174

3.1.3.1	Procedimiento.....	174
3.2	Prueba Biológica.....	175
3.2.1	Procedimiento.....	175
4.	CONTROL DE CALIDAD DE VACUNA	175
4.1	Control de potencia.....	175
4.1.1	Materiales	175
4.1.2	Procedimiento.....	176
4.1.3	Interpretación de la prueba.....	176
4.2	Control de Esterilidad.....	176
4.2.1	Procedimiento.....	176
4.2.2	Interpretación	177
4.3	Control de Inocuidad.....	177
4.3.1	Procedimiento.....	177
4.3.2	Interpretación de la prueba.....	177
4.4	Otras pruebas de control.....	177
4.5	Retiro de muestras para el control.....	177
4.6	Registro de la vacuna antirrábica.....	178
4.7	Control del producto.....	178
4.8	Informes y comunicación	179
5.	PRUEBA DE NEUTRALIZACION PARA DETERMINACIÓN.....	179
	DE ANTICUERPOS CONTRA LA RABIA EN ORGANISMOS	
	VACUNADOS	
5.1	Dilución del Suero Problema frente a Virus Constante.....	179
	(Óptimo 32 DL50)	
5.1.1	Procedimiento.....	179
6.	LITERATURA CONSULTADA.....	181

VII. TUBERCULOSIS BOVINA

1.	DIAGNOSTICO.....	182
1.1	Muestras.....	182
1.2	Examen microscópico.....	183
1.3	Aislamiento.....	186
1.3.1	Tratamiento de la muestra previo al cultivo.....	186
1.3.2	Cultivo.....	188
1.3.2.1	<i>Medios de cultivo</i>	188
1.3.3	Determinación de la sensibilidad de <i>M. tuberculosis</i> y de.....	192
	otras micobacterias a los quimioterápicos y antibióticos	
1.3.4	Método de las proporciones. Principio.....	193

1.3.5	Determinación de la sensibilidad del <i>M. bovis</i> a los quimioterápicos y antibióticos.....	196
1.4	Identificación y clasificación de las micobacterias.....	196
1.5	Tipificación de las micobacterias. Métodos.....	199
1.5.1	Aspecto microscópico.....	199
1.5.2	Determinación de las características del cultivo.....	199
1.5.3	Prueba de fotocromogenicidad.....	204
1.5.4	Prueba de niacina.....	204
1.5.5	Prueba de nitrato reducción.....	205
1.5.6	Prueba de catalasa semicuantitativa.....	207
1.5.7	Prueba de catalasa a temperatura ambiente y a 68° C..... (prueba cualitativa)	207
1.5.8	Prueba de hidrólisis de Tween.....	208
1.5.9	Prueba de toma de hierro.....	209
1.5.10	Prueba de tolerancia al cloruro de sodio.....	210
1.5.11	Prueba de arilsulfatasa.....	210
1.5.12	Prueba de reducción del telurito.....	211
1.5.13	Prueba de ureasa.....	212
1.5.14	Prueba de β - galactosidasa.....	213
1.5.15	Prueba de β -glucosidasa.....	214
2.	PREPARACION Y ESTANDARIZACION DE.....	214
	TUBERCULINA PPD	
2.1	Introducción.....	214
2.2	Procedimiento de preparación de la tuberculina PPD	216
2.2.1	Cepas.....	216
2.2.2	Métodos de conservación de las cepas.....	216
2.2.3	Cultivos semilla.....	217
2.2.4	Cultivo de producción.....	217
2.2.5	Muerte bacilar	217
2.2.6	Separación de la masa bacilar: filtración de los cultivos.....	218
2.2.7	Precipitación de las proteínas.....	218
2.2.8	Controles químicos del “concentrado”	220
	2.2.8.1 <i>Contenido proteínico</i>	220
	2.2.8.2 <i>Determinación de proteínas en el PPD según la</i> <i>prueba del Biuret modificada</i>	221
	2.2.8.3 <i>Determinación de Fenol en Tuberculinas</i>	222
2.2.9	Dilución del “concentrado” y filtración esterilizante.....	224
2.2.10	Control de calidad de la solución filtrada.....	224
	2.2.10.1 <i>Control de esterilidad</i>	224
2.2.11	Estandarización de tuberculina PPD (derivado proteínico.....	225

138	138
139	139
140	140
141	141
142	142
143	143
144	144
145	145
146	146
147	147
148	148
149	149
150	150
151	151
152	152
153	153
154	154
155	155
156	156
157	157
158	158
159	159
160	160
161	161
162	162
163	163
164	164
165	165
166	166
167	167
168	168
169	169
170	170
171	171
172	172
173	173
174	174
175	175
176	176
177	177
178	178
179	179
180	180
181	181
182	182
183	183
184	184
185	185
186	186
187	187
188	188
189	189
190	190
191	191
192	192
193	193
194	194
195	195
196	196
197	197
198	198
199	199
200	200

purificado)	
2.2.11.1 <i>Patrones internacionales para tuberculinas y especificación de la actividad biológica</i>	225
2.2.12 Dilución de la solución filtrada.....	233
2.2.13 Agregado de colorantes.....	234
2.2.14 Control final de la potencia biológica.....	234
2.2.15 Envasado.....	235
2.2.16 Control del producto final envasado.....	235
2.2.17 Etiquetado.....	235
2.2.18 Conservación.....	235
2.2.19 Tuberculina PPD de <i>M. Tuberculosis</i> para pruebas.....	235
tuberculínicas en seres humanos	
2.2.20 Control del producto final diluido y envasado.....	236
3. LITERATURA CONSULTADA	237

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Anemia Infecciosa Equina.....	238
Anexo 2. Brucelosis.....	239
Anexo 3. Fiebre Aftosa.....	250
Anexo 4. Tuberculosis Bovina.....	256

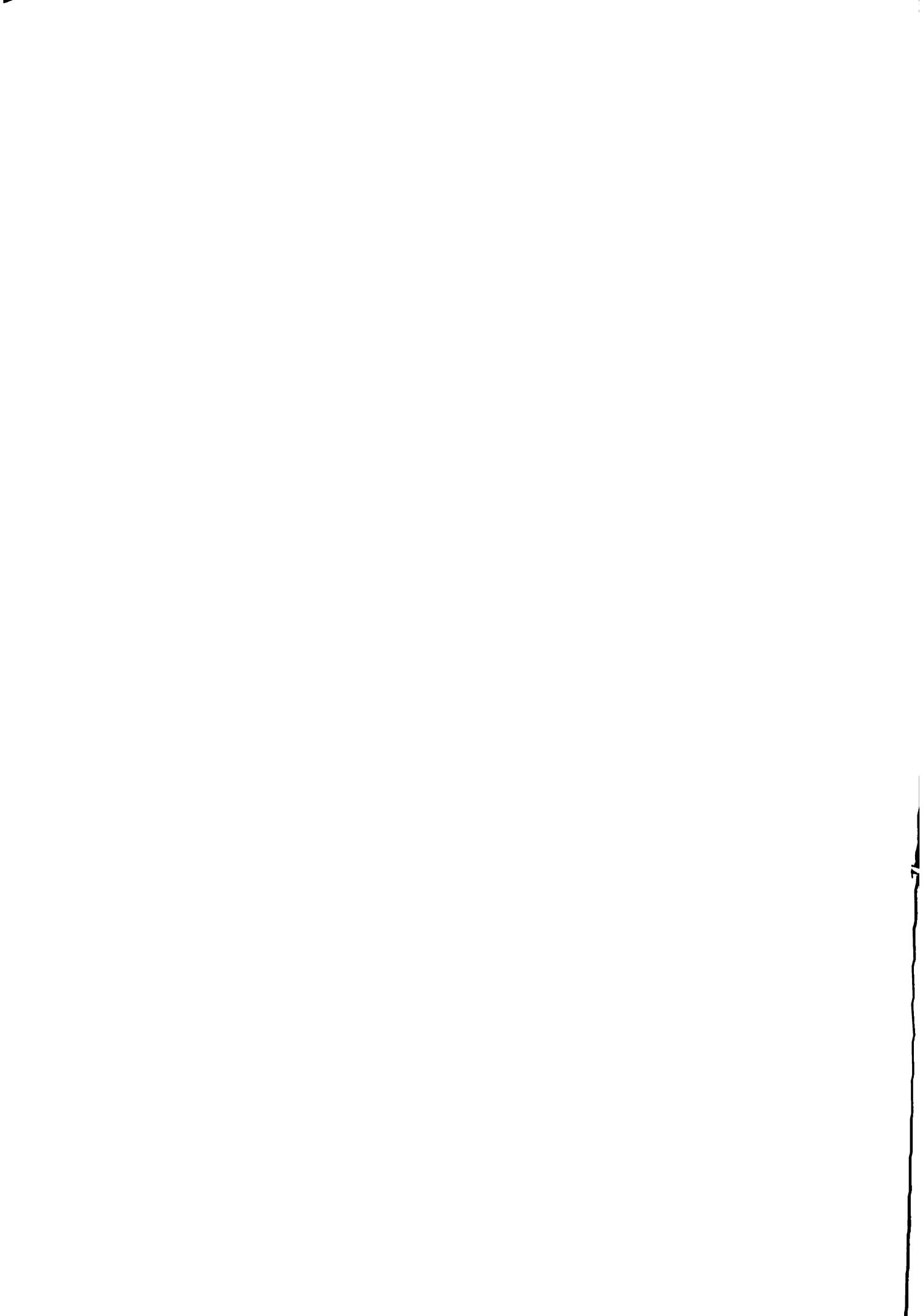
ABREVIACIONES

Ac	=	Anticuerpo
Ag	=	Antígeno
AGID	=	Inmunodifusión en gel de agar
ARN	=	Acido ribonucleico
BCIP	=	5-Bromo, 4-chloro, 3-indolyl phosphatase
BEI	=	Etilenimina binaria
BHK	=	Baby hamster kidney
CT	=	Card test
CVS	=	Virus estándar de confrontación
DLM	=	Dosis letal mínima
DO	=	Densidad óptica
ECP	=	Efecto citopatogénico
EITB	=	Electro inmuno transfer blot
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assay
EPP	=	Espectativa porcentual de protección
FC	=	Fijación de complemento
HA	=	Hemoaglutinación
HI	=	Inhibición de la hemoaglutinación
IDGA	=	Inmunodifusión en gel de agar
LEF	=	Líquido esófago faríngeo
LIC	=	Límite inferior de confianza
MRT	=	Milk ring test
NBT	=	Nitro blue tetrazolium
OPD	=	Ortophenil diamine
PBS	=	Phosphate buffer soluion
SAT	=	Serum agglutination test
SP	=	Suero problema
SPF	=	Specific pathogen free
SVB	=	Solución salina tope con veronal sódico
TMM	=	Tiempo medio de muerte
TTE	=	tricloro-trifluorenato
VA	=	Valor antigénico
VFA	=	Virus fiebre aftosa
VIA	=	Antígeno asociado a la infección viral



IV. FIEBRE AFTOSA

**MANUAL DE TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO
EN SALUD ANIMAL**



IV. FIEBRE AFTOSA

Dra. Mirta Orué

1. CONSIDERACIONES GENERALES

El virus de la Fiebre Aftosa, Estomatitis Vesicular y otras enfermedades vesiculares

La Fiebre Aftosa es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta los animales de pezuña hendida, domésticos y silvestres, causando graves pérdidas económicas por reducción de la producción de carne y leche, muerte de animales y restricciones de comercio en otros países.

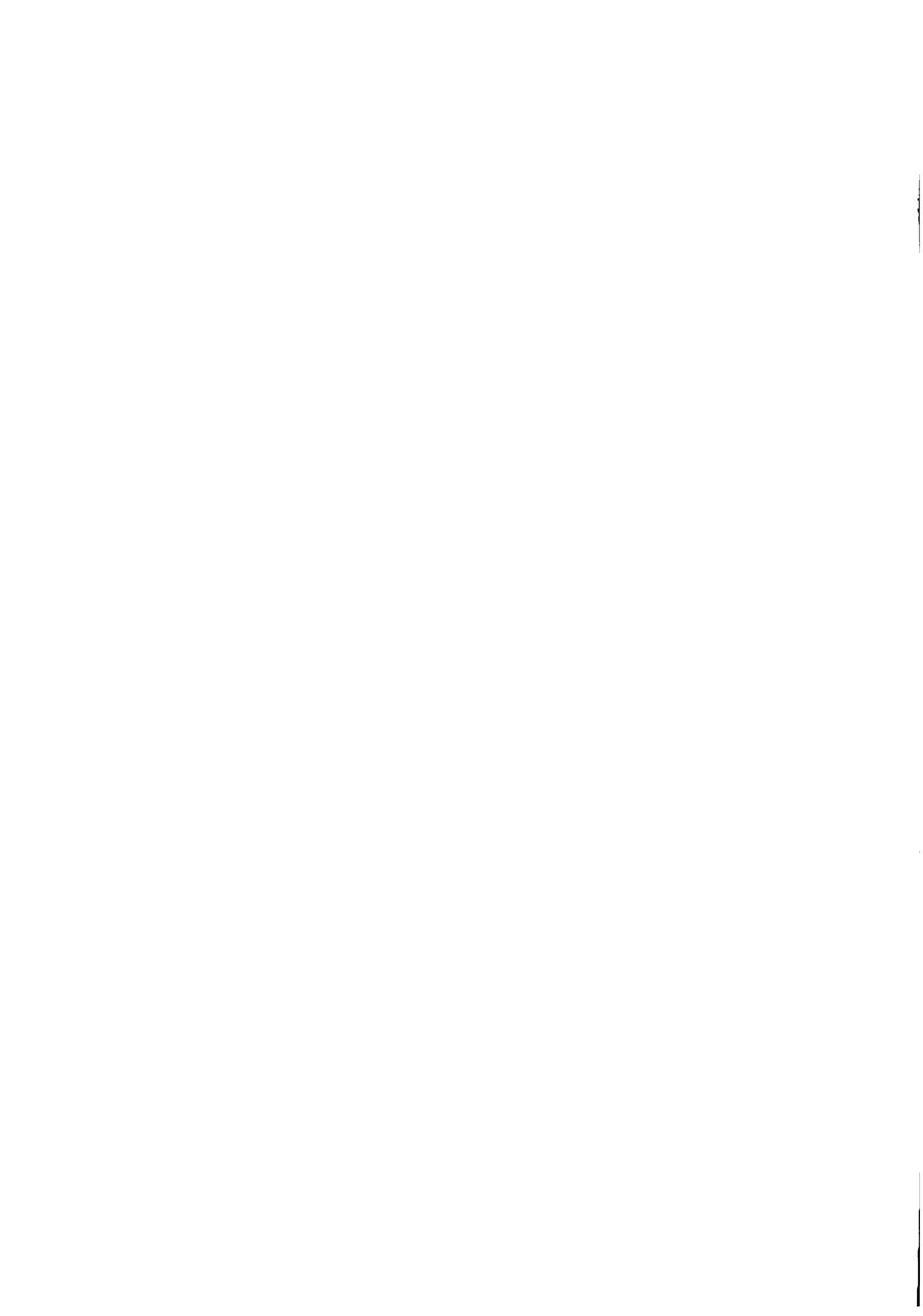
El virus causante pertenece al género rinovirus de la familia picornaviridas. Existen siete tipos serológicos y 64 subtipos distribuidos así:

Tipo	Subtipo
A	32
O	11
C9	5
SAT 1	7
SAT 2	3
SAT 3	4
ASIA 1	2

Esta complejidad inmunológica se debe a la capacidad del virus para mutar, lo cual constituye uno de los problemas más difíciles para el control de la enfermedad y determina la necesidad de contar con laboratorios especializados para realizar los estudios de diagnóstico, identificación rápida y caracterización de las cepas actuantes en el campo.

La vía común de transmisión son los animales enfermos. Además el virus es estable en sangre desecada, leche, carne y cadáveres en general, lo cual facilita su diseminación.

El virus es sensible a pH ácido por disociación de la ribonucleoproteína; es sensible a la temperatura pero resiste en presencia de sustancias protéicas como la leche; también se pueden presentar mutantes resistentes a la temperatura.



Enfermedades vesiculares

Síntomas clínicos

Los bovinos enfermos de Fiebre Aftosa y Estomatitis Vesicular generalmente presentan fiebre, salivación abundante, chasquidos, inapetencia, dificultad para caminar, disminuye su producción de leche, bajan de peso y en general se debilitan. Las vacas preñadas abortan en ocasiones.

Los animales afectados presentan aftas o vesicular en la boca (lengua y encías), en el espacio interdental y en la ubre. Las vesículas al romperse dejan al descubierto la superficie de tejidos conectivos las cuales son muy dolorosas e impiden que el animal coma o camine.

Es frecuente encontrar animales jóvenes muertos, los cuales presentan lesiones histopatológicas típicas especialmente en el tejido del corazón. En lechones la única observación puede ser la mortalidad elevada. En las ovejas las lesiones pueden pasar desapercibidas ya que la Fiebre Aftosa y la Estomatitis Vesicular tienen un curso más benigno.

Aunque los animales presenten los síntomas descritos, el diagnóstico clínico de la Fiebre Aftosa es muy difícil porque se puede confundir con otras enfermedades como la Estomatitis Vesicular y otras. La única forma de obtener un diagnóstico preciso, es mediante el examen de laboratorio.

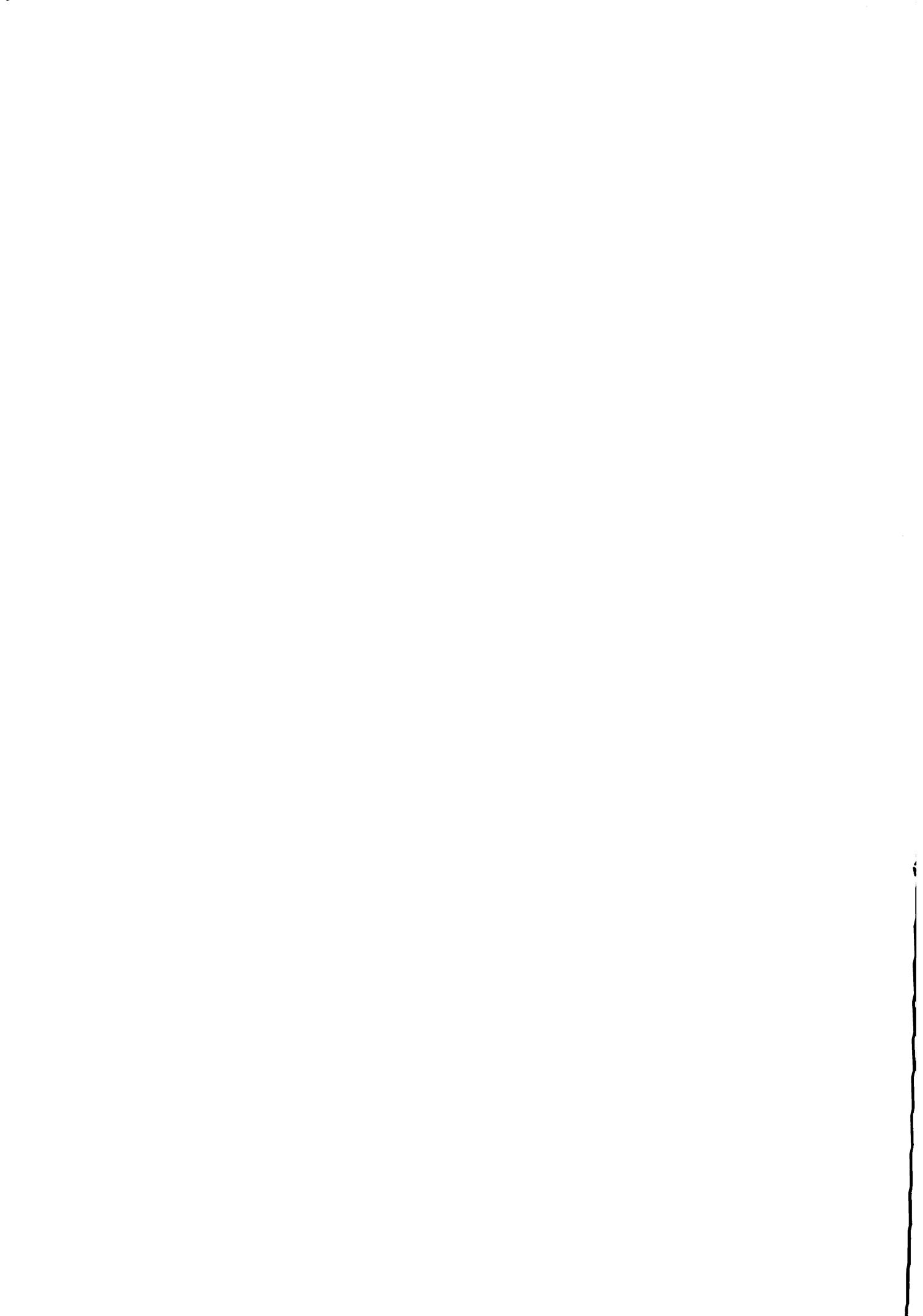
Toma de muestras para el laboratorio

Es aconsejable que sea el médico veterinario quien tome las muestras para el diagnóstico de enfermedades vesiculares en el laboratorio.

Para obtener un diagnóstico rápido las muestras deben ser de buena calidad, tales como epitelios linguales frescos que se hayan sacado de vesículas de reciente aparición. Son muestras de mala calidad los epitelios gingivales, los de las pezuñas y los de la ubre; también es una mala muestra el epitelio lingual, cuando proviene de lesiones en estado de cicatrización.

Para la toma de muestras se deben tener en cuenta los siguientes pasos:

- Alistar los materiales necesarios debidamente esterilizados: tijeras rectas de punta roma, pinzas, guantes de caucho, frascos estériles con glicerina bufferada al 50%, trapos, gasas.
- Sujetar debidamente al animal, inmovilizándolo para manipular la cabeza.

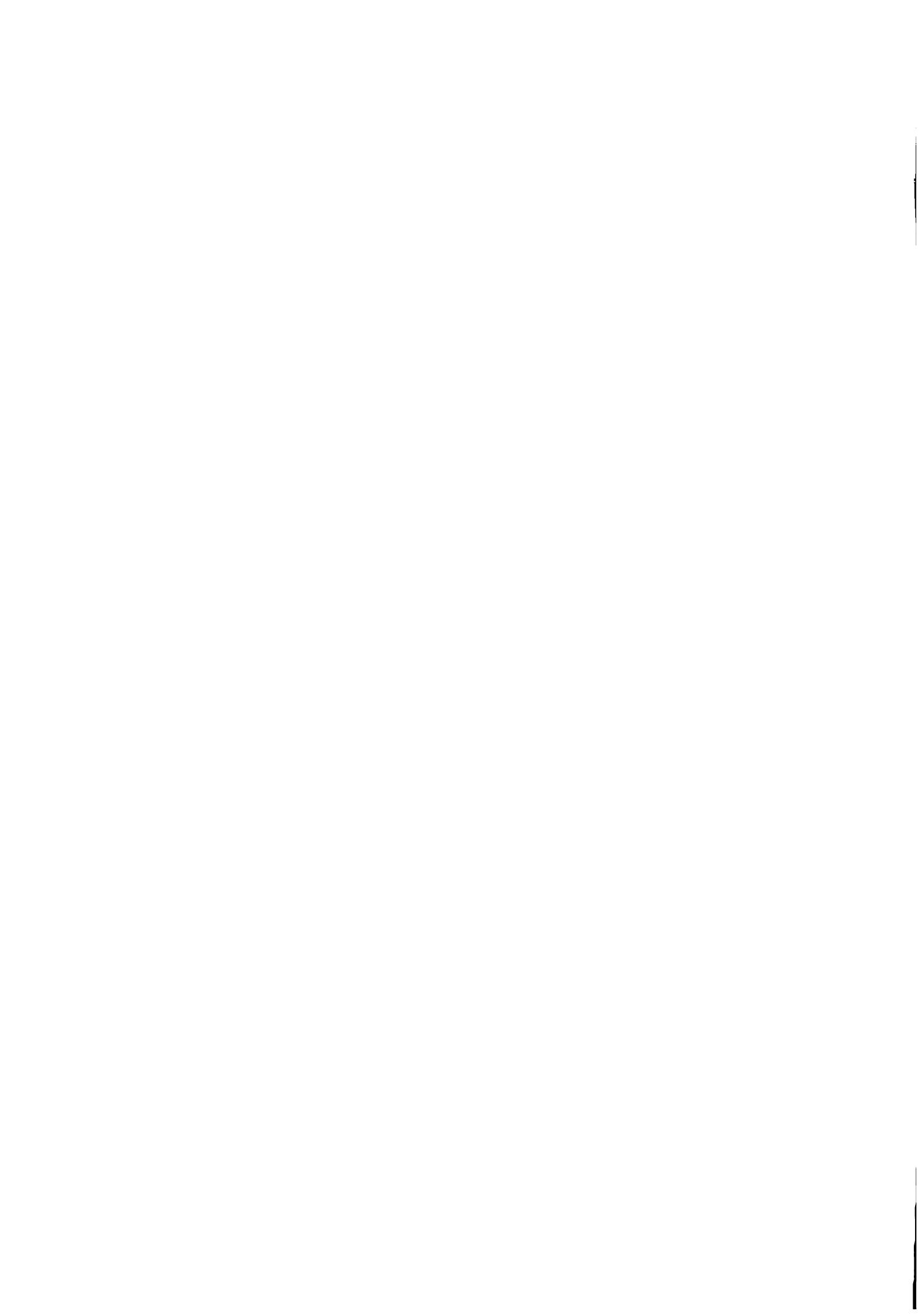


- Examinar la boca y la lengua, agarrando ésta con un trapo o gasa estéril.
- Elegir la vesícula de mayor tamaño, perforarla con tijeras, levantar luego los bordes de las heridas con la ayuda de las pinzas, extraer la muestra del epitelio en cantidad superior a 2 gr. y depositarla dentro del frasco estéril con glicerina bufferada. Tapar el frasco, sellarlo con esparadrapo y marcarlo con el nombre o número del animal y fecha de toma de la muestra.
- Utilizar un frasco distinto para cada animal afectado.
- Proteger el frasco de la muestra con algodón o cualquier otro material para evitar que se rompa durante el transporte y empacarlo en una caja de cartón fuerte.
- Si es posible enviar la muestra conservada en hielo.
- Llenar detallada y correctamente el formulario de información del brote, introducirlo en la caja de la muestra y enviarlo rápidamente al laboratorio del SENACSA.
- Avisar por teléfono o telegráficamente al laboratorio el envío de las muestras, para que sean reclamadas oportunamente.
- Al terminar el trabajo de la toma de muestras hacer que el personal que participó en él, se lave cuidadosamente las manos con abundante agua y jabón detergente, o solución de carbonato de sodio al 5%; antes de salir del potrero infectado se deben desinfectar también los zapatos y el equipo utilizado (nariguera, lazos, pinzas, guantes y otros) con carbonato de sodio al 5%.
- Antes de salir de la finca de donde se presentó el brote hacer desinfectar las llantas y parte baja del vehículo con carbonato de sodio al 5%.
- Cuando no sea posible el envío del epitelio, se debe recurrir a la toma de muestra del líquido esofago-faríngeo, para lo cual se utilizan extractores especiales. En este caso el líquido y el raspado que se obtienen se congelan utilizando alcohol y hielo seco y se envía bajo congelación en un termo de nitrógeno líquido o con hielo seco.

Tanto los formularios para la información de brotes como los frascos estériles con glicerina bufferada, se pueden solicitar en el SENACSA.

2. DIAGNOSTICO

El diagnóstico de laboratorio es indispensable para diferenciar la Fiebre Aftosa de la Estomatitis Vesicular y para determinar el tipo o subtipo del virus actuante con el fin de correlacionarlo con la cepa vacunal. Estos resultados permiten tomar las medidas de control correspondientes. En ciertas ocasiones cuando aparece un nuevo tipo o subtipo de virus de Fiebre Aftosa.



2.1 ANTIGENO ASOCIADO A INFECCION VIRAL (VIA)

2.1.1 INMUNODIFUSION EN GEL DE AGAR (IDGA)

Un antígeno asociado a la infección viral (VIA) fue identificado en suspensiones de virus de fiebre aftosa. Dicho antígeno parecería ser una forma inactiva de la polimerasa del ácido (ARN) viral. Anticuerpos para el antígeno VIA fueron detectados por inmunodifusión en gel de agar (IDGA) en sueros de bovinos que habían enfermado de fiebre aftosa o habían sido inoculados con virus vivo atenuado o con vacunas inactivadas con formol. Sin embargo, sueros de animales primovacunados con vacunas inactivadas con un inactivante de primer orden no tenían anticuerpos anti-VIA detectables por IDGA. No obstante, cuando estos animales fueron inoculados con virus de fiebre aftosa, muchos de ellos desarrollaron anticuerpos VIA sin presentar signos de enfermedad. Trabajos recientes han demostrado que la aplicación repetida de vacunas inactivadas induce en bovinos la aparición de anticuerpos anti-VIA, si bien son de baja intensidad y corta duración.

Los anticuerpos VIA se caracterizan por ser específicos de fiebre aftosa, pero no de tipo de virus, por los que la identificación de estos anticuerpos sirve para detectar infecciones, pero no el tipo de virus actuante.

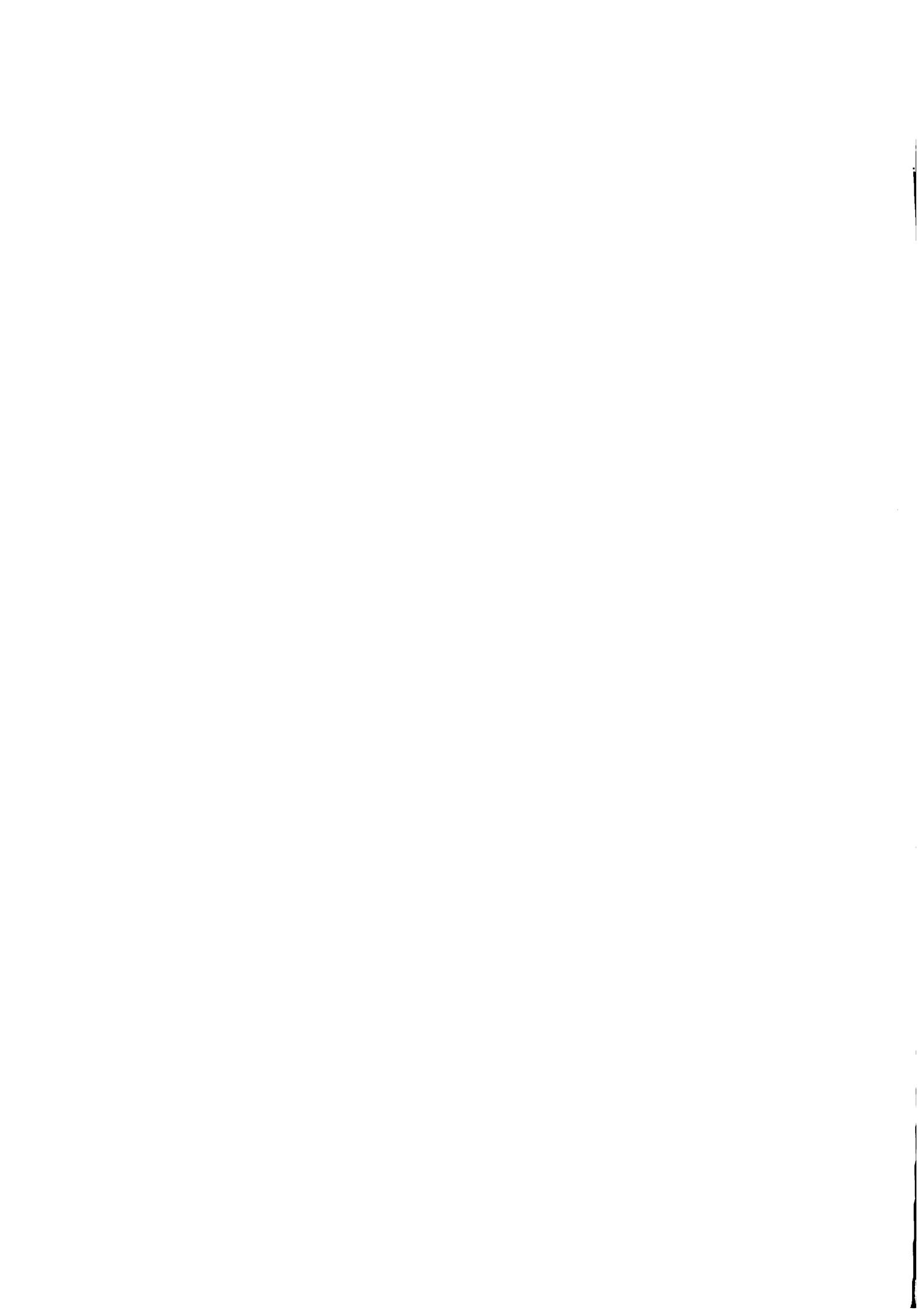
De lo expuesto anteriormente se deduce que la identificación de anticuerpos anti-VIA por pruebas de IDGA proporciona una valiosa ayuda en el estudio de la prevalencia del virus de la fiebre aftosa en las poblaciones animales susceptibles a la enfermedad y en la selección de rebaños libres de fiebre aftosa en áreas endémicas, los cuales podrían proporcionar animales para ser usados en pruebas inmunológicas o para la exportación. Una correcta interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas de IDGA, unido a un adecuado muestreo de la población a ser examinada, permite conocer si un rebaño estuvo o no en contacto con el virus de fiebre aftosa en fecha reciente. En caso de duda pueden hacerse pruebas para aislar virus del líquido esofágico faríngeo (LEF).

En este manual técnico se describe la metodología utilizada por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) para la producción de antígeno VIA, y la cuantificación de los reactivos VIA. Además, se explica el procedimiento seguido para analizar sueros por IDGA y la interpretación de los resultados.

2.1.1.1 Materiales y reactivos

Preparación del antígeno VIA

Células BHK₂₁, Clon 13, de suspensión, cultivadas en frascos rodantes durante 48-72 horas con 100 ml de Eagle modificado sin suero, son inoculadas con 10⁵ dosis



infectante 50% (DI_{50}) de virus, y a seguir son colocadas en estufa a 37°C. Cuando la monocamada presenta marcado efecto citopático y comienza a desprenderse, lo que ocurre aproximadamente a las 18 horas después de la inoculación, a cada frasco se añaden 5 ml de cloroformo, se agitan nuevamente, se congelan a -20°C, se descongelan y se clarifica por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos.

A la suspensión virulenta clarificada se le agrega 0.05% (p/v) de DEAE-Sephadex A₅₀ (0.5 g por litro de suspensión) y se mantiene en agitación suave a 4° C durante 48 horas. Después de este tiempo es recogido el Sephadex, pasando la mezcla por una jeringa de 50 ml, en la que en el fondo fue colocada una capa de lana de vidrio y encima una tela metálica tupida.

Una vez preparada la columna de Sephadex, se lava con tampón A (0.15M ClNa y 0.02M tris, con pH 7.6) hasta que sea eluido el rojo fenol del Sephadex. A continuación, se hace pasar muy lentamente tampón B (1M ClNa y 0.02M Tris, con pH 7.6) en una proporción aproximada de 150 ml por gramo de Sephadex. Este tampón que eluye el VIA es recogido en fracciones de 30 a 50 ml, a las que se añade una solución saturada de $SO_4(NH_4)_2$ hasta que aparezca turbidez debida a la precipitación de las proteínas.

El precipitado es recogido por centrifugación a 8000 g durante 20 minutos a 4°C y resuspendido en tampón A en la proporción de 5 ml por 1000 ml de suspensión virulenta. Posteriormente es clarificado por centrifugación a 3000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante contiene al antígeno VIA.

Inactivación de la suspensión que contiene el antígeno VIA

El antígeno VIA así obtenido puede contener virus activo. Para tomarlo inocuo es inactivado con 0.05M de etilenimina binaria (BEI) a 30°C durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se realiza la prueba de inocuidad, inoculando un frasco relante con células BHK₂₁, Clon 13, con 1 ml de antígeno VIA y realizando dos pasajes consecutivos a las 48 horas de haber realizado la inoculación. El antígeno VIA es considerado libre de virus activo cuando en ningún pasaje la monocamada de células presenta efecto citopático, ni es detectado virus por fijación del complemento. A la suspensión de antígeno VIA inactivada se le añade 0.02% de ázida sódica y se conserva a 4°C.

Suero control

El suero control es una mezcla de sueros hiperinmunes O, A y C obtenidos en cobayos infectados e hiperinmunizados a las 6 semanas de la infección, dos veces con 0.2 ml de virus vivo, a intervalo de una semana. Una semana después de la última hiperinmunización los animales son sangrados y el suero es inactivado a 65°C



durante 30 minutos. La prueba de inocuidad del suero control es realizada igual a como se ha indicado para el antígeno VIA.

Preparación del agar al 2%

Se disuelven 20 gramos de agar noble con 1.100 ml de agua desmineralizada y esterilizada a 15 libras de presión durante 10 minutos. Luego se vierte en una bandeja, se deja solidificar y se corta en cubos de aproximadamente 2 cm de lado, los cuales se colocan en agua corriente durante 24 horas. Posteriormente, se lavan tres veces más con agua desmineralizada y se mantienen a 4°C hasta su uso.

Tampón glicina

Se compone de 1M de glicina, 0.057M de dietilbarbiturato de sodio y 1% de ázida sodica a un pH de 7.8 ajustado con una solución 1N de HCl.

Preparación de placas

El agar al 2%, después de fundido por ebullición, es mezclado en partes iguales con el tampón glicina. A continuación, 16 ml de la mezcla de agar al 1% son vertidos en placas de Petri de plástico de 90 mm de diámetro, las cuales se colocan en una superficie nivelada y se mantienen a temperatura entre 20 y 30°C. una vez gelificado, el agar es perforado con un molde de siete perforaciones, dispuestos: uno en el centro y siete en la periferia, de 4 mm de diámetro externo cada uno, guardando simetría y mediando 2 mm entre ellos y el perforador central. El agar de las cavidades es extraído por succión leve. En cada placa se hacen cuatro moldes.

Titulación de los reactivos

Antes de ser usado, cada lote de antígeno VIA o suero control es titulado en IDGA (Figura 1). Para tal fin, el antígeno es diluido 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 en tampón glicina y es colocado en las 6 cavidades periféricas de los 4 moldes de una placa de Petri. El suero control es diluido 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 también en tampón glicina y distribuido en las cavidades centrales. Cada una de las cavidades debe llenarse hasta el borde con la dilución correspondiente. Una buena distribución de los reactivos se consigue con pipetas Pasteur y perillas de goma.

Las placas se mantienen en medio ambiente y en superficie nivelada. Cuando el lugar de trabajo es seco, es aconsejable utilizar un ambiente humidificado. La titulación es leída entre 1 y 3 días después de realizada. La dilución óptima de uso de cada reactivo es la última que proporciona una reacción nítida.

2.1.1.2 Procedimiento

2.1.1.2.1 Determinación de anticuerpos anti-VIA en sueros de animales

Se usan placas de Petri preparadas como las empleadas en la titulación de los reactivos. De esa manera, en cada placa se pueden analizar 16 sueros.

El antígeno VIA en la dilución adecuada es colocado en las cavidades centrales. El suero control, también en la dilución preestablecida, es colocado en dos cavidades opuestas en la periferia de cada molde. Los sueros a ser examinados son distribuidos en las cuatro cavidades restantes.

Los demás detalles de la técnica son los mismos indicadores en la titulación de los reactivos.

Las reacciones son observadas entre 1 y 2 días. La prueba sólo será considerada válida cuando los controles proporcionen nítidas bandas de precipitación.

Los sueros analizados en la Figura 2 muestran una reacción que es interpretada según indicado en el Cuadro 1.

2.1.1.2.2 Cuantificación de anticuerpos VIA por titulación en IDGA

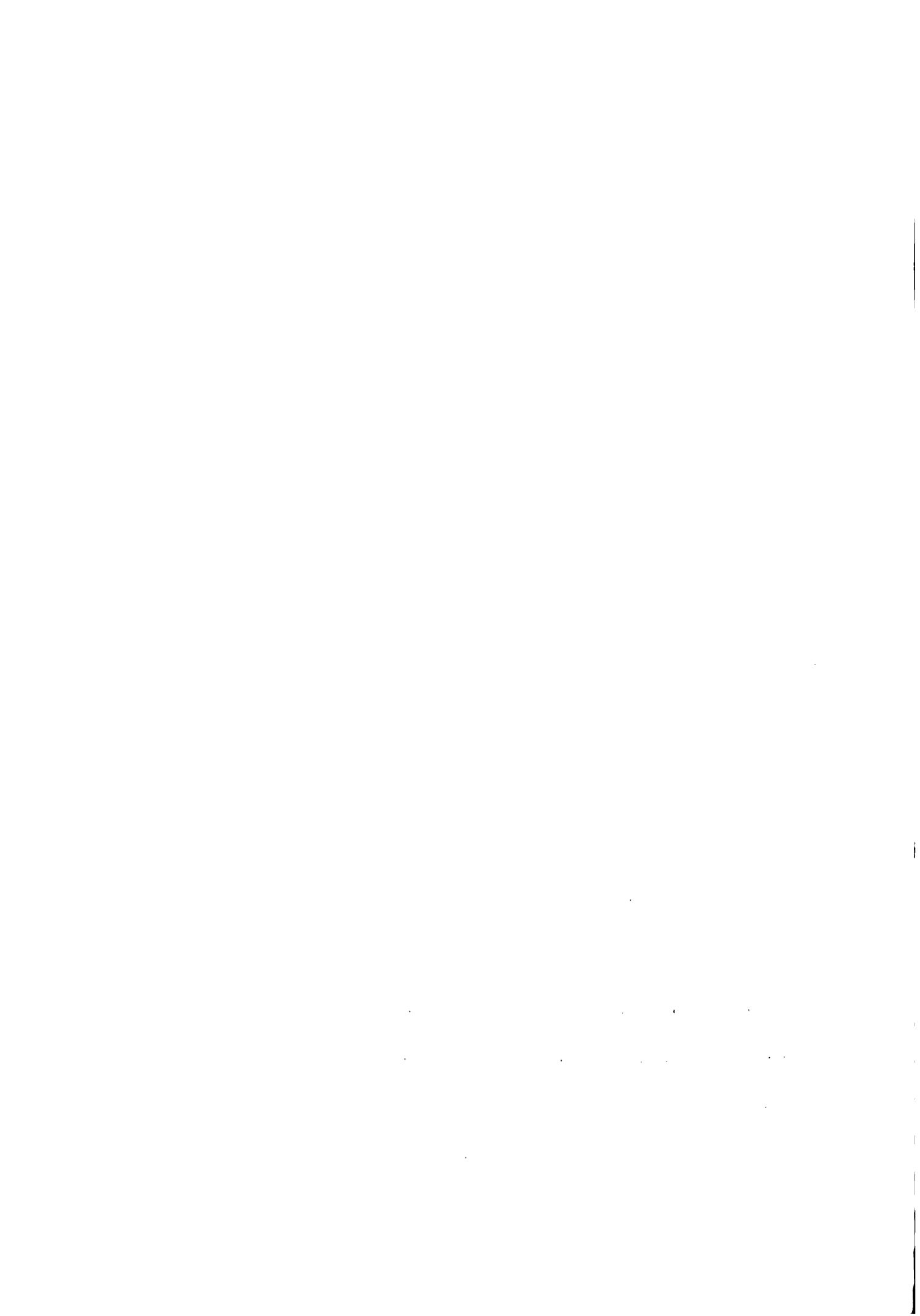
La distribución del antígeno VIA y del suero control y la lectura son iguales a como se ha descrito anteriormente.

Los sueros que en la prueba anterior proporcionaron una reacción intensa (semejante a la del suero control) pueden ser titulados IDGA. Para tal fin, las diluciones 1:2, 1:4, 1:18 y 1:16 son distribuidas en las cuatro cavidades que, en cada molde, corresponden a los sueros desconocidos. Por tanto, en una placa pueden titularse cuatro sueros. El título del suero expresa la última dilución que proporciona una reacción positiva.

2.1.1.3 Lectura e interpretación de resultados

Titulación del antígeno VIA y el suero control

La Figura 1 muestra las reacciones obtenidas al titular un antígeno VIS y un suero control VIA positivo. En esta prueba se comprueba que hay una reacción nítida del antígeno y del suero hasta en las diluciones del 1:16 y 1:4 respectivamente. Sin



embargo, las diluciones de uso son de 1:6 para el antígeno, 1:2 para el suero, las cuales garantizan buenas reacciones.

Análisis de sueros para identificar anticuerpos VIA

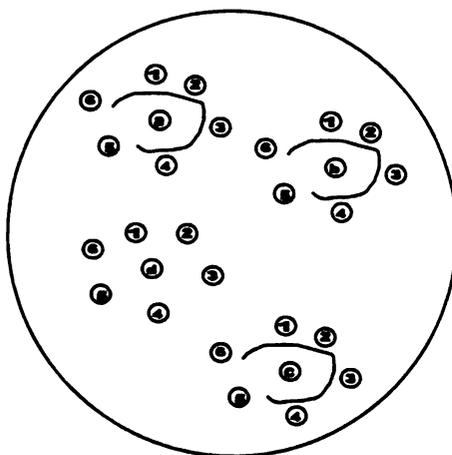
En la Figura 2 se indican los resultados obtenidos al analizar por IDGA 16 sueros bovinos y en el Cuadro 1 se anota la interpretación de las reacciones de los sueros examinados en la Figura 2. En ocasiones, algunos sueros presentan reacciones de no identidad, es decir, líneas de precipitación que cruzan la banda del suero positivo (Figura 2, suero N° 4), lo que indica que dicha reacción no es debida a anticuerpos anti-VIA. Los sueros que no dan reacciones de identidad son considerados negativos. Las reacciones de no identidad han sido observadas en sueros VIA positivos y negativos.

Titulación de sueros

La Figura 3 muestra el esquema para titular algunos sueros que en la Figura 2 (sueros N° 5, 6, 12 y 14) presentaron una intensa reacción positiva. El título de los mismos es 1:4, 1:18, 1:16 y 1:8 respectivamente.

Figura 1.

TITULACIÓN DE ANTÍGENO VIA Y SUERO CONTROL

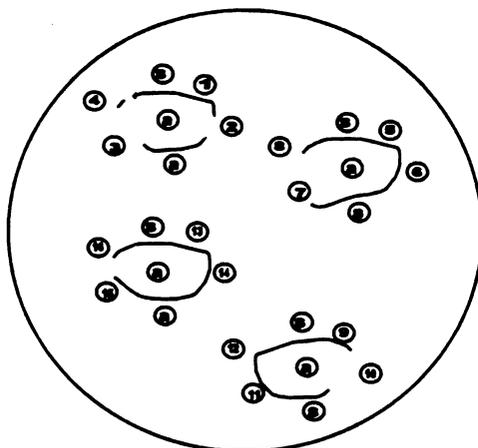


1, 2, 3, 4, 5 y 6 = Dilución de antígeno 1:1, 1:2, 1:4, 1:18, 1:16 y 1:32 respectivamente.

A, b, c, y d = Diluciones de suero 1:1, 1:2, 1:4, y 1:8 respectivamente.

Figura 2.

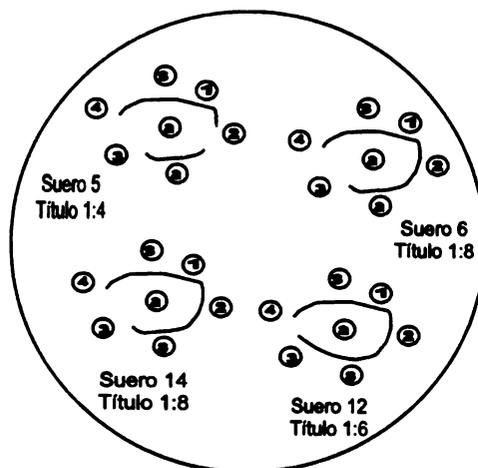
EXAMEN DE SUEROS DE BOVINOS PARA IDENTIFICAR ANTICUERPOS ANTI-VIA POR LA TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR



- a** = Antígeno VIA en al dilución 1:6 titulado en la Figura 1.
- s** = Suero control (VAI positivo) en la dilución 1:4, titulado en la Figura 1.
- 1 a 16** = sueros bovinos en análisis.

Figura 3.

CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VIA POR TITULACIÓN DE SUEROS CON REACCIONES INTENSA



- a** = Antígeno VIA.
- s** = Suero control (VAI positivo).
- 1, 2, 3, y 4** = Diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 de cada suero respectivo



Cuadro 1

INTERPRETACIÓN DE LA REACCIÓN PROPORCIONADA POR LOS SUEROS DE BOVINOS EXAMINADOS EN LA FIGURA 2

Sueros N°	Intensidad Reacción	Sueros N°	Intensidad reacción
1	+	9	-
2	++	10	+
3	-	11	+
4	-	12	++
5	++	13	++
6	++	14	++
7	-	15	++
8	-	16	+

- = Negativo

+ = Positivo ++ = Positivo Intenso.

Nota: En la IDGA, la sensibilidad y reproductibilidad de la prueba depende del uso de los reactivos en diluciones optimas, por lo que su correcta titulación es de suma importancia.

La cuantificación de la intensidad de la reacción de los sueros en la prueba de rutina, junto con un adecuado muestreo de la población a examinar, escalonándola por grupos de edad es de suma utilidad para caracterizar correctamente las diferentes situaciones epidemiológicas específicas debidas a la naturaleza de la experiencia pasada que el animal haya tenido con el virus en las regiones afectadas por fiebre aftosa.

Conviene hacer la sangría de los animales tres o más meses después de la vacunación.

1.1.2 PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

1.1.2.1 Sistema hemolítico

1.1.2.1.1 Preparación de reactivos

Preparación de hemolisina

La hemolisina recibe también el nombre de amboceptor o suero hemolítico y corresponde a los anticuerpos inducidos en animales como respuesta a la inoculación de glóbulos rojos integrales o su estroma. El animal que mejor respuesta produce es el conejo, independientemente del sexo.

En la inmunización para producir hemolisina se forman 2 clases de anticuerpos:

- *Isófilos* del tipo IgG 7S que son específicos de la especie, y
- *Heterófilos* del tipo IgM 19S específicos para el llamado antígeno Forssman, presente en los glóbulos rojos de varios animales. El carnero es un Forssman positivo, mientras que el conejo es negativo.

La hemolisina de buena calidad debe estar formada casi exclusivamente por anticuerpos heterófilos, de manera que su inespecificidad sea muy amplia.

La hemolisina producida con estroma globular es mejor que la producida con glóbulos rojos completos. Los glóbulos rojos los deben suministrar carneros adultos en buen estado de salud, especialmente en lo relacionado con presencia de parásitos internos.

Cuando la fuente de glóbulos rojos sean 2 o más carneros, debe usarse una mezcla de sangre de los carneros utilizados.

1.1.2.1.2 Preparación de los glóbulos rojos

- La sangría debe efectuarse preferencialmente en carneros adultos o hembras que no se encuentran en gestación. No deben utilizarse glóbulos rojos de animales vermifugados con fosforados en un lapso inferior a 60 días, pues éstos se hemolisan fácilmente. Para colectar la sangre se utiliza una solución de Alsever (anticoagulante), en proporción de 100 ml de sangre extraída por 50 ml de solución, o sea, una relación 1/1.5.
- El proceso de preparación de los glóbulos rojos se inicia retirando la solución de Alsever con una pipeta. El sedimento de glóbulos rojos se mezcla con solución fisiológica agitando suavemente el tubo. La suspensión de glóbulos rojos se centrifuga a 3 000 rpm, al término del cual se retira con una pipeta el sobrenadante. Esta operación de lavado de los eritrocitos se realiza 2 veces más, pero reemplazando la salina por el buffer veronal.
- Retirado el sobrenadante, se prepara una solución de glóbulos rojos al 2% en buffer veronal. Por ejemplo, para 50 ml de buffer se colocan 3 ml de eritrocitos y se homogeniza.
- La suspensión que se prepara debe tener una densidad óptica (DO) de 0.66 en el espectrofotómetro Coleman Junior.
- Para medir la DO de la suspensión en un tubo de serología se coloca 1.6 ml de agua destilada más 0.5 ml de la suspensión de glóbulos rojos. Se agita hasta producir lisis y se lee la DO en el espectrofotómetro, ajustando previamente la absorbancia a 0 con un tubo que contiene 2 ml de agua destilada y usando un filtro de 545 mμ. Si la mezcla posee una DO superior a 0.66, debe agregarse



buffer veronal y en el caso contrario deberá adicionarse glóbulos rojos ya lavados.

La fórmula que se aplica para conocer el volumen final de buffer cuando se conoce la DO inicial de una suspensión que se está preparando, es la siguiente:

$$\text{Volumen final} = \frac{\text{densidad conocida} \times \text{volumen conocido}}{\text{densidad deseada}}$$

El estroma se puede producir de varias maneras:

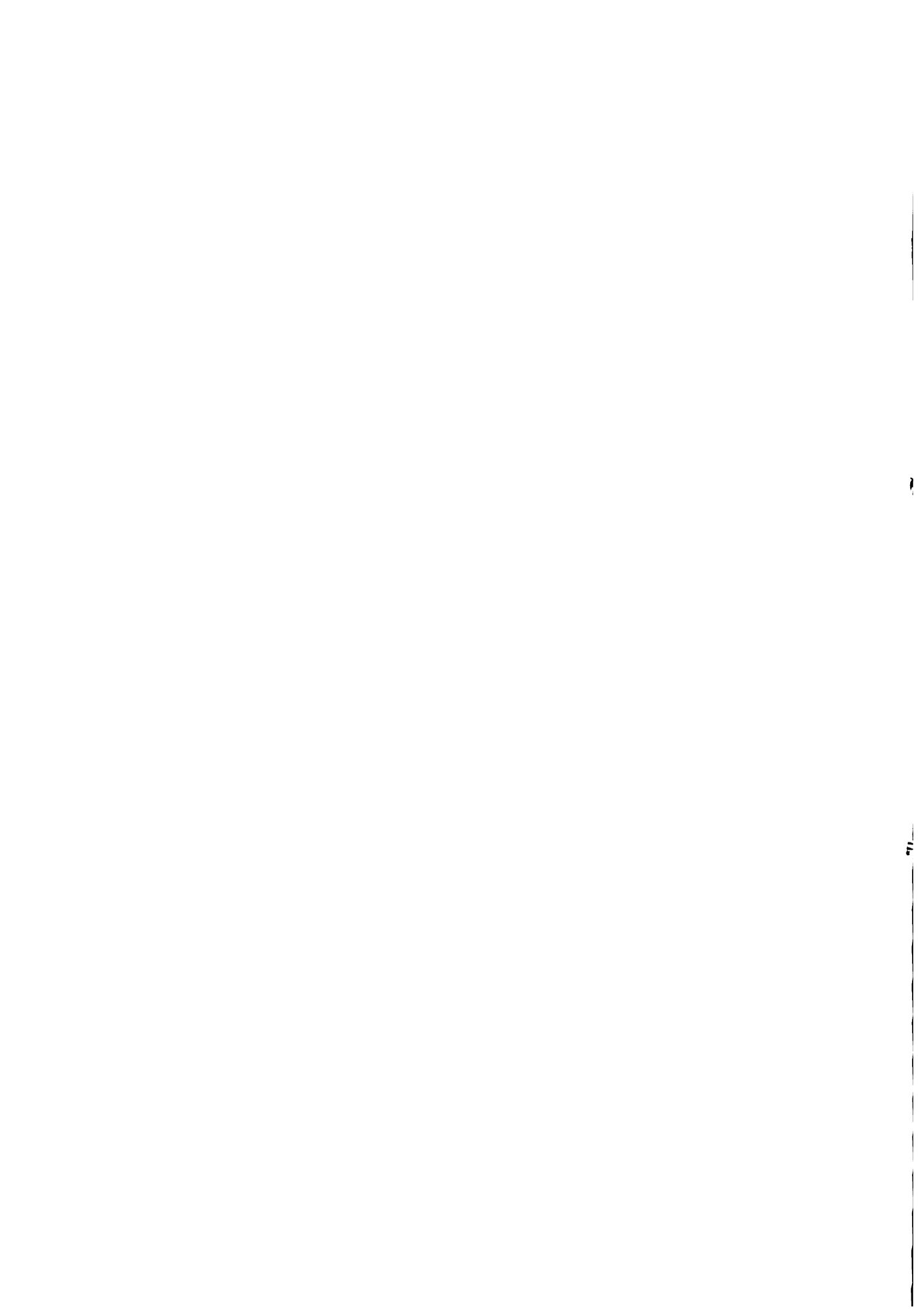
- **Calentando los eritrocitos** a una temperatura alta en agua caliente (80-90°C) hasta que éstos se desintegran. Este método tiene la gran desventaja de provocar la desnaturalización de las proteínas.
- **Lisis por hipotonicidad.** La adición de agua destilada a una suspensión de glóbulos rojos produce la lisis de los mismos con la desnaturalización de las proteínas por el fenómeno de hidrólisis.
- **Inmuno hemólisis.** Este sistema es el más recomendable, pues permite la obtención de un estroma de buena calidad con un alto grado de rendimiento de los glóbulos rojos que los suministran.

La lisis de los hematíes ocurre por un proceso de fijación de complemento, en el que primero la hemolisina se une a los eritrocitos, sensibilizándolos, para permitir luego la acción citolítica del complemento.

Para calcular el volumen de sangre de carnero que se utilizará, se estima que el estroma suficiente para inmunizar un conejo está contenido en 40 ml de sangre. La hemolisina y el complemento en la reacción de inmuno hemólisis van en una proporción del 40% y 60% del volumen de glóbulos rojos; como se necesitarían volúmenes demasiado grandes de hemolisina y complemento para reaccionar con los glóbulos rojos, se pueden diluir ambos elementos en solución salina o buffer veronal en una proporción 7 u 8 veces mayor.

- **Sensibilización.** A los glóbulos rojos ya lavados se les agrega la hemolisina lentamente y se lleva a incubación a 37°C por 30 minutos, agitando constantemente.
- **Hemólisis.** Se adiciona el complemento y nuevamente se lleva la suspensión a 37°C durante 30 minutos. El punto óptimo de hemólisis corresponde al momento en que la suspensión de glóbulos rojos toma un color vino tinto.

Para retirar la hemolisina liberada de los eritrocitos lisados se centrifuga la suspensión a 8 000 rpm durante 10 minutos, retirando el sobrenadante y lavando el estroma celular con solución salina. Este proceso de lavado del estroma se realiza repetidas veces hasta que resulte un sobrenadante incoloro.



El estroma finalmente obtenido se reconstituye en solución salina en una proporción del 10% de su volumen, adicionando antibióticos y congelando a -20°C .

Plan de inmunización

Los conejos se inoculan por vía intravenosa utilizando previamente la vena marginal de la oreja. En su defecto se usa la vena tarsina, situada en la cara externa de la pierna, tercio inferior; se usa para inocular una aguja calibre 22.

El esquema de inoculación del estroma es el siguiente:

Día 0	2.5 ml
Día 3	3.0 ml
Día 6	3.5 ml
Día 9	4.0 ml
Día 12	4.5 ml
Día 15	Sangría total

- La hemolisina debe colectarse cumplidos los 15 días a partir de la primera inoculación a fin de evitar la presencia de anticuerpos isófilos del tipo IgG en cantidades tales que alteren las reacciones del suero.
- La sangría total del conejo puede realizarse por punción cardíaca o por degüello. Con cualquiera de estas técnicas debe procederse con mucho cuidado, pues en el conejo se presenta fácilmente la vasoconstricción, lo que imposibilita la colecta de sangre.
- La sangre ya recogida se somete a temperatura de refrigeración hasta conseguir la formación y retracción de los coágulos. Con una pipeta se retira el suero y se centrifuga luego para precipitar los restos celulares. El suero se inactiva a 50°C durante 30 minutos y después de ampolletarlo se congela a -20°C . Antes de titular se deja estabilizar durante 3 días.

1.1.2.1.3 Titulación de hemolisina

La hemolisina se puede guardar diluida en solución salina pero no en buffer veronal, pues éste la deteriora.

Materiales

- Hemolisina
- Glóbulos rojos al 2% en buffer veronal

- Complemento
- Buffer veronal

Método

- Se usa la técnica de fijación de complemento con grado de hemólisis 50%. Los glóbulos rojos utilizados no deben tener menos de 4 días colectados ni más de 15. Se prepara una suspensión al 2% ajustando a una DO de 0.66, que se establece lisando 0.4 ml de la suspensión con 1.6 ml de agua destilada y leyendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm.
- Seguidamente se preparan diluciones de la hemolisina 1/100 y 1/1 000, en solución buffer veronal teniendo en cuenta los siguientes volúmenes:
 - Para la dilución 1/100 se toman 0.2 ml de hemolisina y 19.8 ml de diluyente buffer.
 - Para la dilución 1/1 000 se toman 4 ml 1/100 ml de diluyente.

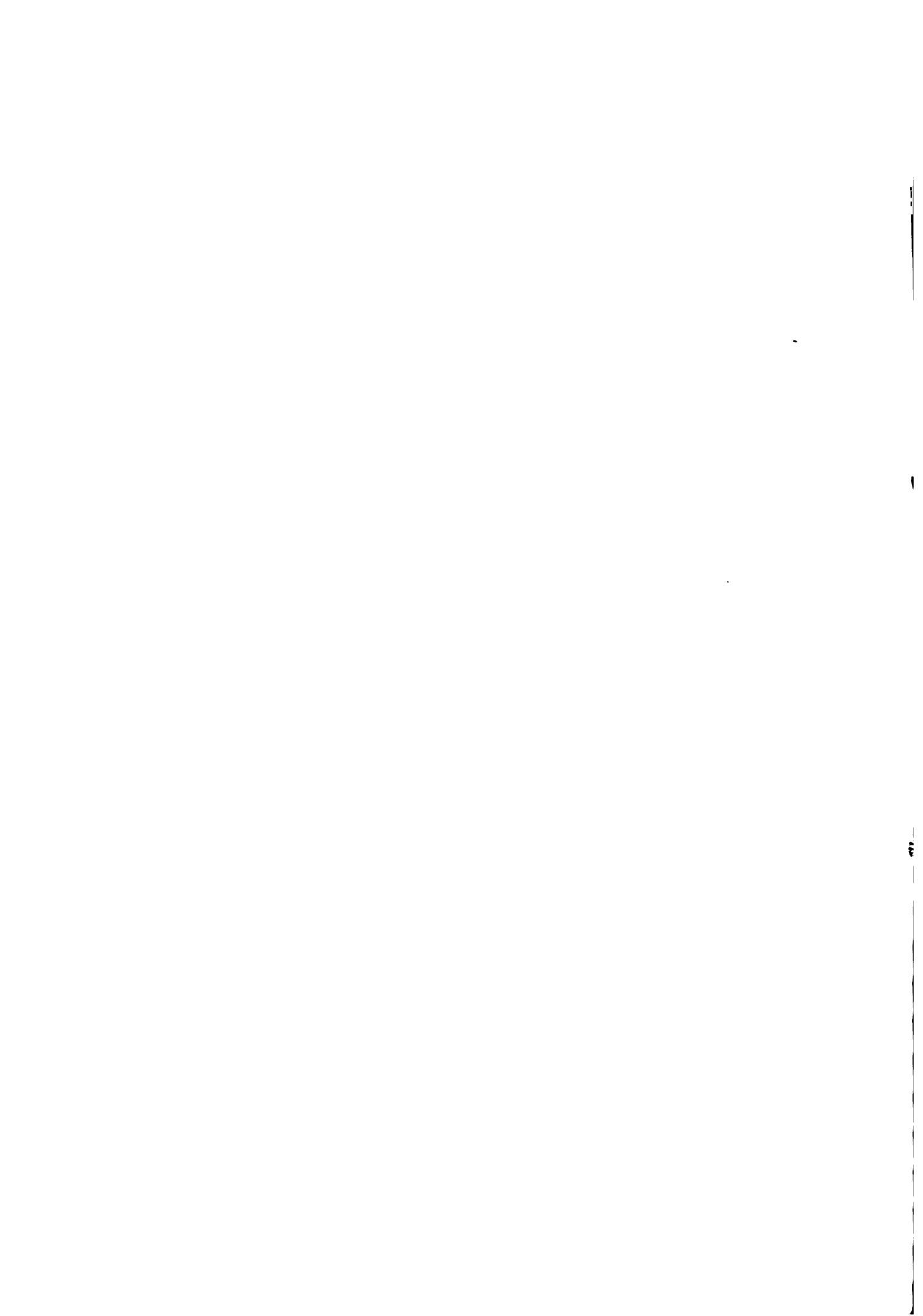
A continuación se sigue el siguiente esquema:

DILUCIONES	HEMOLISINA		HEMOLISINA				
	1/100		1/1 000				
	1/250	1/500	1/1 000	1/2 000	1/4 000	1/8 000	1/12 000
TUBO N°	1	2	3	4	5	6	7
HEMOLISINA (ml)	2	1	5	2.6	1.26	0.63	0.42
BUFFER (ml)	3	4	.	2.6	3.76	4.37	4.58
GLOBULOS ROJOS al 2% (ml)	5	5	5	5	5	5	5
VOLUMEN FINAL (ml)	10	10	10	10	10	10	10

Los tubos con los sistemas hemolíticos se incuban a 37°C durante 30 minutos para sensibilizar los hematíes, después de lo cual se procede a realizar una titulación de complemento con cada uno de los sistemas.

Conocido el título del complemento para cada sistema se elabora un gráfico en el que la ordenada corresponde a los títulos ($UHC_{50\%}$) y la abscisa corresponde a las diluciones de hemolisina.

El título de uso de la hemolisina corresponde en la curva a la dilución anterior en que ésta empieza su ascenso.



TITULACION DE COMPLEMENTO CON LOS SISTEMAS HEMOLITICOS

COMPLEMENTO (ml)	1/100						1/10			CONTROL SH	TITULO
	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.30	0.30	0.30		
UNIDADES HEMOLITICAS											
DILUCIONES HEMOLISINA	D E N S I D A D O P T I C A										
1/250	07	31	43	59	62	62	66	66	66	00	0.21
1/500	09	30	52	60	60	63	66	66	66	0	0.21
1/1 000	09	32	53	60	63	64	66	66	66	0	0.20
1/2 000	06	31	55	60	62	63	66	66	66	0	0.21
1/4 000	07	33	53	60	63	63	66	66	66	0	0.20
1/8 000	04	17	39	48	53	57	63	62	62	0	0.23
1/12 000	04	12	27	40	50	54	60	60	61	0	0.27

En este ejemplo, la hemolisina tiene un título de 1/4 000. Como se ha visto anteriormente, la obtención del título de la hemolisina es independiente del complemento. Sin embargo, en la titulación de hemolisina el complemento se utiliza a un título estándar, de 0.20 ml para una unidad hemolítica (UHC_{50%}).

2.1.2.1.4 Preparación del sistema hemolítico

El sistema hemolítico debe prepararse con glóbulos rojos que tengan un mínimo de 4 y un máximo de 15 días de haber sido obtenidos para mantener la estabilidad en el título del complemento.

Se prepara una suspensión de glóbulos rojos al 2% con ajuste de DO a 0.66 y de este volumen en otro recipiente se prepara uno igual de buffer veronal, al que se añade hemolisina en tal proporción que cuando se mezcla con la suspensión del glóbulo rojo, diluya a su título de uso. La suspensión de glóbulos queda así al 1% y debe poseer una DO de 0.66, la que se verifica agregando a 1.2 ml de agua destilada, 0.8 ml de la suspensión, homogeneizando y leyendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm.

Existe otra forma de preparar el sistema hemolítico; al terminar el lavado de glóbulos rojos se prepara una suspensión al 1% de buffer veronal y se ajusta la DO a 0.66,



mezclando 1.2 ml de agua destilada y 0.8 ml de la suspensión y agregando finalmente la hemolisina para que diluya a su título.

Como paso final se sensibiliza la suspensión, incubando a 37°C durante 30 minutos con agitación constante.

En el ajuste de la DO de las suspensiones se deben medir los volúmenes con la jeringa utilizada de rutina en las pruebas serológicas.

El sistema hemolítico sensibilizado se guarda en refrigeración y se homogeneiza cada vez que se utilice. En trabajos de rutina, puede emplearse una misma suspensión de glóbulos rojos durante 2 días. Para trabajos especiales, es conveniente utilizar un sistema hemolítico fresco.

1.1.2.2 Complemento

Obtención

Para el suministro de complemento se debe utilizar cobayos adultos y sanos, sin importar el sexo pero evitando la utilización de hembras preñadas.

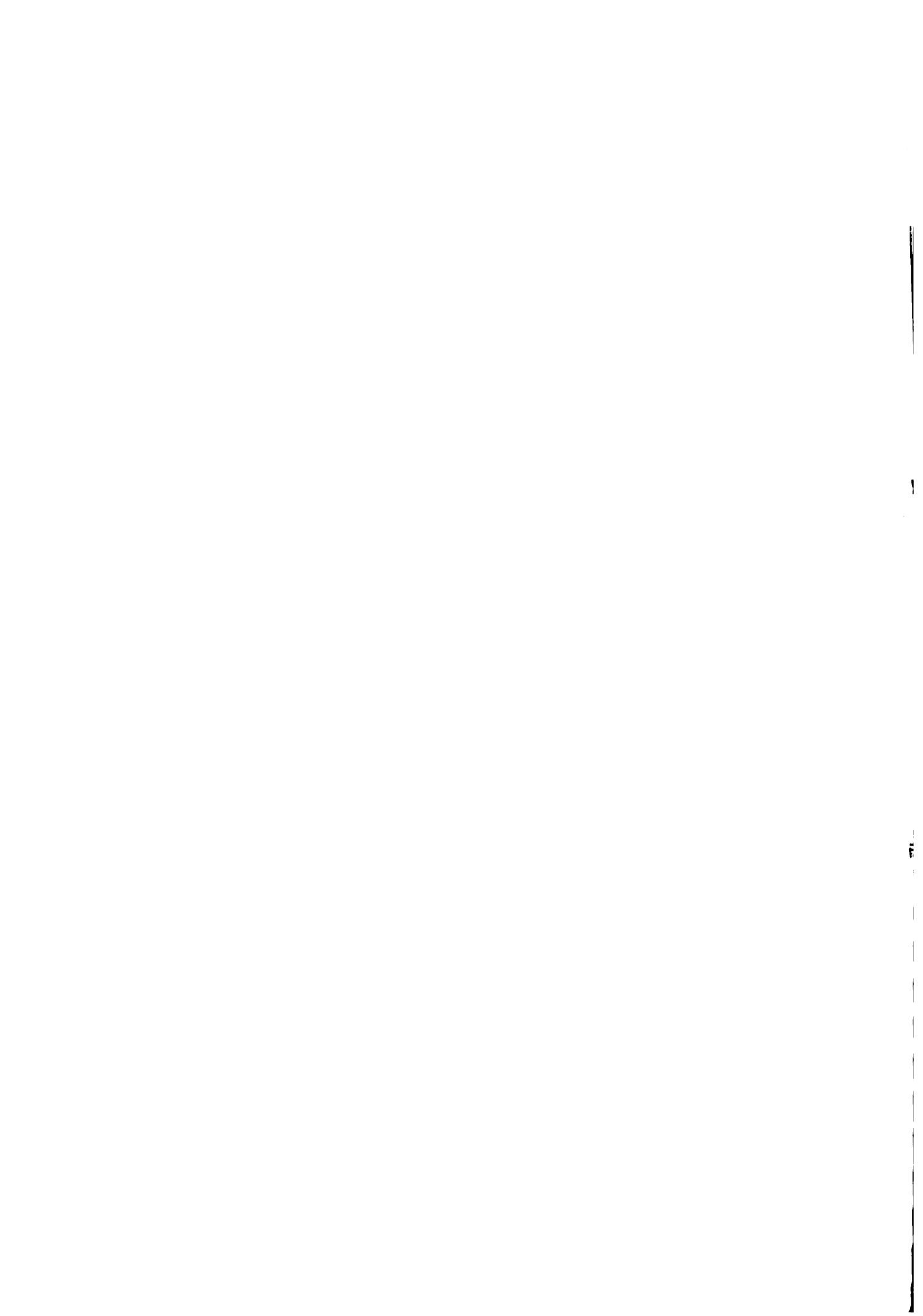
Los cobayos deben mantenerse en un piso seco, con buena ventilación y suministro permanente de comida de buena calidad y agua a voluntad.

Los animales alimentados con forraje verde suministran un complemento de mejor calidad que los que reciben concentrado.

Sangría: Se requiere un ayuno previo de 14-18 hs. para reducir el contenido lipídico de la sangre. Las técnicas de sangría son las siguientes:

- ***Degüello:*** se depila manualmente el cuello del cobayo y luego se conmueve aplicándole un golpe seco en la base del cráneo (nuca). Con un cuchillo se corta en tajos la región yugular, teniendo en alto al animal y se recoge la sangre sobre una caja de petri.
- ***Punción cardíaca:*** se utiliza una gringa de 10 ml y aguja calibre 20. La jeringa debe estar humedecida con solución salina fisiológica. La localización del corazón se consigue mejor palpando el costado izquierdo cerca de la línea esternal.

En ningún caso se debe exceder en más de 3 punciones cardíacas por animal, para evitar el peligro de shock traumático.



El volumen de sangre que normalmente puede extraerse de un cobayo adulto por este método es de 4-6 ml. Si se desea conservar al animal para sangrías periódicas, se lo deja en reposo durante 1 mes antes de la próxima sangría.

Antes de verter la sangre sobre la caja de petri se retira la aguja de la jeringa para evitar hemólisis. Una caja de petri puede contener la sangre de 2 curias.

Extracción del complemento: la sangre se lleva de inmediato a refrigeración por un tiempo aproximado de 10 minutos mientras se forma el coágulo. Con una cuchilla se corta el coágulo, de tal manera que queden áreas de 1cm² aproximadamente y se lleva de nuevo a refrigeración durante 30 minutos para que opere la retracción del coágulo.

Enseguida se coloca todo el contenido de la caja de petri en un embudo provisto de un tapón de gasa humedecido en solución salina. Se deja filtrar el suero y se recoge al cabo de 5 minutos. Cuando se trata de varios animales sangrados se forma un pool, fraccionándolo luego y guardándolo en refrigeración a -20°C.

En otras circunstancias es factible usar complemento de sangre colectada con heparina u oxalatos, pero en este caso ya no se trabajaría con suero sino con plasma.

El complemento se titula después de 3 días de conservarlo a -20°C.

Titulación del complemento

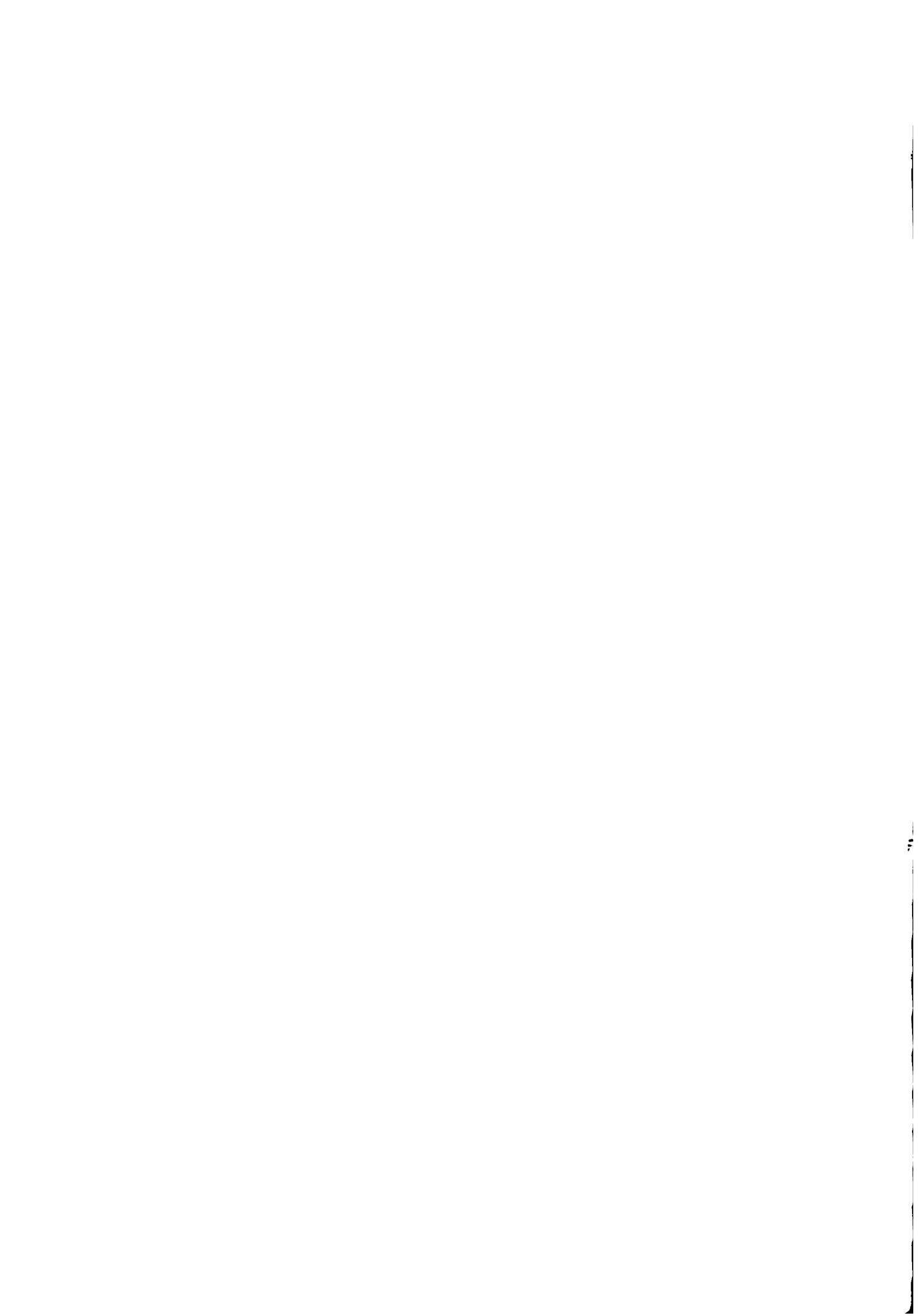
El complemento o alexina © es un conjunto de factores específicos, termolábiles que hacen muy exigentes su manejo.

Materiales

Complemento de cobayo
Solución salina fisiológica
Solución buffer veronal
Sistema hemolítico sensibilizado DO 0.66
Espectrofotómetro
Pipetas, tubos

Método

La técnica de titulación de complemento se basa en el grado de hemólisis 50%, o sea, la determinación del volumen de complemento suficiente para lisar el 50% de un volumen de eritrocitos sensibilizados.



El complemento que permanece a -20°C se retira para descongelarlo lentamente a temperatura ambiente y preservar así sus propiedades citolíticas; luego se diluye originalmente al 10% en salina o buffer veronal y después, partiendo de la dilución anterior se prepara otra al 1% en solución buffer veronal.

En una gradilla se colocan 10 tubos de serología 12 x 75 y se titula de acuerdo al siguiente esquema:

Veronal (ml)	1.05	1.00	0.95	0.90	0.85	0.80	0.90	0.90	0.96
Complemento									
10% (ml)	-	-	-	-	-	-	0.30	0.30	0.30
Complemento									
1% (ml)	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	-	-	-
Sistema Hemolítico									
SH (ml)	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Tubo N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Incubación 37°C Centrifugación 3 000 rpm - 5 minutos Lectura densidad óptica 545 nm									

Con las lecturas de DO se calcula una unidad hemolítica de complemento ($\text{UHC}_{50\%}$).

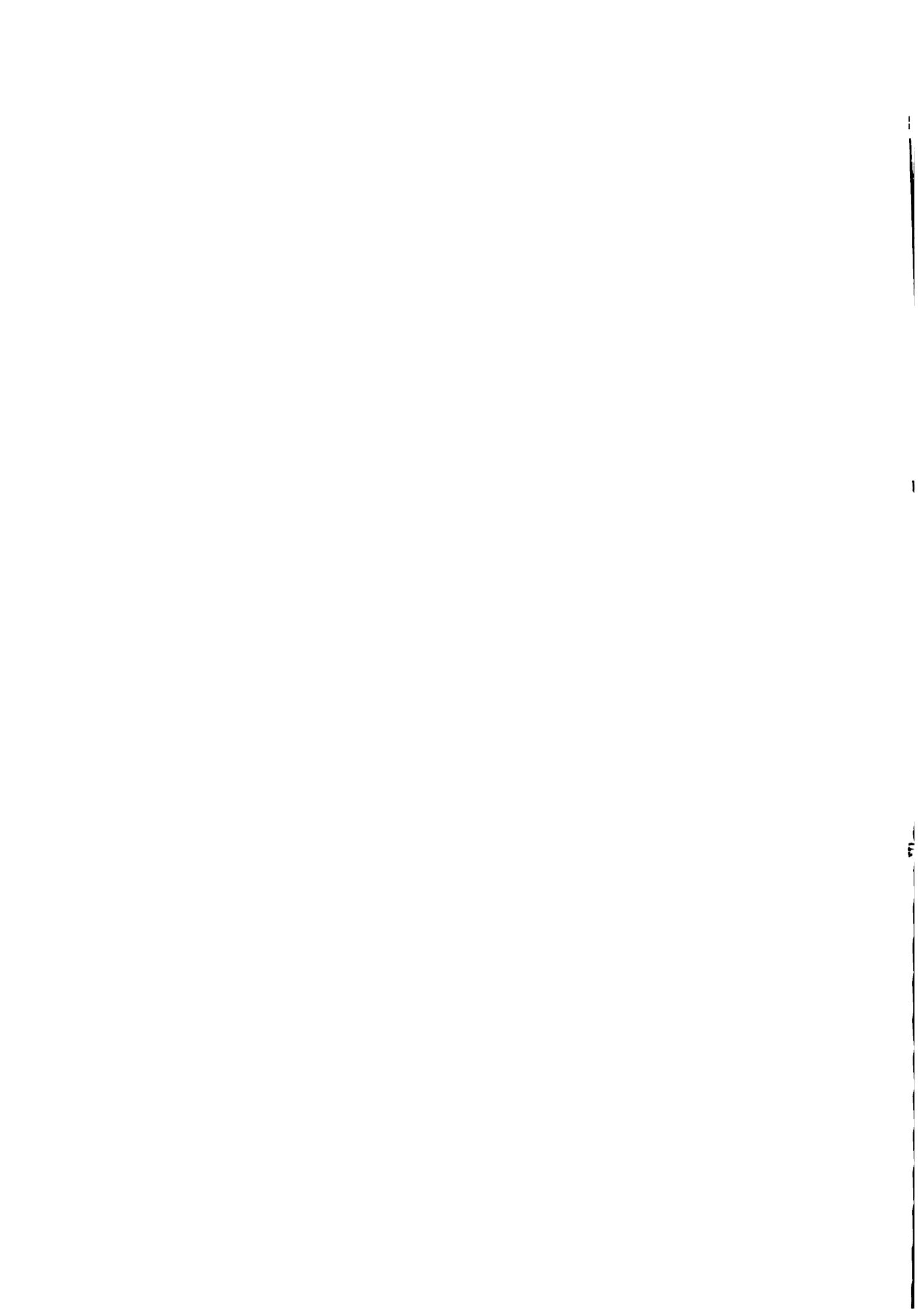
Ejemplo:

	Dilución del complemento									Media	Control SH
	1%			10%							
ml	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.30	0.30	0.30	-	-
DO	0.17	0.24	0.38	0.48	0.55	0.58	0.66	0.65	0.66	0.68	0.0
Tubo N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9		

Para el blanco se usa un tubo con 2 ml de agua destilada.

El valor máximo de hemólisis o hemólisis 100% es el valor promedio de los valores de DO en los 3 tubos con complemento al 10%.

En el presente ejemplo el 100% de hemólisis corresponde a la lectura de DO de 0.66 y el 50% de hemólisis corresponderá a la DO de 0.33. Este valor se encuentra entre



los volúmenes 0.20-0.25 ml de complemento 1% (tubos 2 y 3). Interpolando, se encuentra que a una DO de 0.33 corresponde un volumen de 0.23 ml.

$$0.23 \text{ ml de complemento al } 1\% = 1 \text{ UHC}_{50\%}$$

Cálculo del complemento

De acuerdo a lo anterior, 1 UHC_{50%} se encontrará en 0.23 ml de complemento al 1%. Por lo tanto, atendiendo al hecho de que el complemento se ha diluido al 10%, 1 UHC_{50%} se encontrará en un volumen 10 veces menor, o sea, en 0.023 ml del complemento al 10%.

En la titulación del complemento el volumen total de los elementos que reaccionan es de 2 ml. Sin embargo, en las diferentes pruebas de fijación del complemento, el volumen total de los elementos que entran en la reacción se reduce a 1 ml.

Este 1.0 ml se distribuye así:

<i>Antígeno</i>	<i>0.20 ml</i>
<i>Suero hiperinmune</i>	<i>0.20 ml</i>
<i>Complemento</i>	<i>0.20 ml</i>
<i>Sistema hemolítico</i>	<u><i>0.40 ml</i></u>
<i>Volumen total</i>	<i>1.00 ml</i>

Haciendo la equivalencia para los 2 ml de la titulación de una prueba de fijación de complemento, estará en un volumen de 0.40 ml.

Si el título de complemento al 1% es 0.20 ml (UHC_{50%}) para completar el volumen de 0.40 ml se agrega 0.20 ml de buffer. Para cálculos de complemento diluido al 10%, 1 UHC_{50%} está en 0.02 ml y el volumen a 0.40 ml; se completa con 0.38 ml de buffer.

Pero como las pruebas de serología se montan a un volumen final de 1.0 ml para cada tubo y 0.20 ml corresponden al complemento, la preparación equivalente estará en 0.01 de complemento al 10% más 0.19 ml de buffer.

Ejemplo:

Calcular 4 UHC_{50%} para un complemento al 10% cuyo título 1 UHC_{50%} es 0.20 ml. Preparar cantidad suficiente para 20 tubos.

Complemento al 10% para un tubo:

$$0.020 \text{ ml C al } 10\% \quad x \quad 4 \quad = \quad 0.080 \text{ ml}$$

$$0.320 \text{ ml buffer}$$

Para el volumen de complemento en la prueba que es 0.20 ml, las 4 UHC_{50%} están en:

0.040 ml C al 10%

0.16 ml buffer

Calculamos ahora para 20 tubos:

0.040 ml x 20 = 0.80 ml C

0.160 ml x 20 = 3.20 ml buffer

Preparación de un suero hiperinmune

Un suero hiperinmune es aquel en cuyo contenido es muy rico en inmunoglobulinas específicas (IgG) para un virus dado. El cobayo es el animal de laboratorio que mejores resultados da en la producción de sueros hiperinmunes de Fiebre Aftosa y Estomatitis Vesicular.

Producción

Para producir un suero primero se necesita adaptar el virus al cobayo en un proceso llamado *cobayización*. Un virus está cobayizado cuando se ha adaptado a producir lesiones de generalizaciones, es decir, cuando el virus que se inyecta en la dermis plantar, ingresa al torrente circulatorio e induce la formación de vesículas en todas las extremidades.

Materiales

Jeringas de 1 ml

Agujas romas calibre 24

Virus

Cobayos

Adyuvante (Saponina)

Método

Adaptación: Se escarifica con la aguja roma la dermis plantar de las patas de un cobayo. Después de la escarificación se inyecta para cada pata un volumen de 0.1 ml de antígeno.

A las 18-24 horas. se recoge la linfa acumulada en la dermis escarificada y se retira el epitelio. La linfa se toma con una jeringa en la que se ha colocado 0.2 ml de medio de cultivo (Hanks-Earle-Eagle). El epitelio se retira con la ayuda de pinzas y tijeras curvas.



El extracto de epitelio se congela a -70°C , para que el citoplasma celular, las partículas virales se liberen en el medio de cultivo. Se descongela luego la muestra y se centrifuga a 5 000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante con el virus se recoge en un tubo estéril.

Si el proceso de adaptación se quiere realizar sólo con la linfa, los animales se inoculan tan pronto ésta sea recogida de los cobayos del pasaje anterior.

El proceso de adaptación continúa en igual forma hasta que aparezcan lesiones de generalización en el 100% de los animales inoculados, en un tiempo menor a 120 hs. post-descarga.

A medida que avanza el proceso de adaptación, se incrementa el número de cobayos infectados para contar con un volumen suficiente de antígeno cobayizado en el proceso de inmunización.

Para dar comienzo a la producción del suero hiperinmune con 30 cobayos, se debe disponer del virus cobayizado o que suministren 10 cobayos.

Al antígeno cobayizado se adiciona el adyuvante saponina en una cantidad de 0.15 mg por dosis de 0.2 ml de virus, o sea, en una proporción del 0.07% del antígeno.

Ejemplo: A 9.3 ml de antígeno se agregan 0.7 ml de saponina al 1%.

La saponina se ajusta a un pH de 6.8-7.2.

El volumen total de antígeno se prepara al tiempo con la saponina y se fracciona en 4 partes iguales, las que se rotulan e identifican como fracciones A-B-C-D. La fracción B-C y D se guardan en congelación a -70°C y con la fracción A se da comienzo a la inmunización.

Plan de inmunización

Todo el grupo de cobayos se inocula en forma similar al proceso de adaptación, escurificando en las 2 patas e inoculando en la dermis plantar 0.1 ml del antígeno (fracción A). El epitelio y/o la linfa se recogen dentro de las siguientes 18-24 horas. y se lleva a congelación a -70°C . Este antígeno puede ser utilizado en las descargas de hiperinmunización.

A los 50-60 días de la inmunización se inicia la hiperinmunización.

Con la fracción B se inocula en una sola pata, una dosis de 0.2 ml de antígeno dividido en 0.1 ml vía intradermo-plantar y 0.1 ml vía subcutánea (cojinete plantar). Esta descarga no debe producir lesiones de generalización, lo cual indicaría un bajo nivel de anticuerpos. Si esto sucede se deben eliminar los animales que generalizan.



Transcurridos 4 días se inocula la fracción C en igual dosis y utilizando las mismas vías en la pata contraria. A los 4 días siguientes se inocula la fracción D en la pata que se descargó con la fracción B.

Como es muy posible que no se pueda inocular la fracción D por escarificación, se inocula toda la dosis de 0.2 ml por vía subcutánea plantar.

Al sexto día de la inoculación se sangran los curios en blanco, previo ayuno y se recoge en un pool. Posteriormente se inactiva el suero a 56°C durante 30 minutos y se lleva a congelación a -20°C.

Titulación de sueros hiperinmunes

Consiste en establecer su punto de equivalencia frente al virus homólogo bajo.

Condiciones estandarizadas en la prueba de fijación de complemento. Hemólisis 50%

El enfrentamiento del antígeno y el suero se hace preparando diferentes diluciones para cada uno de ellos en la llamada "*titulación en bloque*". Las diluciones empleadas dependen de la riqueza en virus y en inmunoglobulinas usualmente para los antígenos de 1/2 a 1/32 y para los sueros de 1/20 a 1/2 560.

En la prueba se utiliza además 2 controles: el de especificidad y el de inactivación del suero. Los controles de especificidad determinan si hay o no presencia en el suero de inmunoglobulinas de otros tipos de virus de Fiebre Aftosa. El control de poder de inactivación determina a su vez si el suero posee restos de complemento activo que pueden alterar su título.

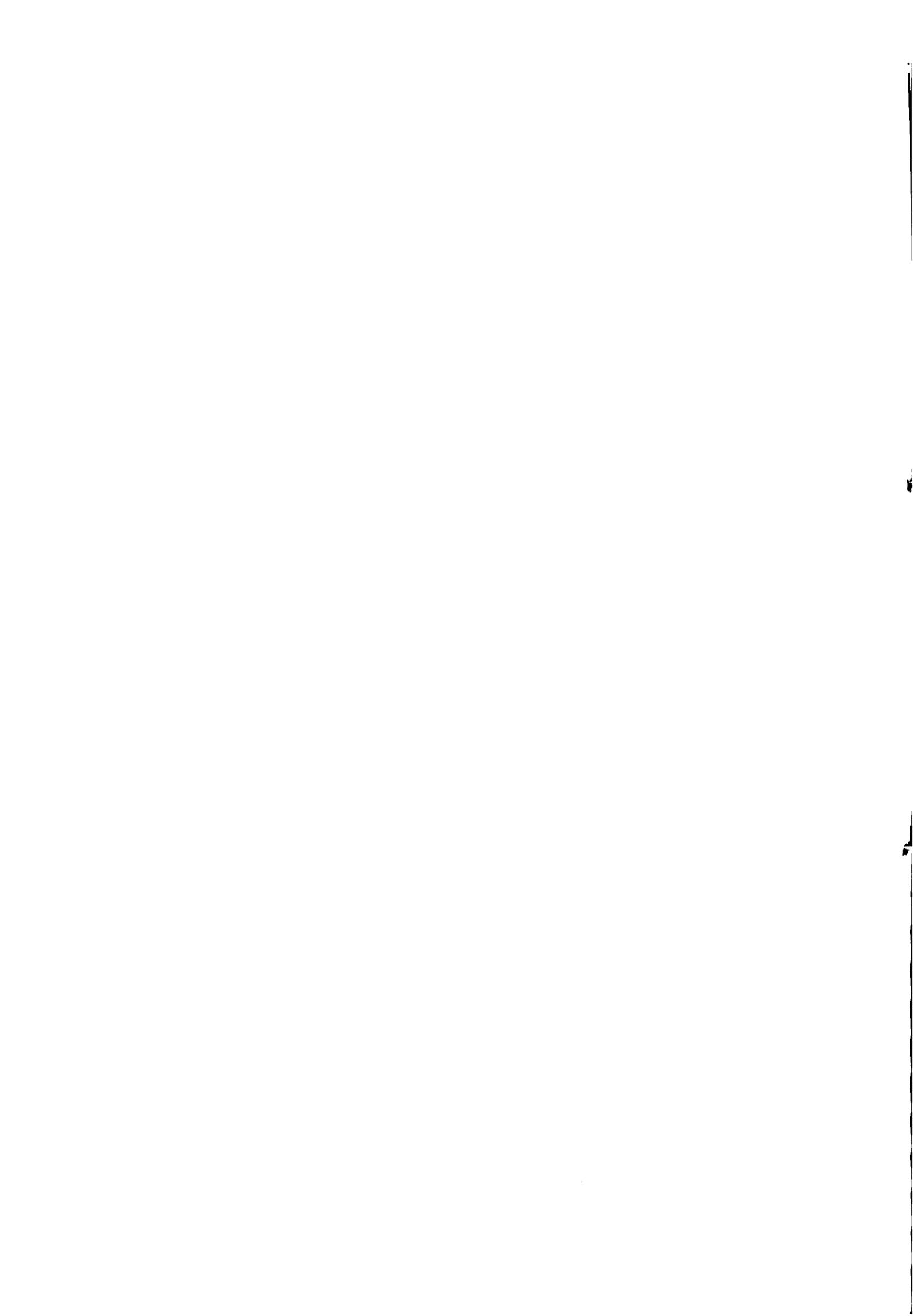
Para estos 2 controles se emplean las mismas diluciones que para titulación del suero.

Métodos

Unidades de complemento. En la titulación del suero y el control de especificidad se emplean 4UHC_{50%}. En el control de activación se toman sólo 2 UHC.

Diluciones. El antígeno homólogo y el suero se preparan en diluciones de escala doble (1/2, 1/4, 1/8, 1/16; 1/40, 1/80, 1/160, 1/320).

El antígeno heterólogo del control de especificidad se usa en la dilución correspondiente a 2.5 UHC_{50%}.



Las diluciones de suero y antígeno se colocan partiendo de la dilución más alta para terminar en la más baja.

TITULACION DE SUEROS

	DILUCIONES SUERO PROBLEMA 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640	CONTROLES		
		Antígeno	C'	SH
REACTIVOS	Suero problema	0.20 ml	-	-
	Ag. homólogo 1/2, 1/4, 1/8, 1/16	0.20 ml	0.20	-
	Complemento 4 UHC _{50%}	0.20 ml	0.20	0.40
	Buffer	-	0.20	0.20
	Suero problema	0.20 ml	-	-
	Ag. heterólogo 2.5 UHC 50%	0.20 ml	0.20	-
	Complemento 4 UHC _{50%}	0.20 ml	0.20	-
	Buffer	-	0.20	-
	Suero problema	0.20 ml	0.20	-
	Complemento 2 UHC 50%	0.20 ml	0.20	-
	Buffer veronal	0.20 ml	-	-
	Incubación	37°C - 30 minutos		
	Sist. Hemolítico	0.40 ml	0.40	0.40
	Hemólisis	37°C - 30 minutos		
	Centrífuga lectura 545 m			

Los tubos se centrifugan a 5 000 rpm durante 3 minutos. El blanco es un tubo de serología con 1 ml de agua destilada.



Ejemplo

		TITULACION DEL SUERO A ₂₇ - 8046							CON-TROL	Ag
Antígeno	U.C	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	C/C	S/C
Densidad Óptica										
8046 1/2	4	03	00	00	07	38	66	66	66	01
8046 1/4	4	04	00	00	04	25	57	66	66	02
8046 1/8	4	00	00	08	24	32	66	66	66	01
8046 1/16	4	00	30	66	66	66	66	66	66	01
0-7250 2.5 UFC	4	30	66	66	66	66	66	66	66	02
Control inactiva.	2	52	50	54	54	56	55	54		

El título del suero o una unidad fijadora de complemento (1 UFC) corresponde a la dilución más alta que fija el 50% del complemento, lo que corresponde a una densidad óptica de 0.33.

En la titulación del suero 8 046, el 50% de fijación está situado entre las diluciones 1/320 (DO 0.25) y 1/640 (DO 0.57); interpolando, el valor 0.33 corresponderá a la dilución 1/400.

$$\begin{aligned} \text{Suero 8 046} &\rightarrow 1 \text{ UFC } 50\% = 1/400 \\ &\searrow 2 \text{ UFC } 50\% = 1/200 \end{aligned}$$

Si 1 UF fija el 50% del complemento 2 UF fijarán el 100%. Sin embargo, en la práctica, el 100% de fijación se consigue mejor diluyendo los sueros a una dilución de 2.5 UFC.

Observaciones sobre la prueba de titulación de sueros

En el control de especificidad de un suero normal, aparece fijación de complemento en las diluciones más bajas (1/20, 1/40) por la reacción VIA antígeno-anticuerpo, reacción que es inespecífica de tipo. En casos de contaminación se presenta una fijación a diluciones más altas (1/160, 1/320).



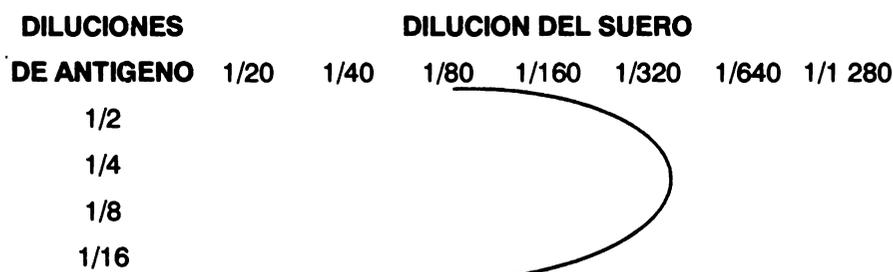
Sin embargo, cuando el suero es muy rico en inmunoglobulinas (1 UFC 1/1 000 o más) la reacción de fijación VIA antígeno-anticuerpo puede llegar igualmente a diluciones más altas (1/80, 1/160).

En el control de inactivación los UHC no producen hemólisis 100% y la densidad óptica no llega a 0.66. La hemólisis en estos tubos se presenta en forma más lenta que en los tubos de titulación. En el suero mal inactivado la lisis aparece rápidamente, en forma homogénea para todas las diluciones y la DO alcanza 0.66.

En caso contrario, la ausencia de hemólisis en los tubos controles del suero, se debe a la presencia de poder anticomplementario originado por contaminación bacteriana o por sangría de los cobayos son haberlos dejado en ayuno total, ya que los lípidos actúan como factor anticomplementario. La contaminación bacteriana puede eliminarse con ázida sódica al 0.05% y precipitación con cloroformo, el cual sirve igualmente para precipitar los lípidos del suero.

En la titulación de un suero, la curva normal de fijación de complemento presenta la siguiente forma:

Figura 4



En la dilución más baja de antígeno, $1/2$, hay exceso de partículas virales para la cantidad de inmunoglobulinas del suero, por lo cual el título fijador es inferior al correspondiente a las diluciones superiores, $1/4$ a $1/8$, en las cuales el antígeno se encuentra en zona de equivalencia con las inmunoglobulinas. A la dilución más alta, $1/16$, la cantidad de inmunoglobulinas excede a la de partículas virales y el título fijador descende.

Cuando el antígeno se prepara en las diluciones apropiadas, la zona de equivalencia se desplaza en forma irregular, tal como se aprecia en el Figura 5.

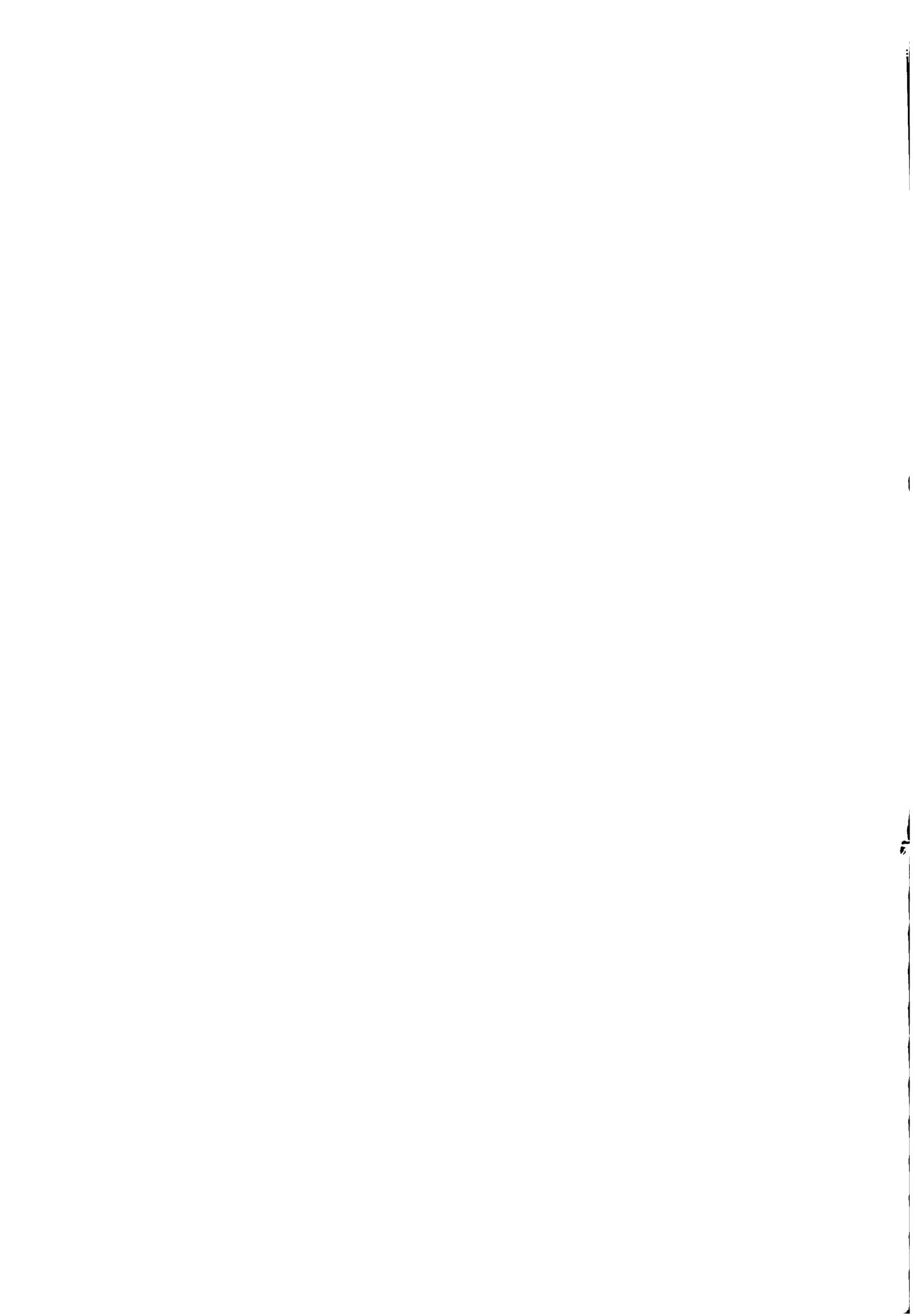
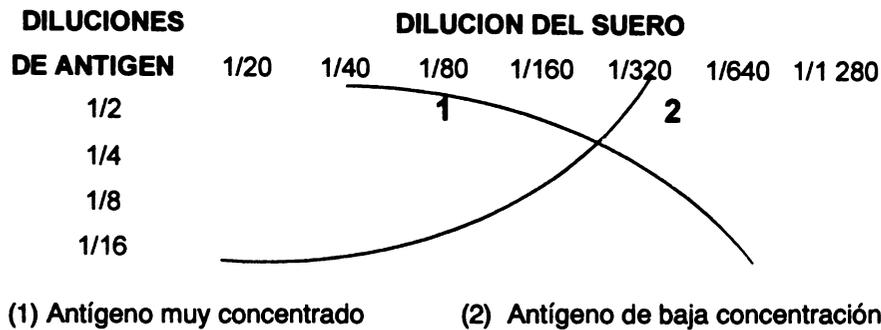


Figura 5



1.1.2.3 Preparación de antígenos

Se consideran que existen 2 tipos de antígenos: los de campo y los de laboratorio.

Antígenos de campo

Los antígenos de campo corresponden a varios tipos de epitelio, según la especie animal:

Bovino	→	bucal, podal, mamario y nasal
Suino	→	bucal, podal mamario y nasal
Equino	→	buca, mamario y nasal
Caprino	→	bucal
Ovino	→	bucal, podal

Es preferible utilizar epitelios lingual o gingival frascos y cuyo peso excede 1 gr. Las muestras epiteliales tratadas con azul de metileno, etanol, yodo, sal y limón pueden ser utilizadas. No conviene trabajar muestras impregnadas en creolina, por su gran poder lítico sobre los glóbulos rojos del sistema fijador.

Los epitelios se lavan con salina estéril en cajas de petri para retirar la glicerina o las impurezas que contengan.

Con ayuda de una pinza y tijeras se toma 1 gr de epitelio y se corta en pedazos lo más pequeños posibles dentro de un mortero estéril. Luego se macera con arena lavada o vidrio estéril. El epitelio se tritura vigorosamente hasta conseguir la mayor fragmentación posible. Al macerado se le agrega 5 ml de solución Earle (1/5 P/V).



El resto de epitelio de la muestra se lava en solución salina y luego de fragmentarlo se coloca en un frasco con glicerina fosfatada y se congela a -70°C .

El epitelio macerado y suspendido en el medio Earle se divide en 2 porciones. A una porción de 3 ml se le agrega 1 ml de cloroformo, agitando vigorosamente; la otra porción no lleva cloroformo.

Ambas muestras se llevan a congelación por 15 minutos a -70°C o por 30-45 minutos a -20°C ; luego se someten a centrifugación con centrífuga refrigerada a 10 000 rpm durante 10 minutos y con centrífuga no refrigerada, a 400 rpm por 15 minutos.

El sobrenadante de la porción cloroformada se destina para las muestras de serología; la porción no cloroformada se utiliza para la inoculación de tejidos celulares de ratones lactantes, previa adición de 0.1 ml de antibióticos.

La porción cloroformada puede utilizarse para inocular célula, pero sin permitir que entre en contacto directo con la monocapa celular, pues tiene un poder tóxico que la desprende.

La inoculación se hace agregando el antígeno al medio de cultivo celular.

Antígeno de laboratorio

Se consideran en este grupo los antígenos provenientes de ratones lactantes o adultos, de epitelios plantares de cobayos y los de cultivos celulares.

Las muestras provenientes de ratones se preparan así: con ayuda de tijeras y pinzas se retira la cabeza, las extremidades, las cola y la piel. Se abren el abdomen y el tórax y se retiran las vísceras. La carcasa del ratón se lava en solución salina, siguiéndose el mismo proceso de las muestras de campo.

Los epitelios de cobayo se procesan también como las muestras de campo; si se desea usar en trabajos de serología es necesario eliminar el factor procomplementario que poseen inactivando a 56°C por 30 minutos.

Material procedente de cultivos celulares infectados se congela a -70°C por 30 minutos, para romper el citoplasma celular y recuperar así la mayor cantidad de partículas virales. La muestra se descongela y se centrifuga a 5 000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante que resulta contiene las partículas virales de la muestra.



Titulación de antígenos

Titular un antígeno es conocer la dilución más alta de éste, que fija el 50% del complemento cuando se enfrenta ante un suero dado.

Materiales y método

Para titular un antígeno (1 UFC_{30%}) generalmente se emplean 4 unidades hemolíticas de complemento 50% y en especial cuando se va a realizar la subtipificación, pues el título de uso de los sueros de referencia se ha conseguido usando también 4 UHC 50%. Se puede conocer también el título fijador de un antígeno, utilizando 3 unidades de complemento.

El rango de diluciones usualmente empleado para un antígeno común de campo o de células es de 1/2 a 1/64. Cuando se trabaja con antígenos concentrados con polietilenglicol (PEG) se amplían estas diluciones hasta 1/2 000.

Cuadro 2

TITULACION DE ANTIGENO

		1/2, 1/4, 1/8 1/16, 1/32, 1/64	Ag	Suero Hip.	SH	C'
REACTIVOS	Antígeno	0.20 ml	0.2	-	-	-
	Suero Hip. 2.5 UFC 50%	0.20 ml	-	0.2	-	-
	Complemento 3 o 4 UHC 50%	0.20 ml	0.2	0.2	-	0.4
	Buffer	-	0.2	0.2	0.6	0.2
	Incubación	37°C - 30 minutos				
	Sist. Hemolítico	0.40 ml	0.40	0.40	0.4	0.40
	Hemólisis	37°C - 30 minutos				
	Centrífuga lectura 545 m					

Cuadro 3

EJEMPLO DE TITULACIÓN DE ANTÍGENOS

Antígeno	Suero	PRUEBA DILUCION ANTIGENO PROBLEMA								CONTROLES			
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	C/C	S/C	Antígeno	Suero completo	SH	
A - 6 304	A - 6 304 Dil. 1/150												
Densidad óptica		00	00	03	16	50	66	66	02	66	66	00	

El 50% de fijación o densidad óptica 0.33 aparece entre las diluciones del antígeno 1/16 y 1/32. Interpolamos y la lectura 0.33 corresponde a la dilución 1/24.

Suero A - 6 304 → 1 UHC 50% de dilución 1/24

2.1.3 ELISA (ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA FIEBRE AFTOSA – ELISA 3 ABC

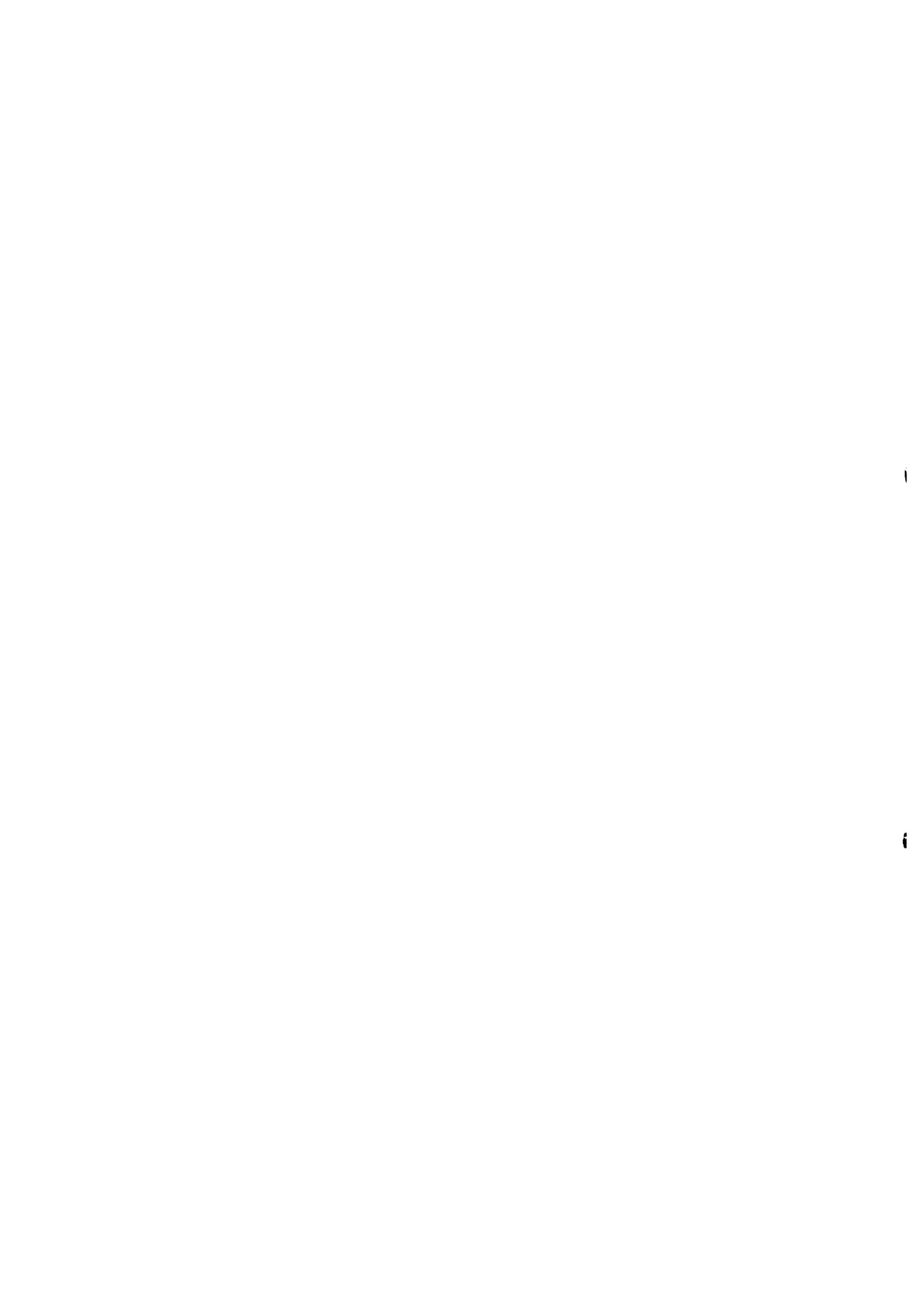
2.1.3.1 Materiales y reactivos

- Pipeta multicanal (100 µl) y micropipetas de volumen ajustable (10 y 100 µl), con inexactitud inferior a 5%. Punteras descartables adecuadas para las micropipetas.
- Placas tipo ELISA para dilución previa de las muestras.
- Papel secante.
- Material de laboratorio (probetas, frascos) para preparar soluciones.
- Agua desionizada y/o destilada.
- Hipoclorito de sodio 5% para inactivación del material y de las soluciones a descartar.
- Lavadora de placas manual o automática.
- Estufa 37°C ±1°C.
- Lectora de microplacas con filtros para lectura a 450 y 620 nm.
- Vórtex.

Reactivos

- Microplacas sensibilizadas con proteínas 3ABC MP

Microplacas con 96 pocillos (12 tiras) sensibilizadas con la proteína 3ABC del VFA obtenida por ingeniería genética. Prontas para uso.



Retirar del plástico el número de tiras necesarias para la prueba; mantener las otras en el plástico cerrado. Conservar en heladera (2 a 8°C).

- **Diluyente de las muestras DA**

Solución PBS con estabilizantes y conservantes. Específica para la dilución de las muestras y sueros controles. Preparar como indicado en los procedimientos. Conservar en heladera (2 a 8°C). Agitar bien antes de usar.

- ***Escherichia coli* EC**

Lisado de *escherichia coli* para adicionar al diluyente de las muestras y diluyente de conjugado como indicado en los procedimientos. Conservar en heladera (2 a 8°C).

- **Control negativo CN**

Suero bovino sin anticuerpos contra el VFA. Manipular como indicado para las muestras. Conservar en heladera (2 a 8°C)

- **Control Cut-off CC**

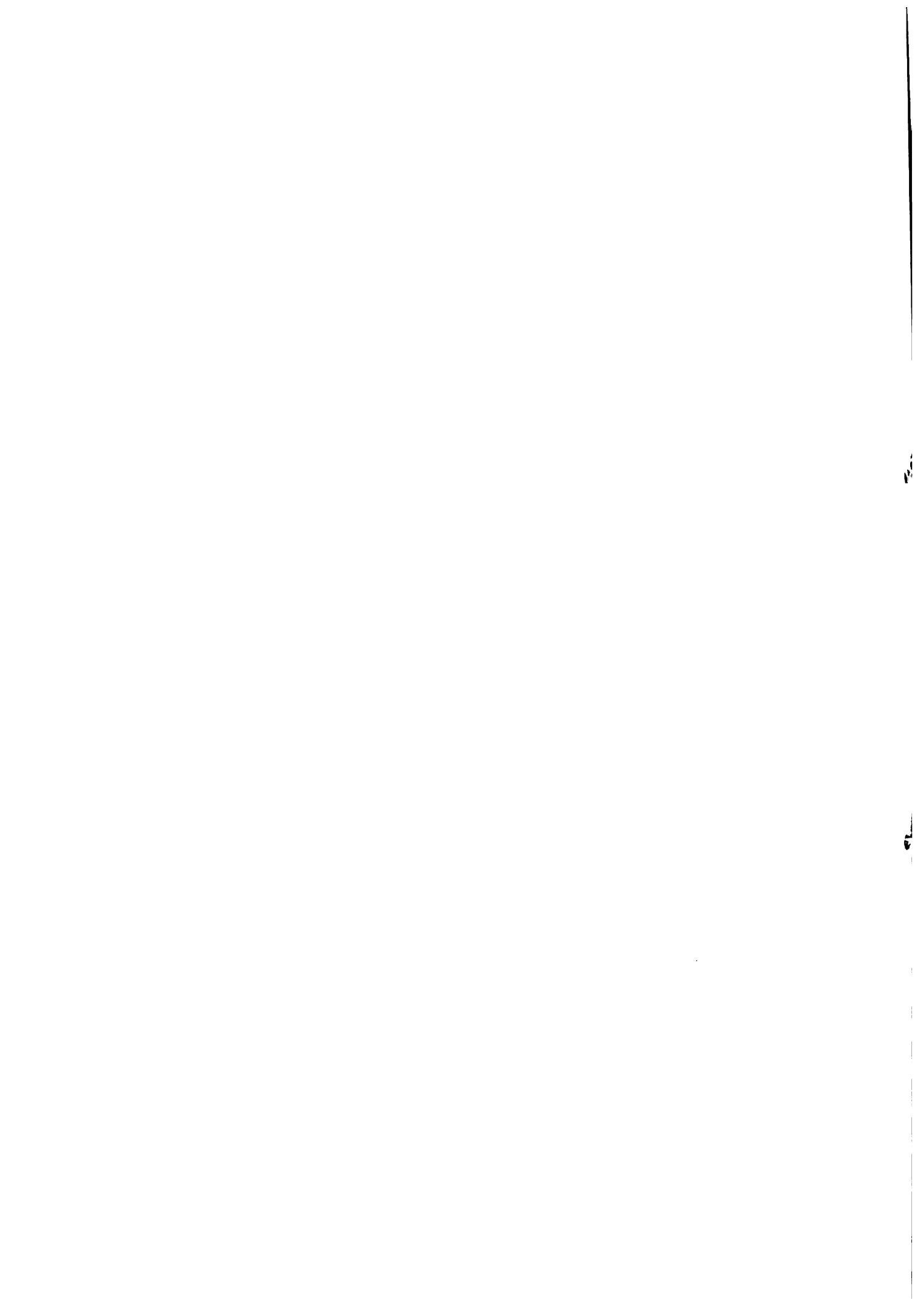
Suero bovino con bajo título de anticuerpos contra la proteína 3ABC del VFA, inactivado a 56°C. Manipular como indicado para las muestras. Conservar en heladera (2 a 8°C).

- **Control positivo CP**

Suero bovino con título medio de anticuerpos contra la proteína 3ABC del VFA, inactivado a 56°C. Manipular como indicado para las muestras. Conservar en heladera (2 a 8°C).

- **Solución de lavado 25x concentrada SL**

Solución PBS con detergente y conservantes, 25x concentrada. Específica para el lavado de placas. Preparar como indicado en los procedimientos. Conservar en heladera (2 a 8°C)



- **Diluyente de conjugado DC**

Solución PBS con estabilizantes y conservantes. Específica para la dilución del conjugado. Preparar como indicado en los procedimientos. Conservar en heladera (2 a 8°C)

- **Conjugado 100x concentrado CJ**

Anticuerpos anti-IgG bovino (producidos en conejos) conjugados con peroxidasa, con etabilizantes y conservantes. Preparar como indicado en la siguiente tabla. Conservar en heladera (2 a 8°C).

N° Tiras	D. Conjugado	Conjugado	D. Substrato	Substrato
02	2 ml	20 µl	2 ml	20 µl
03	3 ml	30 µl	3 ml	30 µl
04	4 ml	40 µl	4 ml	40 µl
05	5 ml	50 µl	5 ml	50 µl
06	6 ml	60 µl	6 ml	60 µl
07	7 ml	70 µl	7 ml	70 µl
08	8 ml	80 µl	8 ml	80 µl
09	9 ml	90 µl	9 ml	90 µl
10	10 ml	100 µl	10 ml	100 µl
11	11 ml	110 µl	11 ml	110 µl
12	12 ml	120 µl	12 ml	120 µl
24	24 ml	240 µl	240 ml	240 µl

- **Diluyente de substrato DS**

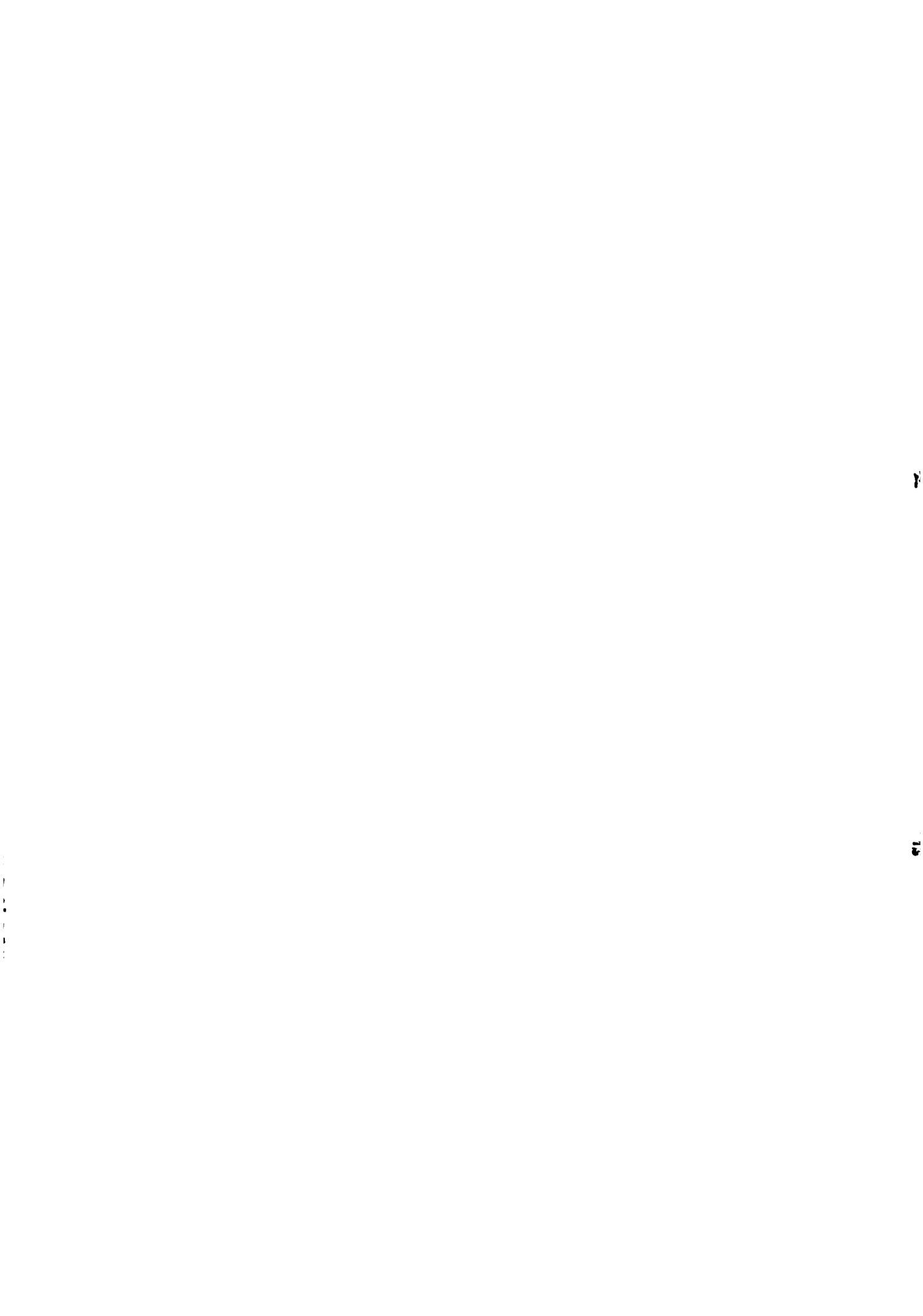
Solución de ácido cítrico en buffer fosfato con peróxido de hidrogenio. Pronta para uso y específica para la dilución del substrato. Conservar en heladera (2 a 8°C).

- **Substrato 100x concentrado ST**

Solución de tetrametilbencidina (TMB) en dimetilsulfóxido (DMSO), 100x concentrada. Preparar como indicado en table anterior. Conservar en heladera (2 a 8°C).

- **Solución bloqueadora SB**

Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N. Pronta para uso.



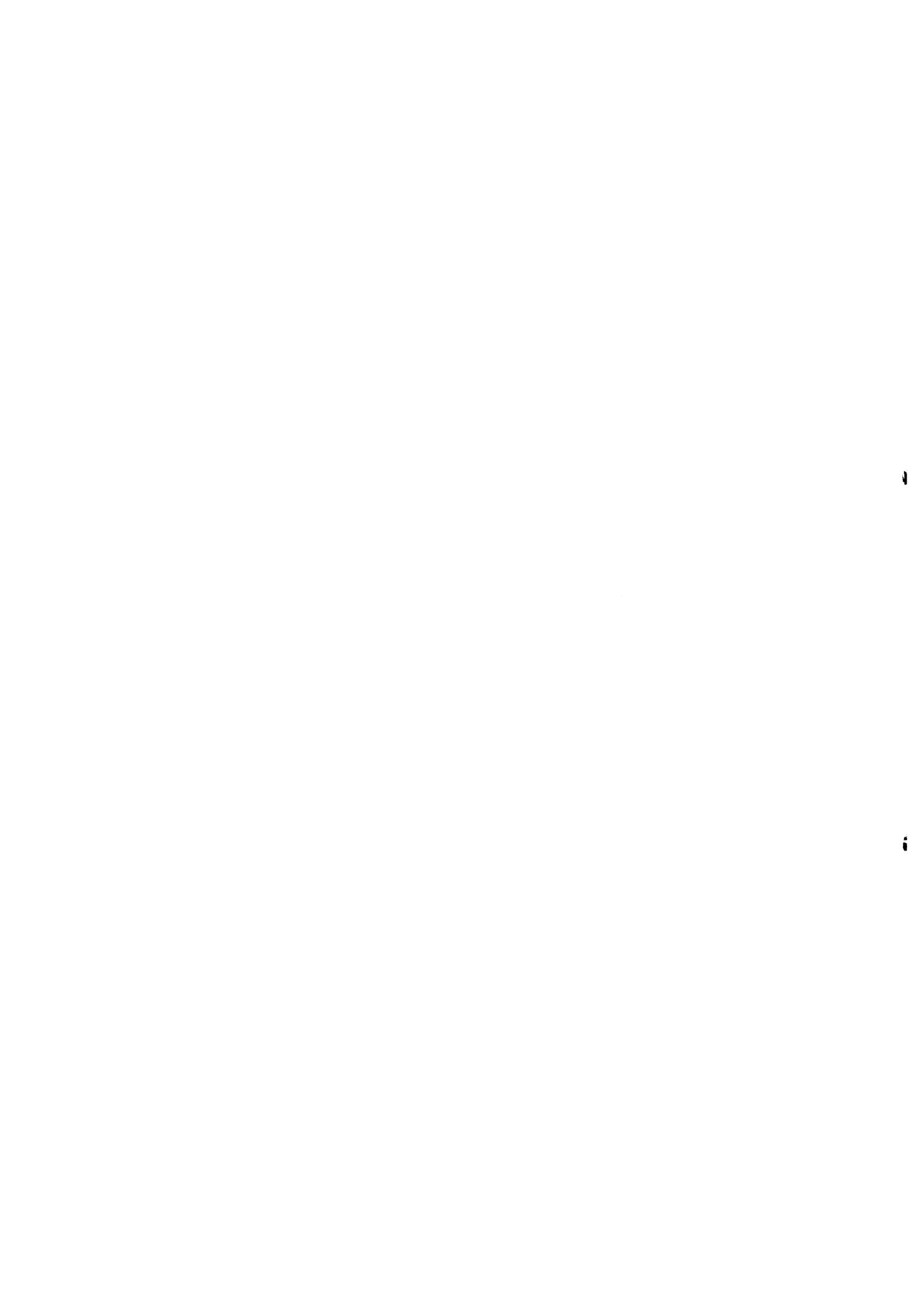
Preparación de las muestras

Para preparar y conservar las muestras recomendamos seguir los siguientes procedimientos:

- Después de la retracción del coágulo, centrifugar la muestra a 2 000g durante 10 minutos.
- Conservar los sueros en heladera (2-8°C) por no más de 2 días; para períodos mayores conservar a -20°C. Caso exista interés en conservar las muestras después de realizada la prueba, recomendamos adicionar ázida sódica 0.1% y gentamicina 0.01% (dilución final).
- Evitar repetidos ciclos de congelamiento/descongelamiento de las muestras.
- No usar sueros contaminados o que presenten material precipitado.
- Homogeneizar los sueros con vortex antes de usarlos.

2.1.3.2 Procedimiento

- Aproximadamente 1 hora antes de comenzar la reacción, retirar todos los reactivos de la heladera -salvo el conjugado- para permitir que estabilicen a temperatura ambiente (20-25°C).
- Preparar la planilla de reacción, teniendo en cuenta que deben ser reservados 2 pocillos para cada suero control y en caso de no disponer de filtro de 620 nm, deberá ser incluido un blanco (pocillo en el que no se aplicará muestra).
- Preparar las soluciones necesarias para la prueba:
 - Solución de lavado –diluir 25 veces con agua desionizada y/o destilada. Antes de diluir observar que no haya precipitados; caso contrario, disolverlo en baño maría a 37°C (preparar 500 ml de solución por placa).
 - Diluyente de las muestras –adicionar 100 µl de extracto *E. coli* a cada 100 ml de diluyente de las muestras (preparar 20 ml de diluyente con extracto *E. coli* por placa).
 - Diluyente de conjugado –adicionar 100 µl de extracto *E. coli* a cada 100 ml de diluyente del conjugado (preparar 20 ml de diluyente de conjugado con extracto *E. coli* por placa).
 - La dilución del conjugado y del sustrato debe ser realizada entre 5-10 minutos antes de su uso, de acuerdo a la tabla a seguir:
 - Prediluir los sueros controles y las muestras 1:20 en placa virgen como se indica a continuación. Pipetear 200 µl de diluyente de las muestras en toda la placa y adicionar 10 µl de muestra y sueros controles en los respectivos pocillos, según las disposiciones definidas en la planilla de



trabajo. Homogeneizar las diluciones. (Obs: usar una puntera limpia para cada muestra y/o control).

Incubación de las muestras

- Transferir con pipeta multicanal 100 μ l de las muestras prediluidas para la placa sensibilizada, respetando las posiciones de las mismas.
- Sellar la placa a incubar a 37°C durante 30 minutos \pm 3 minutos.
- Diez minutos antes de acabar la etapa de incubación de las muestras, preparar el conjugado diluido.

Lavado

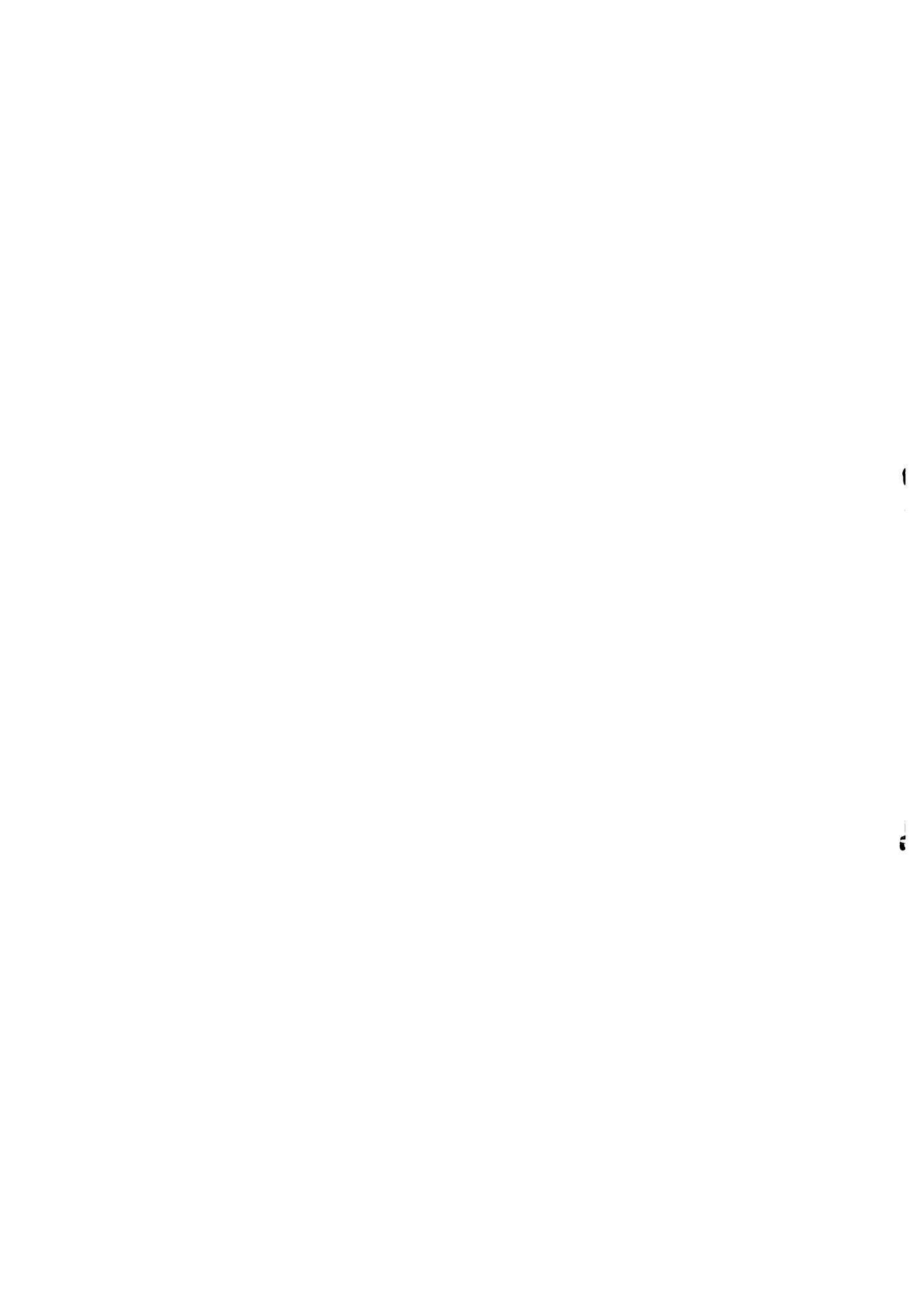
- Concluida la etapa de incubación de las muestras, lavar la placa en 3 ciclos duplos. La perfecta ejecución de esta etapa es fundamental para un buen resultado de la prueba. En caso de no disponer de lavadora automática, el lavado podrá ser realizado manualmente de la siguiente forma: aspirar el contenido de los pocillos y adiciones solución de lavado hasta el tope; repetir la operación. Luego, proceder al lavado de las otras tiras. Repetir 2 veces el mismo procedimiento. Durante el lavado evitar que la solución transborde de los pocillos y no permitir que las agujas de la lavadora manual toque el fondo de la placa. Concluido el lavado, eliminar el resto de la solución golpeando la placa invertida sobre el papel secante.
- Adicionar 100 μ l de conjugado diluido por pocillo. Sellar la placa e incubar a 37°C durante 30 minutos \pm 3 minutos.
- Diez minutos antes de acabar la etapa de incubación de las muestras, preparar el conjugado diluido.

Lavado

- Proceder como se ha indicado en el lavado anterior.

Incubación del sustrato-cromógeno

- Adicionar 100 μ l de sustrato/cromógeno diluido a cada cavidad e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, protegiendo de la luz.
- Finalizada la etapa, adicionar 100 μ l de solución bloqueadora a cada pocillo



2.1.3.3 Lectura e interpretación

- La lectura de la placa debe ser realizada en un plazo máximo de 30 minutos después de la adición de la solución bloqueadora. Leer con filtro de 450 nm usando, filtro de 620 nm para sustracción automática de blanco.

La muestra deberá ser considerada:

- *no reactiva* para valores de $T/C < 0.8$, indicando que el suero en cuestión no contenía anticuerpos anti-3ABC del Virus de la Fiebre Aftosa.
- *Inconclusa o sospechosa* para valores de $0.8 = < T/C < 1$.
- *reactiva* para valores de $T/C > = 1$, indicando que el suero en cuestión contenía anticuerpos anti-3ABC del Virus de la Fiebre Aftosa.

* $T/C = \text{absorbancia del suero} / \text{media de absorbancia de CC}$.

Todas las muestras inconclusas y/o reactivas deberán ser nuevamente analizadas en duplicado para confirmar el resultado.

Control de calidad interno

Como toda prueba diagnóstica basada en la detección de anticuerpos para inferir la presencia y/o exposición previa al virus, hay que tener en cuenta que existe un desfase entre la exposición al virus y la formación de anticuerpos contra el mismo. Este intervalo temporal se constituye en limitación metodológica del ensayo. Pruebas experimentales realizadas con EBK930 permitieron establecer que animales en proceso de seroconversión pasan a presentar resultados inconclusos y/o reactivos a partir de los 7 días post infección.

2.1.4 PRUEBA DE ELISA SANDWICH INDIRECTA

Tipificación del virus de Fiebre Aftosa y Estomatitis Vesicular

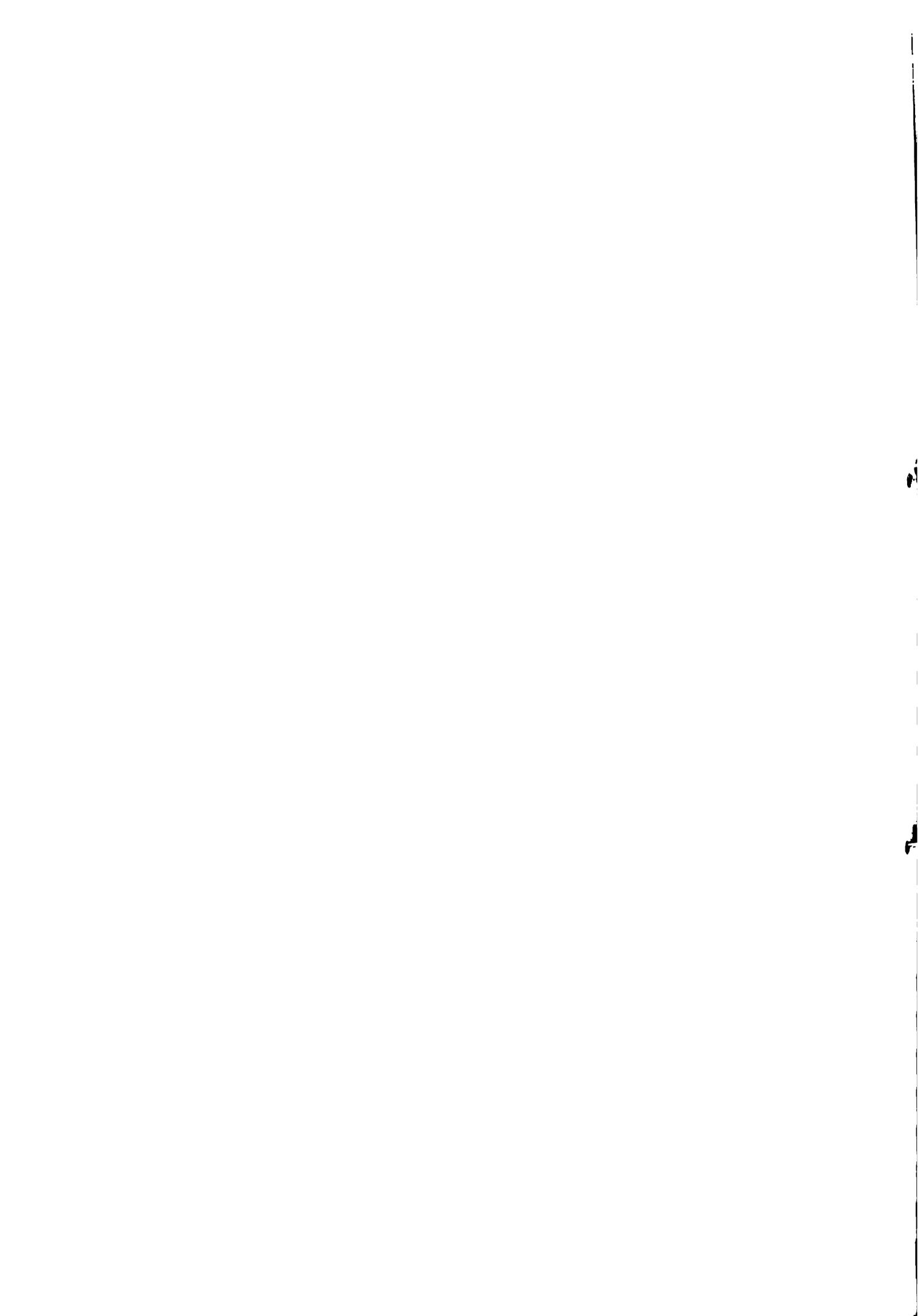
2.1.4.1 Materiales y reactivos (otros, ver en Anexo 3.a)

- **Conjugado IgG de Cabra Anti IgG de Cobayo con Peroxidasa**

Peroxidasa + glutaraldehído + IgG.

- **Antígeno Fa/Ev y Negativo para Control**

Virus de referencia, 01 Campos, Br/58, A24 Cruzeiro Br/55, C3 Indaial Br/71, New Jersey Costa Rica/66, Indiana – 3 Br/86 y medio de cultivo donde se creció células.



Los virus fueron obtenidos a partir de células “baby hamster kidney” (BHK), inactivado con BEI. Fiebre Aftosa tratado con 50% (v/v) de glicerol estéril.

Estomatitis vesicular sin glicerol, ambos almacenados a -20°C en alícuotas de 1-3 ml.

- **Capturas**

Fiebre Aftosa: sueros hiperinmunes preparados en conejos, utilizando como inmunógeno un “pool” de virus tipo O, A y C, inactivado con BEI desarrollado en células IB-RS - 2, purificado por gradiente de cloruro de cesio. Almacenado en alícuotas de 0.5 - 3 ml. a -20°C .

Estomatitis vesicular: conejos hiperinmunizados . Virus New Jersey (Costa Rica/66) y una mezcla de sueros monovalentes Indiana 1 (Costa Rica /72), Indiana 2 (Riberão - Br/79). Indiana 3 (Aguilhas Negras-Br/86). Almacenado en alícuotas de 0.5-3 ml. a -20°C .

Suero normal de conejo: suero de conejo no inmune. Almacenado de 0.5-3 ml. a -20°C .

- **Detectores**

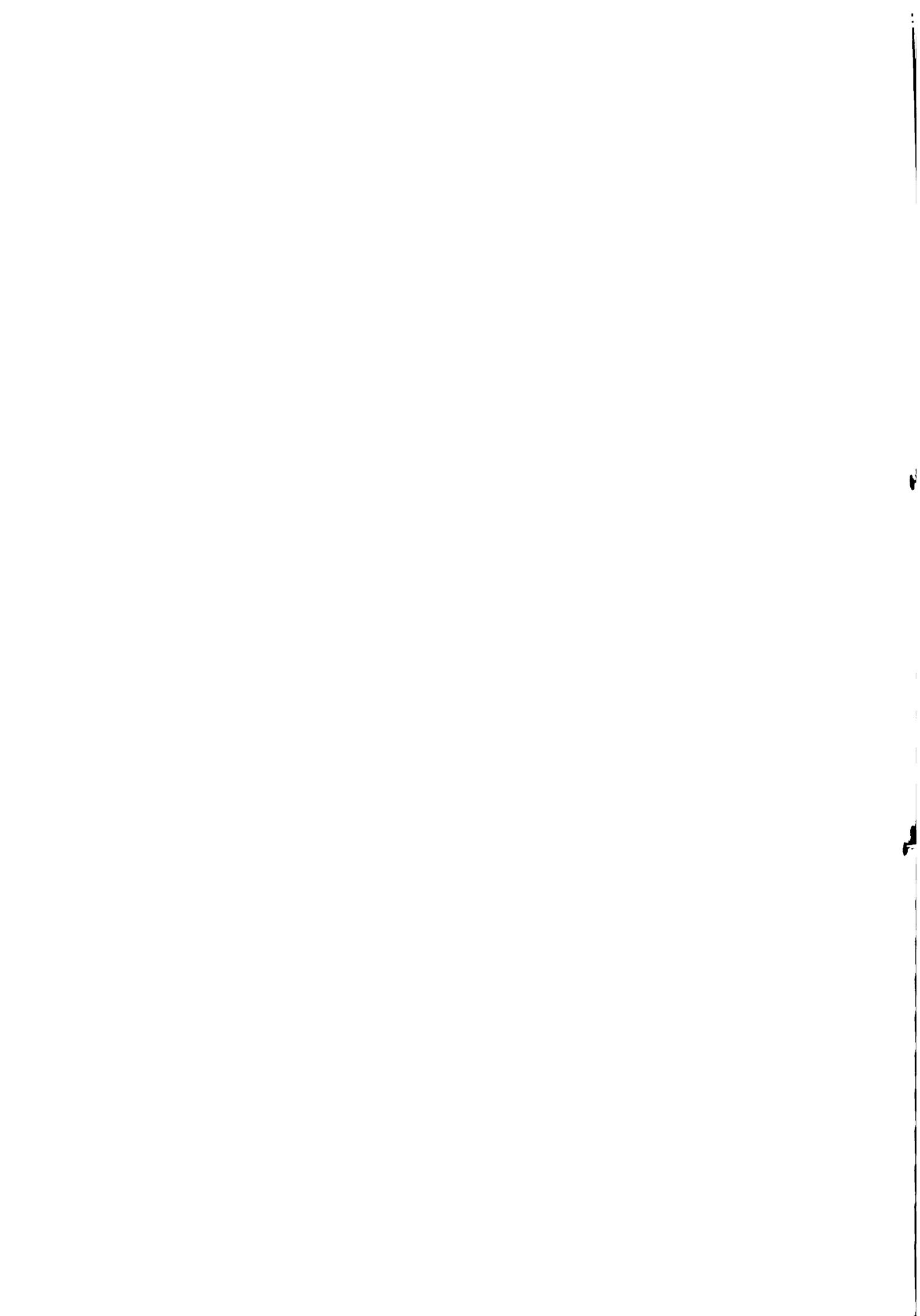
Fiebre Aftosa: sueros hiperinmunes polivalentes, preparados en cobayos por virus adaptados a esta especie y absorbidos con antígenos heterólogos. Almacenados en alícuotas de 0.5-3 ml. a -20°C .

Estomatitis vesicular: se obtuvo un suero monovalente en cobayos para la cepa New Jersey Costa Rica/66 y suero polivalente Indiana (1-Costa Rica/72, 2- Riberão Br/79, 3-Aguilhas Negras Br/86). Almacenado en alícuotas de 0.5-3 ml. a -20°C .

Suero normal de cobayo: suero de cobayo no inmune. Almacenado en alícuotas de 0.5-3 ml. a -20°C .

2.1.4.2 Procedimiento

- Lavar la placa a utilizar 3 veces con agua destilada
- Escurrir sobre papel absorbente.
- Colocar en cada pocillo de la placa 100 μl . de suero de captura en la dilución de uso en tampón carbonato, como sigue:



Columnas	1 y 7	suero conejo polivalente	"O"
	2 y 8	suero conejo polivalente	"A"
	3 y 9	suero conejo polivalente	"C"
	4 y 10	suero conejo monovalente	"NJ"
	5 y 11	suero conejo polivalente	"IND"
	6 y 12	suero conejo normal	

- Incubar durante 18 horas a 4°C.
- Lavar la placa 3 veces con solución salina fisiológica.
- Colocar en cada pocillo de la placa 100 µl. de ovoalbúmina al 1% GV .
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente (22 – 25°C).
- Lavar la placa 3 veces con solución salina fisiológica. Escurrir sobre papel absorbente (*).

* En este momento, las placas se pueden almacenar a -20°C, selladas con un adhesivo. Para uso se descongelan 1 hora antes de la realización de las pruebas.

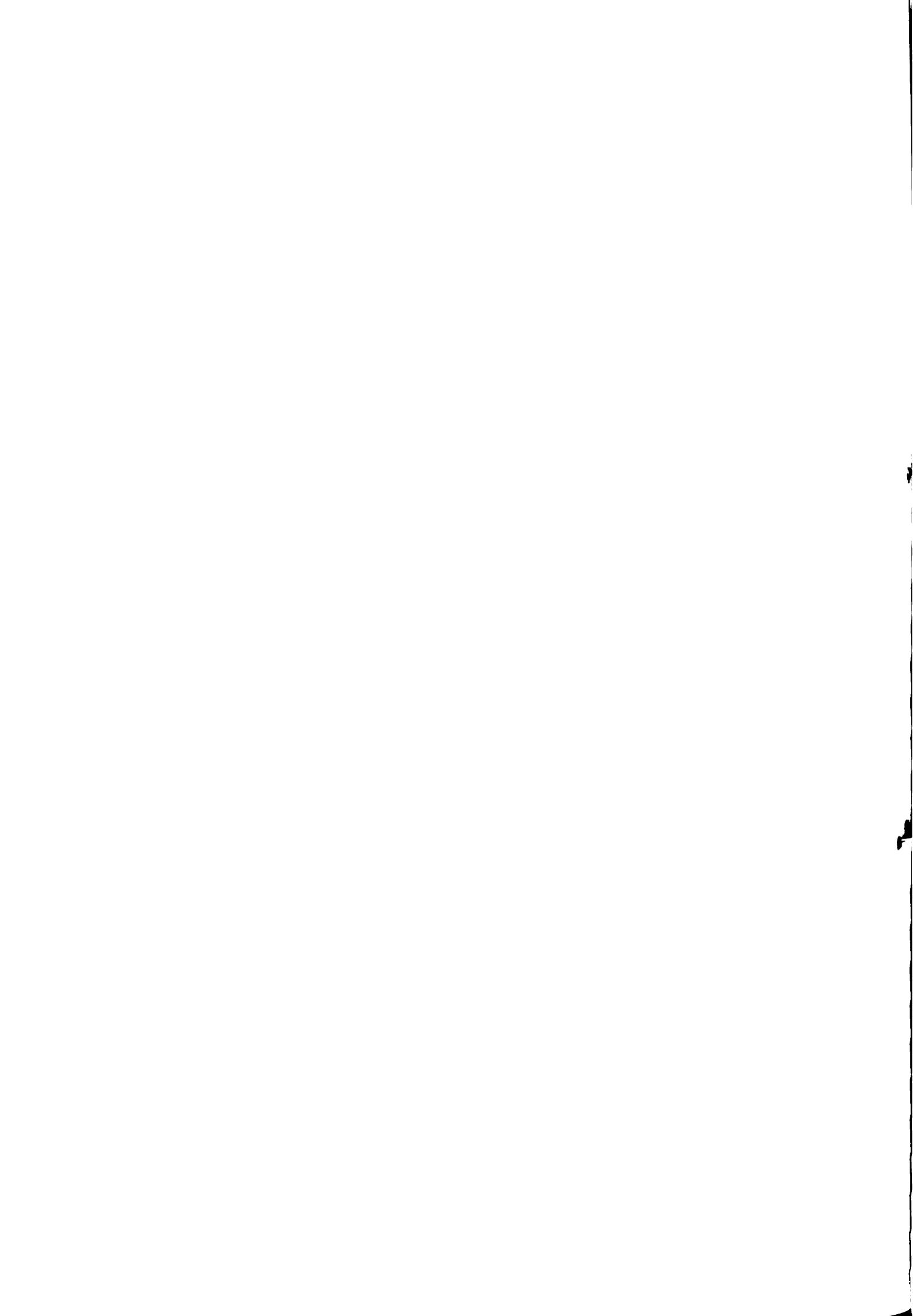
- Preparar dilución 1:5 de antígenos (Ag) de referencia en tampón de dilución bloqueador (PBSTB) y añadir 50 µl. de antígenos por pocillo.

Pocillos	7 (G – H)	Ag	"O"
	8 (G – H)	Ag	"A"
	9 (G – H)	Ag	"C"
	10 (G – H)	Ag	"NJ"
	11 (G – H)	Ag	"IND"
	12 (G – H)	Ag	"BHK" (sobrenadante de cultivo celular no infectado)

- Añadir 50 µl. de las muestras de estudios (ME) 1:5, como sigue:

	1 de 1 a	6	(A – B)
	2 " "	"	(C – D)
ME	3 " "	"	(E – F)
	4 " "	"	(G – H)
	5 de 7 a	12	(A – B)
	6 " "	"	(C – D)
	7 " "	"	(E – F)

- Incubar durante 1 hora a 37°C en agitación .
- Preparar diluciones de suero hiperinmune de cobayo O, A, C NJ, IND y suero animal de cobayo en PBSTB e incubar por ½ hora a 37°C, hasta el momento del uso.
- Descartar el contenido de la placa y lavarla 3 veces con solución de lavado .
- Colocar en cada pocillo de la placa 50 µl. de suero detector, como sigue:

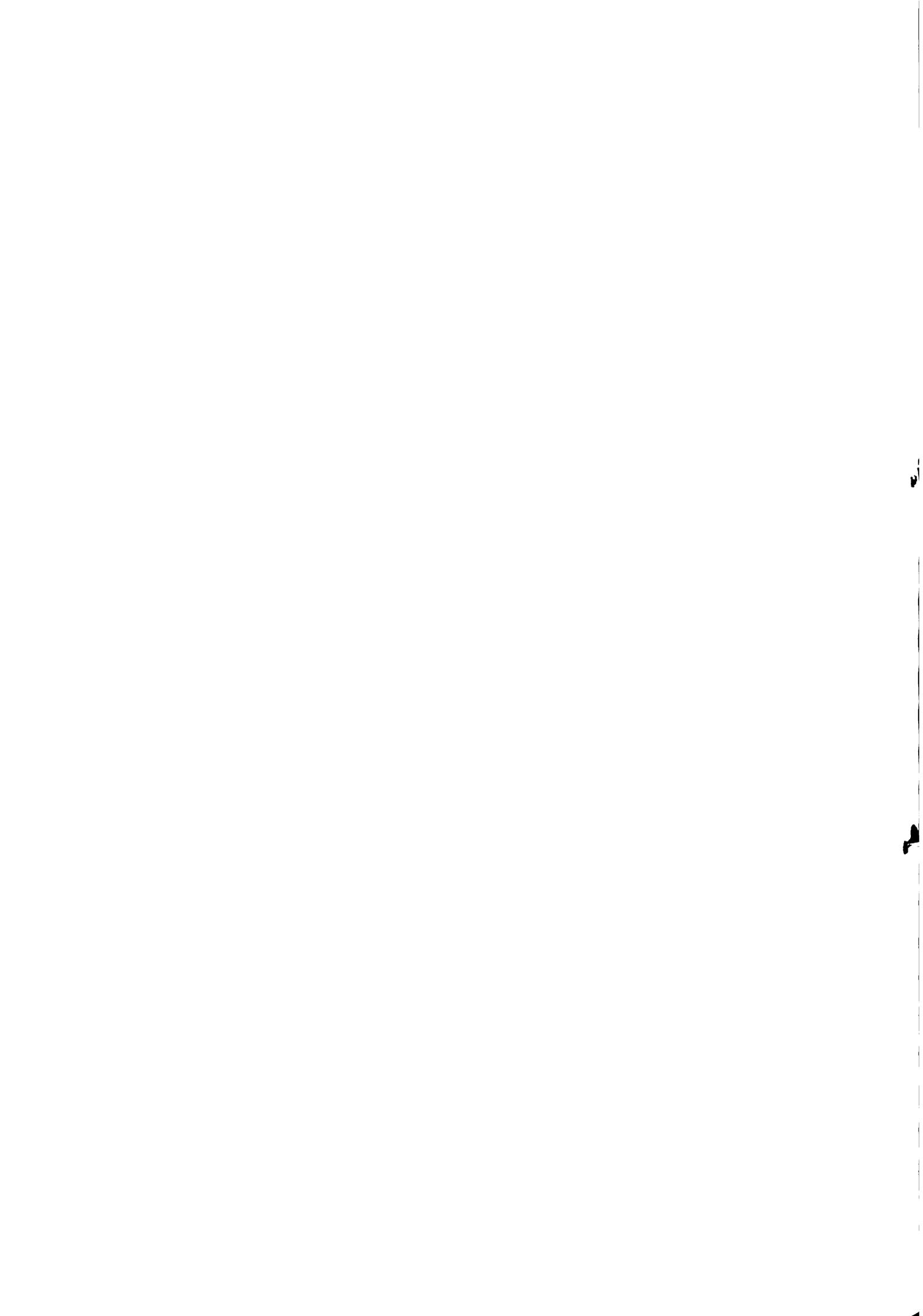


Columnas	1 y 7	suero cobayo polivalente	"O"
	2 y 8	" "	"A"
	3 y 9	" "	"C"
	4 y 10	" "	monovalente "NJ"
	5 y 11	" "	polivalente "IND"
	6 y 12	" "	normal

- Incubar durante ½ hora a 37°C en agitación.
- Preparar una dilución óptima de conjugado anti – cobayo en PBSTB e incubar ½ hora a 37°C hasta el momento de uso.
- Descartar el contenido de la placa y lavarla 3 veces en solución de lavado .
- Añadir 50 µl. del conjugado a cada pocillo de la placa.
- Incubar durante ½ hora a 37°C en agitación.
- Descartar el contenido de la placa y lavarla 4 veces con solución de lavado .
- Preparar el sustrato y colocar 50 µl. en todos los pocillos de la placa.
- Incubar en oscuridad durante ¼ de hora a temperatura ambiente (22 – 25°C).
- Detener la reacción agregando 50 µl. de ácido sulfúrico a todos los pocillos de la placa.

TIPIFICACION DE VIRUS FIEBRE AFTOSA Y ESTOMATITIS VESICULAR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	O	A	C	NJ	IND	N	O	A	C	NJ	IND	N	
ME 1	A												ME 5
	B												
ME 2	C												ME 6
	D												
ME 3	E												ME 7
	F												
ME 4	G							O	A	C	NJ	IND	BHK
	H												CONTROL Ag



Protocolo: Para estudiar 7 muestras

- **Captura:** S.H. conejo fa (O, A, C), ev (NJ, IND) y s. conejo normal (N) – 18 horas a 4°C, lavar 3 veces.
- Ovoalbúmina 1% - 1 hora. a 22 – 25°C (Ta), lavar 3 veces .
- Muestras en estudio y antígeno de referencia dil. 1:5, 1 hora a 37°C con agitación, lavar 3 veces .
- **Detector:** S.F. cobayo homólogo (poli O, A, C, IND, mono NJ) y suero normal de cobayo – ½ hora. a 37°C con agitación, lavar 3 veces .
- Conjugado anti – cobayo – ½ hora a 37°C con agitación, lavar 4 veces.
- Sustrato OPD + H₂O₂ – ¼ hora a 22 – 25°C (TA) .
- H₂SO₄ 3N .
- Leer a 492 nm. .
- Resultado .

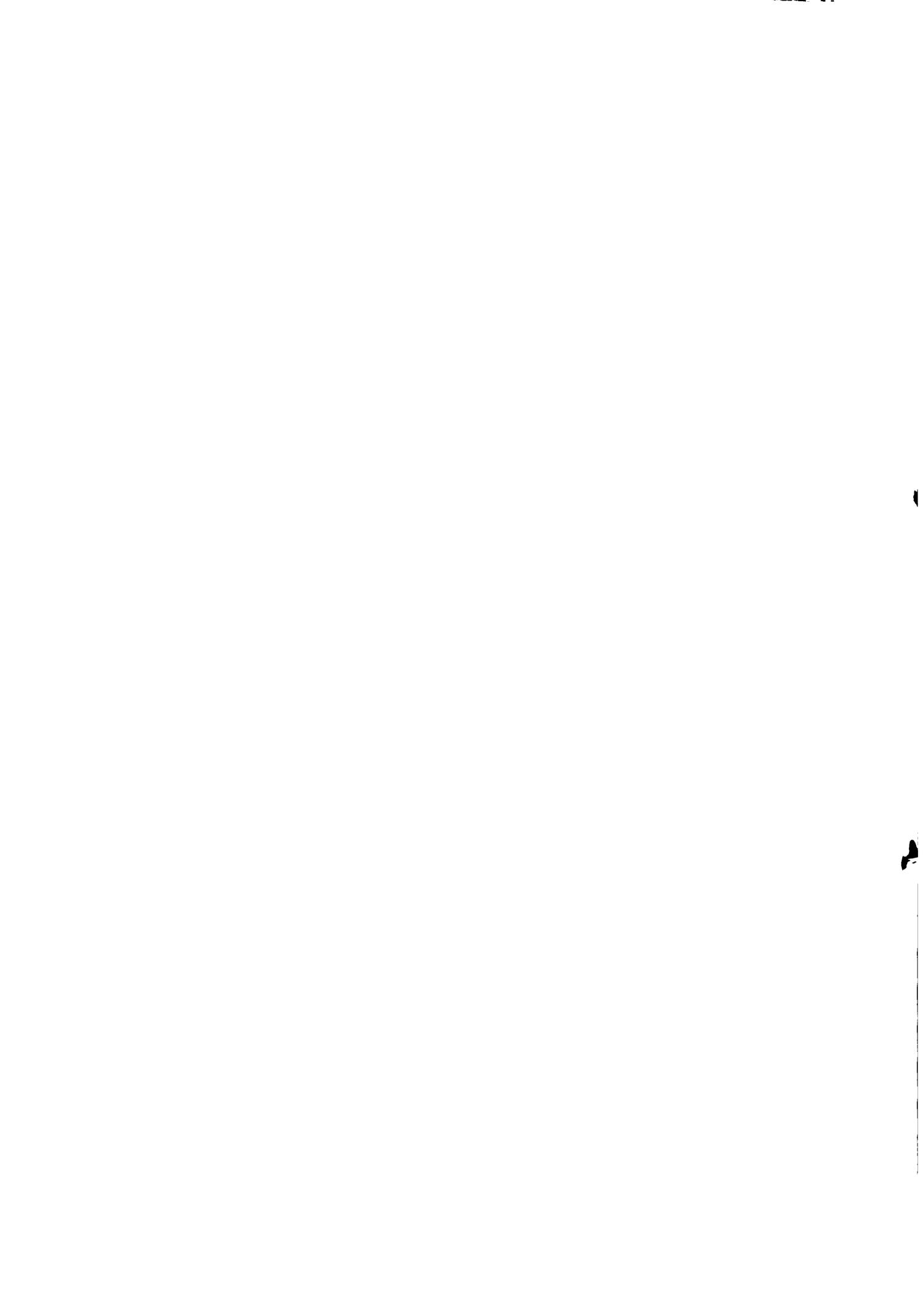
2.1.4.3 Interpretación de la lectura de tipificación de virus de Fiebre Aftosa

1. Confirmar que los controles de antígeno de referencia presenten coloración (pocillos (G-H) 7 a 11) y pocillos (G-H) 12 no presenten coloración.
2. Leer la placa en espectrofotómetro con filtro 492 nm., substrayendo el valor de densidad óptica (DO) del promedio del control de blanco (G12 y H12) de los demás pocillos.
3. Calcular la media de los valores de DO para cada muestra problema.
4. Medias con valores de DO ≥ 0.2 sobre el control normal son consideradas positivas para el suero de captura correspondiente.
5. Medias con valores de DO ≥ 0.2 o próximas a este valor, deben ser re-estudiadas y/o aumentar la concentración antigénica por pasajes con cultivos celulares.
6. Estudiar el sobrenadante obtenido de estos cultivos celulares hasta el tercer pasaje, los que muestren efecto citopatogénico (CPE) y que continúen presentando lecturas < 0.2 , son considerados negativos, los que muestren lectura ≥ 0.2 , son considerados positivos.
7. Lectura en el lector Elisa con filtro 492 mm.

2.1.5 IDENTIFICACIÓN Y TITULACIÓN DE ANTICUERPOS DE LA FIEBRE AFTOSA.

2.1.5.1 Fase sólida (FS)

Materiales y reactivos (otros, ver Anexo 3.a)



- Placas
- Lavador de placas
- Estufa 37° C
- Agitador de placas
- Agitador de tubos
- Tubos de vidrios y soportes de tubos
- Micropipetas y cubetas
- Espectrofotómetro
- Agua destilada
- Muestras para estudio
- Antígeno de referencia
- Sueros de referencia control positivo y negativo
- Captura - sueros hiperinmunes de conejo
- Suero detector - sueros hiperinmunes de cobayos
- Conjugado
- Tampón de dilución
- Solución de lavado
- Tampón carbonato/bicarbonato
- Substrato
- Acido sulfúrico 3N
- Ovoalbúmina G II, y G V

Procedimiento

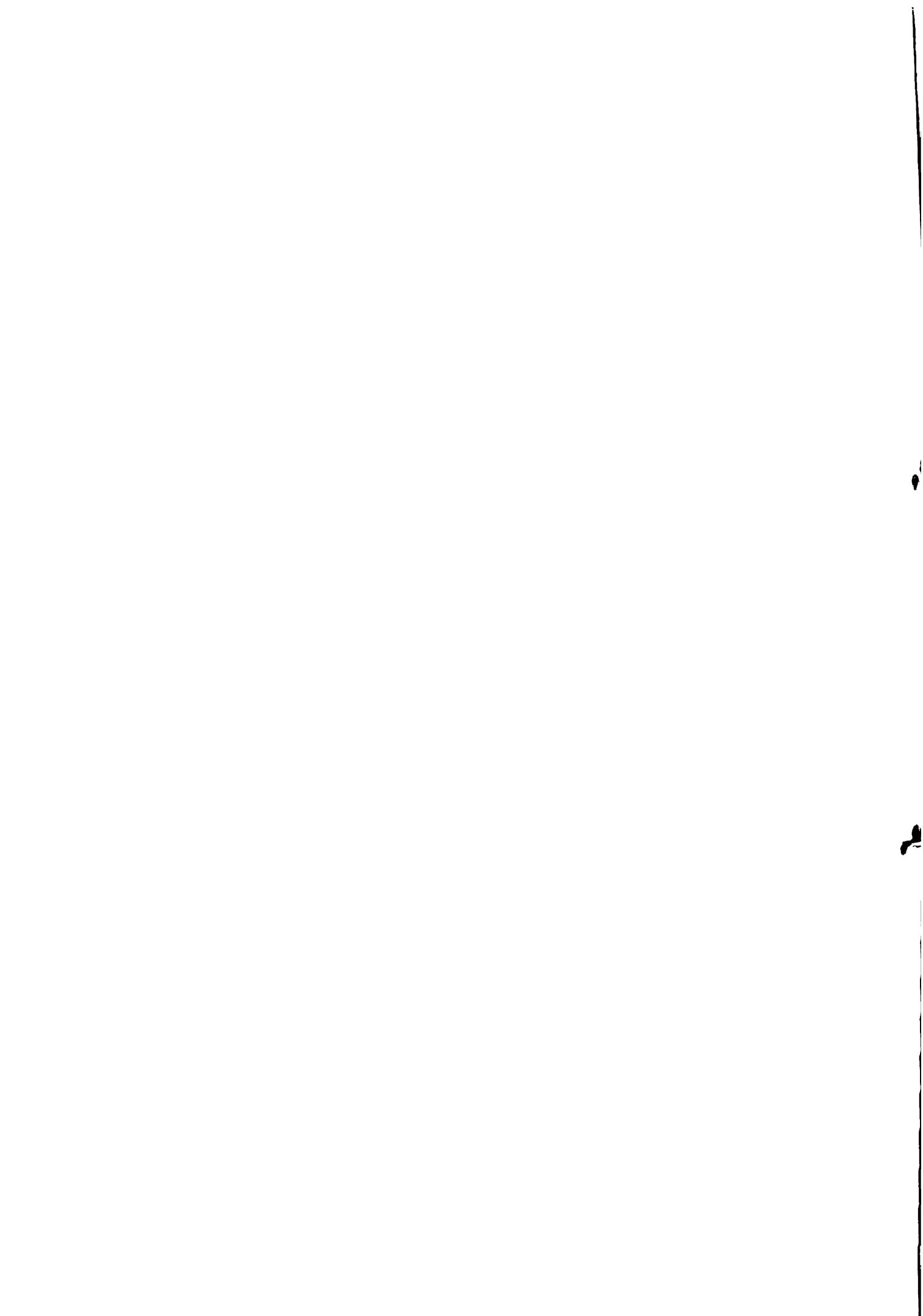
- Lavar la placa a utilizar una vez con agua destilada.
- Escurrir sobre papel absorbente.
- Colocar en cada pocillo de la placa 100 µl de anticuerpos de captura, en la dilución de uso, en tampón carbonato pH 9.6.
- Incubar 18 horas a 4°C.
- Retirar la placa del refrigerador 30 minutos antes de iniciar la prueba.
- Lavar 1 vez con solución salina fisiológica.
- Colocar en cada pocillo de la placa 100 µl de ovoalbúmina GV 1% en PBS.
- Incubar 1 hora entre 22-25°C a temperatura ambiente (TA).
- Lavar 1 vez con solución salina fisiológica.
- Escurrir sobre papel absorbente (*).

** En este momento las placas se pueden almacenar a -20°C. Para uso, descongelar 1 hora antes de la realización de la prueba.*

2.1.5.2 Identificación de Anticuerpos de la Fiebre Aftosa (Prueba de "screening")

Fase líquida y contacto con la fase sólida

- Siguiendo lo dispuesto en el cuadro 4, colocar 72 µl de tampón de dilución en las líneas A, C, E y G hasta la columna 08 de la placa auxiliar. En los pocillos A9, C9 y E9 colocar 100 µl de los controles preparados por separado. Colocar tampón de dilución en los pocillos de las líneas A, C y E, columnas 10, 11 y 12. Adicionar 40 µl en los pocillos G, columnas 09, 10, 11 y 12 –control de antígeno. En H (del 09 al 12) poner 80 µl de diluyente blanco.
- Agregar 08 µl de los sueros problemas (SP), SP1 hasta SP32. Homogeneizar bien y con una pipeta multicanal hacer la réplica de 40 µl cada una de las líneas siguientes, cambiando las punteras.
- Preparar en separado diluciones de los sueros controles, fuerte positivo 1:100 (C++), débil positivo 1:5 (C+) y negativo 1:5 (C-). Hacer diluciones en base 5 en la placa auxiliar, pasando 20 µl a los pocillos siguiente usando una pipeta multicanal con 3 punteras, desechando los 20 µl restantes.
- Después de bien homogeneizado, pasar 40 µl de A para B –cambiar las punteras, de C para D - cambiar las punteras, de E para F - cambiar las punteras. Tener cuidado al pasar de G para H, poner apenas 8 punteras y pasar los sueros hasta la columna 8, manteniendo los controles antígeno (CAg) y de blanco (Blanc).
- Colocar en toda la placa 40 µl de la dilución en uso (*) del antígeno O, A y C, menos en el control de blanco en la línea H, columnas del 09 al 12.
- Incubar durante 1 hora a 37°C, los primeros 20 minutos con agitación.
- Transferir 50 µl de la mezcla suero/antígeno de la placa auxiliar a la placa sensibilizada con suero de captura (fase sólida).
- Incubar 30 minutos a 37°C con agitación.
- Lavar 3 veces con solución de lavado.
- Colocar 50 µl de anticuerpos detectores.
- Incubar 30 minutos a 37°C con agitación.
- Lavar 3 veces con solución de lavado.
- Colocar 50 µl de conjugado en toda la placa, se indica el título en uso. Deben hacerse estudios de titulación sobre los conjugados comerciales, para ajustarse a la prueba.
- Incubar 30 minutos a 37°C con agitación.
- Lavar 4 veces con solución de lavado.
- Incubar en oscuridad 15 minutos a temperatura ambiente (25°C).
- Detener la reacción agregando 50 µl de ácido sulfúrico 3N en cada uno de los pocillos.



Lectura e interpretación

- Leer en lector de ELISA con filtro de 492 nm.
- Interpretación de los resultados.

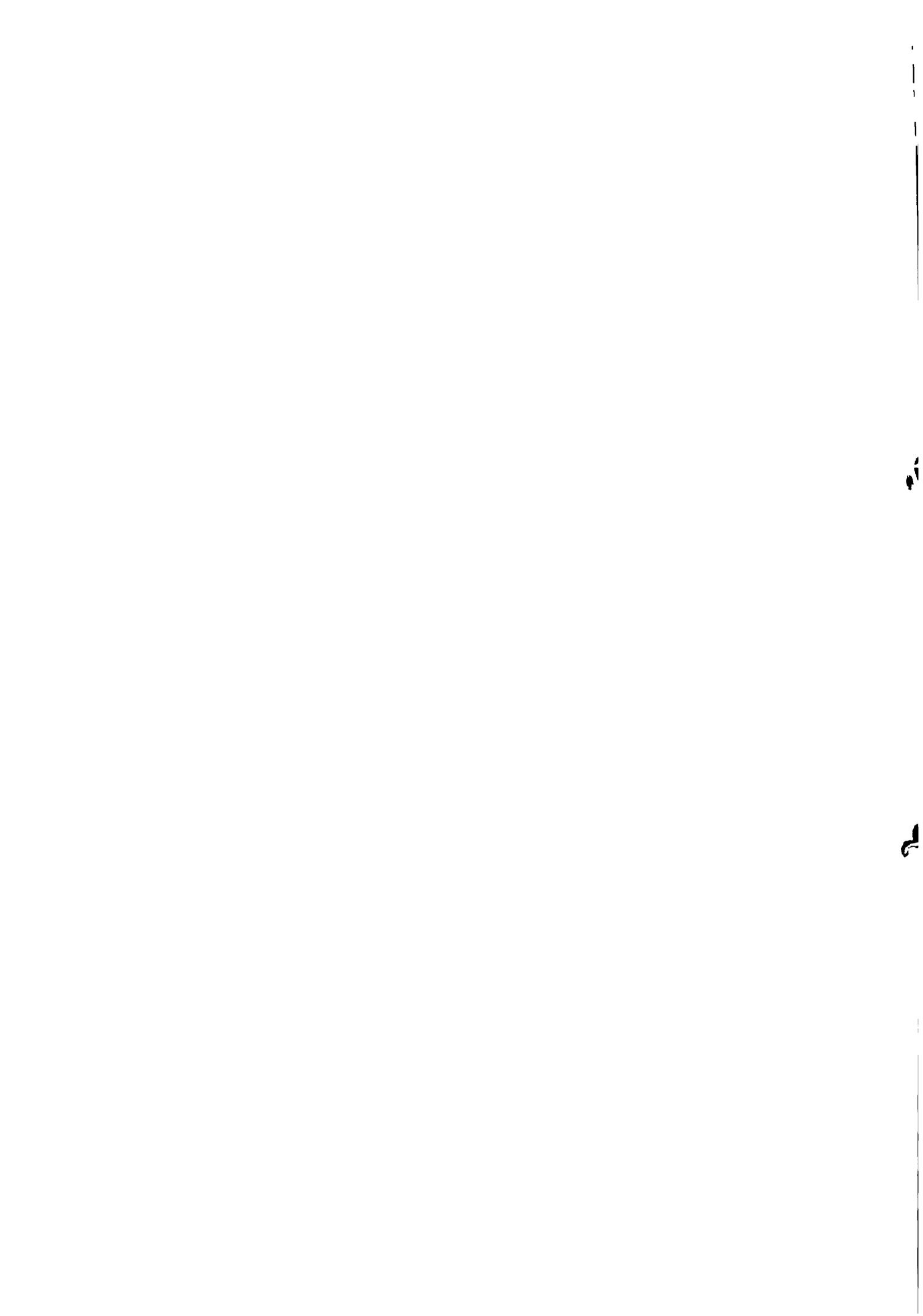
Cuadro 4

PRUEBA DE "SCREENING"

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	C++ 1:200	1: 1000	1: 5000	1: 25000
B	S1	S	S3	S4	S5	S6	S7	S8	C++ 1:200	1: 1000	1: 5000	1: 25000
C	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	C+ 1:10	1:50	1:250	1: 1250
D	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	C+ 1:10	1:50	1:250	1: 1250
E	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	C- 1:10	1:50	1:250	1: 1250
F	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	C- 1:10	1:50	1:250	1: 1250
G	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	C _{Ag}	C _{Ag}	C _{Ag}	C _{Ag}
H	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	C _{Ag}	Blanc	Blanc	Blanc

Protocolo: Para estudiar 32 sueros (S) y controles (C++, C+ y C-) en réplica.

- **Fase sólida (captura):** suero de conejo diluido (DIL) en tampón carbonato-bicarbonato 0.05M, pH 9.60, 18 horas. A 4°C.
- **Fase líquida:** sueros problemas en dilución fija 1:10 y antígeno FA O, A y C, en dilución recomendada. Dilución final de los sueros problema 1:20. Para controles fuerte positivo (++) , débil positivo (+) y negativo, preparar dilución justa basada en las indicaciones del Cuadro 4 (dilución final), haciendo diluciones adicionales en base 5 en la placa auxiliar. Incubar 20 minutos a 37°C con agitación y 40 minutos sin agitar.
- **Contacto:** transferir la mezcla suero-antígeno para la placa captura -30 minutos a 37°C con agitación.
- **Suero detector:** 30 minutos a 37°C con agitación.
- **Conjugado anti-cobayo:** 30 minutos a 37°C con agitación.
- **Sustrato:** OPD + H₂O₂: 15 minutos a 25°C.



- Para la reacción con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3N leer con filtro de 492 nm.
- Interpretación de los resultados.

2.1.5.3 Titulación de Anticuerpos de la Fiebre Aftosa (fase líquida y contacto con la fase sólida)

Materiales y reactivos (otros, ver Anexo 3.a)

- **Conjugado IgG de Cabra Anti IgG de Cobayo con Peroxidasa**

Peroxidasa + glutaraldehído + IgG.
Conjugados comerciales SIGNA, DAKO, o similar.

- **Antígeno Fiebre Aftosa (FA)**

Virus de referencia: 01 Campos Br-1/58, A24 Cruzeiro Br-1/55 y C3 Indaial Br-1/71, obtenido a partir de células BHK (baby hamster kidney), inactivado con BEI y tratados con 50% (v/v) de glicerol estéril. Fueron almacenados en alícuotas a -20°C.

- **Capturas**

Fiebre Aftosa: sueros hiperinmunes preparados en conejos, utilizando virus 01 Campos Br-1/58, A24 Cruzeiro Br-1/55 y C3 Indaial Br-1/71. cultivados en células BHK, inactivados con BEI y purificados por gradiente de cloruro de cesio. Almacenar en alícuotas de 0.20 a 3 ml, a -20°C.

- **Detectores**

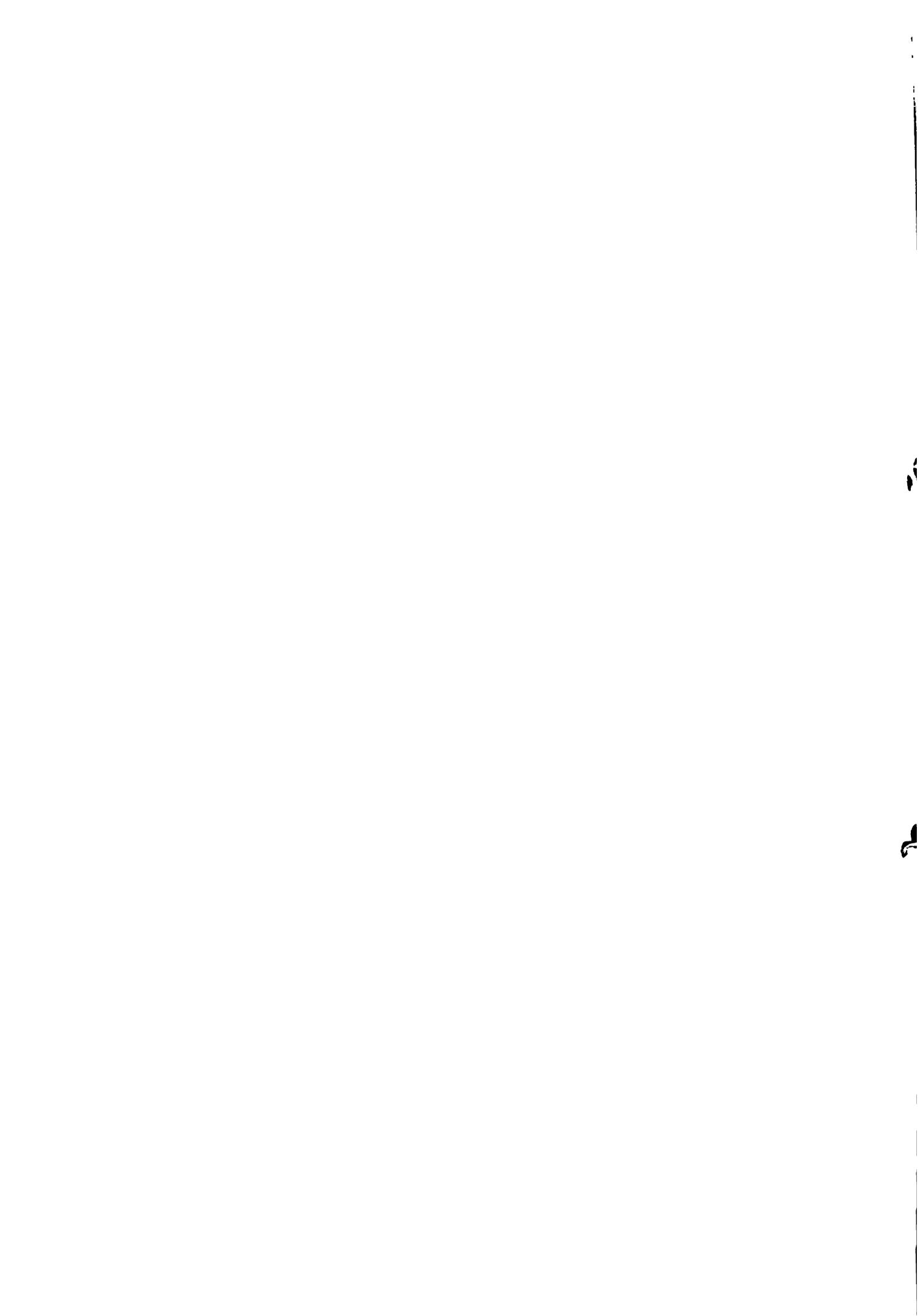
Fiebre Aftosa: sueros hiperinmunes preparados en cobayos, utilizando virus 01 Campos Br-1/58, A24 Cruzeiro Br-1/55 y C3 Indaial Br-1/71, adaptados a esta especie. Almacenar en alícuotas de 0.20 a 3 ml, a -20°C.

- **Sueros Controles de Prueba**

Control fuerte positivo (C++): pool de sueros de bovinos vacunados y revacunados con vacuna oleosa monovalente, almacenados a -20°C.

Control débil positivo (C+): pool de sueros de bovinos de área libre, mezclados con sueros de bovinos vacunados, almacenados a -20°C.

Control negativo: pool de sueros de bovinos de área libre de Fiebre Aftosa y Estomatitis Vesicular.

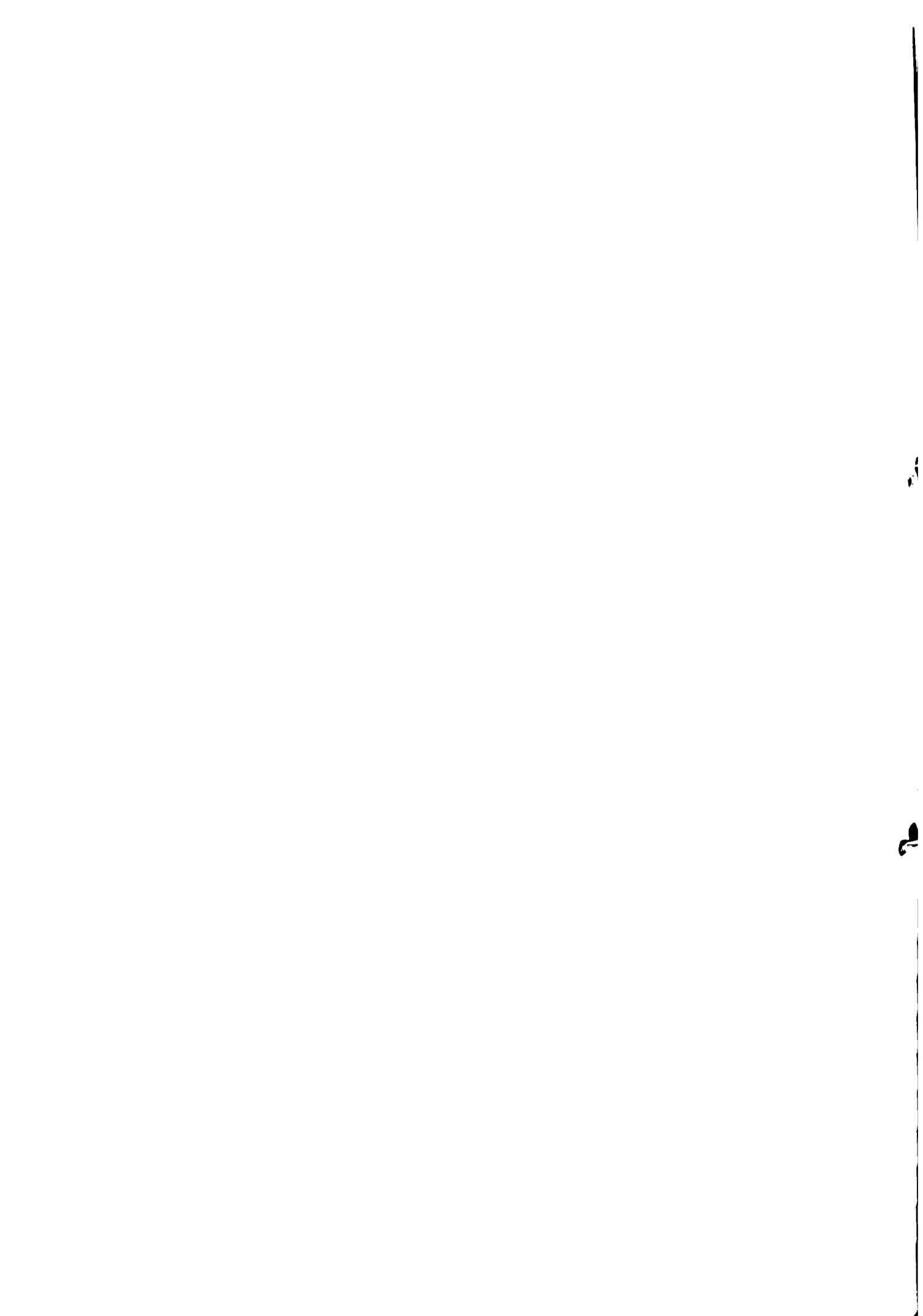


- **Muestras para Estudio**

Sueros de animales bien conservados, centrifugados, sin contaminación aparente por hongos o bacterias, almacenados a 4°C por tiempo corto y a -20°C si se almacenara por más de 2 semanas.

Procedimiento

- Siguiendo lo dispuesto en el cuadro 5, en la placa auxiliar colocar 80 µl de tampón de dilución en las líneas A, C, E y G, columnas 02, 03, 04, 06, 07, 08, 10, 11 y 12. En las líneas A, C, E y G, columnas 01 y 05, colocar 90 µl de diluyente; en el pocillo A 09 no poner diluyente y en los pocillos C y E 09, 80 µl de diluyente. En el pocillo G, columnas 09 al 12, colocar 40 µl de diluyente –control de antígeno. Poner 80 µl de diluyente en la línea H, columnas 09 al 12 –control de blanco.
- Agregar 10 µl de los sueros problemas en los pocillos de las líneas A, C, E y G, columnas 01 y 05. En los controles débil positivo (C+) y negativo (C-), colocar 20 µl puro (1:1), pocillos C 09 y E 09, respectivamente. Añadir 100 µl del control fuerte positivo (C++) en la línea A, columna 09, listo en separado en la dilución 1:100.
- Hacer diluciones en base 5, pasando 20 µl de los pocillos a las columnas siguientes, usando una pipeta multicanal con 4 punteras (columnas 01 al 04), desechando los 20 µl restantes de solución con las punteras antes de pasar a otra columna (de 05 al 08), desechando los 20 µl restantes también con las punteras. En los controles, columnas 09 líneas A, C y E, usar apenas 3 punteras, (de las columnas 09 al 12). Dilución inicial de los sueros en estudio: 1:10, 1:50, 1:250, 1:1 250. Dilución inicial de los controles: (C++) 1:100, 1:500, 1:2 500, 1:12 500, (C+) y (C-) 1:5, 1: 25, 1:125, 1:625.
- Después de bien homogeneizado, pasar 40 µl de la línea A para B –cambiar las punteras, de C para D – cambiar las punteras, de E para F -- cambiar las punteras. Tener cuidado pasando de G para H, poniendo apenas 08 punteras, pasando los sueros hasta la columna 08, manteniendo los controles de antígeno (CAg) y de blanco (blank).
- Colocar 40 µl de antígeno O, A y C en la dilución recomendada en toda la placa auxiliar, **menos en el control de blanco H (09 al 12)**. Quedarán en una dilución final: sueros en estudio (SP) 1:20, 1:100, 1:500 y 1: 2 500, los controles débil positivo (C+) y negativo (C-) 1:10, 1:50, 1:250 y 1:1 250 y el control fuerte positivo (C++) 1:200, 1:1 000, 1:5 000 y 1:25 000.
- Incubar durante 1 hora a 37°C, los primeros 20 minutos con agitación.
- Transferir 50 µl de la mezcla suero/antígeno de la placa auxiliar a la placa sensibilizada con suero de captura (fase sólida).



- Incubar 30 minutos a 37°C con agitación.
- Lavar 3(tres) veces con solución de lavado.
- Colocar 50 µl de anticuerpos detectores, en la dilución de uso.
- Incubar 30 minutos a 37°C con agitación.
- Lavar 3 (tres) veces con solución de lavado.
- Colocar 50 µl de conjugado en toda la placa, en la dilución de uso.
- Incubar 30 minutos a 37°C con agitación.
- Lavar 4 (cuatro) veces con solución de lavado.
- Colocar 50 µl del sustrato en toda la placa.
- Incubar en oscuridad 15 minutos a temperatura ambiente (25°C).
- Detener la reacción, agregando 50 µl de ácido sulfúrico 3N a cada uno de los pocillos.
- Leer en el lector de ELISA con filtro de 492 nm.
- Interpretación de los resultados.

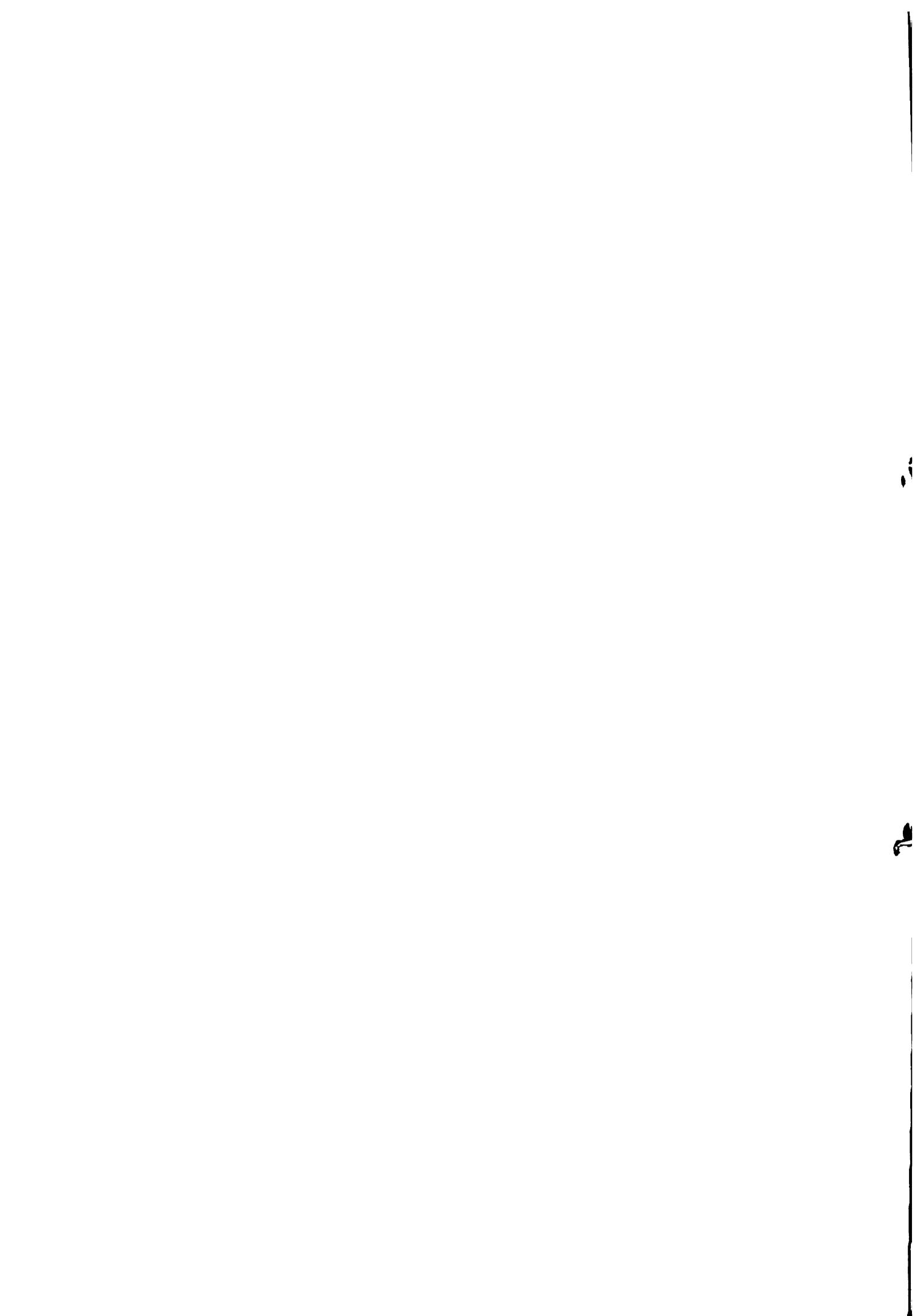
CUADRO 5

TITULACION DE ANTICUERPOS DE LA FIEBRE AFTOSA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1:20	1:100	1:500	1: 1500	S5	S5	S5	S5	C++ 1:200	1: 1000	1: 5000	1: 25000
B	S1 1:20	1:100	1:500	1: 1500	S5	S5	S5	S5	C++ 1:200	1: 1000	1: 5000	1: 25000
C	S2	S2	S2	S2	S6	S6	S6	S6	C+ 1:10	1:30	1:250	1: 1250
D	S2	S2	S2	S2	S6	S6	S6	S6	C+ 1:10	1:30	1:250	1: 1250
E	S3	S3	S3	S3	S7	S7	S7	S7	C- 1:10	1:30	1:250	1: 1250
F	S3	S3	S3	S3	S7	S7	S7	S7	C- 1:10	1:30	1:250	1: 1250
G	S4	S4	S4	S4	S8	S8	S8	S8	C _{Ag}	C _{Ag}	C _{Ag}	C _{Ag}
H	S4	S4	S4	S4	S8	S8	S8	S8	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc

Protocolo: Para estudiar 8 sueros (S) y controles (C++, C+ y C-) en réplica.

- *Fase sólida (captura):* suero de conejo diluido (DIL) en tampón carbonato-bicarbonato 0.05M, pH 9.60, 18 horas. a 4°C.
- *Fase líquida:* sueros problemas en dilución fija 1:10 y antígeno FA O, A y C, en dilución recomendada. Dilución final de los sueros problema 1:20 B5. Para controles fuerte positivo (++), débil positivo (+) y negativo, preparar dilución



justa basada en las indicaciones del Cuadro 5 (dilución final), haciendo diluciones adicionales en base 5 en la placa auxiliar. Incubar 20 minutos a 37°C con agitación y sin agitación.

- **Contacto:** transferir la mezcla suero-antígeno para la placa captura –30 minutos a 37°C con agitación.
- Suero detector: 30 minutos a 37°C con agitación.
- Conjugado anti-cobayo: 30 minutos a 37°C con agitación.
- Sustrato OPD + H₂O₂: 15 minutos a 25°C.
- Para la reacción con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3N leer con filtro de 492 nm.
- Interpretación de los resultados.

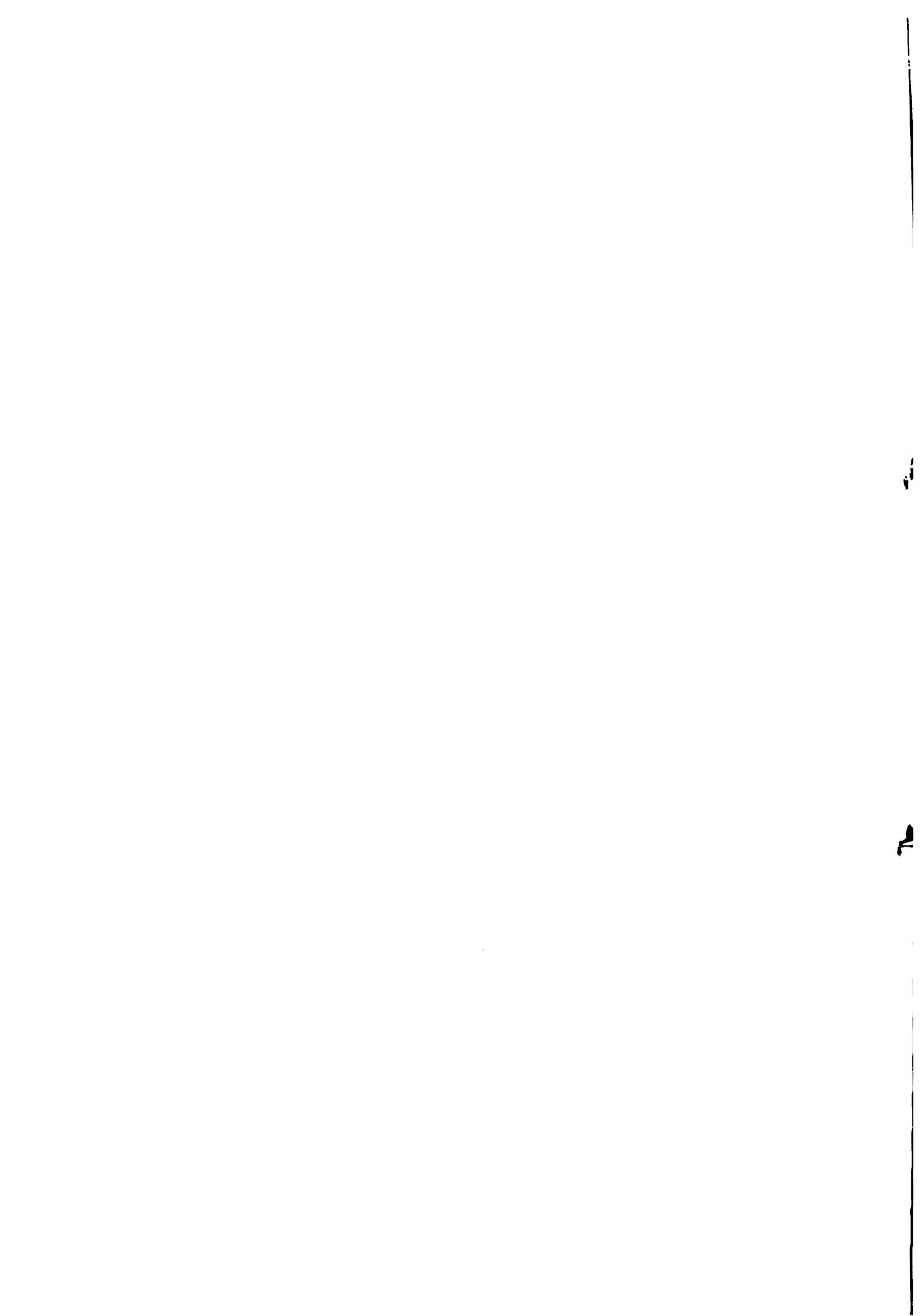
Interpretación de los Resultados

A. Identificación de anticuerpos de la Fiebre Aftosa (Prueba de “screening”)

- Leer la placa en lector con filtro de 492 nm, substrayendo el valor de densidad óptica (DO) del control blanco a todas las lecturas.
- Calcular la media de los valores de DO de cada muestra problema y del control de antígeno.
- Calcular el título 50% del suero control positivo y negativo y confirmar que ellos están satisfactorios.
- Muestras con medias de DO con valores superiores a la mitad del valor medio obtenido en el control de antígeno, son consideradas **negativas**.
- Muestras con medias de DO con valores inferiores a la mitad del valor medio obtenido en el control de antígeno, son consideradas **positivas**.
- Muestras con medias iguales a la mitad del valor medio obtenido en el control de antígeno, serán estudiadas de nuevo por titulación, confirmadas por prueba de virus neutralización y evaluadas en su **contexto epidemiológico**.

B. Cálculo del título 50% de un suero en ELISA Competición en fase líquida (CFL) (Interpolación Linear-Pruebas de titulación)

- Calcular la media de DO del control de antígeno (X). Obtener 50% de este valor medio (Y).
- Elegir la lectura superior (A) y la inferior (B) al valor medio obtenido anteriormente (Y) y restar una de la otra (Z).
- Restar del valor (Y) la lectura inferior (B).
- Multiplicar el valor obtenido en (3), por el logaritmo el factor de dilución (Factor de dilución 5 = 0.7) (C).
- Dividir el valor obtenido en (4), $\{(Y - B) C\}$ por el valor Z.
- Sumar el valor obtenido en (5) con el logaritmo de la dilución de la lectura inferior (D).



$$Y = \frac{X}{2}$$

$$TIT. 50\% = \frac{(Y - B) C + D}{Z}$$
$$Z = A - B$$

- Sueros con título superior a 1.30, son considerados positivos.

2.1.6 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE ELECTROTRANSFERENCIA (EITB)

Reacción inmunoenzimática a ser aplicada en tiras de nitrocelulosa con antígenos no estructurales del VFA ya transferidos y fijos.

A continuación se describe el protocolo de trabajo de trabajo a seguir para analizar 15 sueros problema (1 gel)

2.1.6.1 *Materiales y reactivos (reactivos, Anexo 3.b)*

- 24 tiras de nitrocelulosa con los antígenos transferidos (4 de ellas serán utilizadas con los sueros controles).
- 40 ml de buffer de saturación.
- 1 pinza.
- 3 bandejas para incubar las tiras, muy bien lavadas con agua bidestilada.
- 1 pipeta automática de 1 000 μ l (en su defecto, pipeta de 1 ml).
- 1 pipeta automática de 200 μ l.
- 1 pipeta automática de 20 μ l.
- Tips (para las mencionadas anteriormente).
- 3 vasos de precipitado (o semejante) de aproximadamente 150/250 ml.
- Shaker tipo Rocket oscilante
- 1 piceta
- 100 ml de Buffer de lavado 10X. Para 1 gel, aproximadamente 500 ml de buffer de lavado 1X.
- Toallas de papel.
- Probeta de 1 litro.
- Probeta de 200 ml.
- Probeta de 100 ml.
- Pipetas de vidrio.
- Medidor de pH
- Anti IgG bovina conjugada a fosfatasa alcalina.
- 100 μ l NBT (Nitro Blue Tetrazolium).

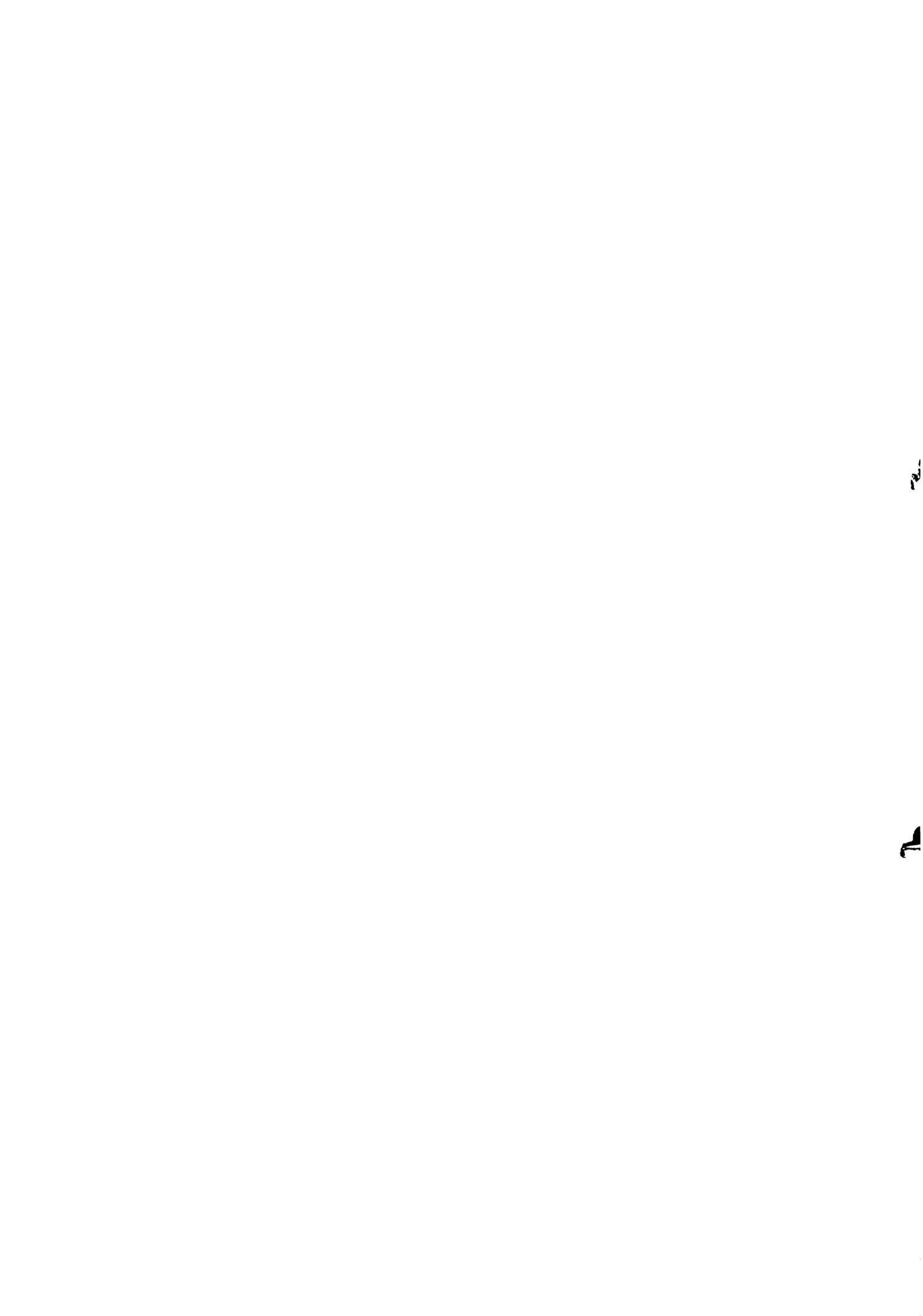
100

100

- 50 μ l BCIP (5-Bromo, 4-Chloro, 3-Indolyl Phosphatase).
- 14 μ l ml de Buffer Sustrato.
- Agua bidestilada (aproximadamente 1 litro).
- Sueros controles.
- Sueros problemas.

2.1.6.2 Procedimiento

- Ubicar las tiras ya cortadas (3 mm de ancho) en las calles de las bandejas, con el auxilio de una pinza (la nitrocelulosa no se debe tocar con las manos).
- Colocar sobre cada tira 0.8 ml de Buffer de saturación, cuidando de que las tiras queden bien sumergidas.
- Colocar las bandejas sobre el Shaker oscilante a una velocidad de aproximadamente 10 segundos para completar una subida y una bajada (selector de velocidad entre 5-6 en el Shaker. Dejar incubando por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Pipetear los sueros en dilución 1:200 o sea 4 μ l de cada suero en cada pocillo con 0.8 ml de Buffer de saturación).
- Incubar con agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Acabada la incubación, lavar las tiras. Se descarta el buffer de saturación con el suero. Luego con ayuda de una piceta, enjuagar las tiras con buffer de lavado 1x, y luego secar un poco las bandejas golpeándolas sobre papel toalla. Enjuagar las tiras nuevamente con abundante buffer. Dejar lavando por 5 minutos con agitación. Cambiar el buffer de lavado 2 veces más dejando, cada vez, 5 minutos en agitación.
- Preparar la dilución apropiada de conjugado exactamente en el momento de usar (para el lote actual, se usa dilución 1:5000. Pipetear 3 μ l de conjugado en 15 ml de buffer de saturación -usar tips nuevos-1). Descartar el buffer de lavado de las bandejas, secarlas golpeando en las toallas de papel y adicionar 600 μ l por tira de la dilución de conjugado. Incubar por 60 minutos con agitación.
- Lavar las tiras 3 veces por 5 minutos en buffer de lavado (de la misma forma en que se hizo anteriormente).
- En el momento de usar (y no antes) adicionar a 12 ml de buffer sustrato, 86 μ l de NBT y luego de agitar bien, 43 μ l de BCIP (ambos deben agregarse lentamente y agitando) Agregar 500 μ l de esta mezcla a cada tira y luego incubar con agitación durante 15 minutos.
- Acabada la incubación descartar el líquido y lavar las tiras con agua deionizada. Escurrir bien y colocar las tiras, con ayuda de una pinza encima de un papel secante.
- Dejar secar y pegar con cinta adhesiva mágica.



OBS: Cada gel transferido contiene 20 tiras. Para una mejor interpretación de los resultados se usan los sueros controles todas las veces que se usan diferentes geles. Por ello por cada 15 sueros problema, se utilizan 5 controles y 1 gel.

Lavado de bandejas

Para reutilizar las bandejas, lavarlas según siguiente protocolo:

- Inmediatamente luego de su uso, sumergir las bandejas en una solución de Hipoclorito al 5%. Dejar toda la noche.
- Enjuagar muy bien con agua corriente.
- Enjuagar muy bien con agua desmineralizada.

2.1.7 INVESTIGACIÓN DE PORTADORES SANOS AISLAMIENTO DE VIRUS AFTOSO DE LÍQUIDO ESÓFAGO-FARÍNGEO – OP –

2.1.7.1 Instrucciones para la toma de líquido Esófago-Faríngeo (LEF) y procedimiento.

Equipos y materiales

Congelador Revco (-70°C)

Congelador (-70°C)

Refrigerador

Centrífuga refrigerada

Homogenizador eléctrico (Virtis) y accesorios

Destilador de agua. Desmineralizador de agua

Cubetas para baño de hielo

Cajas térmicas

Copas probang

Gradillas para tubos de ensayo y de centrífuga

Botellas para cultivos de células (botellas dilución de leche)

Frascos erlenmeyer graduados varios volúmenes

Beakers, varios volúmenes

Pipetas serológicas 1.5 y 10 ml

Columnas graduadas, varios volúmenes

Pipetas automáticas Conwall 5 y 10 ml

Pipetas pasteur

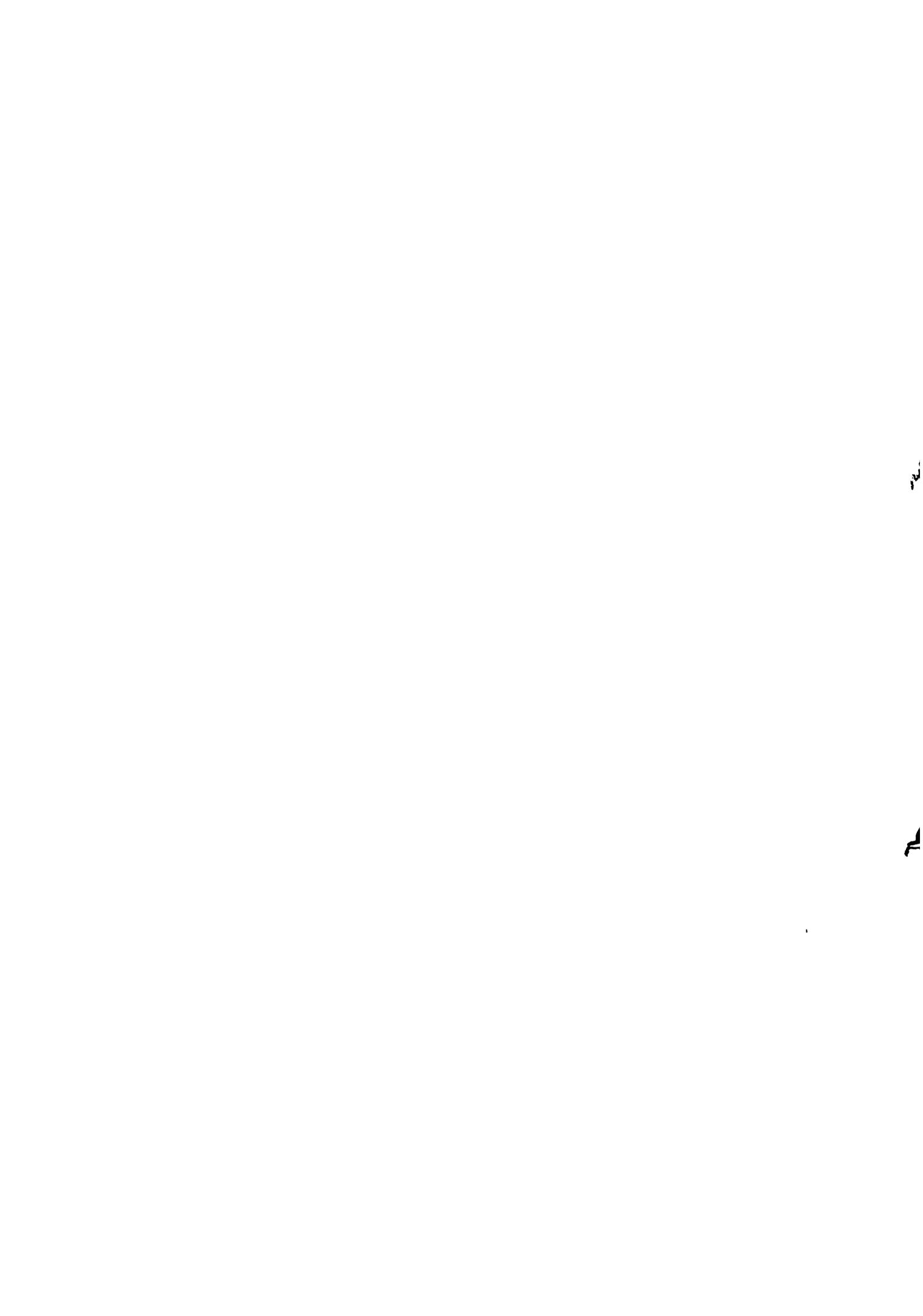
Tubos de ensayo 20 lm

Tubos para centrifugar refrigerada

Peras propipeta

Tapones de caucho

Triclorotrifluor etano T.T.E.



Medios para crecimiento de células
Medios para mantenimiento de células
Soluciones de transporte de muestras
Líneas celulares
Cultivos primarios de células
Antibióticos
Fungistáticos
Cinta elástica, cinta adhesiva
Alcohol – hielo seco
Acido cítrico

Método

Preparar el equipo para tomar muestra.

Mantener el ganado sin agua ni comida por lo menos durante 12 horas antes a la toma de muestras. Suministrar agua para beber 1 hora antes para evitar la presencia de alimento en la muestra y para lubricar el tracto digestivo. Es conveniente tomar las muestras en las horas de la mañana.

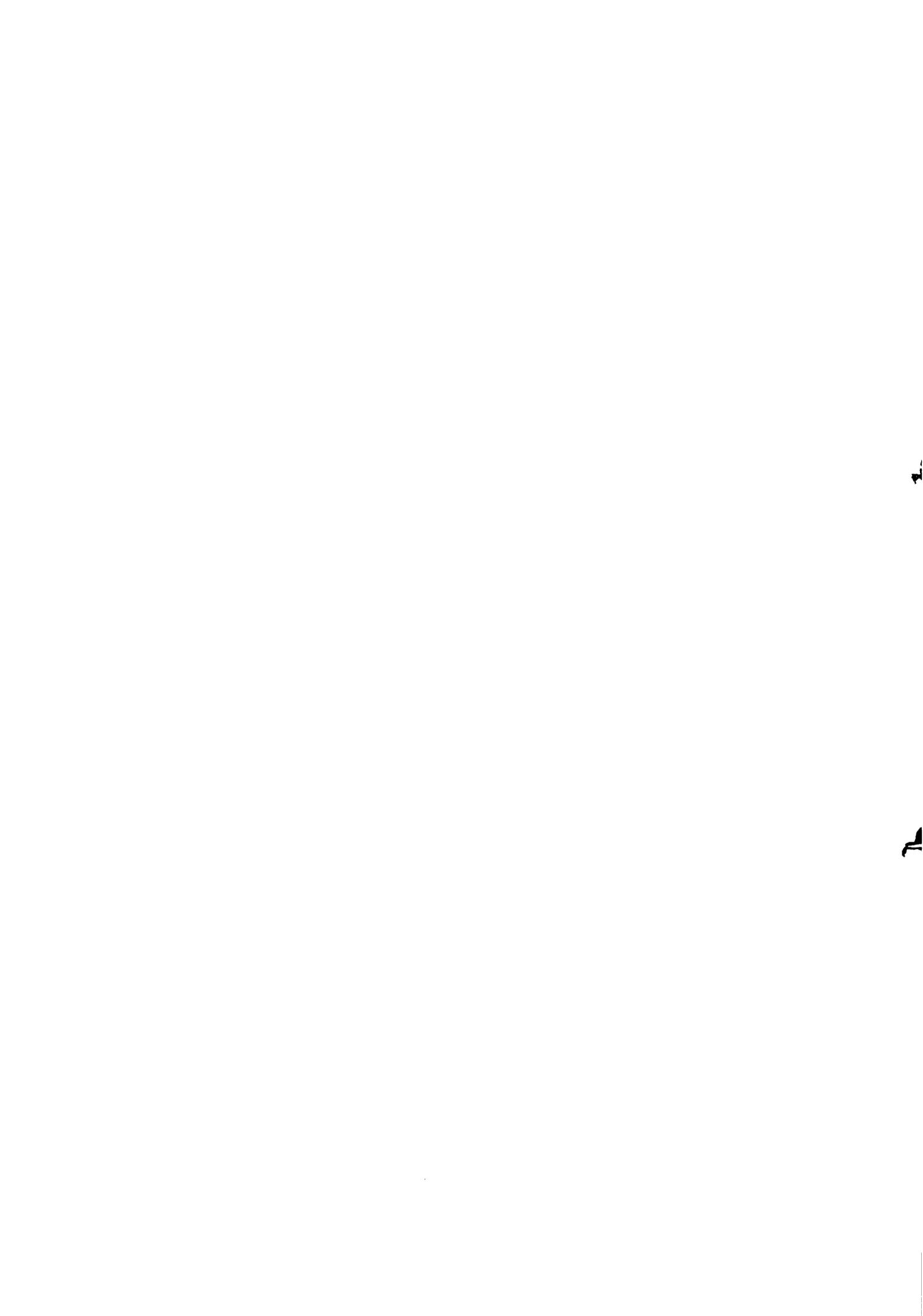
Con la copa de probang del tamaño apropiado, obtener una muestra del líquido de la faringe y de la porción anterior del esófago. Para ello, introducir la copa por la boca y haciendo poca presión el animal la deglute, deslizar la copa hacia arriba y hacia abajo a la altura de los órganos mencionados por 3 o 4 veces (mayor número de veces puede estimular regurgitación), tratando de hacer un ligero raspado de la mucosa. Evitar el sangrado del animal. Extraer la copa sin causar traumatismo. Obligar al animal a mantener la boca abierta mientras se extrae la copa firme pero no bruscamente y sin derramar el contenido.

La operación puede repetirse pero se aumenta el riesgo de causar lesiones. Si ocurre la presentación de bolo alimenticio (regurgitación) se puede echar pequeñas cantidades de agua en la boca del animal para estimular la deglutación antes de intentar una nueva toma.

Cuando se debe utilizar la misma copa para muestrear varios animales se recomienda lavarla con agua potable entre 2 tomas.

Para ello se recomienda el uso de desinfectantes porque deben quedar residuos en la copa que podrían inactivar el virus.

Mezclar el líquido colectado con un volumen aproximadamente igual de la solución de transporte (Medio Mantenimiento Celular). Tapar, identificar y sellar el tubo. Sellar con cinta elástica eléctrica para evitar la entrada de CO₂ que puede alterar la muestra. Agitar vigorosamente, congelar en una mezcla de hielo seco y alcohol,



rotando el tubo para una congelación uniforme. Mantener en congelación en una caja térmica con hielo seco hasta la llegada al laboratorio.

Procesar las muestras lo más pronto posible después de la toma. Si no se procesan a la llegada del laboratorio se deben conservar a -70°C .

2.1.7.2 Instrucciones para el procesamiento de muestras de líquido Esófago – Faringeo (LEF)

Preparar los equipos y materiales necesarios

Descongelar las muestras OP y mantener en baño con hielo

En un vaso de homogenizar colocar cada muestra, adicionar tricloro-trifluoreno (T.T.E.) en un 60% de su volumen. Homogenizar la mezcla a alta velocidad por 2 o 3 minutos en un homogenizador tipo Virtis, o en su defecto usar un molino de tejidos durante 10 a 20 minutos. El material debe quedar homogéneo y de aspecto viscoso. Colocar las muestras homogenizadas en tubos para centrifuga. Evitar el calentamiento en todos los pasos usando los baños con hielo.

Centrifugar a 10.000 RPM por 20 a 30 minutos en centrífuga refrigerada a 40°C .

Remover el líquido acuoso sobrenadante evitando remover el centrifugado que consiste en una masa gelatinosa.

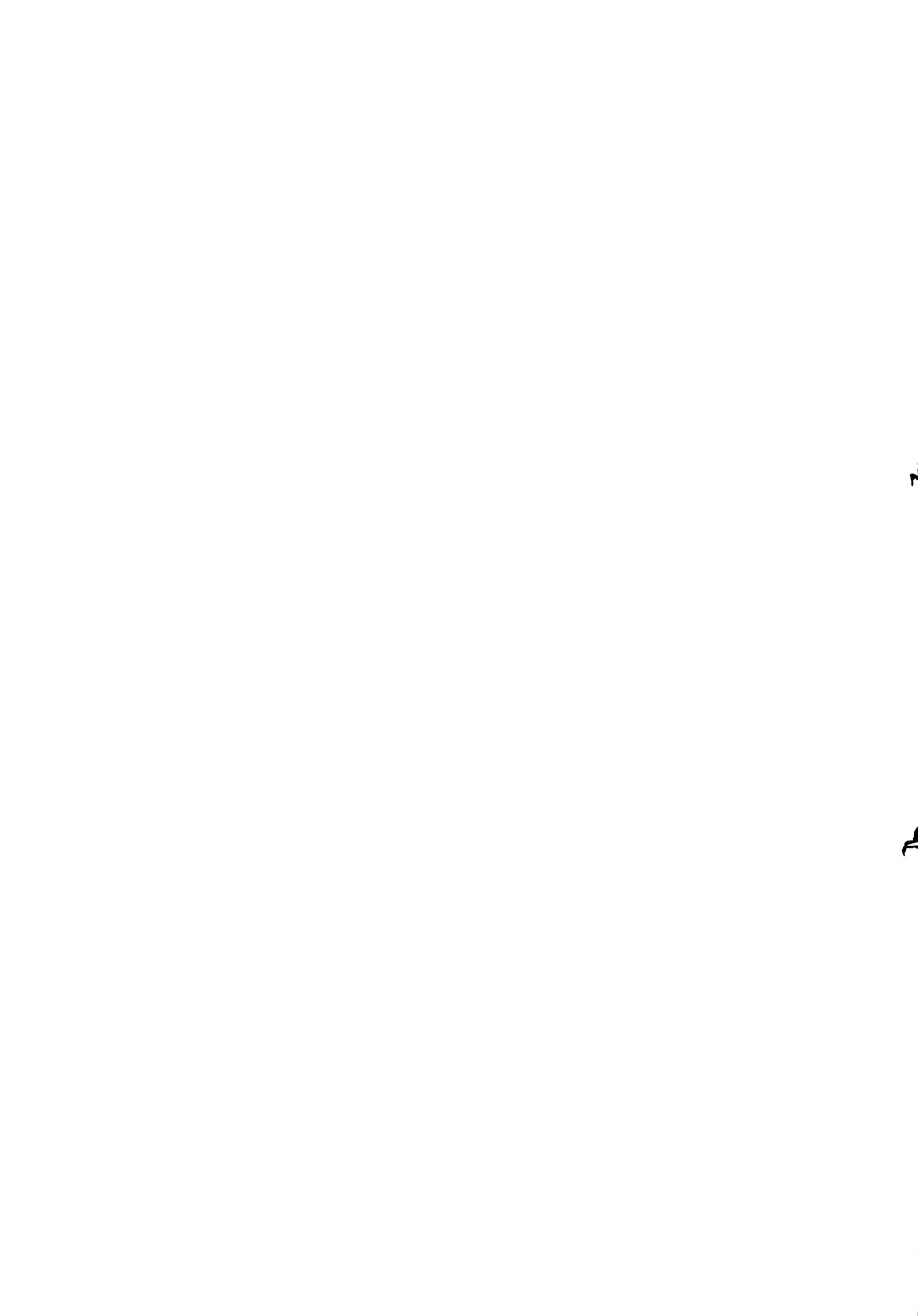
Inocular cultivos y ratones lactantes con el líquido sobrenadante.

Cuando se utiliza una misma copar para varias muestras se recomienda lavar con agua destilada y desinfectada con una solución de ácido cítrico al 0.05% y nuevamente lavar con agua destilada 5 veces antes de ser usada para homogenizar una nueva muestra.

Igualmente se deben lavar y desinfectar el eje y las cuchillas del homogenizador. Cuando se utilizan los molinos de vidrio se recomienda utilizar uno estéril para cada muestra.

2.1.7.3 Inoculación en cultivos celulares

Deben usarse cultivos celulares en monocapa con una confluencia mínima del 80% de las líneas celulares BHK₂₁, CL₁₃, IBRS₂, MVPK y PK₁ con 48 a 72 horas de crecimiento o cultivos primarios de células de riñón o tiroides fetales bovinos de 5 a 7 días de crecimiento. Monocapas que presentan sobrecrecimiento de células (con festones) no deben usarse. Las células empleadas deben ser de reciente preparación, cada muestra en proceso es inoculada como mínimo en dos botellas tipo dilución de leche de 4 onzas, de vidrio, con células cultivadas según sus características.



El volúmen del inóculo debe ser de 1 ml. por botella, colocado directamente sobre las células a las que se les ha descartado previamente el medio de crecimiento que contiene suero y se lavan con una solución isotónica estéril (Earle's o medio de mantenimiento). La inoculación del material en proceso puede hacer sobre el medio de mantenimiento, el cual ha sido colocado después de lavar la monocapa. Este procedimiento se recomienda cuando se sospecha toxicidad del inóculo para las células, así se atenúa el efecto.

Se llevan a incubación por 48 horas a 37°C. La adsorción se hace durante las primeras horas de este tiempo.

Se recomienda dejar las células con la solución de lavado durante 30 a 60 minutos antes de ser inoculadas con las muestras correspondientes. Descartar la solución de lavado.

Mantener los cultivos celulares inoculados en absorción a 37°C por 60 minutos

Agregar 10 ml. de un medio de mantenimiento con antibióticos calentado a 37°C (para evitar shock celular por cambios de temperatura).

Incubar a 37°C por 48 horas congelar hacer pasaje. Puede hacerse primer pasaje ciego a las 48 horas en las respectivas células utilizadas pero si es posible se recomienda observar los cultivos a las 24 y 48 horas para controlar contaminación de los materiales en proceso.

Si se detecta contaminación se debe congelar el material y pasar a través de filtro Millipore GSWP 0.22 μ adaptado a jeringa después de descongelado y centrifugado a 40°C.

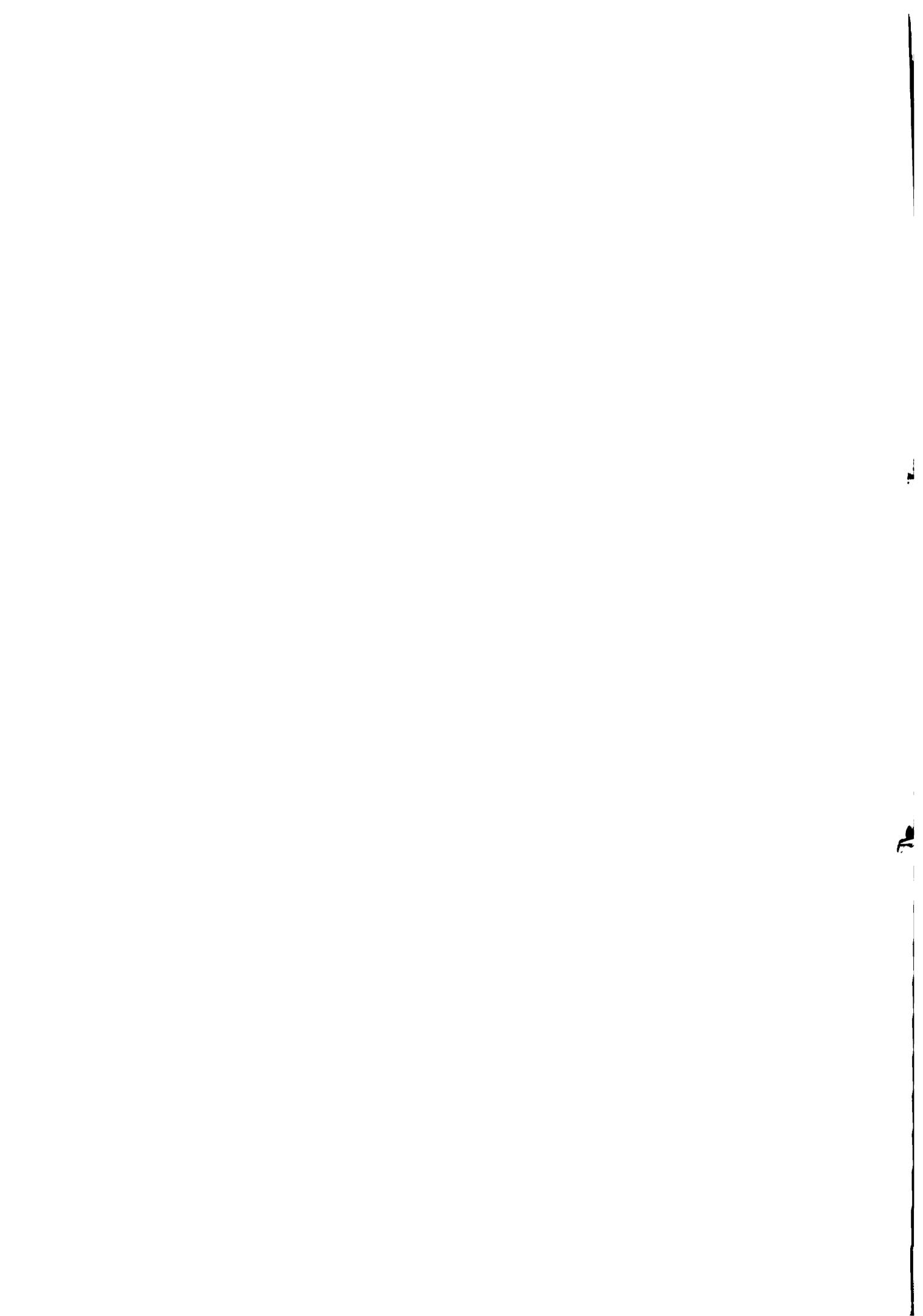
Lectura e interpretación

Hacer 3 pasajes seriados en los respectivos cultivos celulares con 48 horas de inoculación. Lecturas a 24 y 48 horas. Si se detecta efecto citopatogénico (ECP) congelar los cultivos cuando presentan un ECP del 60% o más o cuando completen 48 horas de inoculación.

Remitir una muestra del material a serología para fijación de complemento (FC) . Determinar si es virus de Fiebre Aftosa y el tipo a que pertenece.

Estudios subsiguientes se realizan cuando sean requeridos

Si el ECP es realmente bajo (menos del 40%) se recomienda hacer otros pasajes hasta obtener una replicación de virus que permita su tipificación.



Generalmente el virus aftoso se revela en los 2 primeros pasajes. Si no se observa ECP en los 3 primeros pasajes se puede dar por terminado el proceso o si se requiere se realizan otros cultivos o se inoculan en ratones lactantes.

Congelar los cultivos para causar rompimientos celulares y liberación de posibles partículas virales.

Descongelar y mantener en baño de hielo.

Inocular 1-2 ml del material en una nueva monocapa del tipo de células correspondientes, continuar siguiendo el procedimiento para el primer pasaje

Conservar en congelación (-70°C), una pequeña muestra de cada pasaje, debidamente identificada hasta terminar la prueba por si ocurre algún incidente.

3. CONTROL DE VACUNAS

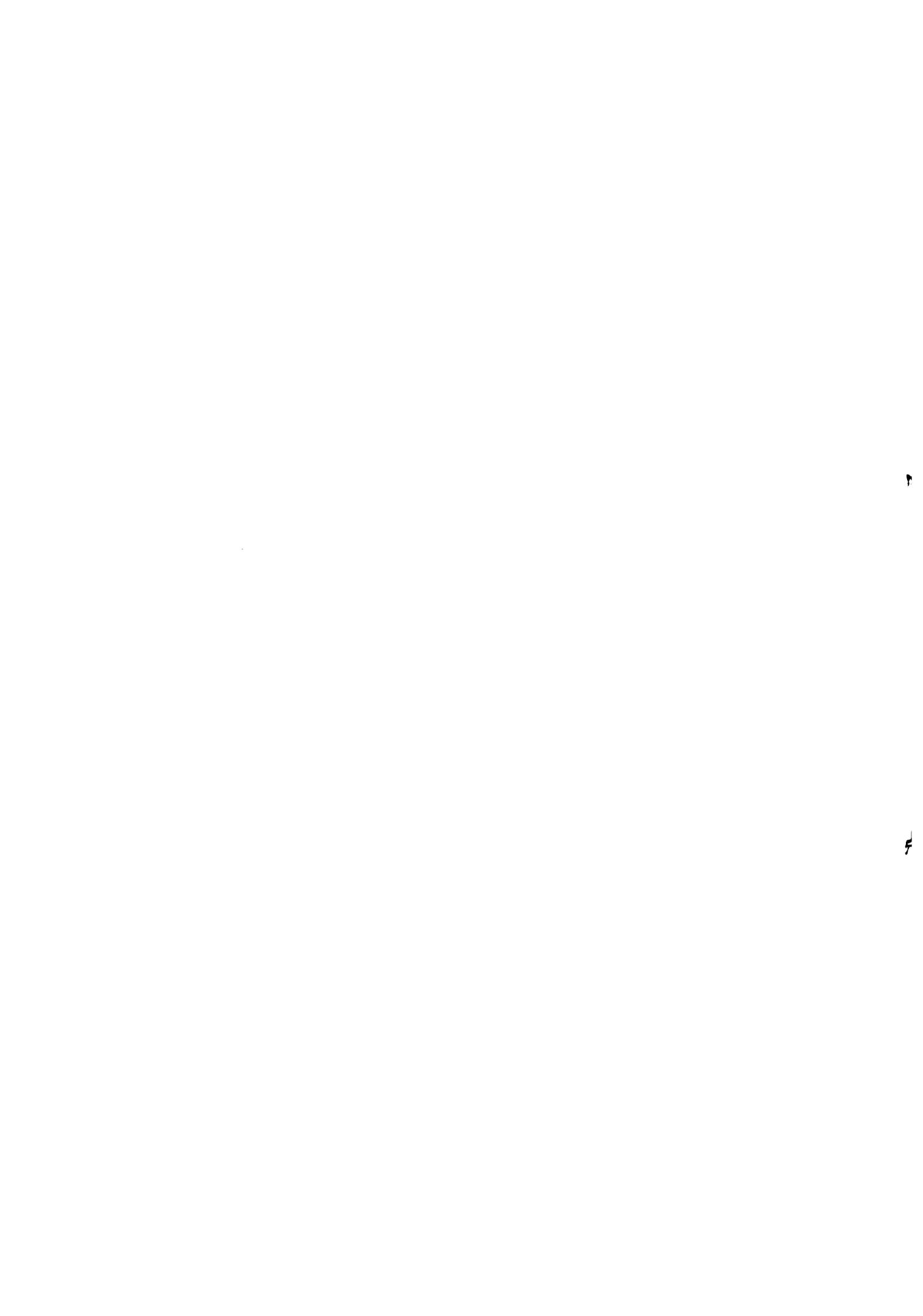
3.1 Desarrollo de un ELISA para identificar y cuantificar anticuerpos de Fiebre Aftosa.

Con el objeto de apoyar los servicios de diagnóstico, fue desarrollada una prueba de ELISA de competición en fase líquida (ELISA CDL-FA), para identificar y cuantificar anticuerpos de la Fiebre Aftosa en sueros de especies susceptibles (principalmente bovinos)

La rapidéz y sensibilidad de la prueba y la utilización de antígenos inactivados hacen que sea un instrumento muy valioso para evaluar niveles de anticuerpos en poblaciones animales en laboratorios convencionales

PANAFTOSA inició el desarrollo de esta técnica en 1988, tomando como base la metodología propuesta por Mc Collough *et al.* 1985 y Hamblin *et al.* 1986, con la finalidad de medir el nivel de anticuerpos en sueros de animales vacunados para definir su grado de protección. Igualmente, se aplicó para detectar anticuerpos específicos de Fiebre Aftosa en sueros de animales de campo.

Esta técnica fue utilizada en el desarrollo del Proyecto de la Cuenca del Río de la Plata, financiado por la Comunidad Económica Europea (CEE), con participación de Argentina, Brasil y Uruguay a través del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA), con la finalidad de ser usada para el control de potencia de vacunas.



En este proyecto se comparó la ELISA CFL-FA con anticuerpos policlonales y monoclonales, la virus neutralización en células con monocamadas preformadas y en suspensión y la protección a la generalización podal en bovinos (PGP), siendo esta última la prueba de referencia.

Todos los procedimientos de trabajo para esta técnica están descriptos en el protocolo de la prueba de ELISA CFL-FA para control de potencia de vacuna antiaftosa.

3.2 Materiales y reactivos (otros, ver Anexo 3.a)

- Placas
- Lavador de placas
- Estufa 37° C
- Agitador de placas
- Agitador de tubos
- Tubos de vidrios y soportes de tubos
- Micropipetas y cubetas
- Espectrofotómetro
- Agua destilada
- Muestras para estudio
- Antígeno de referencia
- Sueros de referencia control positivo y negativo
- Captura - sueros hiperinmunes de conejo
- Suero detector - sueros hiperinmunes de cobayos
- Conjugado
- Tampón de dilución
- Solución de lavado
- Tampón carbonato/bicarbonato
- Substrato
- Acido sulfúrico 3N
- Ovoalbúmina G II, y G V

- **Antígeno Fiebre Aftosa (FA)**

Virus de referencia: 01 Campos Br-1/58, A24 Cruzeiro Br-1/55 y C3 Indaial Br-1/71, obtenido a partir de células BHK (baby hamster kidney), inactivado con BEI y tratados con 50% (v/v) de glicerol estéril. Fueron almacenados en alícuotas a -20°C.

- **Capturas**

Fiebre Aftosa: sueros hiperinmunes preparados en conejos, utilizando virus 01 Campos Br-1/58, A24 Cruzeiro Br-1/55 y C3 Indaial Br-1/71, cultivados en células

22

23

BHK, inactivados con BEI y purificados por gradiente de cloruro de cesio. Almacenados en alicuotas de 0.20 a 3 ml, a -20°C .

- **Detectores**

Fiebre Aftosa: sueros hiperinmunes preparados en cobayos, con los virus 01 Campos Br-1/58, A24 Cruzeiro Br-1/55 y C3 Indaial Br-1/71, adaptados a esta especie. Almacenados en alicuotas de 0.20 a 3 ml, a -20°C .

- **Sueros Controles de Prueba**

Control fuerte positivo (C++): pool de sueros de bovinos vacunados y revacunados con vacuna antiaftosa oleosa monovalente, almacenados a -20°C .

Control débil positivo (C+): pool de sueros de bovinos de área libre de fiebre aftosa, mezclados con sueros de bovinos vacunados, almacenados a -20°C .

Control negativo: pool de sueros de bovinos de área libre de Fiebre Aftosa y Estomatitis Vesicular.

- **Tabla de Espectativa Porcentual de Protección (EPP)**

- virus 01 Campos
- virus A24 Cruzeiro
- virus C3 Indaial

- **Muestras para Estudio**

Sueros de animales bien conservados, bien conservados, centrifugados, sin contaminación aparente por hongos o bacterias, almacenados a 4°C por tiempo corto y a -20°C si se almacenara por más de dos semanas.

- **Regla de decisión**

$$LIC = \overline{EPP} - 1.64 \sqrt{\frac{EPP(100 - EPP)}{n}}$$

EPP = Medias de las EPP

n = Numero de bovinos

1.64 = ABSCISA de la curva normal para 95% de confianza (Unilateral)

4

5

3.3 Fase sólida

- Lavar la placa a utilizar una vez con agua destilada
- Escurrir sobre papel absorbente
- Colocar en cada pocillo de la placa 100 µl de Anticuerpos de Captura, en la dilución de uso, en tampón Carbonato pH 9.6
- Incubar 18 horas a 4° C.
- Retirar la placa del refrigerador 30 minutos antes de iniciar la prueba
- Lavar 1 vez con solución salina fisiológica
- Colocar en cada pocillo de la placa, 100 µl de ovoalbúmina GV al 1% en PBS
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente (TA) (22-25° C)
- Lavar 1 vez con solución salina fisiológica
- Escurrir sobre papel absorbente (*)

(*) *En este momento las placas se pueden almacenar a -20°C. Para uso descongelar una hora antes de la realización de la prueba*

3.4 Fase líquida y contacto con la fase sólida

- En una placa auxiliar preparar las diluciones de los sueros. Colocar 40 µl de tampón de dilución en columnas 2 a 6 y 8 a 12. En línea H columnas 7 a 12 (control de blanco) agregar doble volumen de tampón de dilución.
- Colocar 50 µl de los sueros problemas en los respectivos pocillos.
- Colocar en E7 50 µl de suero control negativo; F7 50 µl de dilución 1:5 del suero control positivo débil; en G7 50 µl de la dilución 1:100 del suero control positivo fuerte.
- Con pipeta multicanal preparar las diluciones base 5 de los sueros, pasando 10 µl de la columna 1 a la columna 2. Homogeneizar bien y pasar 10 µl de la columna 2 a la columna 3. Continuar así hasta la columna 6 descartando los últimos 10 µl.
- Con punteras limpias proceder a preparar las diluciones en la segunda mitad de la placa en las líneas A a D, pasando 10 µl de la columna 7 a la columna 8, homogeneizar bien y pasar 10 µl de la columna 8 a la columna 9. Continuar hasta la columna 12 y descartar los últimos 10 µl.
- Proceder a la dilución de los sueros controles en líneas E, F y G, columnas 7 a 10. Pasar 10 µl de la columna 7 a la columna 8, homogeneizar bien y pasar 10 µl de la columna 8 a la columna 9. Volver a homogeneizar y pasar 10 µl de la columna 9 a la columna 10. Homogeneizar y descartar los 10 µl excedentes de la columna 10.
- Reservar líneas E, F y G, columnas 11 y 12 para el control de antígeno.
- En este punto todos los pocillos de la placa, excepto los controles de blanco, se encuentran con un volumen de 40 µl.

11

12

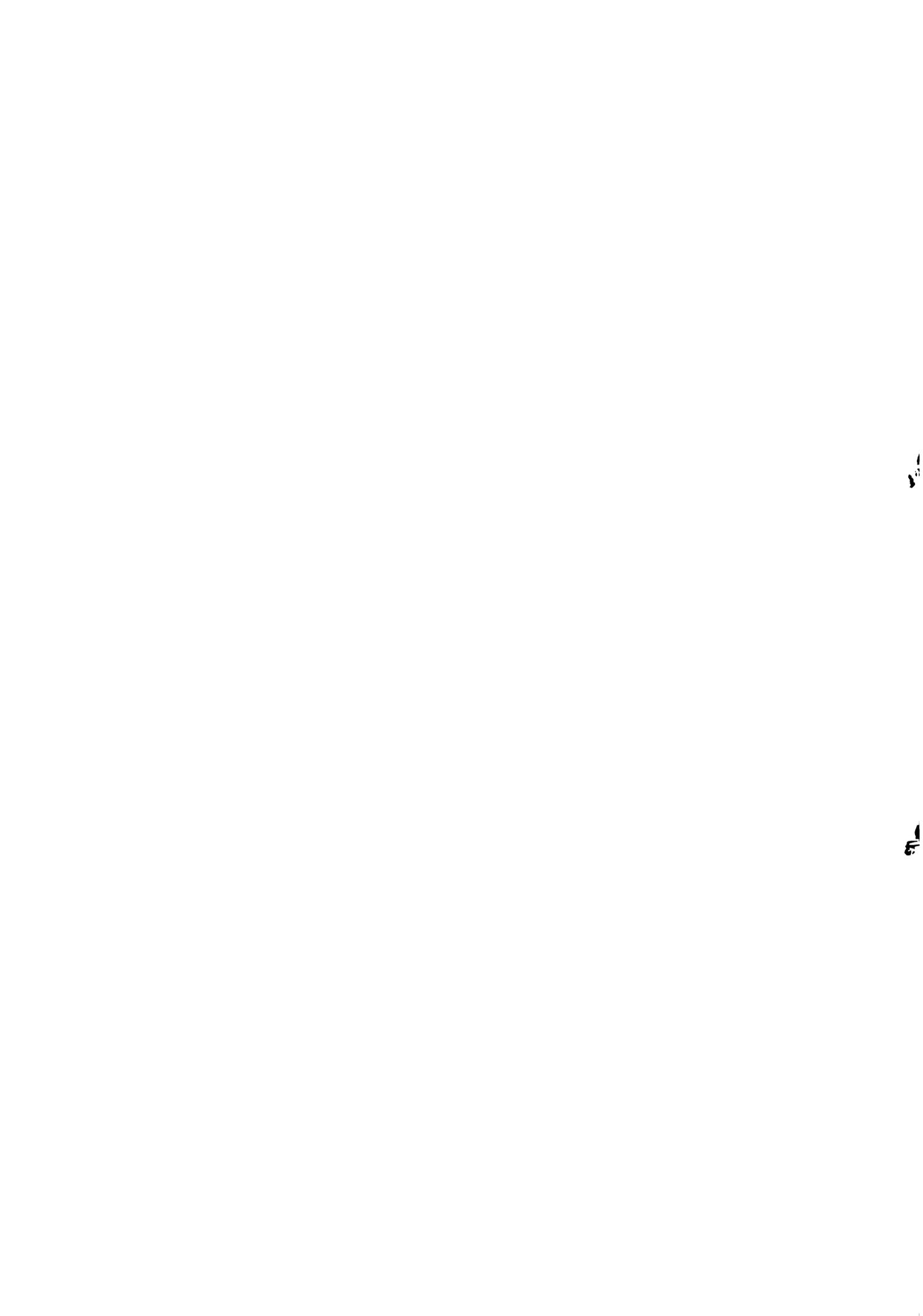
- Agregar la dilución correspondiente del antígeno, en volumen de 40 μ l en todos los pocillos excepto los correspondientes al control de blanco (H7 a 12).
- Homogeneizar con golpes suaves en los bordes de la placa.
- Incubar durante 1 hora a 37° C. Los primeros 20 minutos con agitación .
- Transferir 50 μ l de la mezcla suero/antígeno de la placa auxiliar a la placa sensibilizada con sueros de captura (fase sólida).
- Incubar 30 minutos a 37° C con agitación.
- Lavar tres veces con solución de lavado
- Colocar 50 μ l de anticuerpo detector .
- Incubar 30 minutos a 37° C con agitación.
- Lavar tres veces con solución de lavado.
- Colocar 50 μ l de conjugado en toda la placa.
- Incubar 30 minutos a 37° C con agitación.
- Lavar cuatro veces con solución de lavado
- Colocar 50 μ l del sustrato en toda la placa.
- Incubar protegido de la luz 15 minutos a temperatura ambiente (25° C)
- Detener la reacción agregando 50 μ l de ácido sulfúrico 3N a cada uno de los pocillos
- Leer en lector de ELISA con filtro de 492 nm
- Interpretación de los resultados:

Las lecturas de DO de la placa son procesadas por el software de titulación de anticuerpos de PANAFTOSA para la interpretación de la placa. Los valores de DO del control de antígeno son considerados como el 100% de color de la placa y los valores de DO del blanco son sustraídos de la DO de cada pocillo.

El cálculo de los títulos 50% de cada uno de los sueros se realiza en forma individual para cada suero de la siguiente manera:

Interpolación lineal – pruebas de titulación

- Calcular la media de DO del control del antígeno (X). Obtener 50% de este valor medio (Y).
- Elegir la lectura de DO del suero a titular que sea superior (A) y la inferior (B) al valor medio obtenido anteriormente (Y) y restar una de la otra (Z).
- Restar del valor (Y) la lectura inferior (B)
- Multiplicar el valor obtenido en (3), por el logaritmo del intervalo de dilución del suero (factor de dilución 5 = 0.7) (C).
- Dividir el valor obtenido en (4), $\{(Y - B) C\}$ por el valor de Z.
- Sumar el valor obtenido en (5) con el logaritmo de dilución de la lectura inferior (D).



$$Y = \frac{X}{2}$$

$$Z = A - B$$

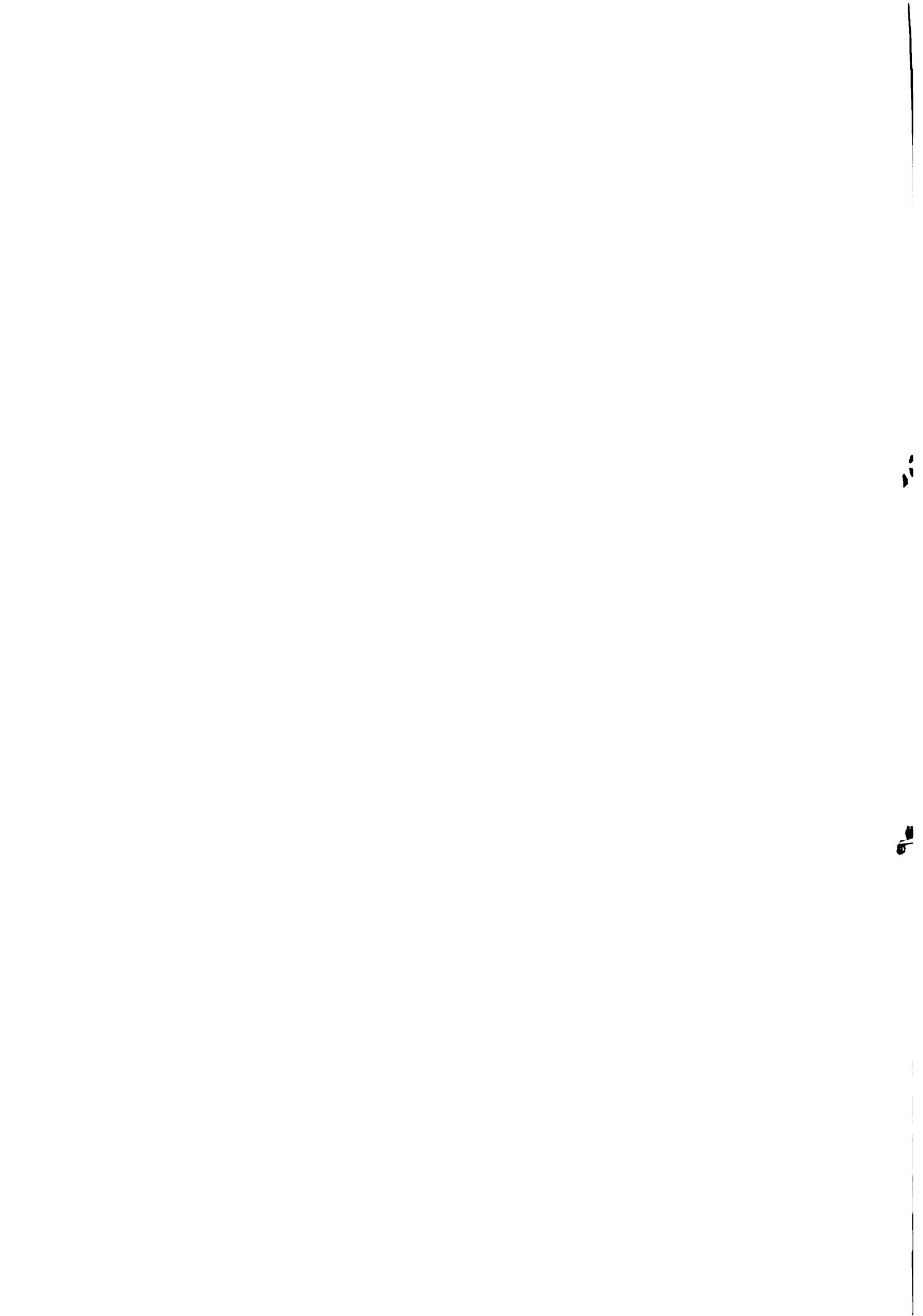
$$TIT. 50\% = \frac{(Y - B) C + D}{Z}$$

- Verificar que los títulos 50% de los sueros controles estén dentro de los límites aceptables determinados por PANAF-TOSA para cada lote de suero control. Si los títulos de los sueros control están fuera de los límites, la placa debe ser repetida.
- Para cada título de suero problema se adjudicará una Expectativa Percentual de Protección (EPP) según tabla EPP para virus 01 Campos, A24 Cruzeiro y C3 Indaial adjunta
- Después de obtenidas la EPP de los 30 sueros en estudio, se calcula la media aritmética de las EPPs del grupo y el Límite Inferior de Confianza (LIC) unilateral para 95% de confianza.
- Regla de decisión: vacunas con LIC > 75% son aprobadas. Vacunas con LIC < 69% son reprobadas. Las vacunas tendrán derecho a una segunda prueba de potencia cuando el valor de LIC es < 75% > 69%. En este caso se vacunarán 16 animales y se sumarán los resultados de los sueros de éstos a los resultados obtenidos con los 30 animales testados previamente. Si este grupo de 46 sueros presenta un valor de LIC > 75% la vacuna es aprobada.

CUADRO 12

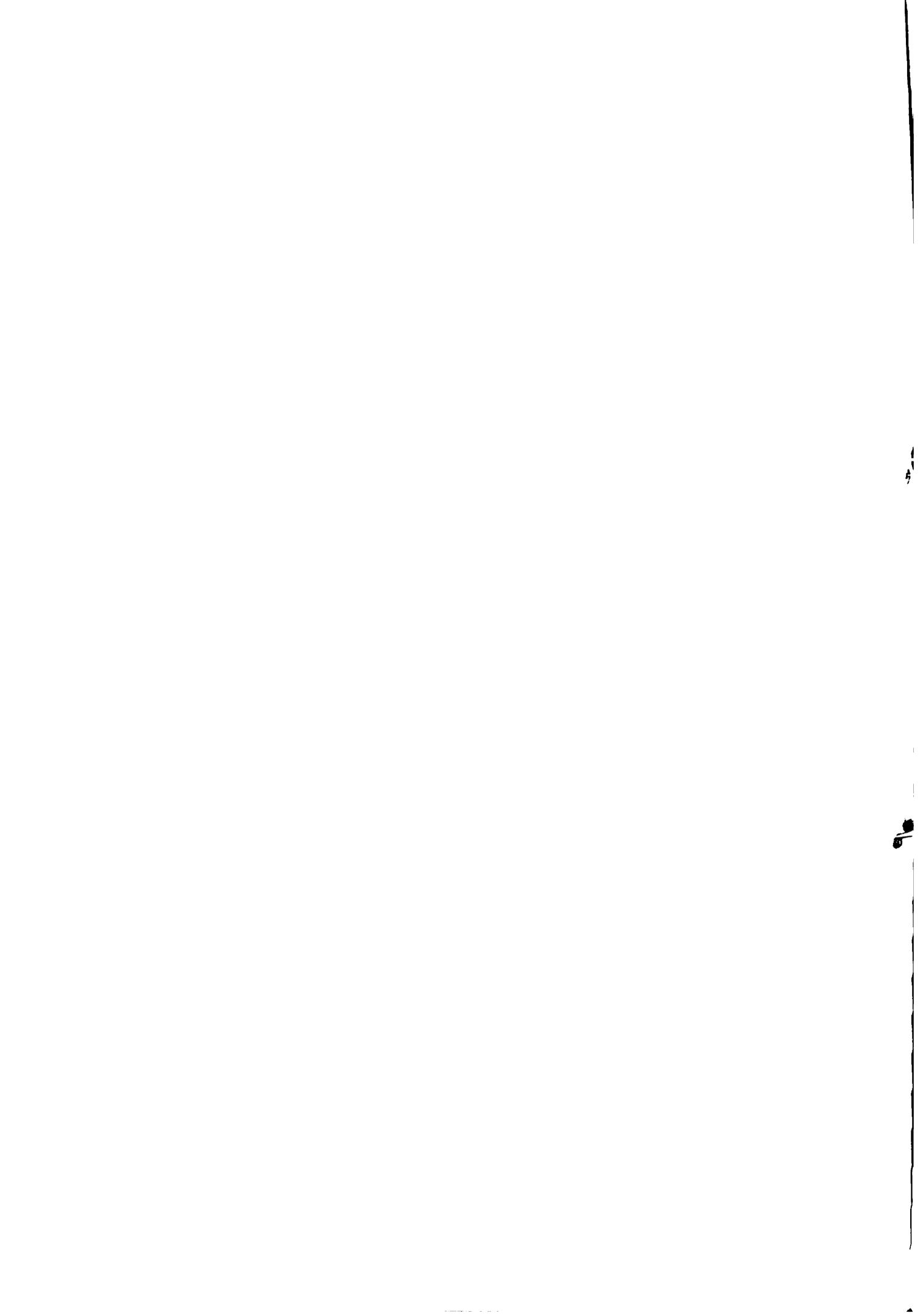
TITULACION DE ANTICUERPOS DE LA FIEBRE AFTOSA Prueba de "Control de potencia de vacuna"

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1:2	1:10	1:50	1: 250	1: 1250	1: 6250	S5					
B	S1 1:2	1:10	1:50	1: 250	1: 1250	1: 6250	S5					
C	S2						S6					
D	S2						S6					
E	S3						C- 1:2	1:10	1:50	1:250	Cag	Cag
F	S3						C+ 1:10	1: 1:50	1:250	1:1250	Cag	Cag
G	S4						C++ 1:200	1:100	1:5000	1:2500	Cag	Cag
H	S4						Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc



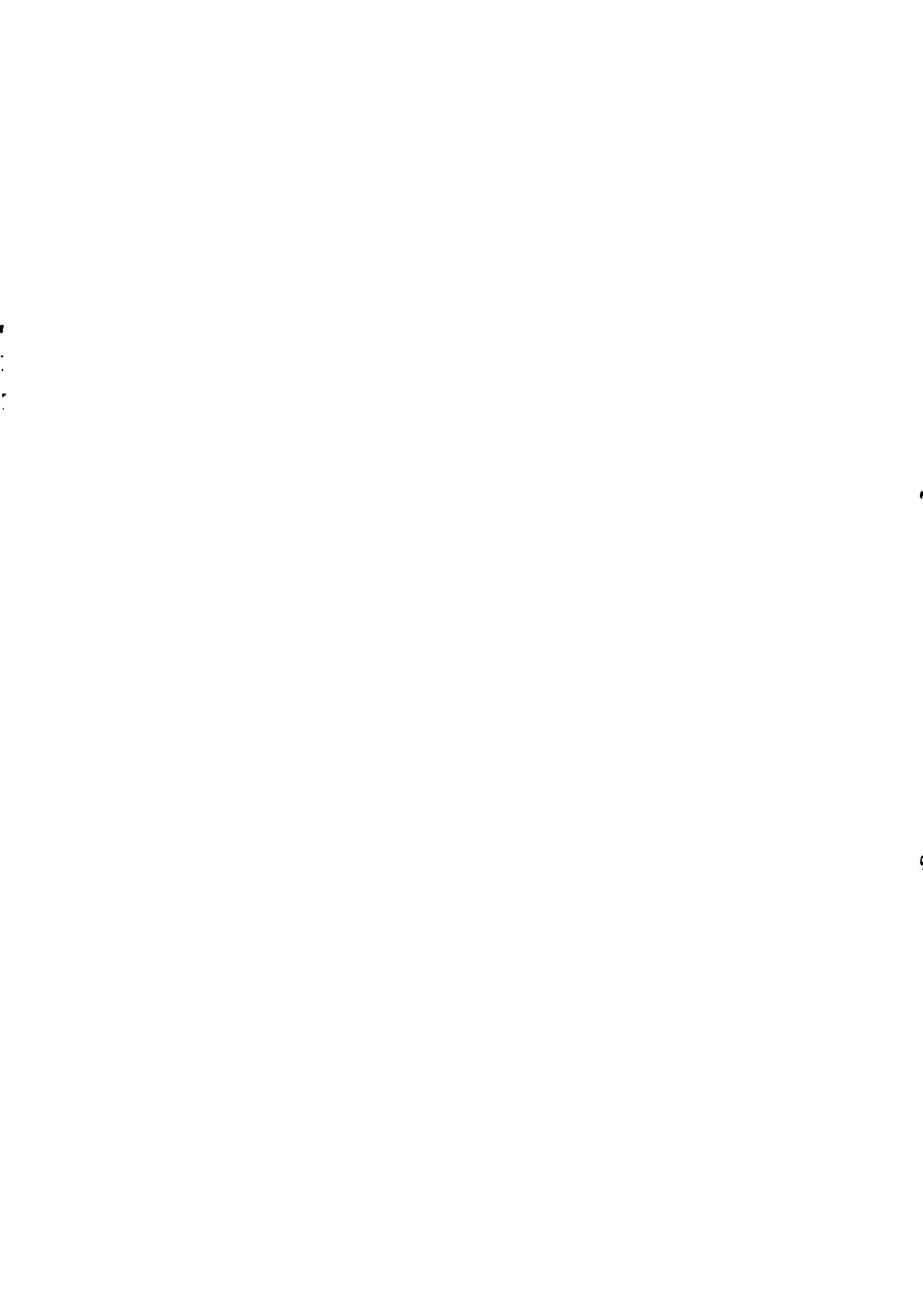
Protocolo: Para estudiar 6 sueros (S) en replica y controles (C++, C+ y C-).

- *Fase sólida (captura):* suero de conejo diluido (DIL) en tampón carbonato-bicarbonato 0.05M, pH 9.60, 18 horas. a 4°C.
- *Fase líquida:* sueros problemas en dil. 1:1 B5 y antígeno FA O, A y C, en dilución recomendada. Dil. final de los sueros problema 1:2 B5. Para controles fuerte positivo (++), débil positivo (+) y negativo preparar dil. justa basada en las indicaciones del Cuadro 12 (dil. final), haciendo diluciones adicionales en base 5 en la placa auxiliar. Incubar 20 minutos a 37°C con agitación y 40 minutos sin agitar.
- *Contacto:* transferir la mezcla suero-antígeno para la placa captura –30 minutos a 37°C con agitación.
- *Suero detector:* 30 minutos a 37°C con agitación.
- *Conjugado anti-cobayo:* 30 minutos a 37°C con agitación.
- *Sustrato OPD + H₂O₂:* 15 minutos a 25°C.
- Parar la reacción con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3N y leer con filtro de 492 nm.
- Interpretación de los resultados.



4. LITERATURA CONSULTADA

- CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA.HCP/OPS/OMS. 1998. *Manual. Virus Neutralización Virus Diarrea Viral Bovina.* 19 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA.HCP/OPS/OMS. 1998. *Manual. Elisa Competición Fase Líquida. Identificación y titulación de Anticuerpos de la Fiebre Aftosa.* 16 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA.HCP/OPS/OMS. 1998. *Manual. Elisa sandwich Indirecta. Tipificación de virus Fiebre Aftosa y Estomatitis Vesicular.* 10 p.
- HAMBLIN, C, BARNETT, I.T.R., CROWTHER, J.R. 1986. *A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. II. Application. J. Immunol. Meth., 93: 123-129.*
- MCCULLOUGH, K. C., CROWTHER, J. R., BUTCHER, R. N. 1985. *A liquid phase ELISA and its use in the identification of epitopes on foot-and-mouth disease virus antigens. J. Virol. Meth., 11(4): 329-338.*



V. PESTE PORCINA CLASICA

**MANUAL DE TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO
EN SALUD ANIMAL**

11

12

VII. TUBERCULOSIS BOVINA

Dra. Lidia Sanabria

1. DIAGNOSTICO

1.1 MUESTRAS

Por lo general, las muestras de origen animal que se remiten al laboratorio para el diagnóstico de la tuberculosis son ganglios o trozos de órganos, y más raramente, pus de cavidad abierta u otras secreciones.

La toma de muestras de ganglios o trozos de órganos se efectúa en el matadero y está a cargo del inspector sanitario.

El manejo de las vísceras durante la inspección se puede efectuar en una bandeja de metal, enganchando los tejidos y cortando y separando los ganglios o trozos de órganos para la investigación de tuberculosis.

En los bovinos se deben considerar preferentemente ganglios del tracto respiratorio:

- mediastinales (anteriores, posteriores y ventrales),
- bronquiales (izquierdo, derecho y dorsal medio) y
- pulmonares.

Además, deben inspeccionarse la pleura y el tejido pulmonar por palpación, a fin de determinar la presencia de zonas con lesiones, que se separarán. En tercer término, en orden de importancia, está la investigación de infecciones tuberculosas intestinales. Para realizarla, se separarán los ganglios linfáticos mesentéricos. También se debe inspeccionar el hígado.

En el caso de porcinos, se deberán también inspeccionar los ganglios de la cabeza y los cervicales.

La toma de ganglios y órganos en el matadero no se efectúa con cuidados de esterilidad y, por lo tanto, éstos se pueden enviar en envases sin esterilizar.

En cuanto al lapso entre la toma de la muestra y la llegada al laboratorio existen dos posibilidades:



- El lapso es corto (menos de 24 horas). Se puede envasar cada muestra en un frasco de vidrio o plástico, de boca ancha (aproximadamente 10 cm. de diámetro) y altura conveniente (entre 10-20 cm., dependiendo del tamaño de la muestra). La muestra no debe llenar más de la mitad de la capacidad del frasco, a fin de que no resulte difícil extraerla. La tapa puede ser de rosca o a presión.

También puede optarse, especialmente cuando el número de muestras es muy grande y el ritmo de recolección acelerado (por ejemplo, toma de todos los ganglios mediastinales de la matanza de un día, en una inspección de un gran matadero), por bolsas de plástico (polietileno) resistentes, cerradas con bandas de goma. El conjunto de muestras se coloca en una conservadora térmica de poliéster aglomerado, con el agregado de refrigerante.

- El lapso es largo (entre 1-10 días). En este caso se debe optar por frascos de boca ancha, del tipo ya mencionado. Luego de colocar las muestras se agregará solución saturada de borato de sodio previamente hervida, en volumen suficiente para alcanzar 2/3 de la altura del frasco. El envío en estas condiciones puede hacerse sin refrigerar.

En la actualidad, es muy difícil que el transporte requiera más de 10 días.

La etiqueta debe indicar el nombre de la víscera, la identificación del animal, el origen y la fecha de recolección.

El agregado de solución conservadora también debe indicarse en la etiqueta, o en nota adjunta al envío.

El pus de cavidad abierta, las secreciones diversas, las biopsias, etc., son muestras contaminadas y se deben enviar refrigeradas al laboratorio en envases herméticos que no necesitan ser estériles.

1.2 EXAMEN MICROSCOPICO

La capacidad de formar complejos coloreados con los derivados del trifenilmetano que resisten la acción del etanol-ácido (ácido-alcohol resistencia), es una propiedad característica de las micobacterias.

Los colorantes aniónicos derivados del trifenilmetano que se emplean para poner de manifiesto esta propiedad son: *la fucsina, el cristal violeta y la auramina O*. A ellos se les agrega fenol acuoso, que aumenta la penetración del colorante en los lípidos constituyentes de la pared bacilar.

2

4

Baciloscopía

En tuberculosis animal su importancia no es tan decisiva puesto que, aún en órganos con lesiones macroscópicas, pueden no observarse bacilos ácido - alcohol resistentes en el examen directo, por lo que siempre se debe efectuar el cultivo.

Preparación del extendido a partir de la muestra

En tuberculosis animal el extendido se prepara a partir de muestras de órganos con lesiones macroscópicas, previamente decontaminadas, aunque pueden no observarse bacilos ácido-alcohol resistentes en el examen directo.

Coloración del extendido por el Método de Ziehl - Neelsen

Preparación de las soluciones colorantes

Las soluciones colorantes se deben filtrar con frecuencia.
Limpiar los frascos goteros cada vez que se vacíen.

a) Fucsina, solución madre

Fucsina básica10 gr.
Alcohol 96%.....100 ml.

Disolver por agitación en un frasco, o por tratamiento en un mortero grande. A 10 ml. de la solución madre, agregar 5 ml. de fenol acuoso*, agitar y agregar agua destilada hasta completar 100 ml. Dejar reposar 24 horas y filtrar por papel.

* *El fenol acuoso se prepara agregando a 100 gr. de fenol cristalizado 10 ml. de agua destilada. Calentar a baño María hasta la completa disolución y dejar enfriar.*

b) Azul de metileno, solución madre

Azul de metileno.....1 gr.
Alcohol 96%.....100 ml.

Disolver por agitación.

c) Solución de azul de metileno al 1% (para coloración)

Solución madre de azul de metileno.....100 ml.
Agua destilada.....900 ml.

,

.

Dejar reposar 24 horas y filtrar por papel.

d) Solución decolorante

Acido clorhídrico para análisis..... 30 ml.
Alcohol 96%.....970 ml.

El ácido debe ser agregado en forma lenta sobre el alcohol, al tiempo que se agita suavemente la solución.

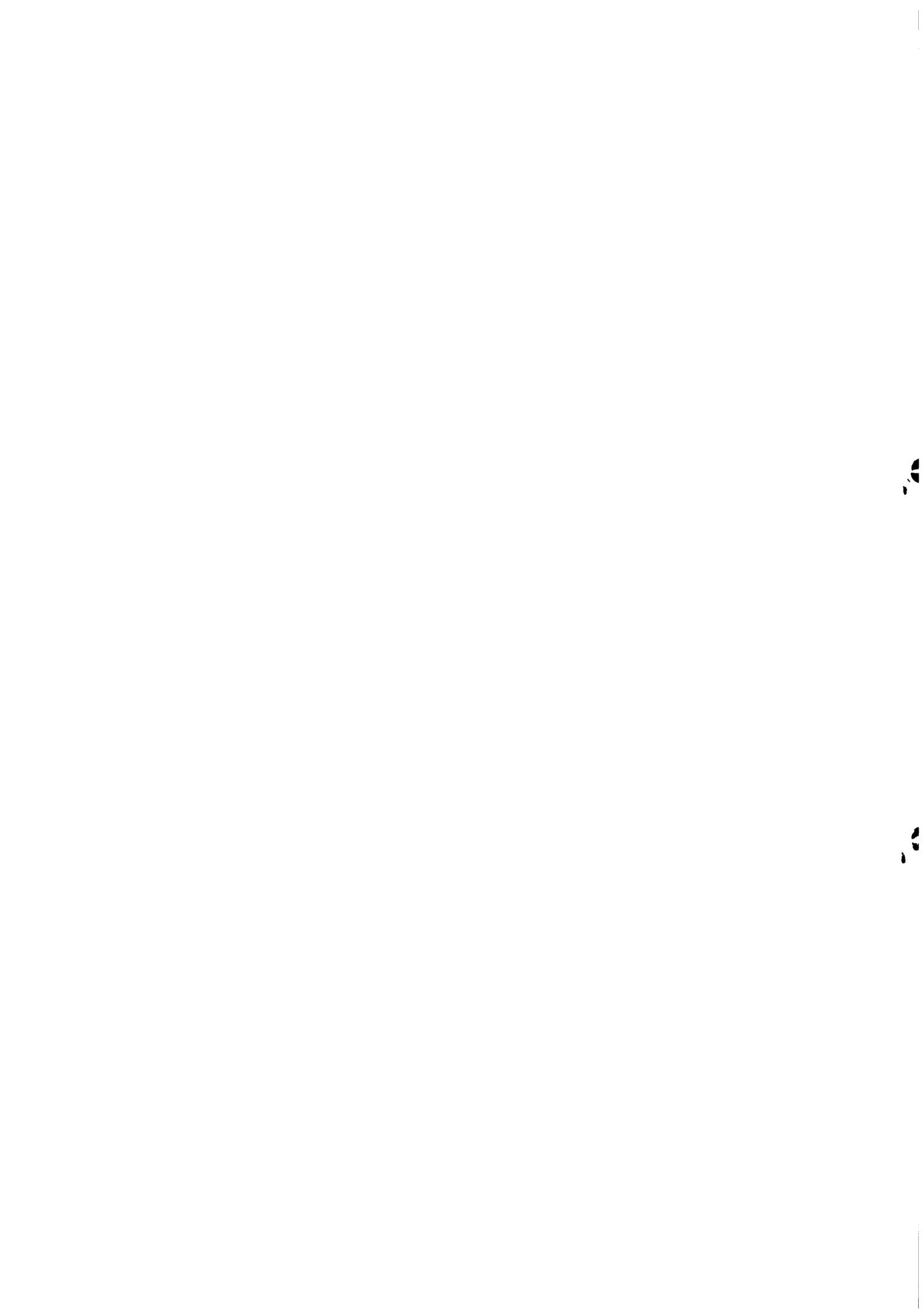
Técnica de coloración

- Fijar previamente los extendidos por calor.
- Cubrir la superficie del portaobjetos con fucsina fenicada, previamente filtrada.
- Calentar suavemente 2 o 3 veces sucesivas con la llama de un hisopo de algodón embebido en alcohol, pasándolo por debajo del portaobjetos, hasta que se observe emisión de vapores. Se debe cuidar que el calentamiento sea suave y que no se produzca la ebullición del colorante. Si el volumen del colorante disminuye por evaporación se debe agregar más hasta cubrir el extendido. El tiempo mínimo de coloración con fucsina es de 5 minutos.
- Lavar con agua corriente a baja presión.
- Cubrir la totalidad de la superficie del portaobjetos con alcohol ácido. Dejar 2 minutos como máximo.
- Lavar con agua corriente a baja presión.
- Cubrir el portaobjetos con solución de azul de metileno, la que se dejará no menos de 30 segundos.
- Lavar con agua corriente a baja presión.
- Dejar secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente limpio.

El examen microscópico del extendido

Se emplea un microscopio equipado con objetivo de inmersión (100x) y ocular 8x a 10x. Se coloca una gota de aceite de cedro entre el portaobjetos y el objetivo, dejándola caer sobre el portaobjetos sin apoyar el cuentagotas. De lo contrario, se corre el riesgo de transportar bacilos suspendidos en el aceite de un preparado a otro. Al enfocar un preparado positivo los bacilos se observan como formas alargadas coloreadas en rojo brillante sobre un fondo azul.

La observación microscópica del extendido coloreado del material biológico investigado se debe efectuar siempre de la misma manera. Por ejemplo, una vez enfocado el preparado se recorre de su extremo izquierdo al derecho, siguiendo una línea recta. La observación cuidadosa de cada campo demanda entre 2 y 5 segundos.



El observador irá tomando nota del número de bacilos observados en cada campo. Si la preparación contiene más de 10 bacilos por campo, es suficiente observar 20 campos; si contiene de 1 a 10 bacilos por campo, se deben observar por lo menos 50 campos. Si se trata de una muestra con muy escaso número de bacilos se deben observar 100 o más campos.

1.3 AISLAMIENTO

1.3.1 Tratamiento de la muestra previo al cultivo

El objeto de este tratamiento es eliminar la flora asociada que se encuentra en la mayoría de las muestras. Sólo en algunos casos (líquidos cefalorraquídeos, pleurales, peritoneales o articulares extraídos estérilmente) puede prescindirse de la descontaminación previa; se realiza una centrifugación y se inocula el sedimento en el medio de cultivo.

Selección y homogeneización

Cuando se trate de ganglios u otro tipo de biopsias o materiales de exéresis, así como de muestras de órganos de animales, se deben cumplir dos etapas previas a la descontaminación: a) la selección de la parte del material más apropiada para la investigación, y b) la preparación de una suspensión homogénea a partir del material seleccionado. Para efectuar ambas operaciones el técnico debe operar en una cabina de aislamiento o con el rostro protegido, ya sea con una máscara transparente, o con barbijo y anteojos.

a) Se diseca el material con instrumental quirúrgico estéril. Según el tamaño del mismo, la disección se puede efectuar en un mortero de porcelana estéril, en el que luego se preparará la suspensión, o en una bandeja metálica, que se esterilizará antes y después de la operación. Se selecciona la parte del material donde se observan lesiones aparentes, con caseo, necrosis o cualquier otro aspecto anormal y se desecha el resto. Si la muestra es lo suficientemente pequeña, esta etapa se puede obviar. La operación debe estar a cargo de un técnico con considerable experiencia en la observación de lesiones tuberculosas.

b) Se coloca la porción seleccionada en un mortero de porcelana con una capacidad tres o más veces mayor que el tamaño de la muestra, previamente esterilizado y envuelto en papel. Se agrega una pequeña cantidad de arena y de agua destilada estériles y se trabaja la mezcla con la mano del mortero, cuidando de mantener a este cubierto con el papel. Se agrega agua hasta obtener una suspensión. Se toma la suspensión con pipeta Pasteur grande (diámetro aproximado del pico: 3 mm., longitud total aproximada de la pipeta: 280 mm.), provista de pipeteador (propipeta) de caucho, y se trasvasa a un tubo.

1

2

Método de decontaminación

Método de Petroff

En un tubo, se mezcla la muestra con solución estéril de hidróxido de sodio al 4% en una proporción 1:2. Por lo general, los volúmenes empleados son 2 ml. de muestra y 4 ml. de solución de hidróxido de sodio. Se agita vigorosamente. Se incuba a 37° C durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos.

Se centrifuga durante 20 minutos a 2000 – 3000 r.p.m. y se desecha el sobrenadante.

Se agrega al sedimento 1 a 2 gotas de solución de rojo fenol (indicador de pH)* y la cantidad necesaria de solución de ácido sulfúrico al 10 o 15% para producir el viraje del indicador, desde el rojo violáceo al amarillo anaranjado. Generalmente bastan con 1 o 2 gotas. Posteriormente se efectúa un lavado para eliminar los restos de ácido sulfúrico: se agregan aproximadamente 3 ml. de agua destilada estéril, se agita, se centrifuga durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. El sedimento puede inocularse agregándole previamente 1 o 2 ml. de agua para diluirlo. La cantidad inoculada a cada tubo de medio de cultivo es de 4 o 5 gotas.

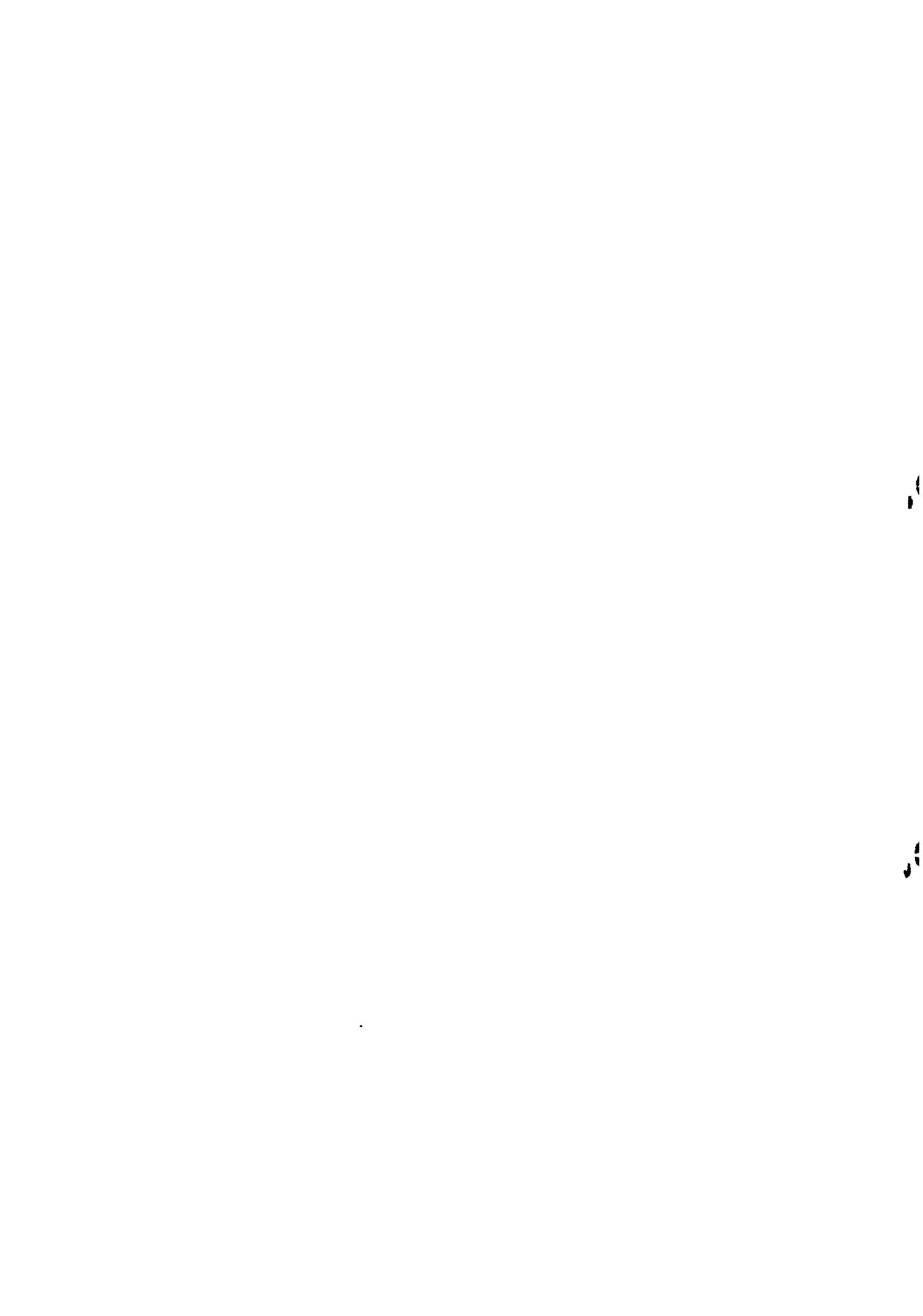
** La solución madre de rojo fenol se prepara agregando a 0.4 gr. de esta sustancia, 100 ml. de hidróxido de sodio al 4%. Conservar en frasco oscuro, en refrigeración. Su duración es limitada. La solución de trabajo se prepara agregando a 10 ml. de la solución madre, 90 ml. de agua destilada, en oscuridad. Autoclavar. Conservar sin contacto con la luz.*

Método del laurilsulfato de sodio

El agregado al hidróxido de sodio de un agente tensioactivo, el laurilsulfato de sodio, facilita la homogeneización de la muestra y permite un mejor contacto del bacilo con el hidróxido. Se disminuye así la concentración final del hidróxido de sodio y se previene la acción tóxica que este agente podría ejercer también sobre las micobacterias, lo cual aumenta la sensibilidad del método. El agregado del detergente hace a esta técnica muy apropiada también para el tratamiento de muestras ricas en lípidos (por ejemplo, investigación de micobacterias en leche).

Se mezclan 2 ml. de la muestra con 3 ml. de la solución siguiente, que debe guardarse a 37°C:

Laurilsulfato de sodio, en polvo.....30 gr.
(disolver en caliente)
Hidróxido de sodio, en lentejas.....10 gr.
Agua destilada q.s.p. 1 000 ml.



La mezcla se agita en agitador mecánico durante 30 minutos y se neutraliza hasta el viraje de violeta a amarillo violáceo con la solución siguiente:

Acido fosfórico puro.....	1.5 ml.
Púrpura de bromocresol 1/250.....	2.0 ml.
Agua destilada q.s.p.....	1 000 ml.

Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 30 minutos. Se desecha el sobrenadante y se inocula el sedimento en los medios de cultivo.

1.3.2 Cultivo

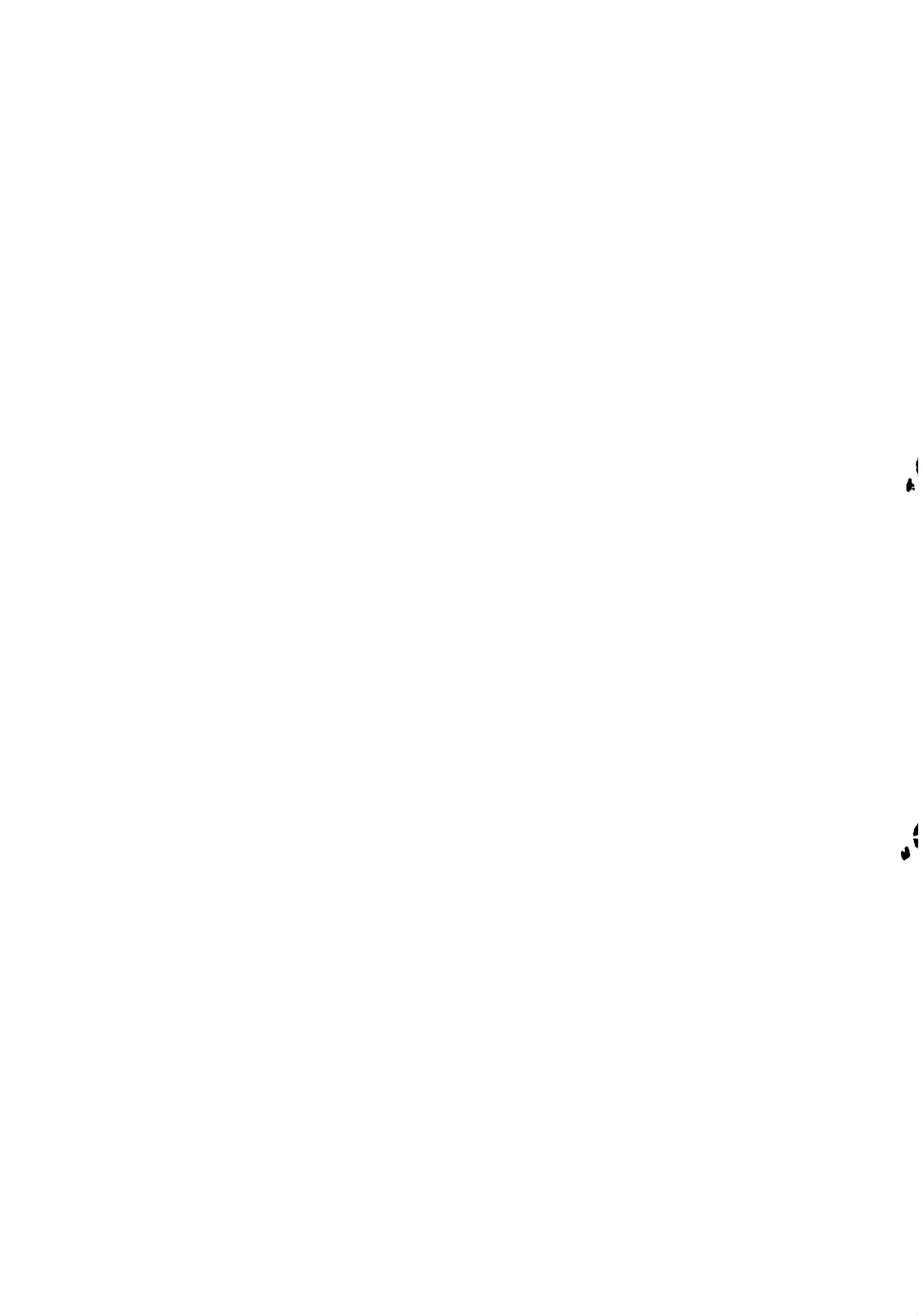
Las micobacterias son aerobios estrictos. Las necesidades básicas de nutrientes de las especies cultivables son, en general, sencillas: glicerol o glucosa como fuente de carbono, y una sal de amonio como fuente de nitrógeno. Sólo el *M. paratuberculosis* requiere el agregado de factores más complejos, contenidos en la micobactina. El intervalo de pH en el que pueden desarrollar la micobacterias es amplio (entre 5.5 y 8.2). Sin embargo, su iniciación es óptima en un medio ligeramente ácido (entre 6.4 y 6.8).

1.3.2.1 Medios de cultivo

Medios a base de huevo

La yema de huevo es un constituyente empleado para obtener medios de cultivo ricos en lípidos, por los que las micobacterias tienen especial preferencia. Los medios a base de huevos están, en general, constituidos por soluciones reguladoras a base de fosfatos, ciertos cationes en muy bajas concentraciones, una fuente de carbono (glicerol), otra de nitrógeno (asparagina, medio de Löwenstein-Jensen) o una fuente de ambos elementos (piruvato, medio de Stonebrink). Además, se les agrega verde de malaquita como protector contra la contaminación.

Por su alta eficacia en la obtención de primocultivos a partir de lesiones, estos medios, especialmente los de Löwenstein-Jensen y de Stonebrink, se emplean habitualmente en los laboratorios de diagnóstico bacteriológico de tuberculosis. Todas las micobacterias cultivables patógenas para el hombre se desarrollan en el primero de ellos, pero en el segundo se obtienen mejores cultivos de *M. bovis* y de algunas cepas de *M. tuberculosis*, que sólo dan desarrollo disgónico en el de Löwenstein-Jensen.



Medios semisintéticos de aislamiento y subcultivo

A partir de los primeros estudios de Dubos y Middlebrook, se comenzó a conocer en profundidad y detalles el metabolismo de las micobacterias y se formularon medios semisintéticos que contienen los elementos requeridos por ellas para un buen desarrollo, tanto en el primer aislamiento como en los subcultivos.

El medio basal está constituido en estos medios por elementos inorgánicos, glicerol o glucosa, aminoácidos (digerido enzimático de caseína) y asparagina.

Los ácidos grasos de cadena larga (ácido oleico, por ejemplo), ejercen una acción doble sobre las micobacterias: a muy bajas concentraciones promueven su desarrollo, pero a concentraciones mayores lo inhiben. La seroalbúmina tiene la propiedad de ligarse al ácido oleico y su fracción V es agregada a estos medios a fin de prevenir que el ácido oleico alcance en ellos concentraciones tóxicas. El suero total tiene la misma propiedad de ligarse a los ácidos grasos, pero puede contener asimismo sustancias inhibitorias del desarrollo bacilar.

El ácido oleico puede también agregarse al medio en su forma de éster de polioxietilén sorbitano o Tween 80 que, además de nutriente, es un agente tensioactivo: actúa como tal uniéndose a la pared lipídica bacilar por la parte hidrofóbica de su molécula, y al medio externo por su parte hidrofílica. Se obtienen así suspensiones homogéneas de *M. tuberculosis* en medio acuoso. La lipasa contenida en las preparaciones de albúmina puede hidrolizar el Tween, liberando ácido oleico que, como se ha señalado, es tóxico para el bacilo en concentraciones elevadas. Por lo tanto, las soluciones de albúmina deben calentarse a 56°C durante 30 minutos antes de agregarlas al medio para inactivar esa enzima.

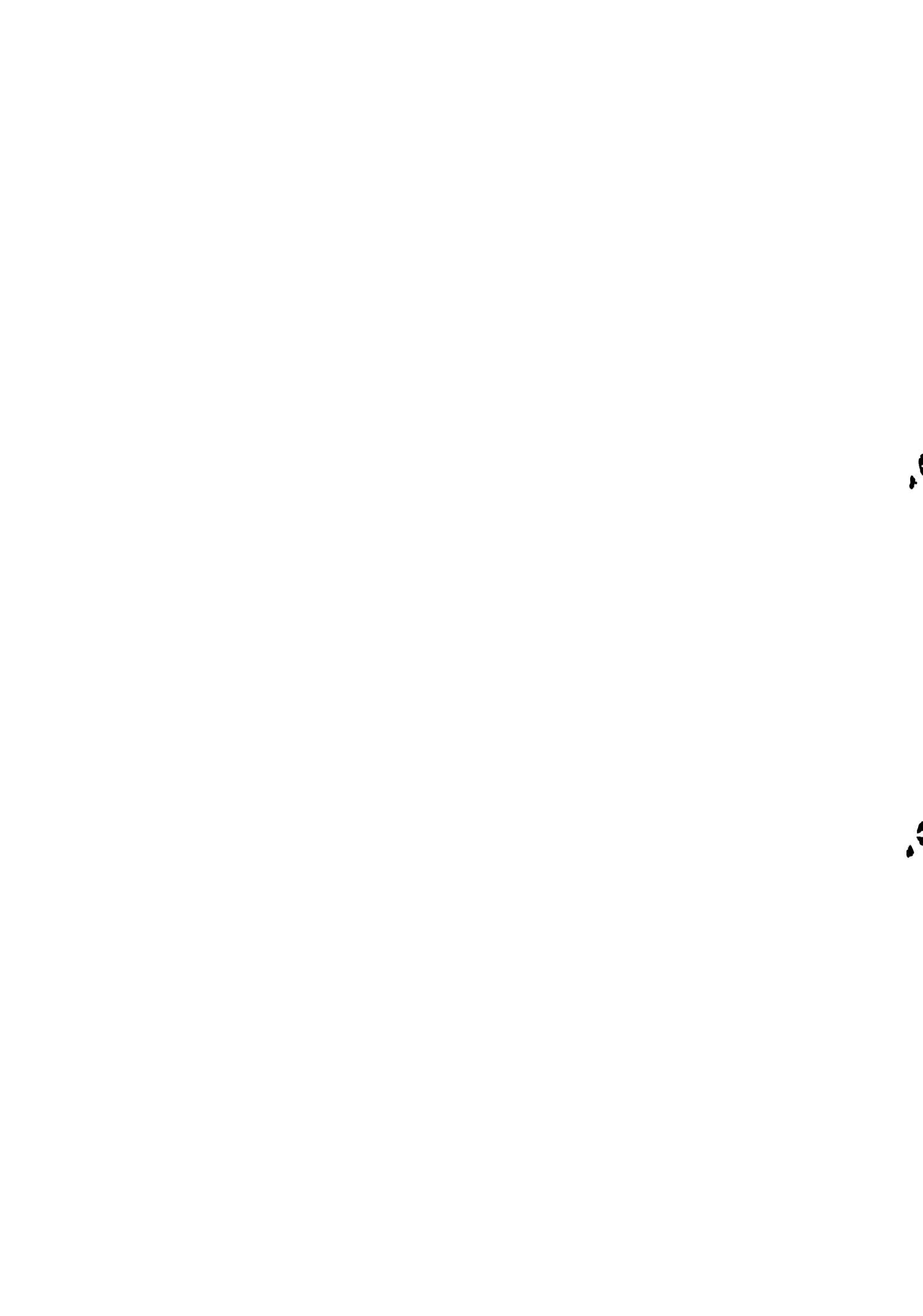
Se describen a continuación la composición y método de preparación de dos medios de cultivo indispensables para los laboratorios de tuberculosis humana y animal.

Medio de Löwenstein - Jensen

Constituyentes

- Solución de sales:

Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄).....	2.4	gr.
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	0.24	gr.
Citrato de magnesio.....	0.6	gr.
L – asparagina.....	3.6	gr.
Glicerina bidestilada.....	12	ml.
Agua destilada.....	600	ml.



- Suspensión de huevos enteros.....1000 ml.
- Solución acuosa de verde de malaquita al 2%, recién preparada..... 20 ml.

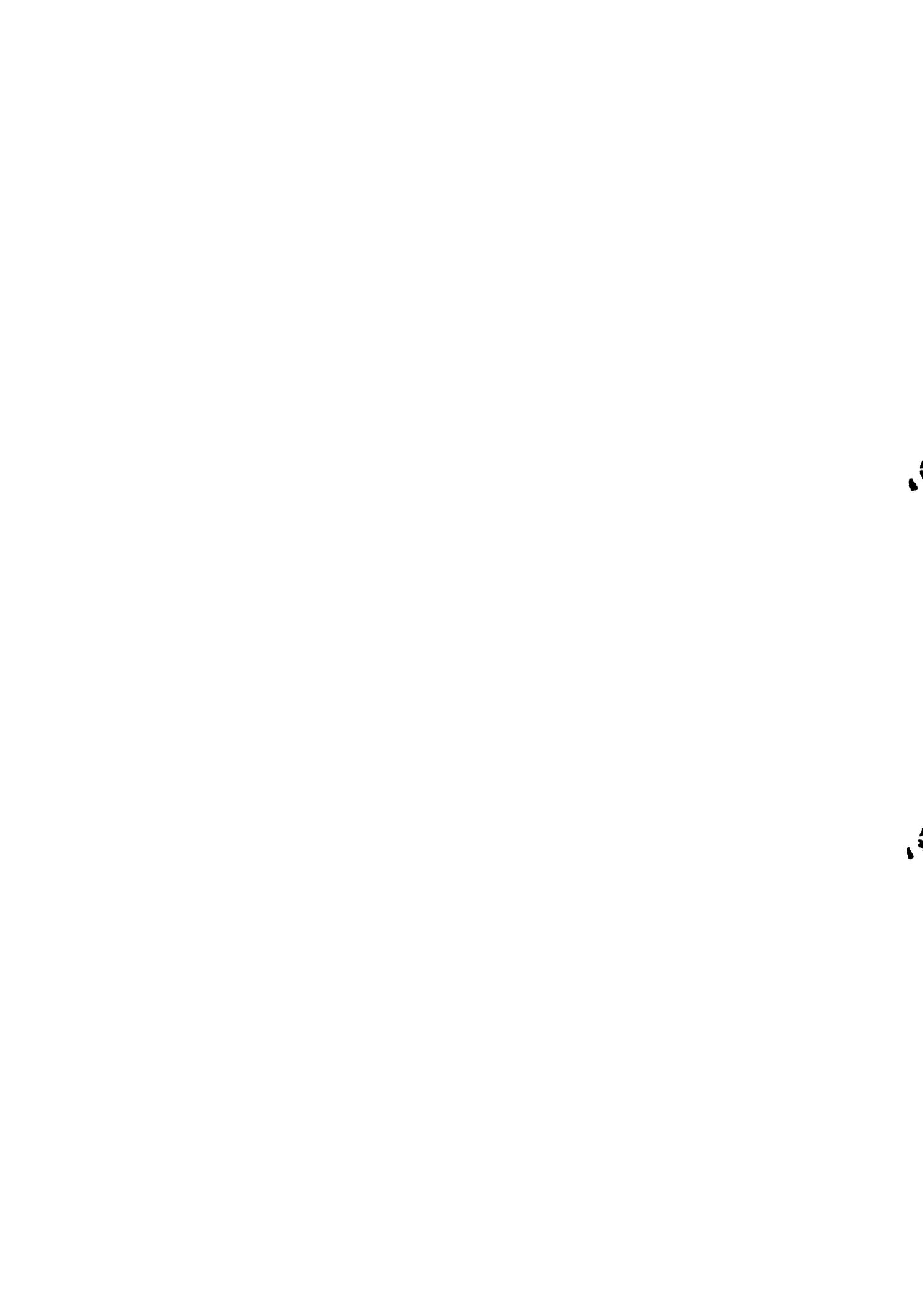
Equipo necesario

- Un frasco fraccionador de 2000 ml., provisto de caño de goma o látex, pinza de Mohr y accesorio en forma de campana para verter. De ser posible, debe disponerse también de una barra magnética para mezclar. Este equipo puede ser reemplazado por una jeringa graduable tipo “luer - lok” con equipo de pipeteo continuo.
- Un embudo grande cubierto con dos capas de gasa, sujetadas al pico del embudo y protegidas por envoltura de papel grueso.
- Probeta graduada de un litro.
- Batidora o licuadora de tipo casero con vaso de vidrio, con tapa, que pueda ser esterilizado, de más de un litro de capacidad.
- Tubos de ensayo con tapas de rosca o algodón, de medidas aproximadas 16 x 160 mm.
- Un coagulador a gas o eléctrico, regulable a 80- 85° C, con bandejas de fondo inclinado.

Todo el material de vidrio debe estar estéril.

Método de preparación

Disolver las tres primeras sales y la asparagina en 200-300 ml. de agua destilada. Calentar a baño María hasta disolución de la asparagina. Pasar la solución a un frasco de 2000 ml. de capacidad, agregar agua destilada hasta completar 600 ml. y 12 ml. de glicerina. Esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Los huevos, que deben ser frescos, se limpian con agua y detergente, se enjuagan con agua corriente y se dejan secar. Se lavan luego con alcohol etílico 70°C. Se van rompiendo uno a uno, en el borde de una probeta de un litro y se vuelca en ella su contenido. De allí se transvasan al frasco de la licuadora y se los mezcla cuidando de no causar exceso de burbujas. La suspensión resultante se vuelca en el frasco de 2000 ml. de capacidad que contiene la solución salina y se le agrega la solución de verde de malaquita. Se agita moviendo el frasco en forma circular. Se filtra por el embudo cubierto de gasa; se recibe el filtrado en el frasco fraccionador, cuidando de cerrar con pinza de Mohr el caño de salida. De emplearse para fraccionar la jeringa con equipo de pipeteo continuo, se recibe el filtrado en un frasco de capacidad suficiente, en el que se introduce el extremo de tubo de látex unido a la jeringa.



Se distribuye el medio en los tubos, flameando la boca de éstos al sacarles y ponerles la tapa. Se debe trabajar siempre en condiciones de asepsia. Se colocan los tubos en el coagulador. No deben transcurrir más de 15 a 20 minutos desde el momento de su llenado hasta la colocación en el coagulador. La cantidad de medio agregado a cada tubo y el ángulo de inclinación de la bandeja del coagulador deben ser tales como para que el medio forme en el tubo un plano inclinado que vaya desde el fondo hasta cerca de la boca, pero sin tocar el tapón. El coagulador debe haberse encendido previamente hasta lograr una temperatura de 85°C. Los tubos deben permanecer en él durante 30 minutos a esa temperatura.

Medio de Stonebrink

Constituyentes

- Solución de sales:

Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄).....	3.5	gr.
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O).....	2.0	gr.*
Piruvato de sodio.....	6.25	gr.
Agua destilada.....	500	ml.

* Si el fosfato disódico tiene 12 moléculas de H₂O se emplearán 4 gr. y si se usa la droga anhidra, 1.59 gr.

Disolver, esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 110°C.

Suspensión de huevos enteros.....	1 000	ml.
Solución acuosa de verde de malaquita al 2%.....	20	ml.

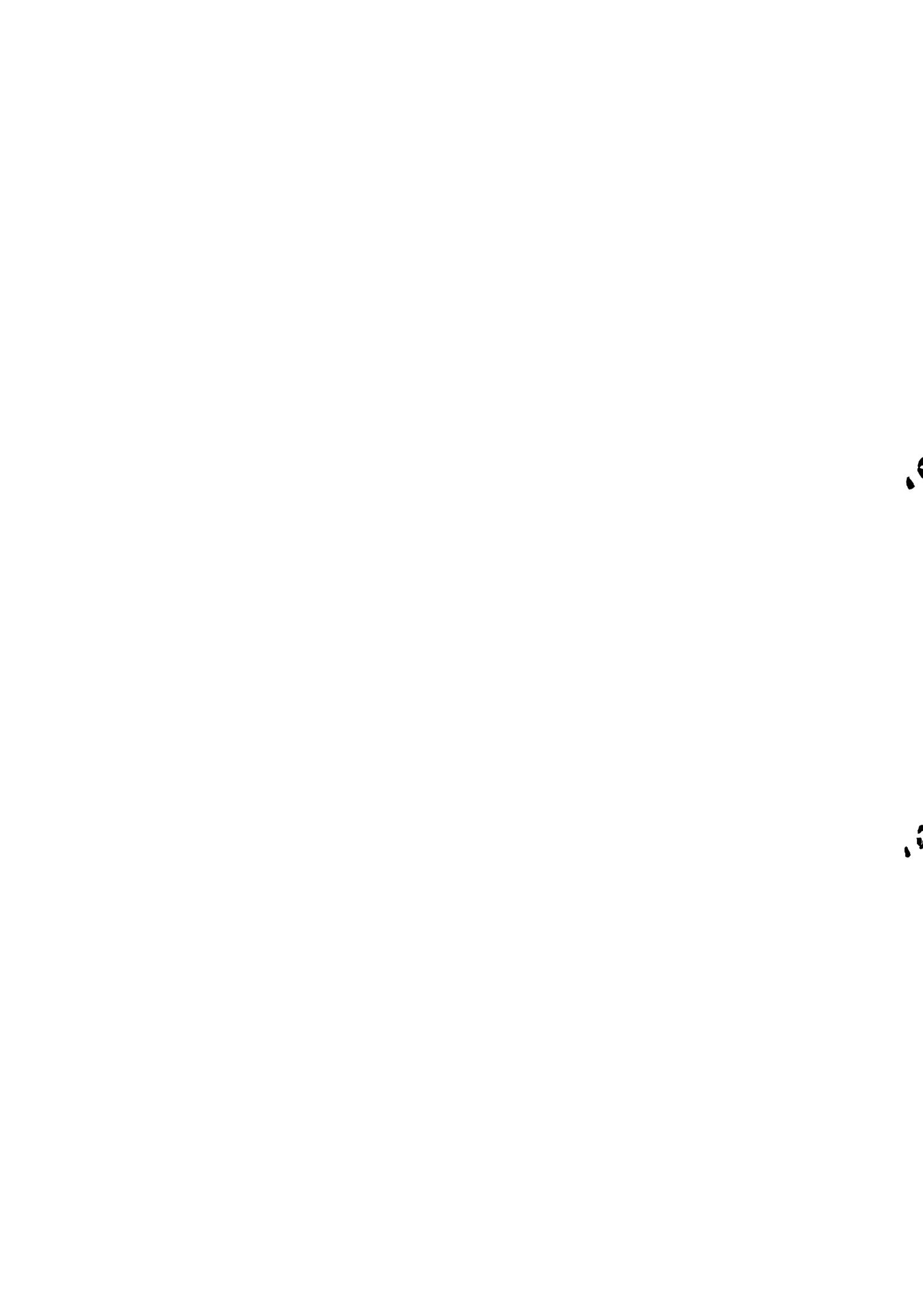
Método de preparación

El método de preparación es similar al del medio Löwenstein-Jensen.

Medio de Middlebrook (7H-9) Agar (16):

Constituyentes (por 1 000 ml. de medio)

Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄).....	0.5	gr.
Acido L-glutámico (sal de Na).....	0.5	gr.
Citrato de sodio (Citrato de Na ₃ , 2H ₂ O).....	0.1	gr.
Piridoxina.....	0.001	gr.
Biotina.....	0.0005	gr.
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O).....	2.5	gr.
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	1.0	gr.



Citrato de amonio férrico.....	0.04	gr.
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	0.05	gr.
Cloruro de calcio (CaCl ₂).....	0.0005	gr.
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O).....	0.001	gr.
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O).....	0.001	gr.
Agar purificado.....	15.0	gr.

Método de preparación

Disolver 4.7 gr. de la mezcla de ingredientes arriba señalados en 900 ml. de agua destilada con 0.5 gr. de Tween 80. Distribuir en cantidades de 180 ml. y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. A cada 180 ml. de medio estéril mantenido a 50-55°C agregar 20 ml. del complejo albúmina - dextrosa adquirido en el comercio. Distribuir el medio resultante en tubos de 16 x 160 mm. aproximadamente, con tapa de rosca, colocarlos en posición inclinada y dejar solidificar el medio.

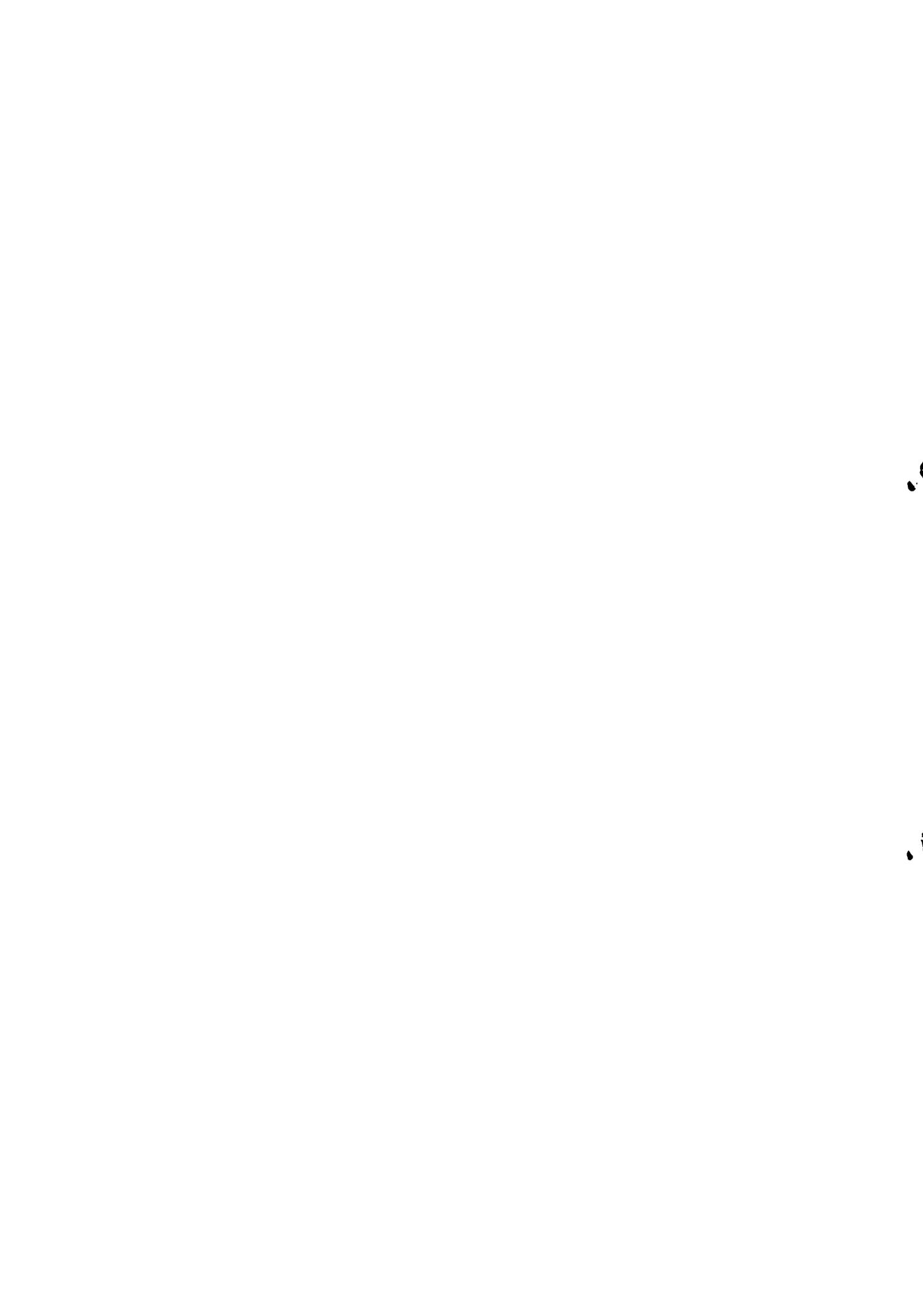
1.3.3 Determinación de la sensibilidad de *M. tuberculosis* y de otras micobacterias a los quimioterápicos y antibióticos

El desarrollo de métodos confiables de determinación de la resistencia bacilar a los quimioterápicos y antibióticos, ha significado un gran avance en el conocimiento de la biología del *M. tuberculosis*, en el control de la terapia antituberculosa, y en la determinación de los índices de resistencia primaria (resistencia en pacientes no tratados) y de resistencia adquirida durante el tratamiento, ambos de gran valor como indicadores epidemiológicos.

La resistencia bacilar a las drogas antituberculosas es, según los estudios realizados hasta ahora, el resultado de mutaciones ocurridas independientemente del contacto del bacilo con esas drogas. De existir en el *M. tuberculosis* los fenómenos de conjugación, transducción y transferencia, tendrían escasa importancia.

A fin de obtener la mayor concordancia posible en los resultados de las pruebas de sensibilidad, en las condiciones de América Latina es recomendable:

- Emplear un método de determinación relativamente sencillo, económico, reproducible y confiable.
- De acuerdo con las condiciones especiales de cada país o región, realizar las pruebas de sensibilidad sólo en el laboratorio central, o bien en este y en algunos laboratorios regionales.
- En el caso de que existan en el país varios laboratorios que realizan esta técnica, efectuar un control de calidad periódico, a fin de garantizar la comparabilidad de los resultados. Este control de calidad está a cargo del laboratorio central, o de un



laboratorio regional de referencia. Es conveniente que un solo laboratorio prepare el medio de cultivo para las pruebas de sensibilidad.

1.3.4 Método de las proporciones. Principio

Esta prueba consiste en medir la proporción de bacilos resistentes que existen en cada cepa. Para ello, la prueba indica el número total de bacilos cultivables

- (Colonias en el medio sin drogas) y el número de bacilos resistentes de esa población total
- (Colonias en el medio con droga). Ello permite establecer la proporción $(b/a \times 100)$ de bacilos resistentes a esa droga.

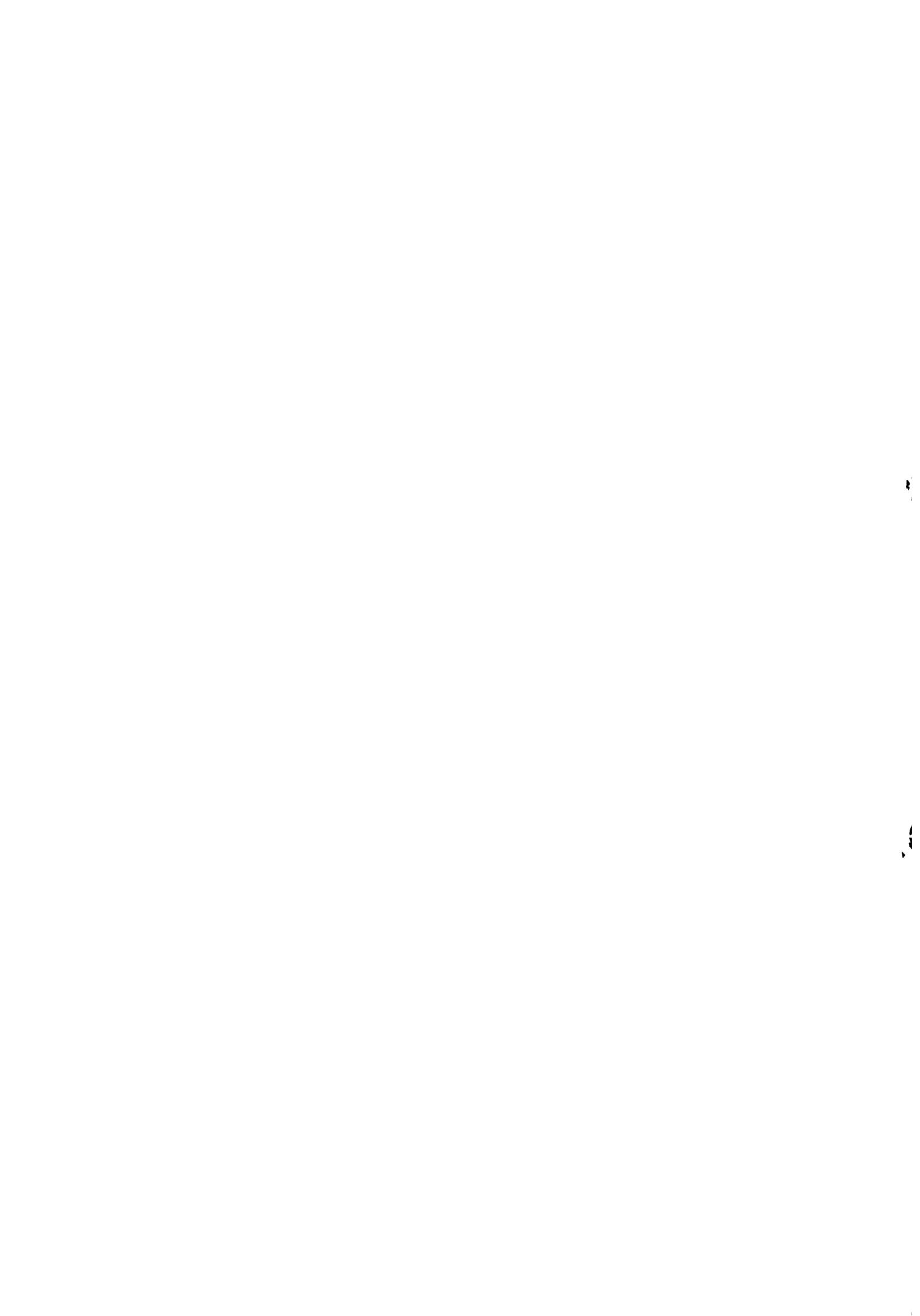
Se ha definido para cada droga una *concentración "crítica"*, capaz de inhibir el desarrollo de todas, o casi todas, las cepas "salvajes" (cepas aisladas de pacientes no tratados). Se definió luego para cada droga una *proporción crítica* (criterio de resistencia), que es la proporción de mutantes resistentes de una población bacilar, por encima de la cual la cepa es considerada resistente. Para ello se determinó:

- la proporción media de mutantes resistentes a cada droga, existente en poblaciones bacilares sensibles, y
- la proporción máxima de mutantes resistentes compatibles con el éxito terapéutico.

Se estableció la coincidencia de esa *proporción crítica* con los resultados clínicos. Estos estudios fundamentales fueron hechos por Canetti, Rist y Grosset para diversas drogas.

Se presentan a continuación las concentraciones y proporciones críticas (criterios de resistencia) empleadas en la variante simplificada del método de las proporciones, con las drogas adicionadas al medio Löwenstein-Jensen antes de coagular.

- Concentración de droga en el medio Löwenstein-Jensen, antes de la coagulación.
- Se emplea sulfato de dihidroestreptomomicina. La sal de estreptomomicina es inactivada en mayor grado por el calor que el derivado dihidrogenado.
- Concentración empleada si se usa Rifamicina en lugar de Rifampicina. La ventaja de la primera es su solubilidad en agua. Los resultados de la prueba son coincidentes, salvo para la especie *M. kansasii*, que es resistente a la Rifamicina y sensible a la Rifampicina.
- Medio Löwenstein - Jensen o Stonebrink a pH 5.0.
- Debe prepararse una solución madre al 1% en etilenglicol. El medio se debe mantener refrigerado y emplear dentro de los 30 días siguientes a su preparación.



- La solución madre de Tb1 se prepara en 2 - metoxietanol.

Cuadro 1

CRITERIOS DE RESISTENCIA DEL *M. TUBERCULOSIS* A LAS DROGAS ANTIBACILARES

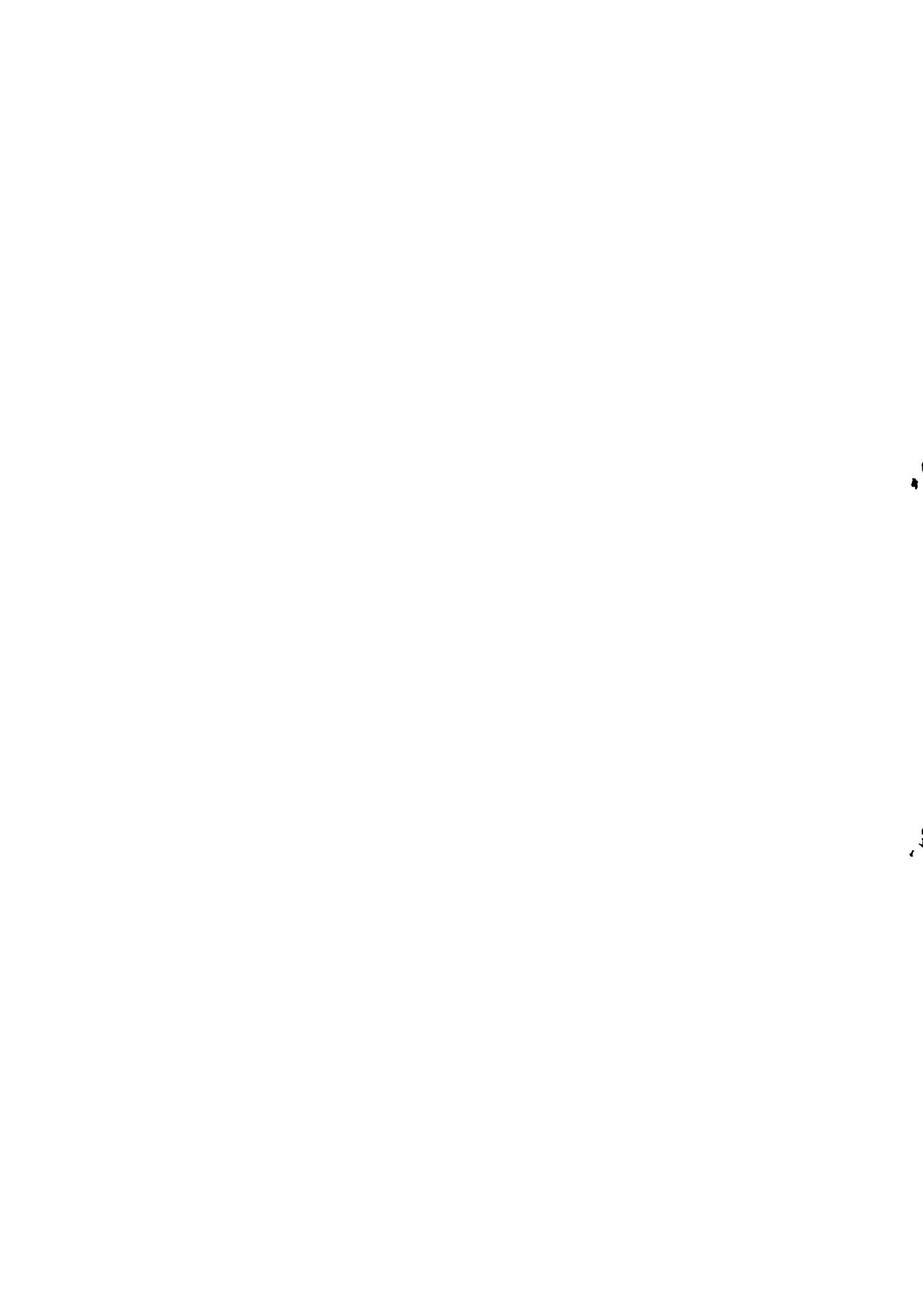
Quimioterápicos y Antibióticos	Concentración ug/ml.(1)	Proporción crítica (%)
Isoniacida (INH)	0.2	1
Estreptomina (SM) (2)	4.0	10
Ac. para-amino-salicílico (PAS)	0.5	1
Rifampicina (RFP)	40.0 (3)	1
Etambutol EMB)	2.0	1
Pirazinamida (PZA) (4)	200.0	10
Ethionamida (1314) (5)	20.0	10
Kanamicina (KM)	20.0	10
Viomicina (VM)	30.0	10
Ciclocerina (CS)	30.0	10
Tiosemicarbazona (Tb1) (6)	2.0	10

Técnica del método de las proporciones

La prueba de sensibilidad puede efectuarse a partir del material bacilífero (prueba directa), o a partir del cultivo (prueba indirecta). Se describe a continuación la técnica indirecta, por ser la más recomendable para el empleo de rutina en los laboratorios de América Latina. Todo material y soluciones deben ser estériles.

Preparación de la suspensión bacilar y sus diluciones:

- Con el asa metálica, tomar material del mayor número posible de colonias del cultivo.
- Colocar dentro de un frasco que contenga 20-30 perlas de vidrio de 3-5 mm. de diámetro y aproximadamente 0.5 ml. de agua destilada estéril.
- Agitar el frasco durante 20-30 segundos o hasta lograr una suspensión homogénea.
- Agregar aproximadamente 5 ml. de agua destilada. Mezclar agitando muy suavemente. Pasar esta suspensión con pipeta Pasteur a un tubo de ensayo, comparar la turbidez con una suspensión patrón de 1 mg/ml. de BCG. De ser necesario, ajustar diluyendo.
- A partir de esta suspensión madre, efectuar una dilución 1:10 (10 - 1 mg/ml.).



- Seguir realizando diluciones, 1:10, 1:100, hasta 10^{-5} . Al preparar cada dilución, mezclar bien y utilizar una pipeta diferente.

Inoculación en el medio de cultivo

Se inoculan 0.2 ml. de las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} en cada uno de dos tubos de medio sin droga. Si se efectúa una prueba de sensibilidad a tres drogas, se deberán inocular 10 tubos.

Incubación

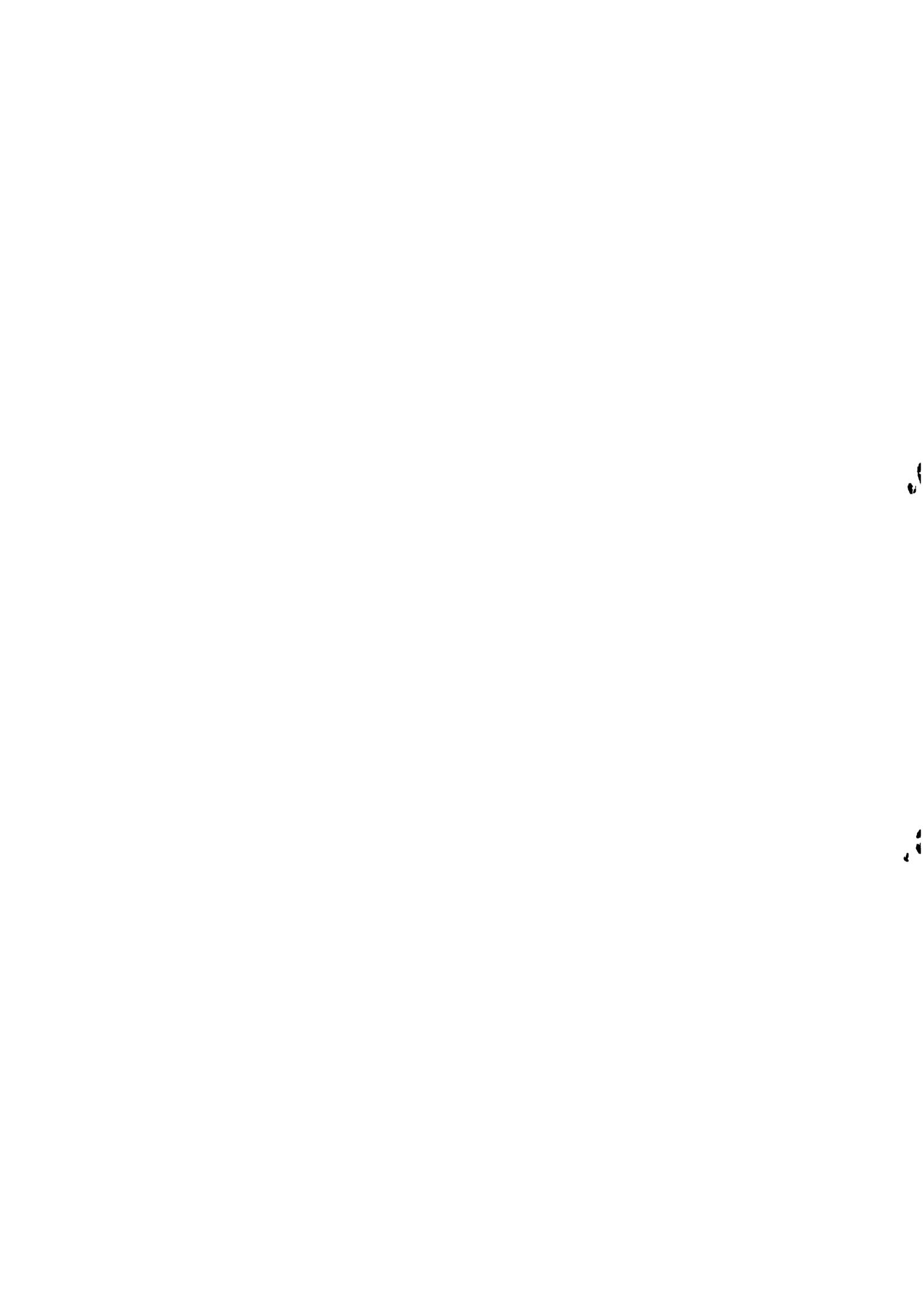
Una vez inoculados los tubos, se colocan inclinados en la estufa a 37°C . Si se emplean tubos con tapón de algodón, a las 48 horas se introduce ligeramente el algodón en el tubo con una pinza y se cierra éste con un tapón de caucho o látex bien ajustado. Si se emplean tubos con tapa de rosca, se debe dejar la tapa ligeramente floja y ajustarla a las 48 horas. Desde ese momento los tubos se incuban en posición vertical. Se efectúan dos lecturas de la prueba, a las 4 y a las 6 semanas de incubación.

Interpretación

Se realiza con los criterios de resistencia antes señalados. Cuando se observa resistencia a una o más drogas en la lectura hecha a las 4 semanas, se informa directamente. Cuando en esa lectura hay sensibilidad, se espera a hacer la lectura a las 6 semanas para informar.

Algunas precauciones

- El cultivo que se emplee para la prueba de sensibilidad debe tener más de 30 días, ya que es frecuente que los bacilos resistentes a algunas drogas tarden más en multiplicarse que los que son sensibles a ellas.
- No es conveniente emplear cultivos con muy escasas colonias que podrían no ser representativas de la población bacilar en la lesión.
- Cada nuevo lote de medio con droga debe ser controlado. Para ello se efectúa una prueba de sensibilidad con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Con la técnica indicada, esta cepa es sensible a todos los quimioterápicos y antibióticos.
- Los lotes de medio con drogas deben guardarse refrigerados y no emplearse después de transcurridos 2 meses.



1.3.5 Determinación de la sensibilidad del *M. bovis* a los quimioterápicos y antibióticos

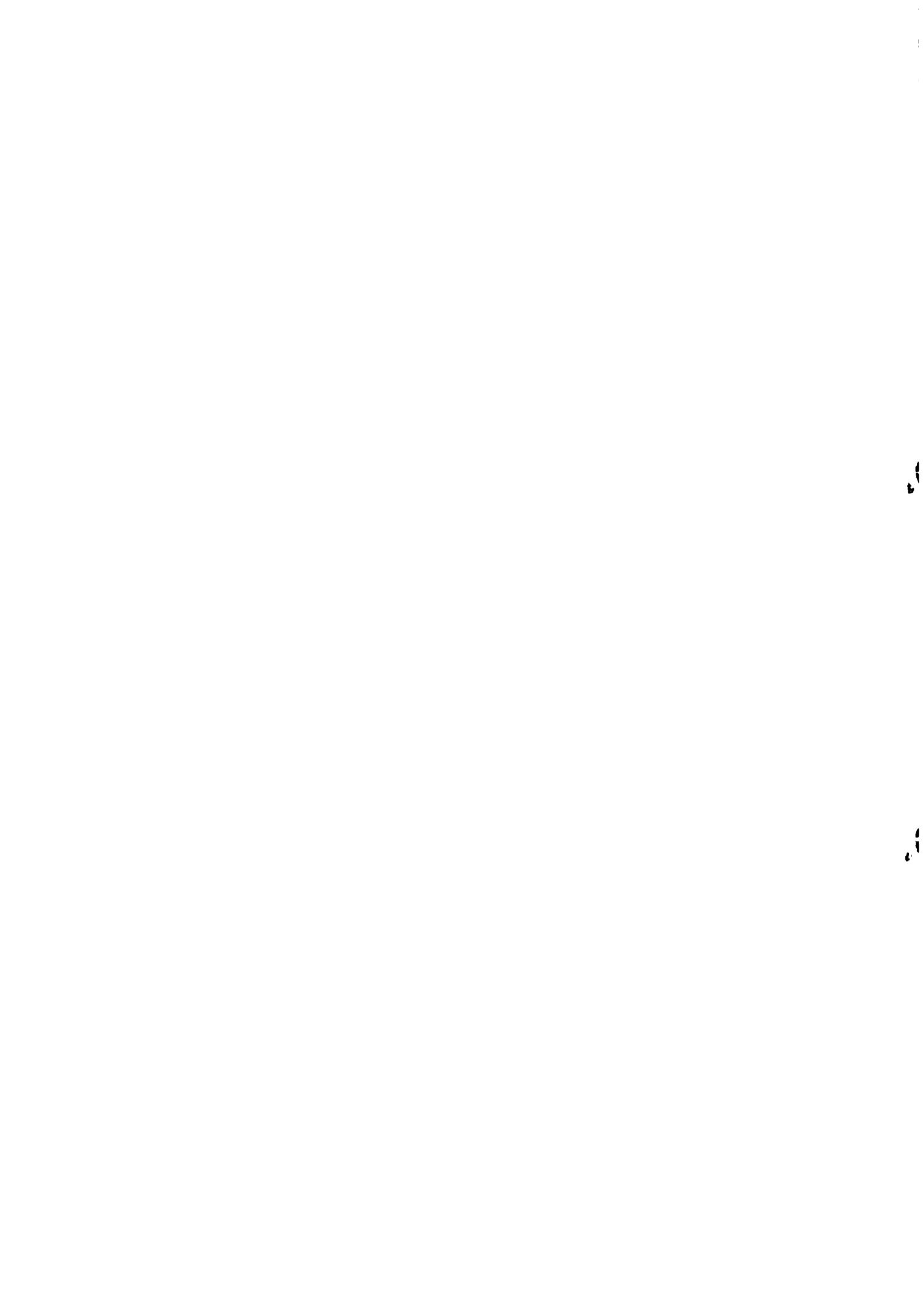
Al efectuar la prueba de sensibilidad en una cepa de *M. bovis* se presenta un problema especial. La sensibilidad natural de esta especie a las drogas es muy similar a la de *M. tuberculosis*. En los casos de tuberculosis bovina en humanos la posibilidad de adquisición de resistencia durante el tratamiento es también semejante. El *M. bovis* crece bien en el medio de Stonebrink, pero no en el de Löwenstein-Jensen. El piruvato de sodio, constituyente del medio de Stonebrink, inhibe in vitro a la isoniacida, tiosemicarbazona, cicloserina y en forma menos marcada, a la kanamicina y al estambutol. Por lo tanto, no se deben efectuar pruebas de sensibilidad en el medio de Stonebrink. Reemplazando el piruvato por glutamato de sodio se obtiene un medio en el que el *M. bovis* se multiplica mejor que en Löwenstein-Jensen. El glutamato no interfiere en la actividad de los quimioterápicos y antibióticos antes mencionados, por lo que este medio puede emplearse para la realización de la prueba de sensibilidad por el método de las proporciones, con concentraciones de drogas y criterios semejantes a los descritos anteriormente.

1.4 IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS

Las micobacterias están ubicadas taxonómicamente en la familia Micobacteriaceae, género *Micobacterium*. Son bacilos cortos, aerobios, no móviles, no esporulados, no capsulados, no flagelados. Su propiedad común más característica es la ácido-alcohol resistencia. El género incluye parásitos, saprófitos y formas intermedias. La mayor parte de las especies que lo constituyen pueden cultivarse in vitro; una excepción notable es el *M. leprae*. Dentro de este género, los tiempos necesarios para una división celular son muy variables (desde 2 a 3 horas. para el *M. phlei* hasta 14 días para el *M. leprae*).

Estructura celular

Las micobacterias son procariotas. El núcleo celular consiste en filamentos de DNA. La célula se halla rodeada de una pared rígida, constituida por una estructura covalente, compuesta por dos polímeros unidos entre sí: un micolato de arabinogalactano y un peptidoglicano. Sobre esta estructura se articulan proteínas y lipoproteínas complejas; entre el 20 y el 40% del peso seco de las micobacterias está constituido por lípidos, proveniente de su pared. Esto implica la posesión de un sistema enzimático específico para la síntesis y la degradación de estos compuestos. Dentro de estos compuestos se hallan los "ácidos micólicos" (ácidos grasos ramificados hidroxilados) muy importantes taxonómicamente, ya que sólo se han aislado de las micobacterias y de cepas de los géneros *Nocardia* y *Corynebacterium*, si bien con una composición diferente en cada uno de ellos. El factor "cuerda" (6-6



dimicolato de trehalosa), que ha sido aislado de todas las especies micobacterianas investigadas, se comporta como una toxina, hecho observado por primera vez por Bloch. La denominación de “factor cuerda” proviene de haberse considerado a este compuesto responsable de la distribución típica en cuerdas o trenzas que adquiere *el M. tuberculosis* en medio líquido y que se correlaciona con la virulencia de la cepa, si bien no de modo absoluto. Los detergentes no iónicos del tipo del Tween 80 disminuyen la formación de “cuerdas”, aunque no la virulencia.

El carácter de las colonias de las micobacterias en medios sólidos (rugoso o liso, cromógeno o no) no está asociado a su virulencia. Sin embargo, se ha observado en el *M. avium* que las colonias transparentes en medio 7H10 son virulentas, mientras que las colonias opacas no lo son.

La pigmentación es una propiedad genética. Los carotenos son específicos para cada especie. Algunos de ellos son fotoinducibles. Las cepas fotoinducibles, luego de exposición a la luz visible (400-700 nm), aumentan en varias veces el nivel de carotenos biosintetizados. La localización celular parece ser la membrana citoplasmática.

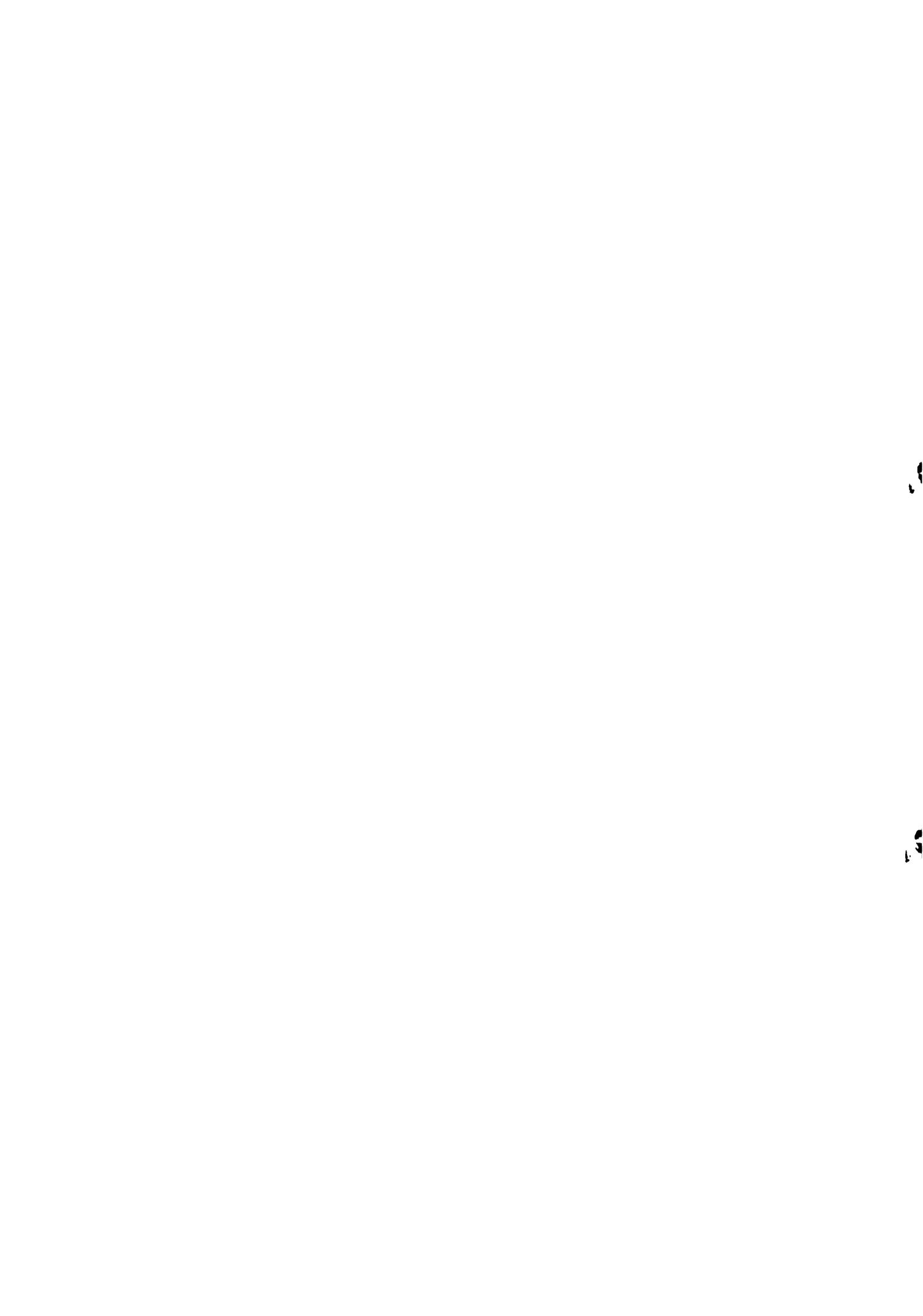
División celular

Las micobacterias se multiplican comúnmente por división binaria que comienza con una elongación intracitoplasmática de la membrana.

Clasificación de las micobacterias

Históricamente, la primera especie descrita fue el *M. leprae* (1870), luego el *M. tuberculosis* (1882), el *M. phlei*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis* y *M. avium*. Pero más del 50% de las especies del género no eran conocidas antes de 1950. Sin duda, las especies importantes desde el punto de vista de la salud pública humana y veterinaria son aquellas patógenas para el hombre y/o los animales. Su número es reducido, y el laboratorista debe diferenciarlas de otras especies saprófitas y de las que sólo ocasionalmente son causantes de enfermedad. Por otra parte, el conocimiento de que ciertas micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso humano o bovino pueden dar origen a lesiones semejantes a las de la tuberculosis en el hombre, ha provocado un verdadero alud de trabajos de investigación en este campo.

Estas micobacterias han recibido la denominación conjunta de “atípicas”, “no clasificadas”, “anónimas”, “MOTT” (mycobacteria other than tubercle) y “no tuberculosas”. Si bien llamarla “atípicas” no es correcto, ya que cada una de ellas es típica dentro de su especie, este nombre se ha popularizado y constituye la denominación más corriente.



Runyon propuso en 1959 una división de las micobacterias aisladas más comúnmente en un laboratorio basada en caracteres sencillos de observar: el tiempo de crecimiento y la cromogenicidad. Esa primera clasificación, aunque superada en profundidad y detalle, tiene gran utilidad como guía, en especial para el bacteriólogo clínico y médico. Consta de cuatro grupos y no incluye las especies típicas y las no cultivables: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. microti* y *M. paratuberculosis*.

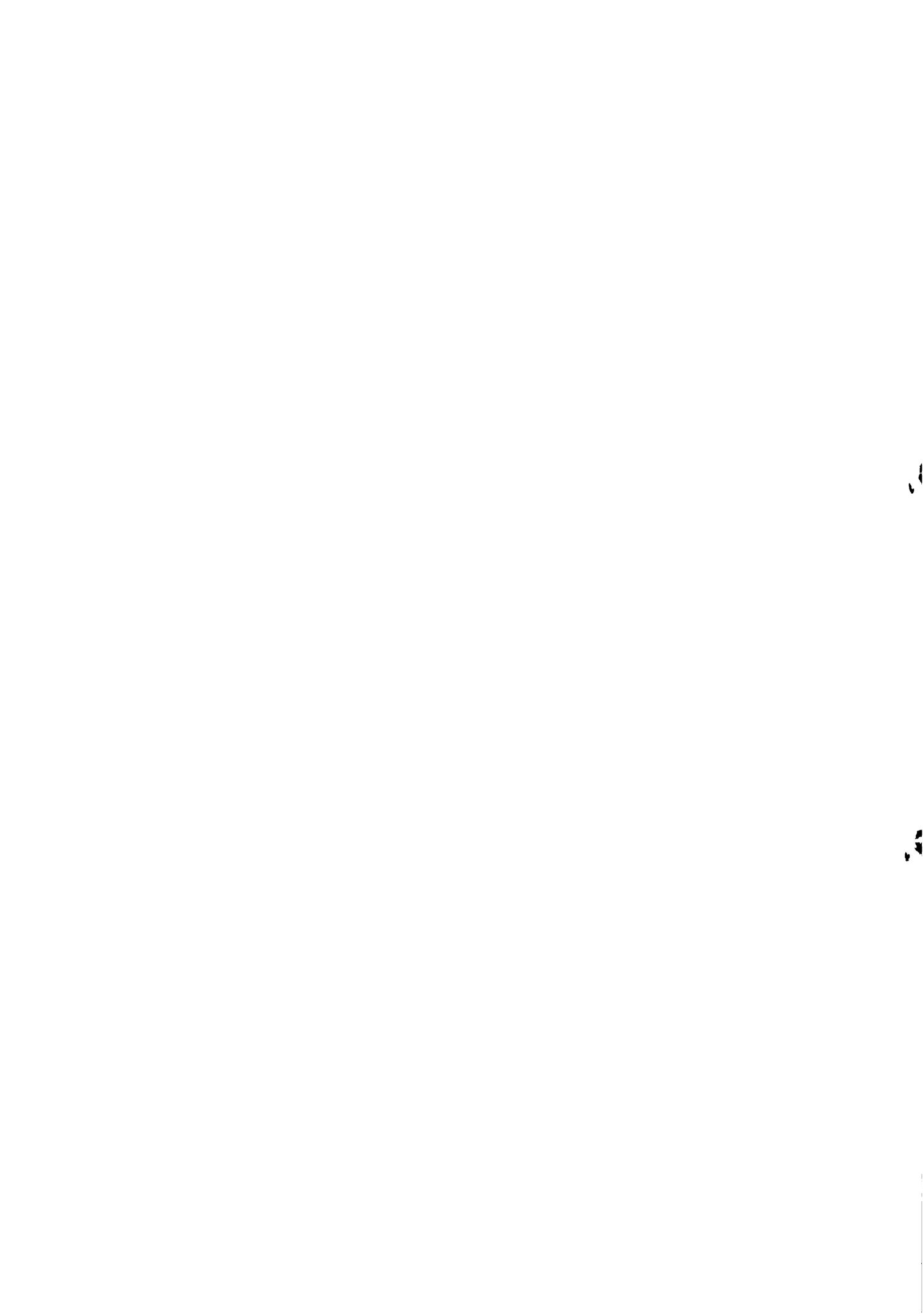
Cuadro N° 2

CLASIFICACION DE LAS MICOBACTERIAS ATIPICAS SEGUN RUNYON

Grupo	Descripción
I. Fotocromógenas	Crecimiento lento. Colonias no pigmentadas en la oscuridad, los cultivos jóvenes adquieren un color amarillo al exponerlos a la luz
II. Escotocromógenas	Crecimiento lento. Colonias pigmentadas, amarillentas o anaranjadas, aunque desarrollan en oscuridad.
III. No cromógenas	Crecimiento lento. Colonias no cromógenas generalmente. En algunos casos los cultivos viejos adquieren color amarillento
IV. De crecimiento rápido	Desarrollan colonias en los medios de cultivo en menos de una semana.

En 1965 se constituyó una Comisión Internacional para el Estudio de la Taxonomía de las Micobacterias (International Working Group on Mycobacterial Taxonomy, IWGMT). Este grupo ha preparado una serie de publicaciones de gran utilidad para el especialista, en las que se ha clarificado gradualmente este complejo problema.

Considerando el primer objetivo señalado -el diagnóstico de enfermedad- Runyon publicó en 1974 la lista de "patógenos micobacterianos" para el hombre, que se transcribe a continuación:



- *M. leprae*
- *M. simiae*
- *M. ulcerans*
- *M. szulgai*
- Complejo *M. tuberculosis*
- Complejo *M. avium-scrofulaceum*
- *M. kansasii*
- *M. xenopi*
- *M. marinum*
- Complejo *M. fortuitum*

Estas especies o complejos son responsables de las 10 micobacteriosis reconocidas hasta el momento. Dejando aparte el *M. leprae*, no cultivable, la importancia relativa de cada una de estas micobacterias es muy variable en América Latina. Por razones epidemiológicas, el *M. tuberculosis* en salud pública y el *M. bovis* en sanidad animal, deben seguir siendo las “estrellas” de las micobacterias en América Latina.

1.5 TIPIFICACION DE LAS MICOBACTERIAS. METODOS

Se describirán a continuación una serie de pruebas de laboratorio, bioquímicas y enzimáticas, relativamente sencillas, de tipificación de micobacterias, cuya utilidad práctica se puede observar en los cuadros 3 y 4.

En el cuadro 5 se han seleccionado algunas pruebas y criterios de diferenciación de especies, o de complejos de especies micobacterianas, que pueden constituir el método básico de rutina para los laboratorios de bacteriología de tuberculosis, de nivel central o regional en América Latina.

1.5.1 Aspecto microscópico

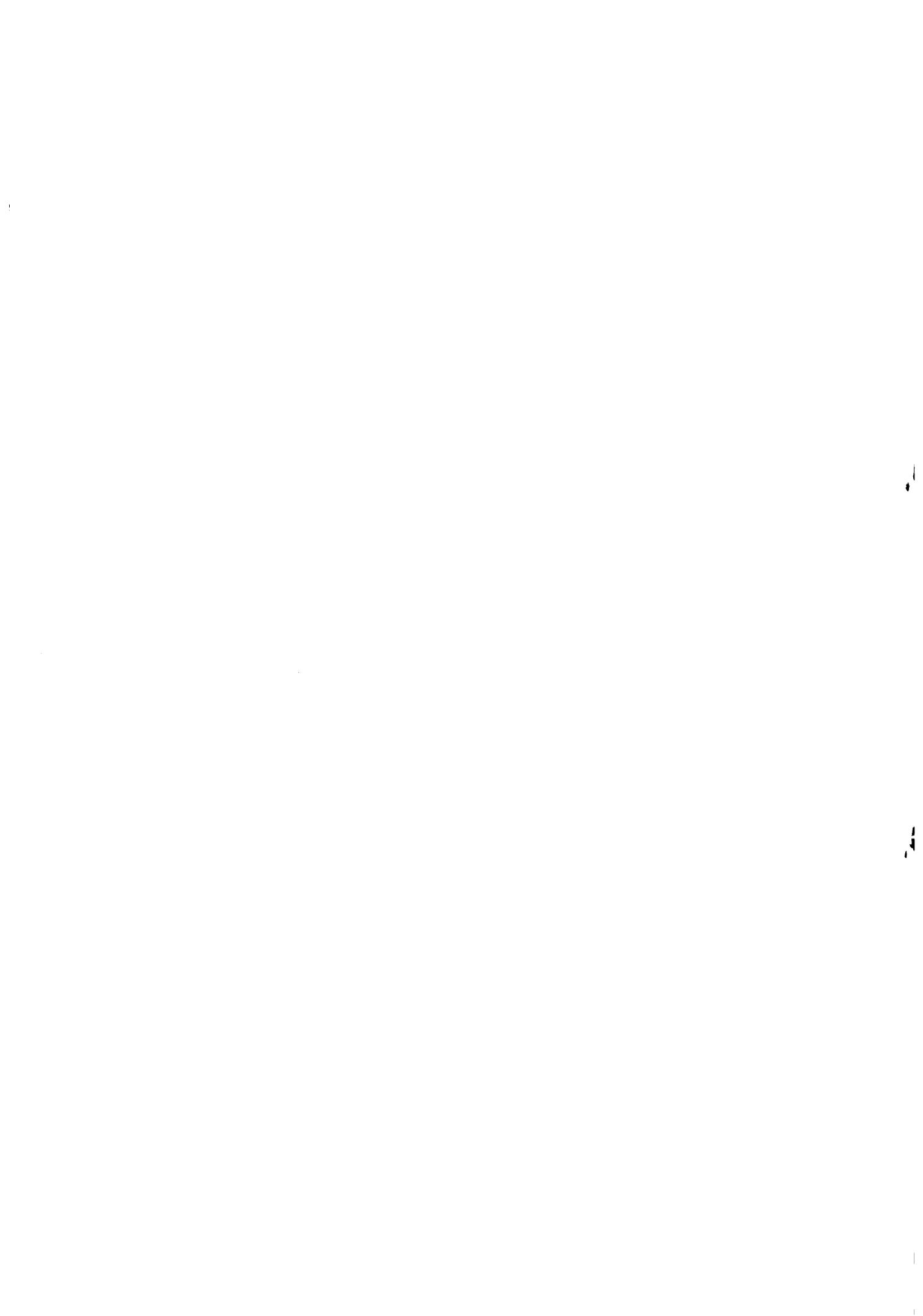
La observación microscópica es el primer control que se debe realizar de todo cultivo que se quiera tipificar. Para ello, se efectúa una coloración de Ziehl-Neelsen a partir de colonias aisladas en medio a base de huevo de la siguiente manera: se coloca una gota de agua sobre el portaobjetos, se toca la colonia con el asa estéril y se mezcla el material bacteriano recogido con la gota sobre el portaobjetos. Una vez fijada y coloreada esta preparación, se observan y anotan:

- la presencia de formas ácido - alcohol resistente,
- su morfología y
- su tamaño.

1.5.2 Determinación de las características del cultivo

Para determinar las siguientes características del cultivo se pueden emplear los medios de Löwenstein - Jensen y de Stonebrink:

- el tiempo que transcurre hasta la aparición de colonias observables,



Cuadro N° 3

**ALGUNAS CARACTERISTICAS UTILES
PARA LA DIFERENCIACION DE MICOBACTERIAS**

Prueba o Propiedad	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i>	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. similes</i>	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. goodii</i> <i>M. flavescens</i>	<i>M. xenopi</i> <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. goodii</i> Comp. <i>M. Terres</i> <i>M. triviale</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i>
Crecimiento	L L	L L L	L L L L	L L L L L L L L	R R R R R
Medio Löwenstein	+ +	+ + +	+ + + +	+ + + + + + + +	+ + + + +
Medio Stonebrink	+ +	+ + +	+ + + +	+ + + + + + + +	+ + + + +
Temperatura de crecimiento					
22-25°C	- -	+ +	+ + ++ +	- P P P + + +	+ + + + +
32-35°C	+ +	+ +	+ + + +	P + + + + + +	+ + + + +
35-39°C	+ +	+ 1 +	+ + - +	+ + + - + + +	+ + + + +
41-43°C	- -	- - -	- - -	+ + P - P P P	P P + + P
Niacina	✓ -	- - +	- - -	- - - + - - -	- V - - -
Nitrato reducción	+ -	+ - -	- + +	- - - - - +	+ - + + +
Catalasa (> 45 mm)	- -	+ - +	+ + +	- - - + - + +	+ + + + +
Catalasa luego de calentar 68°C, 20 min	- -	+ - +	+ + +	+ + + + - + +	+ + + P +
Pigmentación en la oscuridad	- -	- - -	+ 2 +	3 4 4 - - -	- - + - V
Fotocromogenicidad	- -	+ + +	3 2.3	- - - - - -	- - - - +
Hidrólisis de Tween (5 - 10 días)	P -	+ + -	- P +	- - - - + + +	P - + + +
Reducción de telurito (3 días)	- -	- -	- - P	- P P - - -	P P P + P
β-glicosidasa	+ -	- - -	V +	- - - - + V	+ -
β-galactosidasa	- -	- - V	- - V	V - - + -	- -
Crecimiento con CINA 5%	- -	- -	- - +	- - - - - +	+ P + + +
Toma de Hierro	- -	- -	- - -	- - - - - -	+ - + + +
Arilsulfatasa (3 d)	- -	- -	- P -	P - - - - P	+ + - - -
Ureasa	+ +	+ -	+ +	- - - + -	+ +
Significación clínica	+ +	+ + +	+ + -	+ + + + - - -	? ? - - -

L: Lento

R: Rápido

P: Parcial, algunas cepas poseen esta característica y otras no

V: Variable

?: Muy poco probable

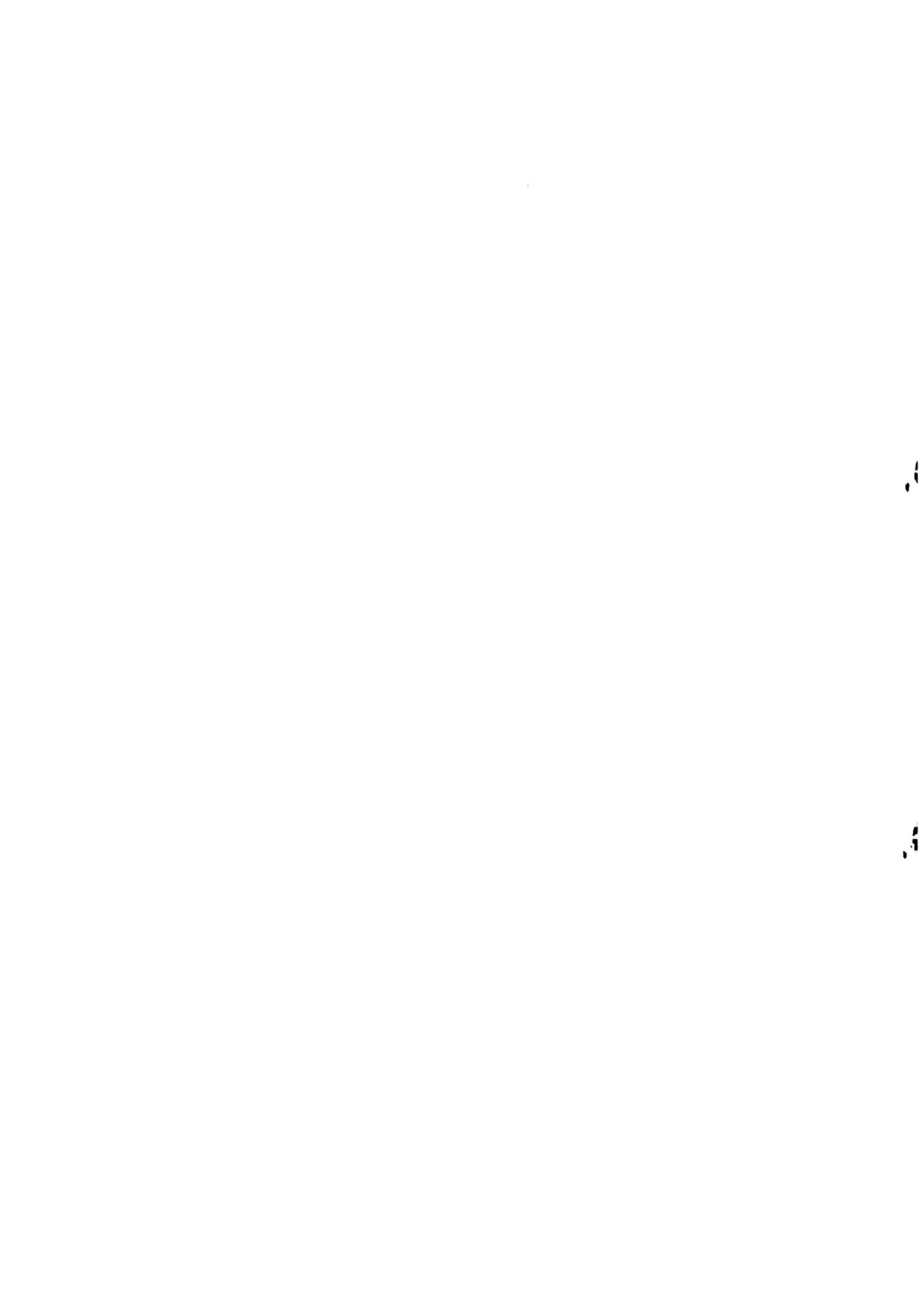
1: En el primer aislamiento sólo crece a 31°-33°C, pero en sucesivos subcultivos puede crecer a 37°C

2: *M. szulgai* es escotocromógeno cuando crece a 37°C y fotocromógeno a 25°C

3: El pigmento se intensifica por envejecimiento o por exposición prolongada a la luz

4: En algunas cepas aparece pigmentación por envejecimiento

Espacio en blanco: no hay suficientes datos



- la temperatura óptima de crecimiento y
- los caracteres de las colonias.

Cuadro N° 4

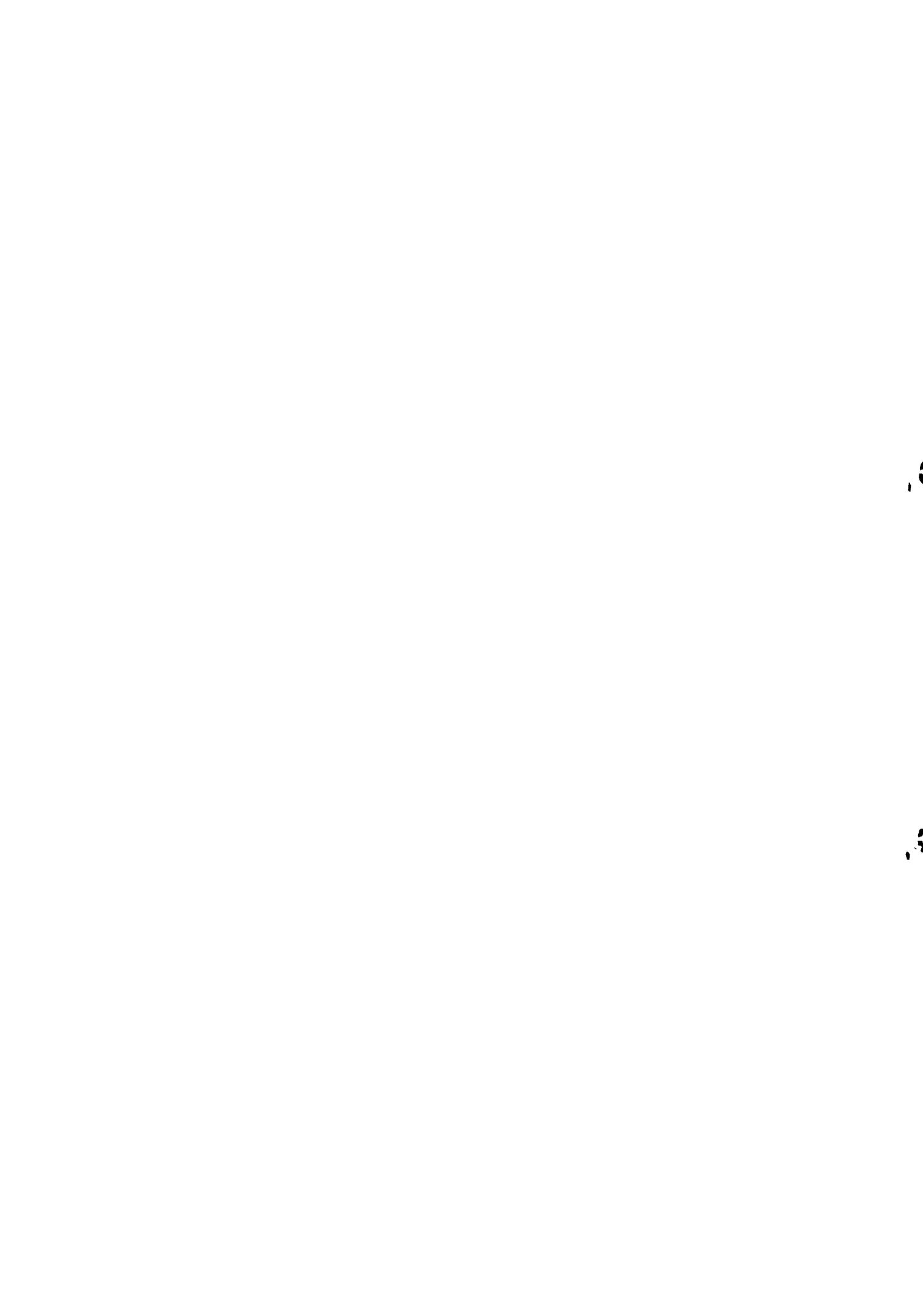
OTRAS CARACTERISTICAS UTILES PARA LA DIFERENCIACION DE MICOBACTERIAS

Pruebas propiedad	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> INH Res.	BCG	<i>M. africanum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. Intracellulare</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. fortuitum</i>
Crecimiento en Presencia de:												
TCH 2 µg/ml	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
HA 250 µg/ml	V	-	V	-	V	+			+	+		
INH 10 µg/ml	-	-	±	-	-	P	+	+	+	+	+	+
PNB 50µg/ml	-	-	-	-	-	P			P	P		
SM 4 µg/ml	-	-	-	-	-	+	+	+		+		+
PAS 0,5 µg/ml	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	V	+
Cicloserina 30 µg/ml	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
PZA 100 µg/ml	-	+	+	+	-	+		-	+	+	+	+

P: Parcial, algunas cepas poseen esta característica y otras no

V: Variable

Espacio en blanco: no hay suficientes datos



Cuadro N° 5

METODO BÁSICO DE DIFERENCIACION DE MICOBACTERIAS

Prueba o Propiedad	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. flavescens</i>	Compl. <i>M. avium-intracellulare</i> <i>scrofulaceum</i> (MAIS)	<i>M. ulcerans</i>	Compl. <i>M. nonchromogenicu-</i> <i>terrae-triviale</i>	<i>M. gastri</i>	Compl. <i>M. fortuitum-peregrinum</i>	Compl. <i>M. chelonae</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. vaccae</i>
Crecimiento	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R
Temperatura de crecimiento														
22-25°C	-	-	+	+	+	+	-	P	+	+	+	+	+	+
35-38°C	+	+	+	1	+	+	+	-	+	+	++	+	+	+
41-43°C	-	-	-	-	-	-	+	-	P	P	P	P	+	P
Medio Löwenstein	+	+ ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Medio Stonebrink	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Niacina	+	-	-	-	-	-	-	+ ¹	-	-	-	V	-	-
Catalasa 68°C	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Nitrato reducción	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
Hidrólisis de Tween	P	-	+	+	+	+	-	-	+	+	P	-	+	+
Toma de Hierro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Crecimiento con CINA 5%	-	-	-	-	-	+	-	-	P	-	+	P	+	+
Pigmentación en oscuridad	-	-	-	-	+	+	P	-	-	-	-	-	+	P
Fotocromogenicidad	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
Significación clínica	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	?	?	-	-

L: Lento

R: Rápido

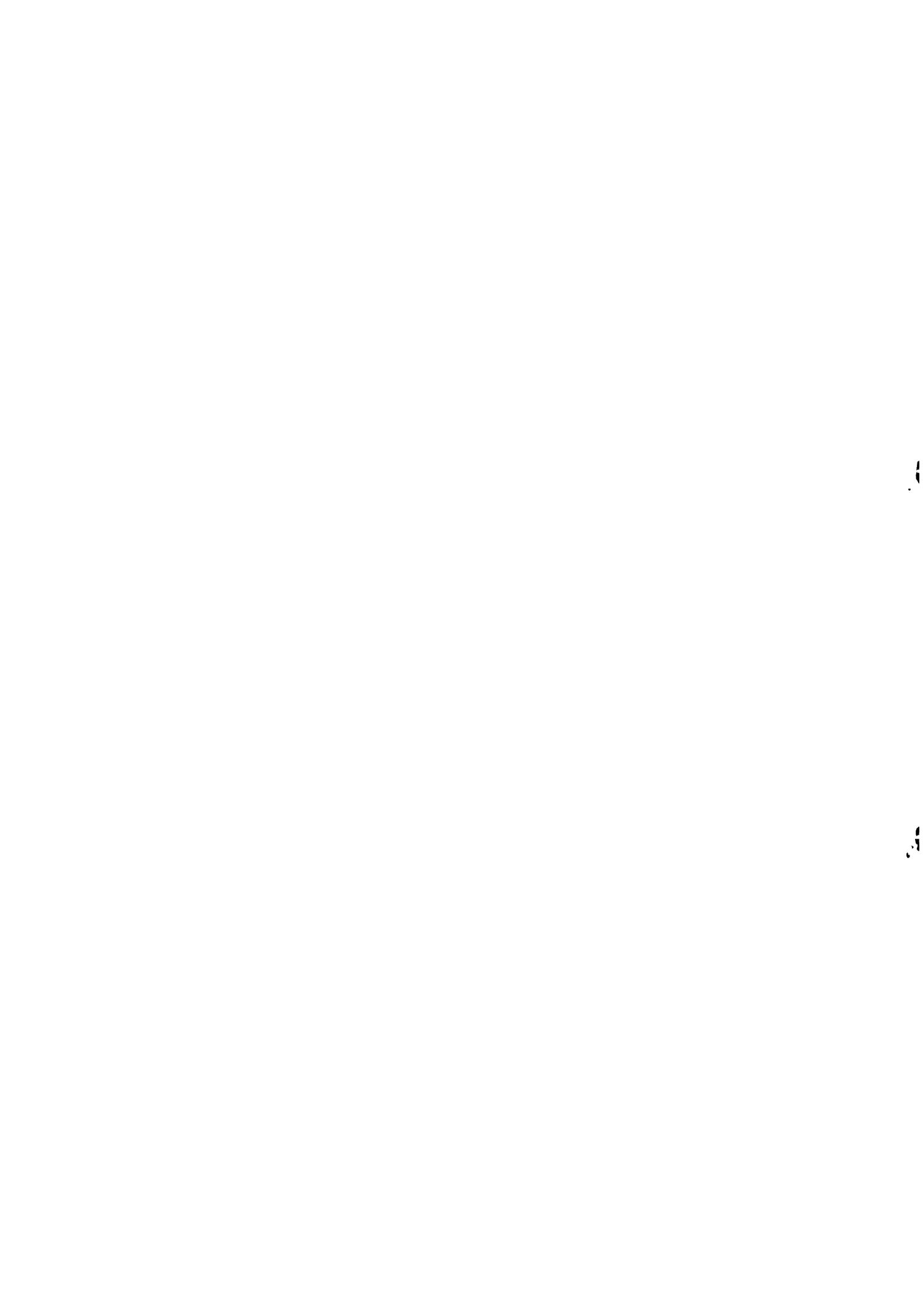
P: Parcial, algunas cepas poseen esta característica y otras no

V: Variable

?: Muy poco probable

1: En el primer aislamiento sólo crece a 31°-33°C, pero en subcultivos puede crecer a 37°C

2: En el primer aislamiento el *M. Bovis* muy difícilmente llega a crecer en Löwenstein-Jensen



Preparación de la suspensión bacteriana para inoculación de los medios de cultivo

El método es semejante al que se debe seguir en una prueba de sensibilidad indirecta. Se debe contar para ello con una suspensión bacilar patrón de turbiedad, para cuya preparación se siguen los pasos siguientes:

Pesada estéril de BCG, a partir de colonias de ese bacilo en medio de Löwenstein-Jensen. Para realizarla se colocan en el platillo de una balanza de precisión, sobre un papel encerado o papel de aluminio estéril (de peso conocido) 10 mg. de bacilos, tomados del cultivo con una espátula o asa estéril. El material pesado se pasa a un frasco de 50 ml. de capacidad, con 20-30 perlas de vidrio de 3-5 mm. de diámetro, al que previamente se han agregado 0.5 ml. de agua destilada estéril. Se agita manualmente hasta observar el rompimiento de las colonias y se adiciona lentamente 5 ml. de agua destilada.

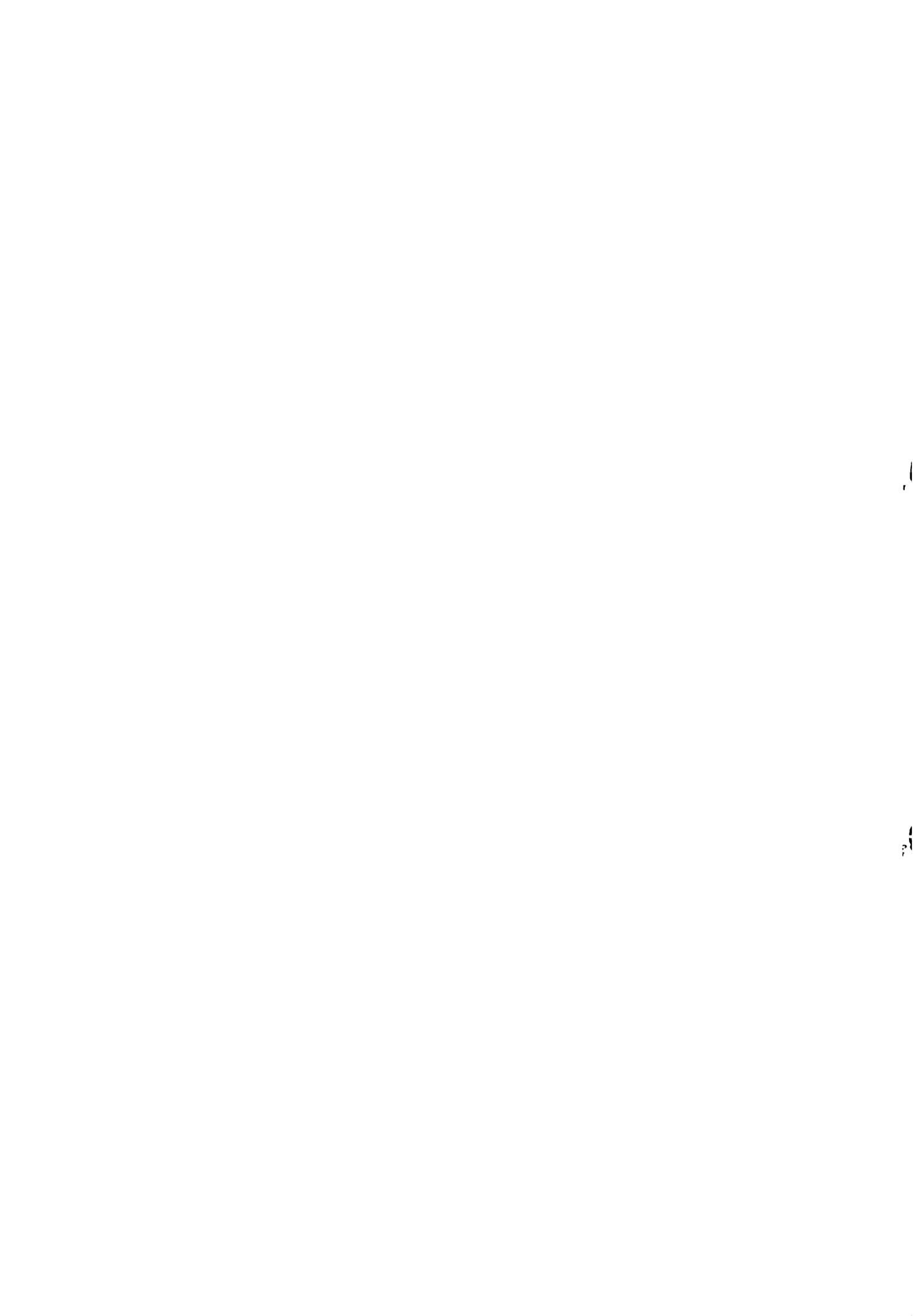
La suspensión se pasa a un tubo y se completa hasta 10 ml. El tubo se sella y se guarda en refrigerador; esta suspensión debe renovarse mensualmente. Puede emplearse en su lugar una ampolla de la Preparación Internacional de Referencia de Opacidad, de 10 unidades de Opacidad por ml. (Patrón Biológico Internacional de la OMS).

Se prepara una suspensión madre bacilar del cultivo que se va a estudiar y se compara la turbiedad con el patrón.

A fin de obtener colonias bien separadas en el cultivo, se emplea una dilución 10^{-2} o 10^{-3} de esa suspensión madre, de la cual se inoculan 0.2 ml. en cada uno de 10 tubos de Löwenstein - Jensen y 4 de Stonebrink que se incuban de la forma siguiente:

- 2 Löwenstein - Jensen a 20-25°C,
- 3 Löwenstein - Jensen y 2 Stonebrink a 37°C,
- 3 Löwenstein - Jensen a 30°C y
- 2 Löwenstein - Jensen y 2 Stonebrink a 42°C.

Dos tubos de Löwenstein incubados a 37°C y dos incubados a 30°C se envuelven en papel negro o de aluminio. Se controla la aparición de desarrollo a los 4, 8, 15, 30 y 60 días. Se anota el aspecto de las colonias: lisas, rugosas, pequeñas, cremosas, brillantes, etc., la presencia o no de pigmento y las temperaturas en las cuales hubo crecimiento.



1.5.3 Prueba de fotocromogenicidad

En lo que respecta a la presencia de pigmento, dos son los resultados posibles:

- a) Se observa pigmentación tanto en los tubos cubiertos como en los no cubiertos (escotocromogenicidad).
- b) No se observa pigmentación en ninguno de ellos.

En el caso b) se debe efectuar la prueba de fotocromogenicidad que consiste en destapar uno de los tubos y colocarlo expuesto a la luz natural directa, o bien a una distancia de 40 cm. de una lámpara fluorescente, durante 48 horas. Luego de este período se destapa el tubo restante y se compara su color con el del que fue expuesto a la luz. De observarse en este último la aparición de pigmento, se considerará a la cepa fotocromógena. Esta prueba no es válida si el cultivo tiene más de 3 semanas. Algunas cepas pueden desarrollar color después de exposición muy prolongada a la luz natural, pero en este caso no son consideradas fotocromógenas.

1.5.4 Prueba de niacina

Reactivos

- Bromuro de cianógeno*, solución acuosa al 4 - 10%
- Solución alcohólica de bencidina o de anilina al 4%

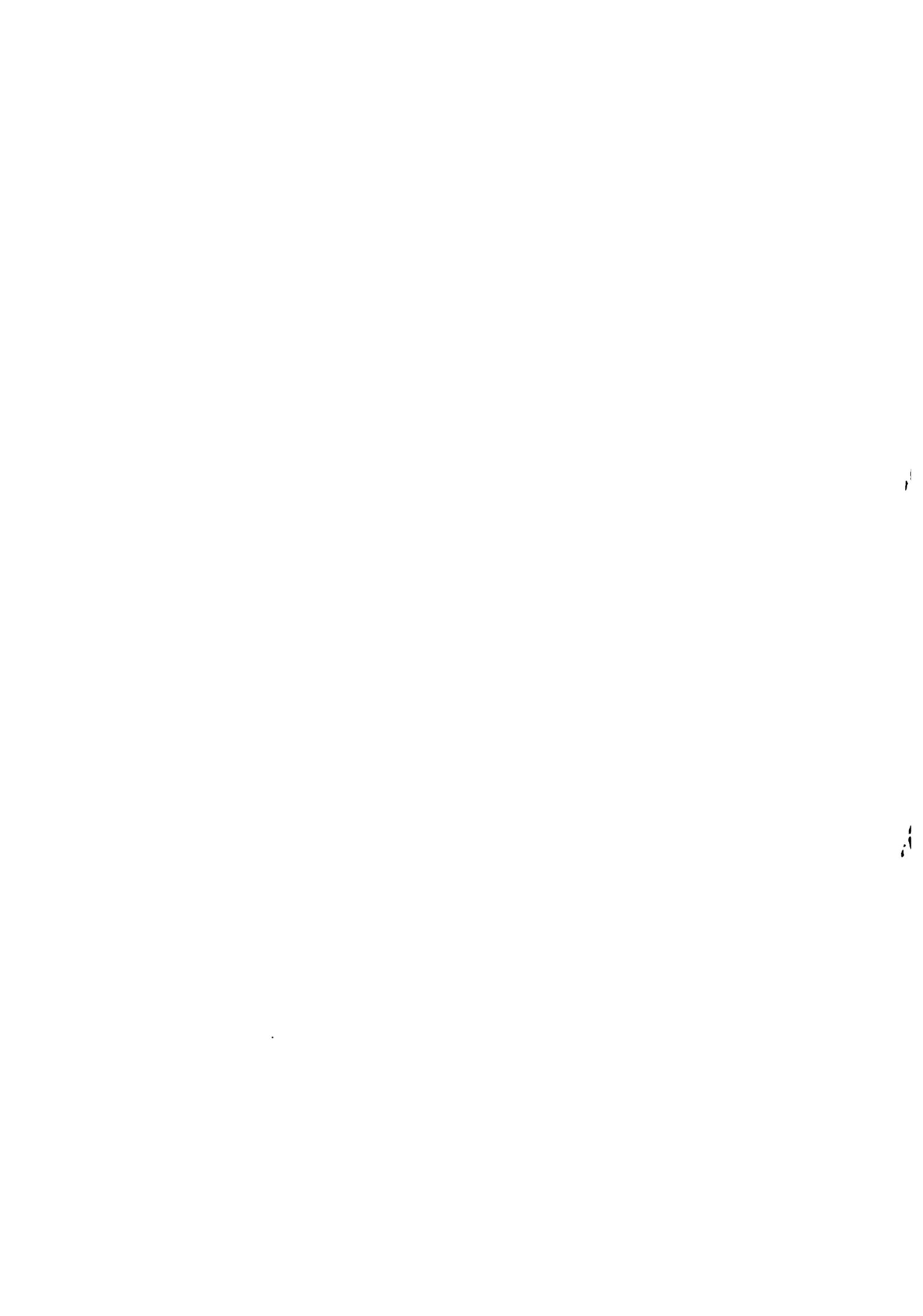
** El bromuro de cianógeno se puede adquirir en forma cristalina, o bien preparar la solución de la manera siguiente:*

Trabajar en una cabina de seguridad muy bien ventilada. Agregar, al tiempo que se mezcla, con pipeta o bureta, gota a gota, una solución de cianuro de potasio al 4% recién preparada sobre 2 ml. de bromo, contenidos en un erlenmeyer, hasta la completa decoloración. Conservar la solución de bromuro de cianógeno en refrigeración, en frasco color caramelo. La solución es muy volátil, por lo que es conveniente preparar una cantidad pequeña y conservarla sólo por lapsos cortos.

Advertencia: Resulta muy peligroso manipular una ampolla de bromo. Conviene conservar el bromo en forma de agua de bromo, en un frasco de vidrio color caramelo con tapón esmerilado.

Técnica

Agregar a un cultivo abundante en medio Löwenstein-Jensen, de no menos de 4 semanas, 1 ml. de agua destilada estéril. Romper las colonias a fin de facilitar la



difusión de la niacina. Dejar el tubo inclinado durante no menos de 15 minutos. Colocar nuevamente el tubo en posición vertical en la gradilla, extraer el líquido con una pipeta, pasarlo a un tubo pequeño y agregar en éste 0.5 ml. de bromuro de cianógeno y 0.5 ml. de la solución de bencidina o anilina.

Advertencia: Todo el procedimiento debe realizarse con suma precaución, en una cabina de seguridad bien ventilada. Al finalizar las pruebas se debe agregar solución de hidróxido de sodio a los tubos, ya que bromuro de cianógeno es muy tóxico y en presencia de ácidos se convierte en ácido cianhídrico.

Lectura e interpretación

De ser la reacción positiva aparecerá de inmediato una coloración violácea, o amarilla, según se haya empleado bencidina o anilina.

Siempre se debe efectuar simultáneamente un testigo positivo: un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv de abundantes colonias y de más de 4 semanas. Si el testigo fuera negativo, debe repetirse la reacción, empleando soluciones recién preparadas de bromuro de cianógeno y de bencidina.

1.5.5 Prueba de nitrato reducción

Esta técnica se efectúa en cultivos de menos de 1 mes.

Reactivos

- Solución acuosa 0.01M de nitrato de sodio (0.085%)
- Reactivo de Griess:

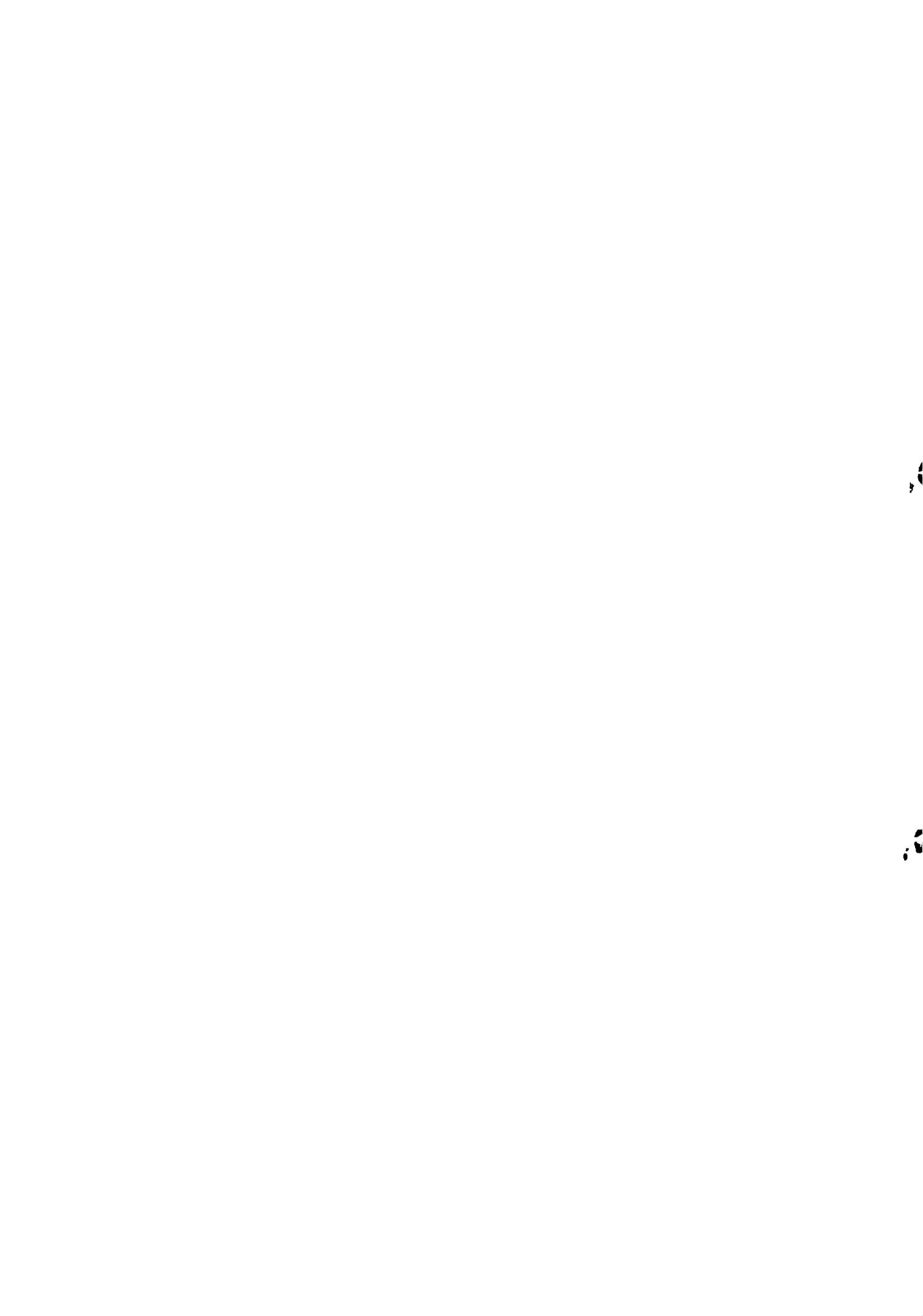
Solución A

Acido sulfanílico (o sulfanilamida).....0.8 gr.
Acido acético..... 30 ml.
Agua destilada100 ml.

Solución B

α -naftilamina..... 0.5 gr.
Acido acético..... 30 ml.
Agua destilada.....100 ml.

Conservar ambas soluciones en frascos de color caramelo, preferentemente en refrigeración. Si se produce cambio de color, desecharlas.



Técnica

La reacción se realiza en tubos de 16 x 125 mm. con tapa de rosca, a los que se agregan 4 o 5 gotas de agua destilada, luego se introducen con un asa aproximadamente 10 mg. de masa bacilar, tratando de homogeneizar la mezcla. El sustrato lo constituyen 2 ml. de la solución de nitrato de sodio. Se incuba la suspensión 2 horas. a 37° C. Al cabo de este tiempo se agregan 0.2 ml. de la solución A y 0.2 ml. de la solución B, del reactivo de Griess. Se agita suavemente y se realiza la lectura de inmediato.

Lectura e interpretación

Reacción positiva: coloración roja.

Reacción débil o dudosa: coloración rosada.

Reacción negativa: sin coloración o rosa pálido.

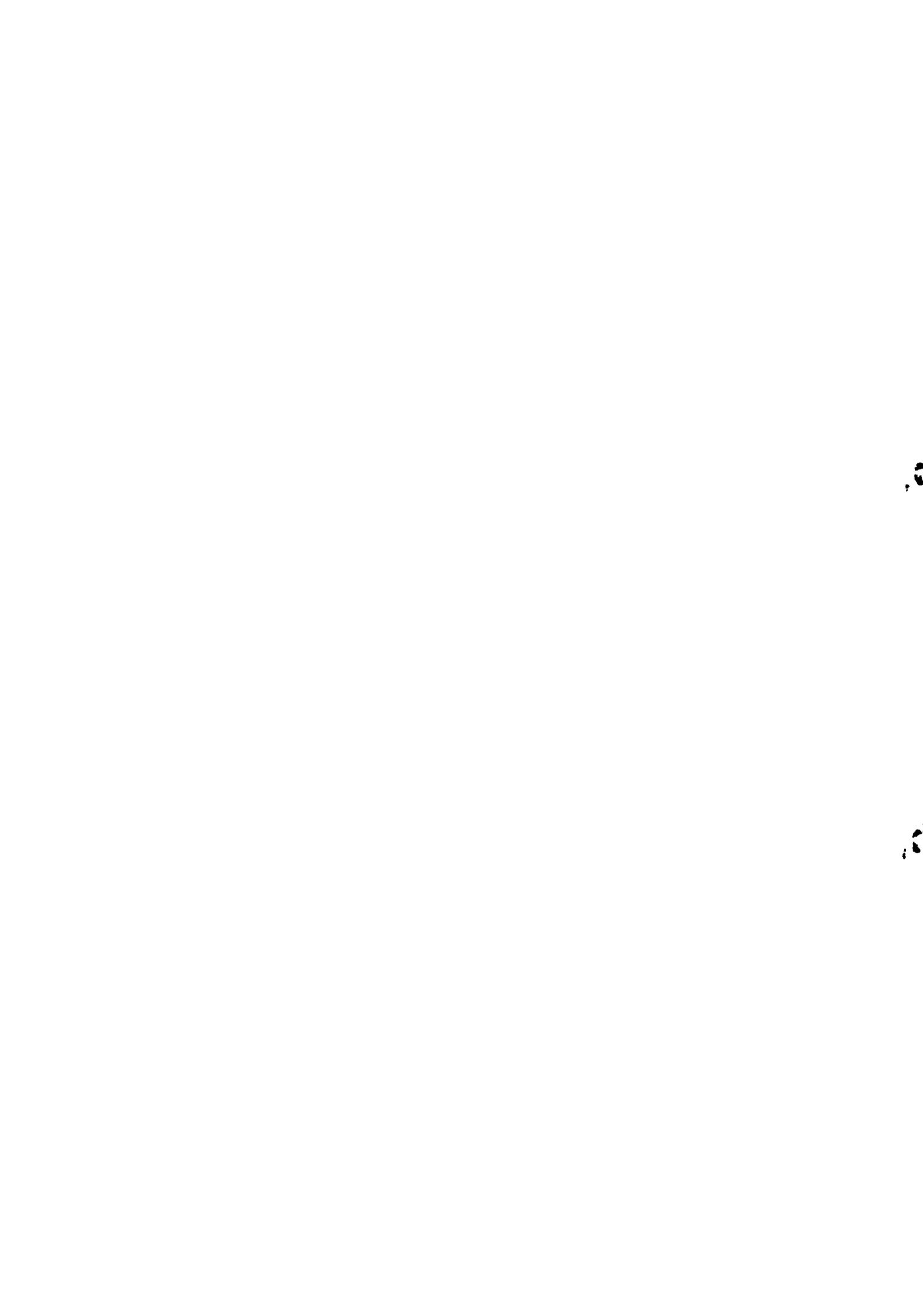
Se deben efectuar dos controles simultáneamente: uno, en un tubo con el sustrato solamente, y otro, en un tubo con colonias de un cultivo joven de *M. tuberculosis* (positivo).

Variante

Esta prueba se puede efectuar empleando una mezcla de polvos, el reactivo de Lampe, cuya composición es la siguiente:

Acido sulfanílico.....	1 parte
N (1 - naftil) etilendiamina, clorhidrato.....	1 parte
Acido tartárico.....	10 partes

Agitar y mantener protegido de la luz natural. Se procede según la técnica arriba descrita, pero en vez de agregar el reactivo de Griess, adicionar a cada tubo con una espátula una pequeña cantidad del reactivo de Lampe. La lectura e interpretación son similares a las indicadas antes.



1.5.6 Prueba de catalasa semicuantitativa

Reactivos

- Agua oxigenada 110 volúmenes (solución de peróxido de hidrógeno al 30%). Debe conservarse en refrigeración.
- Solución acuosa de Tween 80 al 10%. Calentar ligeramente el agua para obtener mejor disolución. Conservar luego en refrigeración.

Técnica

- Distribuir 5 ml. de medio Löwenstein-Jensen en tubos estériles de 18 x 150 mm., con tapa de rosca.
- Coagular el medio con los tubos en posición vertical, lo cual puede efectuarse colocándolos en un baño de agua termorregulado a 85°C, durante 40 minutos.
- Inocular la superficie del medio con 0.1 ml. de una suspensión bacilar en agua destilada de concentración aproximada 1mg/ml.
- Incubar 2 semanas a 37°C. Asegurarse al cabo de este tiempo, que existe buen desarrollo.
- Mezclar partes iguales de peróxido de hidrógeno y solución de Tween. Dejar a temperatura ambiente.
- Agregar 1 ml. de la mezcla de soluciones Tween - peróxido de hidrógeno al tubo de cultivo.
- Dejar el tubo en posición vertical durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Lectura e interpretación

Medir en mm. la altura de la columna de burbujas sobre la superficie del medio:

Menor de 31 mm. de burbujas: catalasa negativa o muy débil.

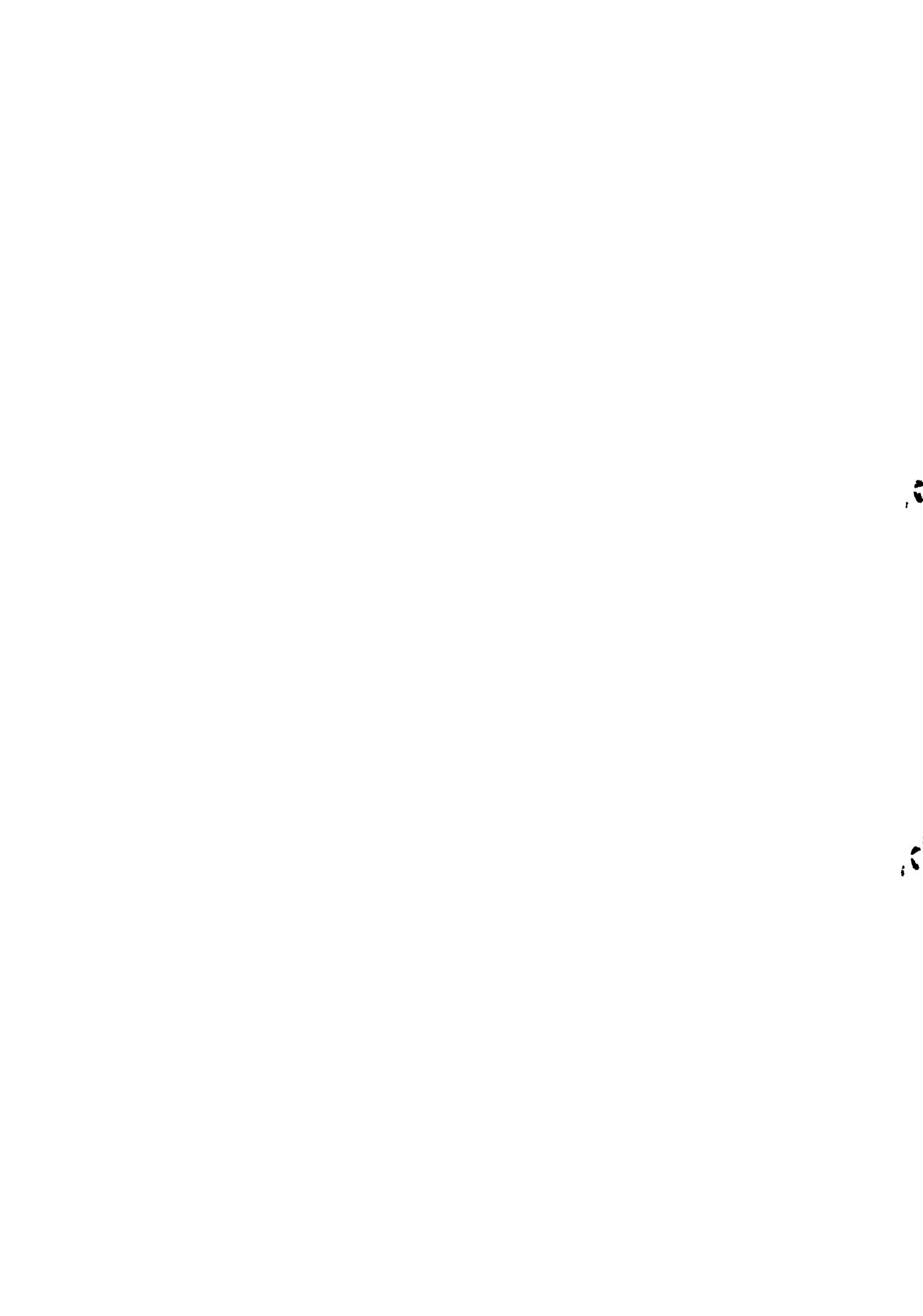
Entre 31 y 45 mm. de burbujas: resultado no concluyente.

Más de 45 mm: actividad, catalasa francamente positiva.

1.5.7 Prueba de catalasa a temperatura ambiente y a 68° C (prueba cualitativa)

Reactivos

- Las soluciones de agua oxigenada y de Tween 80 descritas para la prueba semicuantitativa.



- Solución reguladora de fosfatos M/15, pH 7: mezclar 61.1 ml. de una solución de fosfato disódico M/15 (9.47 gr. de Na_2HPO_4 en 1 000 ml. de H_2O), con 38.9 ml. de solución de fosfato monopotásico M/15 (9.07 gr. de KH_2PO_4 en 1 000 ml. de H_2O).

Técnica

Distribuir la solución reguladora en tubos de 12 x 100 mm. aproximadamente (0.5 ml. en cada tubo). Se emplean dos tubos por cada cepa. Agregar en cada uno de ellos el contenido de un asa cargada de colonias tomadas de un cultivo joven en medio a base de huevo.

Colocar uno de los tubos en baño de agua termorregulado a 68°C durante 20 minutos. Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar a ambos tubos 0.5 ml. de la mezcla de solución de Tween y agua oxigenada.

Lectura e interpretación

Observar la formación de burbujas en la superficie. Dejar en observación 20 minutos antes de informar resultado negativo.

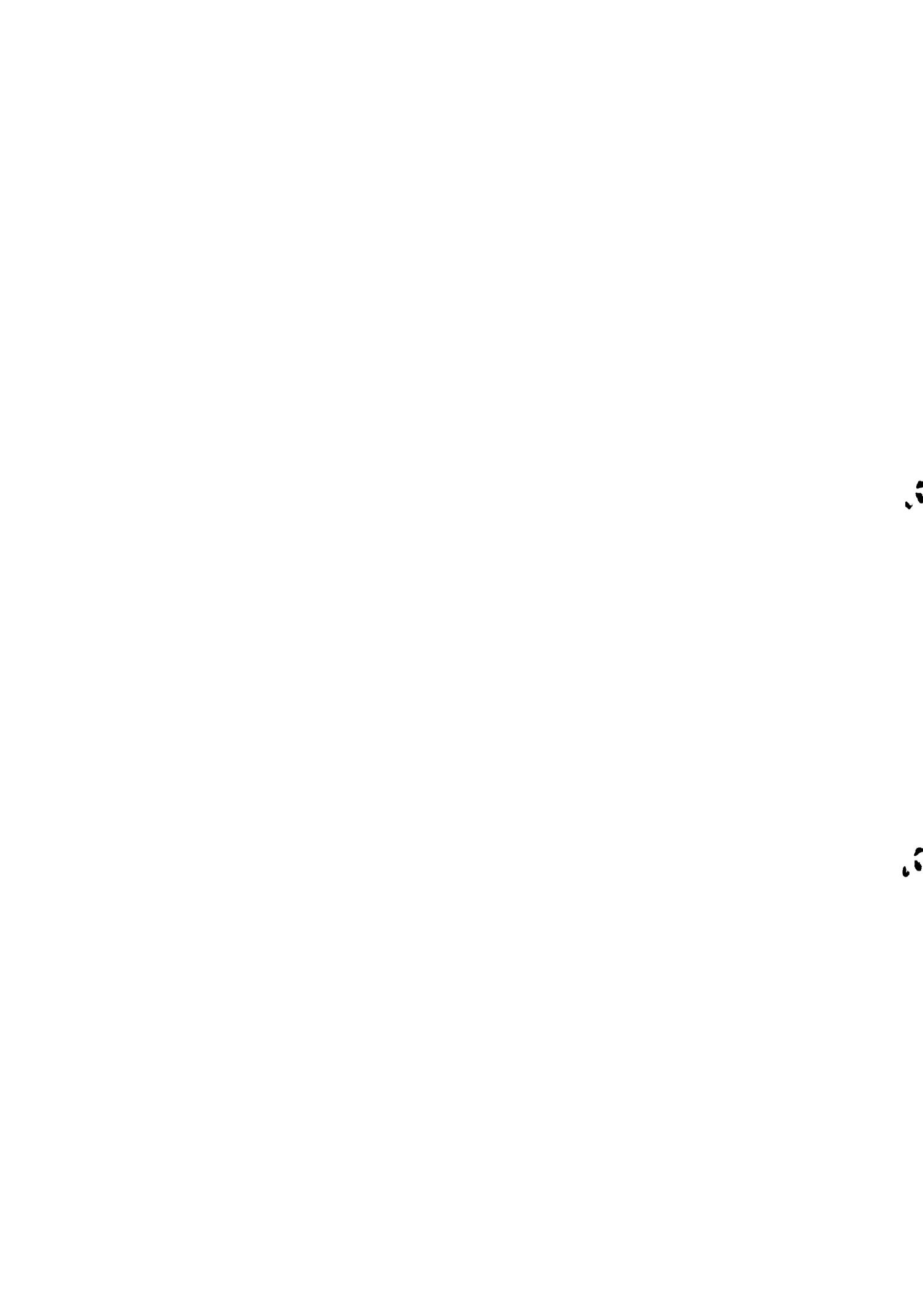
1.5.8 Prueba de hidrólisis de tween

Reactivos

- Tween 80
- Rojo neutro
- Solución reguladora de fosfato M/15, pH 7 (ver preparación en prueba de catalasa 1.5.7.).

Disolver 0.5 ml. de Tween 80 y 2 mg. de rojo neutro en 100 ml. de solución reguladora. Controlar el pH, que no debe ser menos de 7.0, y el color amarillo ámbar. Distribuir en tubos con tapa rosca (4 ml. en cada tubo). Autoclavar 15 minutos a 121°C. Conservar en refrigeración y sin contacto con la luz, no más de 2 semanas.

El rojo neutro debe tener un grado de pureza del 100%. De lo contrario se debe corregir la cantidad que se va a agregar.



Técnica

Suspender en el sustrato colonias de un cultivo joven en medio sólido (el contenido de un asa de 3 mm. de diámetro aproximado). Incubar a 37°C, sin contacto con la luz. Examinar a los 5 y a los 10 días. Incubar un tubo control sin inóculo.

Lectura e interpretación

Observar los tubos, comparativamente con el control ámbar. Se considera positividad un cambio de color a rosa salmón. Tomar nota de la fecha en que se observa ese cambio y seguir incubando hasta completar los 10 días para confirmar; el color puede intensificarse a rosa más intenso y hasta rojo oscuro.

Se informan los resultados como “positivos a los 5 días”, “positivos a los 10 días”, o bien como “negativos a los 10 días”.

Los tubos no deben ser agitados antes de la lectura.

Algunas células pueden tomar el colorante, lo que provoca un color rosado en el sedimento del tubo, mientras que el sobrenadante continúa ámbar; en estos casos el informe es negativo.

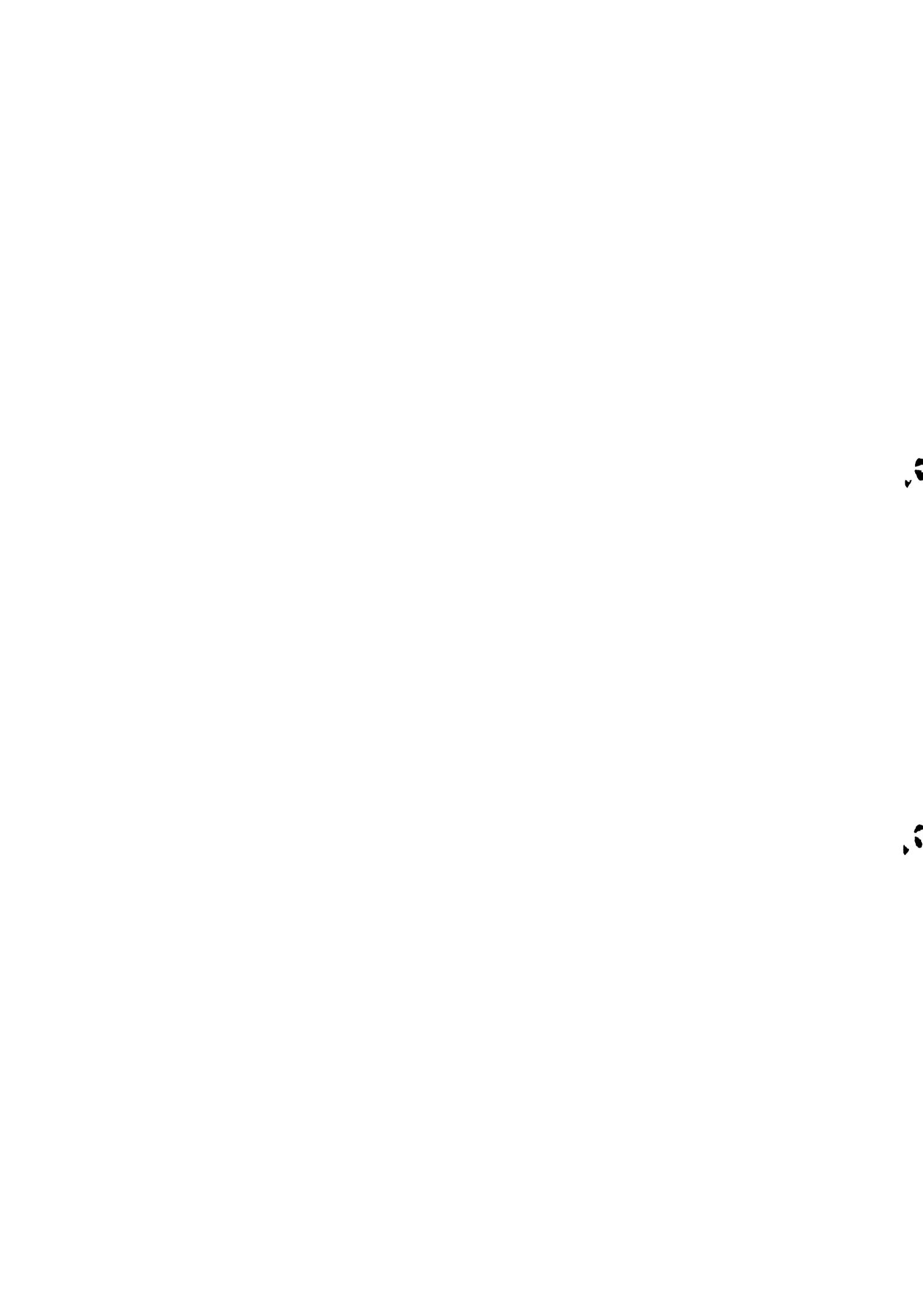
1.5.9 Prueba de toma de hierro

Reactivo

- Solución acuosa de citrato de hierro amoniacal al 4%, esterilizada en autoclave.

Técnica

Inocular dos tubos de medio Löwenstein-Jensen, cada uno con 0.2 ml. de una suspensión bacilar de aproximadamente 0.1 mg/ml., de la capa problema. Colocar los tubos inclinados, difundiendo la siembra en toda la superficie del medio. Luego colocarlos verticalmente y añadir en el fondo de uno de ellos 1 ml. de la solución de citrato de hierro amoniacal. En el otro, agregar 1 ml. de agua destilada estéril. Incubar en posición vertical a 37°C.



Lectura e interpretación

De ser la reacción positiva aparece en el tubo con citrato, entre la primera y la tercera semana de incubación, un color marrón que se va extendiendo a las colonias por encima del nivel del líquido. Se compara con el tubo control.

1.5.10 Prueba de tolerancia al cloruro de sodio

Medio

Antes de su coagulación, agregar al medio Löwenstein-Jensen solución de NaCl para alcanzar una concentración final del 5% o bien agregar el NaCl a la solución salina constituyente del medio de cultivo antes de autoclavar. En el último caso, para 100 ml. de medio de cultivo medir 37.5 ml. de la solución salina usada para el medio Löwenstein-Jensen, agregarle 5 gr. de NaCl y autoclavar. Añadirle, mientras se agita, 1.25 ml. de solución acuosa de verde de malaquita al 2% y completar con suspensión de huevos homogeneizados, hasta 1000 ml. Distribuir en tubos y coagular como es habitual en la preparación de este medio.

Técnica

Inocular una suspensión bacilar, de concentración aproximada 1 mg/ml., en agua destilada a dos tubos de Löwenstein-Jensen, uno con NaCl y otro sin agregado. Incubar a 37°C y examinar una vez por semana, durante 4 semanas.

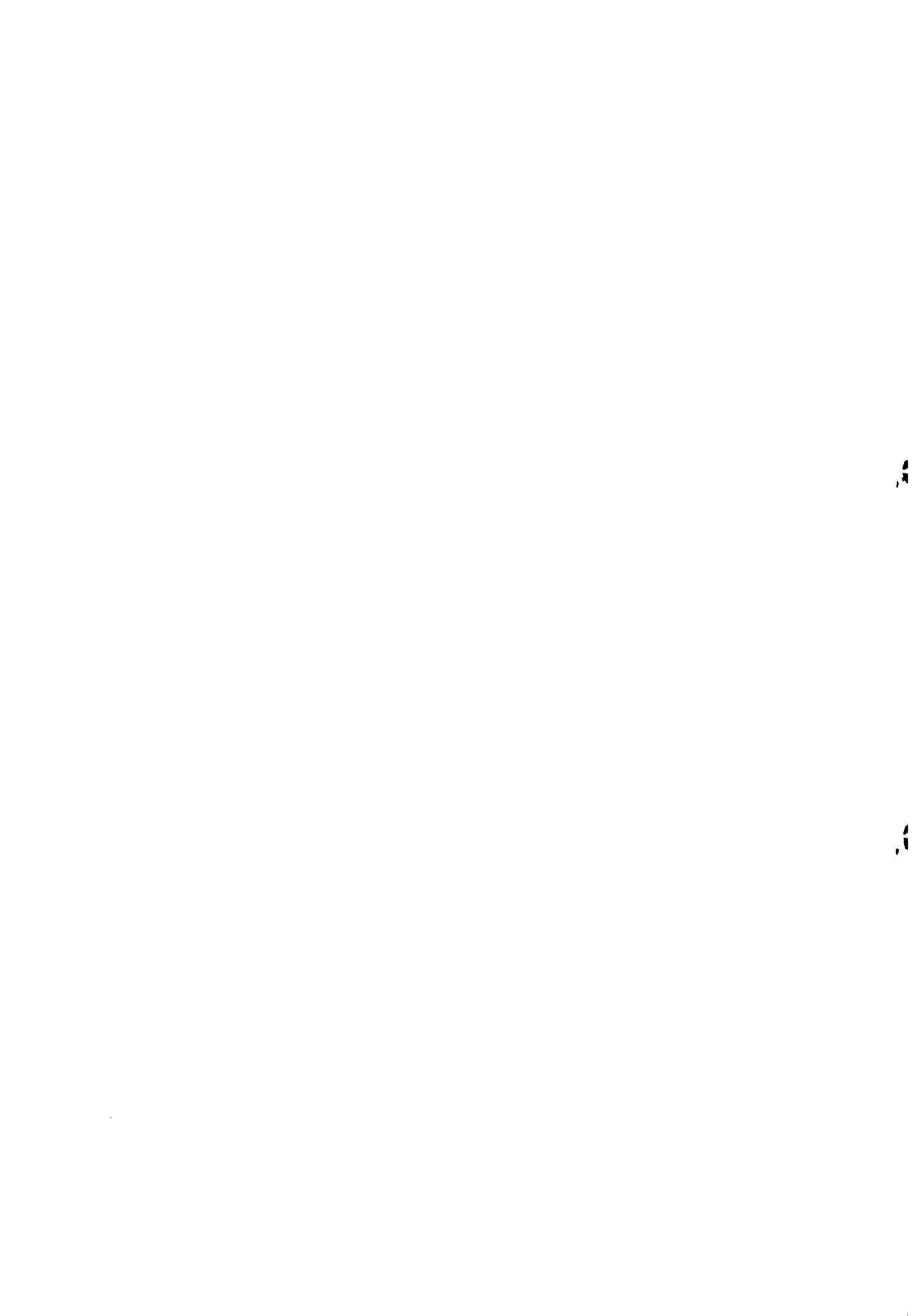
Lectura e interpretación

En el tubo control normalmente se obtendrá desarrollo de colonias incontables. Si, en esas condiciones, en el tubo con NaCl se observa desarrollo de más de 50 colonias, se considerará que la cepa es resistente o tolerante al NaCl, y si el desarrollo es menor a 50 colonias, se considerará que es sensible.

1.5.11 Prueba de arilsulfatasa

Sustrato

Solución 0.08M de fenolftaleín disulfato tripotásico (2.6 gr. del reactivo en 50 ml. de agua destilada). Esterilizar por filtración. Mantener en refrigeración.



Medio de cultivo

Preparar 200 ml. de medio líquido de Dubos. Agregar al medio 2.5 ml. de la solución del sustrato para la prueba de 3 días, y 7.5 ml. para la prueba de 2 semanas. Distribuir asépticamente en tubos de 16 x 125 mm. con tapa de rosca, 2 ml. en cada tubo.

Reactivo

- Solución de carbonato de sodio 2N; disolver 2.6 gr. de Na_2CO_3 anhidro en 100 ml. de agua destilada.

Técnica

Para cada cepa, inocular 0.1 ml. de una suspensión bacilar concentrada o colonias tomadas de un cultivo joven. Incubar a 37°C. A los 3 días, agregar en el tubo correspondiente 6 gotas de la solución de Na_2CO_3 . A las dos semanas hacer lo propio en el tubo restante.

Lectura e interpretación

Emplear como control negativo un tubo con sustrato sin inóculo y como control positivo un tubo con *M. fortuitum*. La aparición de color rojo o rosado indica resultado positivo.

Advertencia: Cuando el sustrato contiene fenolftaleína libre, el control no inoculado puede adquirir color rojo al agregarle solución de carbonato. Debe entonces recrystalizarse el sustrato en etanol absoluto, en el cual la fenolftaleína es soluble, mientras que el fenolftaleín disulfato tripotásico es insoluble.

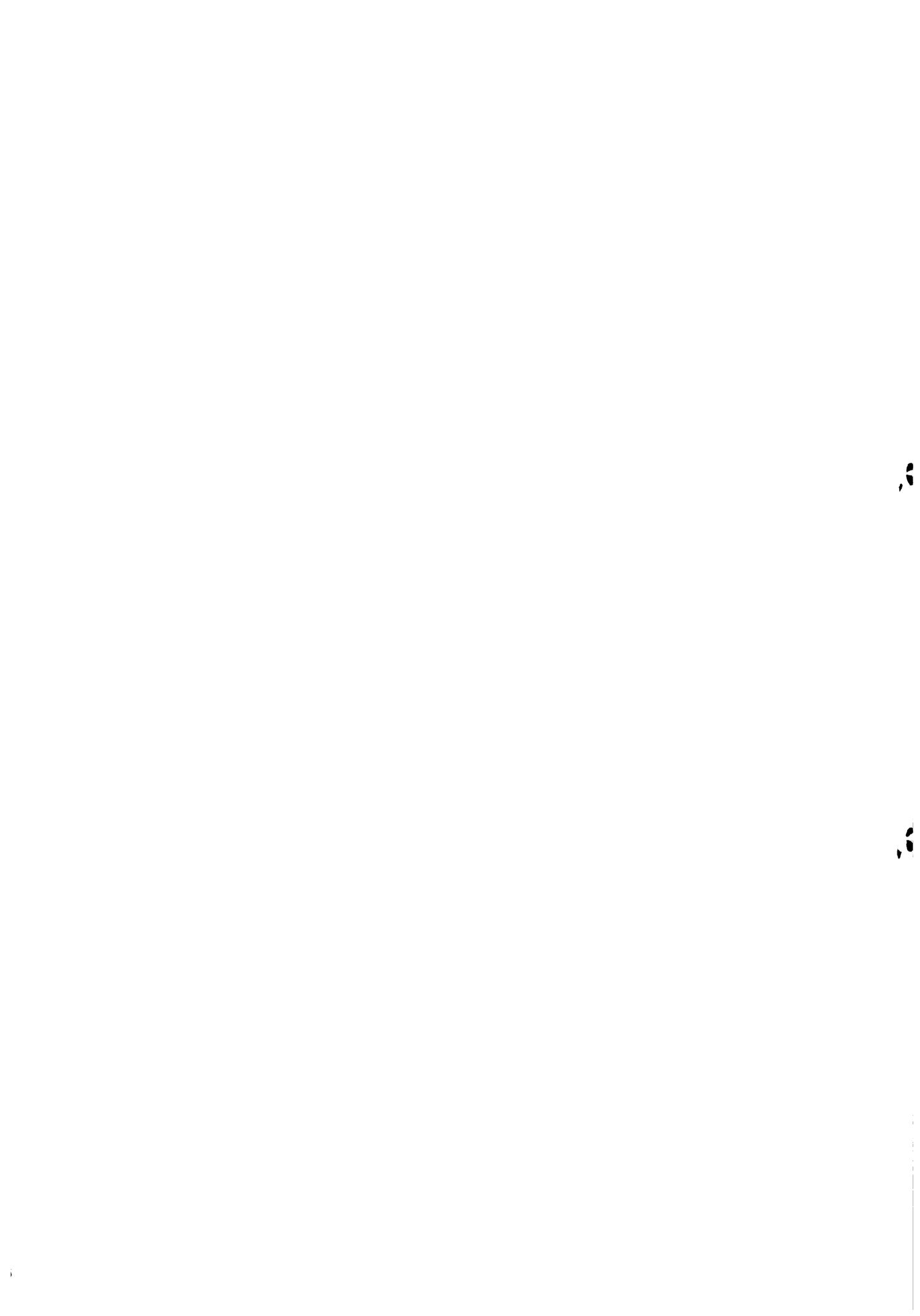
1.5.12 Prueba de reducción del telurito

Medio

Middlebrock 7H9 líquido, distribuido en tubos de 18 x 150 mm., con tapa de rosca (5 ml. en cada tubo).

Reactivo

- Solución de telurito de potasio al 0.2% esterilizada en autoclave.



Técnica

Inocular el medio de cultivo con una suspensión concentrada bacilar, o con colonias de un cultivo en medio sólido. Incubar a 37°C durante 7 días. Agregar 2 gotas de la solución de telurito. Reincubar a 37°C durante 3 días más.

Lectura e interpretación

No agitar los tubos. Observar la coloración de la masa bacilar depositada en el fondo. La formación de un precipitado metálico negro se considera reacción positiva.

Control positivo: *M. avium-intracellulare*

Control negativo: tubo sin inóculo

1.5.13 Prueba de ureasa

Medio

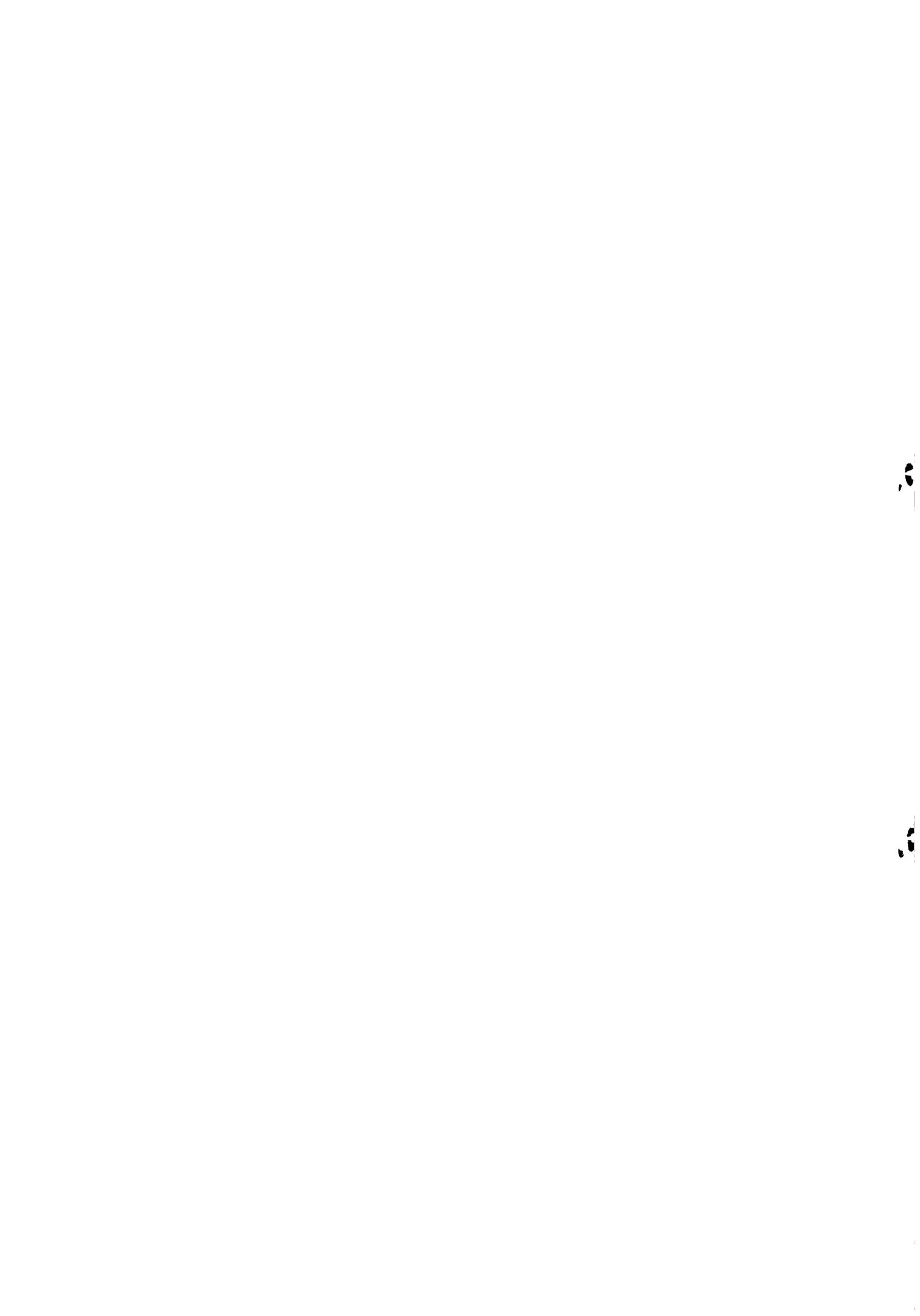
Peptona	1.0	gr.
Dextrosa	1.0	gr.
Cloruro de sodio (Na ₂ Cl)	5.0	gr.
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄).....	2.0	gr.
Urea	20	gr.
Rojo fenol.....	0.012	gr.
Agua destilada c.s.p.....	100	ml.

Controlar el pH que debe ser 6.8 - 6.9.

Una vez preparado el medio y esterilizado por filtración, se diluye 1:10 con agua destilada y se distribuye en tubos estériles de 13 x 100 mm., con tapa de rosca.

Técnica

Con el asa agregar al tubo colonias de un cultivo joven en medio de huevo. Al tomar las colonias, se debe cuidar especialmente de no arrastrar medio. Incubar 3 días a 37° C.



Lectura e interpretación

La aparición de color rosa se interpreta como resultado positivo. La comparación se efectúa con un tubo control no inoculado.

Existen otras técnicas para la prueba de ureasa.

1.5.14 Prueba de β -galactosidasa

Medio

Preparar medio de Dubos modificado según la fórmula siguiente:

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1.0 gr.
Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....	6.25 gr.
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	0.6 gr.
Citrato de sodio.....	1.5 gr.
Asparagina.....	2.0 gr.
Tween 80 (solución acuosa al 10%).....	5.0 ml.

Se disuelven los componentes, cada uno por separado, en un volumen de 100 ml. de agua destilada. Luego se mezclan y se completa un volumen total de 1 000 ml., pH 7.2. Se distribuye en frascos, 100 ml. en cada uno. Se autoclavan 20 minutos a 121°C .

Se prepara una solución al 9% de fracción V de albúmina bovina en solución fisiológica. Esta solución debe calentarse a 56°C durante 30 minutos y esterilizarse por filtración.

Se disuelven en 100 ml. del medio basal anteriormente descrito 100 mg. del sustrato, 2-nitrofenil β -D-galactopiranosido, agregándose luego 4 ml. de la solución de albúmina.

Se esteriliza por filtración nuevamente y se distribuye en tubos con tapa de rosca, 5 ml. en cada tubo.

Técnica

Se inoculan 0.5 ml. de una suspensión bacilar de aproximadamente 1 mg/ml., en cada tubo con medio. La suspensión bacilar debe prepararse a partir de un cultivo joven. Se incuba a 37°C , 4 - 6 semanas.



Lectura e interpretación

La aparición de color amarillo indica positividad. Ella es debida a la hidrólisis enzimática del sustrato, con liberación de nitrofenol.

Advertencia: Si se emplea medio Dubos deshidratado de origen comercial, en lugar del descrito más arriba, su color ligeramente amarillo puede interferir en las lecturas.

1.5.15 Prueba de β -glucosidasa

Sustrato

Disolver 300 mg. de p-nitrofenil β -D- glucósido en 100 ml. de solución reguladora de tris (hidroximetilaminometano) 0.05 M, pH 7.0.

La solución incolora obtenida puede conservarse 2 semanas a 4°C.

Técnica

Distribuir el sustrato en tubos, a razón de 0.5 ml. en cada tubo. Emulsionar colonias de un cultivo joven en medio sólido, tomadas con un asa. Incubar a 37°C durante 3 horas.

Lectura e interpretación

La aparición de color amarillo indica positividad. Es el resultado de la hidrólisis enzimática del sustrato con liberación de p - nitrofenol.

2. PREPARACION Y ESTANDARIZACION DE TUBERCULINA PPD

2.1 INTRODUCCION

Las tuberculinas son productos de uso generalizado para el diagnóstico y el control de la tuberculosis en el hombre y los animales.

La infección por micobacterias produce en el huésped hipersensibilidad de tipo retardado a las proteínas de origen bacilar. Al inyectar tuberculina por vía intradérmica, esa hipersensibilidad se manifiesta por una induración en el sitio de la inyección. Esta reacción se debe leer en el hombre y en los bóvidos, a las 72 horas aproximadamente.



En *salud pública*, la prueba tuberculínica es un elemento útil para el diagnóstico de la tuberculosis, especialmente en estudios epidemiológicos: determinación de índices de infección, conversión tuberculínica después de la vacunación con BCG, etc.

En *medicina veterinaria*, la prueba tuberculínica intradérmica posee fundamental importancia, ya que es el método de diagnóstico de infección universalmente empleado en los programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina.

El término *tuberculina* se aplica a un extracto obtenido de filtrados de cultivos micobacterianos, previamente esterilizados.

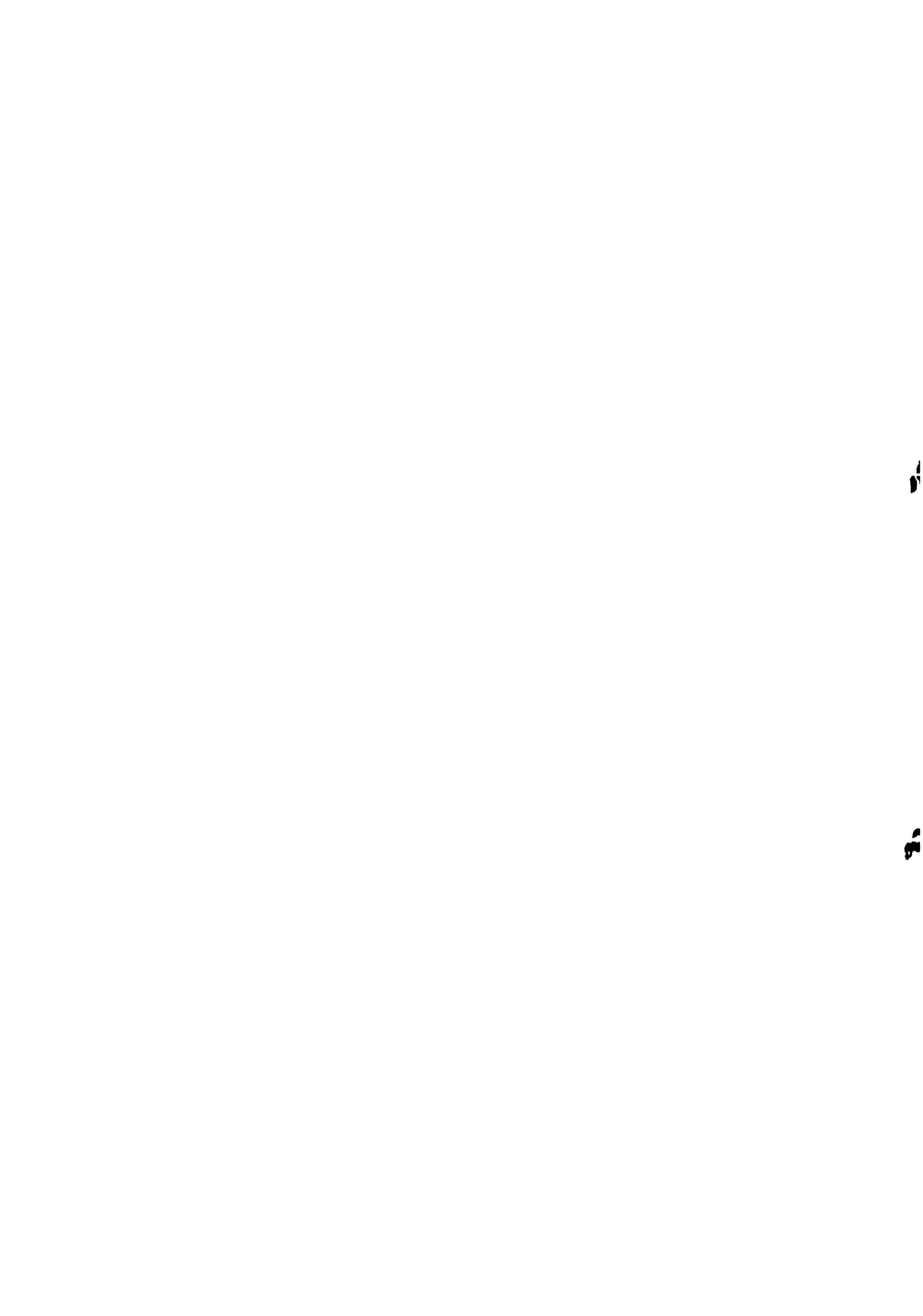
Las micobacterias son cultivadas en medio líquido, muertas por calor y separadas por filtración. El líquido filtrado es luego concentrado por calor hasta un décimo de su volumen original. La tuberculina fue preparada por primera vez por Roberto Koch en 1890 (tuberculina antigua, TA; old tuberculin, OT). En los primeros tiempos se empleaba como medio de cultivo caldo de carne glicerinado, que posteriormente fue reemplazado por medio sintético (HCSM: heat concentrated synthetic medium). Con ello se evitaba agregar al producto final proteínas heterólogas, provenientes del medio de cultivo.

En el PPD (derivado proteínico purificado), el proceso de preparación es similar salvo que, en vez de concentrar las proteínas por acción del calor, se las separa por precipitación. De esa manera, se logra conservar mejor la estructura proteínica original. Tanto las tuberculinas como los PPD contienen, además de proteínas, otros antígenos de composición química variable.

El PPD tiene dos ventajas principales sobre la tuberculina antigua o tuberculina preparada en medio sintético: a) es más específico y b) puede ser normalizado más fácilmente y con mayor exactitud.

El Patrón Internacional de PPD de *M. tuberculosis* (PPD - S) fue establecido en 1952. En 1958 se preparó en el Instituto del Suero de Dinamarca, un lote de PPD humano (RT23) de más de 500 gr., a fin de poder satisfacer durante muchos años las necesidades fundamentales para el uso humano de este biológico.

El PPD preparado con *M. bovis* ha reemplazado al PPD de *M. tuberculosis* para la prueba en ganado bovino. Si bien los bacilos tuberculosos humano y bovinos son muy semejantes antigénicamente, se han comprobado ciertas diferencias entre ellos.



Desde 1954 existe un Patrón Internacional de PPD de *M. avium*. El uso más importante de este PPD es la prueba tuberculínica comparativa en bovinos, en la cual se aplica simultáneamente con el PPD de *M. bovis* para diferenciar la respuesta específica (infección tuberculosa bovina) de la paraespecífica (sensibilidad por *M. avium* u otras micobacterias antigénicamente semejantes a ella).

También se han preparado derivados proteínicos purificados de diversas micobacterias "atípicas", denominados generalmente *sensitinas*, los que se emplean en investigaciones epidemiológicas sobre la sensibilización de esos gérmenes.

2.2 PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE LA TUBERCULINA PPD

2.2.1 Cepas

Para el PPD de *M. tuberculosis*: cepas DT, C y PN

Para el PPD de *M. avium*: cepa D4

(Origen: Laboratorio Central de Weybridge, Surrey, Inglaterra, Laboratorio Internacional FAO/OMS de Patrones Biológicos).

Para el PPD de *M. bovis*: cepa AN5

(Origen: Central Veterinary Institute, Rotterdam, Holanda).

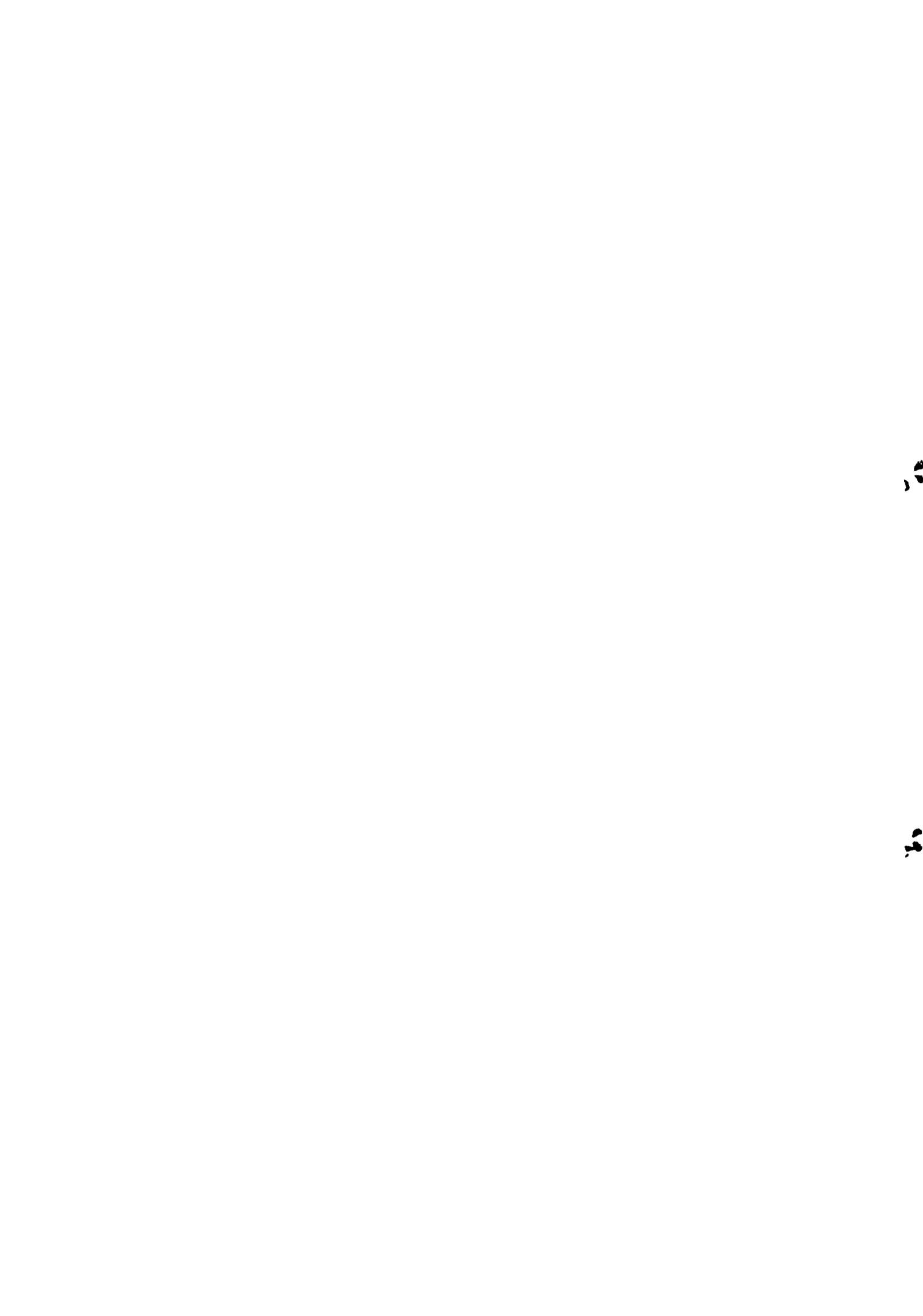
Advertencia: todo el material de vidrio, conexiones, filtros y soluciones empleados en la producción, dilución y envasado del PPD deben estar estériles. Todas las drogas y los reactivos deben ser de calidad pro - análisis.

2.2.2 Métodos de conservación de las cepas

La mejor manera de mantener las cepas y de preservar sus caracteres originales es en forma liofilizada.

Otro método consiste en conservar a -70°C los cultivos en medios Dubos Tween albúmina o en Middlebrok 7H-9 líquido, envasados en pequeños frascos ampolla, con tapón de goma y sobretapa de aluminio.

A partir de la ampolla con la cepa liofilizada o mantenida a -70°C, se efectuarán pasajes en medio agar, caldo glicerinado o medio Löwenstein-Jensen, hasta obtener



subcultivos de caracteres augónicos (segundo o tercer pasaje), para luego cultivar la cepa en medio líquido (cultivos semilla).

Los subcultivos en medio sólido se deben realizar mensualmente. En cada pasaje se verificará que las colonias presenten los caracteres de la cepa original.

2.2.3 Cultivos semilla

Primer Cultivo: se efectúa a partir de un cultivo en medio sólido (Löwenstein-Jensen), inoculando 85 ml. de medio con una espátula metálica en la superficie de caldo de carne glicerinado envasado en frascos Erlenmeyer de 250 ml. de capacidad. Los frascos se incuban a 37°C hasta la formación de una película que cubra totalmente la superficie del medio (20 - 40 días).

Segundo cultivo: se inocula la masa bacilar del desarrollo del primer cultivo semilla en varios frascos Erlenmeyer de 250 ml., con 85 ml. de caldo glicerinado cada uno.

Para ello, se toma con un asa metálica espiral una porción de la película bacilar del primer cultivo semilla y se la deposita en la superficie del nuevo medio. Se incuba a 37°C, hasta la obtención de una película superficial que cubre el medio (1 semana a 10 días después). En ese momento se debe efectuar la siembra de producción.

Un cultivo semilla es suficiente inóculo para 10 frascos de producción.

2.2.4 Cultivo de producción

Para el cultivo de producción se emplea el medio Dorset Henley envasado en frascos "tipo penicilina" o en frascos rectangulares de 2 lt. de capacidad, con 1 lt. de medio, que se inoculan en la superficie con los cultivos semilla, mediante un asa metálica espiral.

Los cultivos de producción se incuban 8 semanas a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Durante ese lapso, la película bacilar va transformándose en una capa gruesa y rugosa. El pH original del medio es 6.8 - 7.0, el cual al final de la incubación puede llegar a 8.0-8.4.

2.2.5 Muerte bacilar

Los bacilos son muertos por calor (2-3 horas. en autoclave de vapor fluente). Los frascos se agitan ligeramente al sacarlos del autoclave y se dejan reposar a

1

2

temperatura ambiente durante 24-48 horas, lapso durante el cual conviene agitarlos cada 6 horas, aproximadamente.

2.2.6 Separación de la masa bacilar: filtración de los cultivos

El contenido de los frascos se filtra a través de una malla metálica fina (180 μ de apertura), o de un género blanco de malla cerrada (toalla), para separar la mayor parte de los organismos muertos, los que se desecharán. El líquido residual, algo turbio, se clarifica por filtración a través de membranas de asbesto celulosa (Carlson Ford 1/1250 BK9, Seitz K₍₂₎, K₍₃₎ o similares).

También se puede utilizar un equipo filtrante clarificante compuesto de: a) filtro de vidrio, b) membrana de 2 μ de poro, c) membrana de 0.90 μ de poro, o pulpa de papel de filtro de 1.5 cm. de espesor.

2.2.7 Precipitación de las proteínas

El filtrado que se obtiene está formado por el medio sintético, los metabolitos eliminados por los bacilos durante su crecimiento y los productos de su lisis. Por cada 9 volúmenes de ese filtrado se agrega 1 volumen de ácido tricloroacético 40% (p/v); la concentración final de ácido es, por lo tanto, de 4%.

Se agita para mezclar bien. Se produce un precipitado, el cual se deja sedimentar por gravitación durante 16 horas aproximadamente. No es conveniente que el PPD esté en contacto con el ácido durante un lapso mayor.

Separación y lavado del precipitado

El líquido sobrenadante se separa por aspiración. El precipitado se somete a lavados y centrifugados para eliminar los residuos del medio y el exceso de ácido. Primeramente, se lo lava 3 veces con ácido tricloroacético al 1%, y luego con solución de cloruro de sodio al 5%, hasta que el pH del sobrenadante sea de 2.7, aproximadamente.

Para el lavado de lotes provenientes de 25-100 frascos de cultivo, se pueden emplear frascos de centrifuga de 500 ml. de capacidad, en los que los precipitados son resuspendidos por agitación y centrifugados nuevamente.

2

3

El número de lavados con solución de cloruro de sodio al 5% necesarios para alcanzar el pH 2.7 depende del espesor de la capa del precipitado y de la cantidad del líquido empleado.

En caso de que se efectúe más de un lavado con esta solución, se deberá controlar cuidadosamente el pH, pues si éste se eleva a más de 2.7 el PPD comenzará a redisolverse. Tratándose del PPD aviar en particular, conviene agregar ácido tricloroacético a la solución de cloruro de sodio para bajar su pH hasta 3.0, si el sobrenadante ya alcanzó un pH de 2.4.

Disolución del precipitado

Se agrega lentamente al precipitado solvente alcalino (Anexo 4.a) y se agita hasta que se hayan disuelto todas las partículas. Se obtiene un líquido color café cuyo pH es 6.7-7.0, que se denomina "preconcentrado" y cuyo contenido proteínico es de 40-60 mg/ml. Se debe emplear el menor volumen posible de solvente para la dilución del PPD y se medirá la cantidad utilizada.

Purificación del preconcentrado

El preconcentrado se centrifuga a 2 000 3 000 r.p.m. durante 20 minutos para separar las impurezas y partículas insolubles.

Dilución del preconcentrado

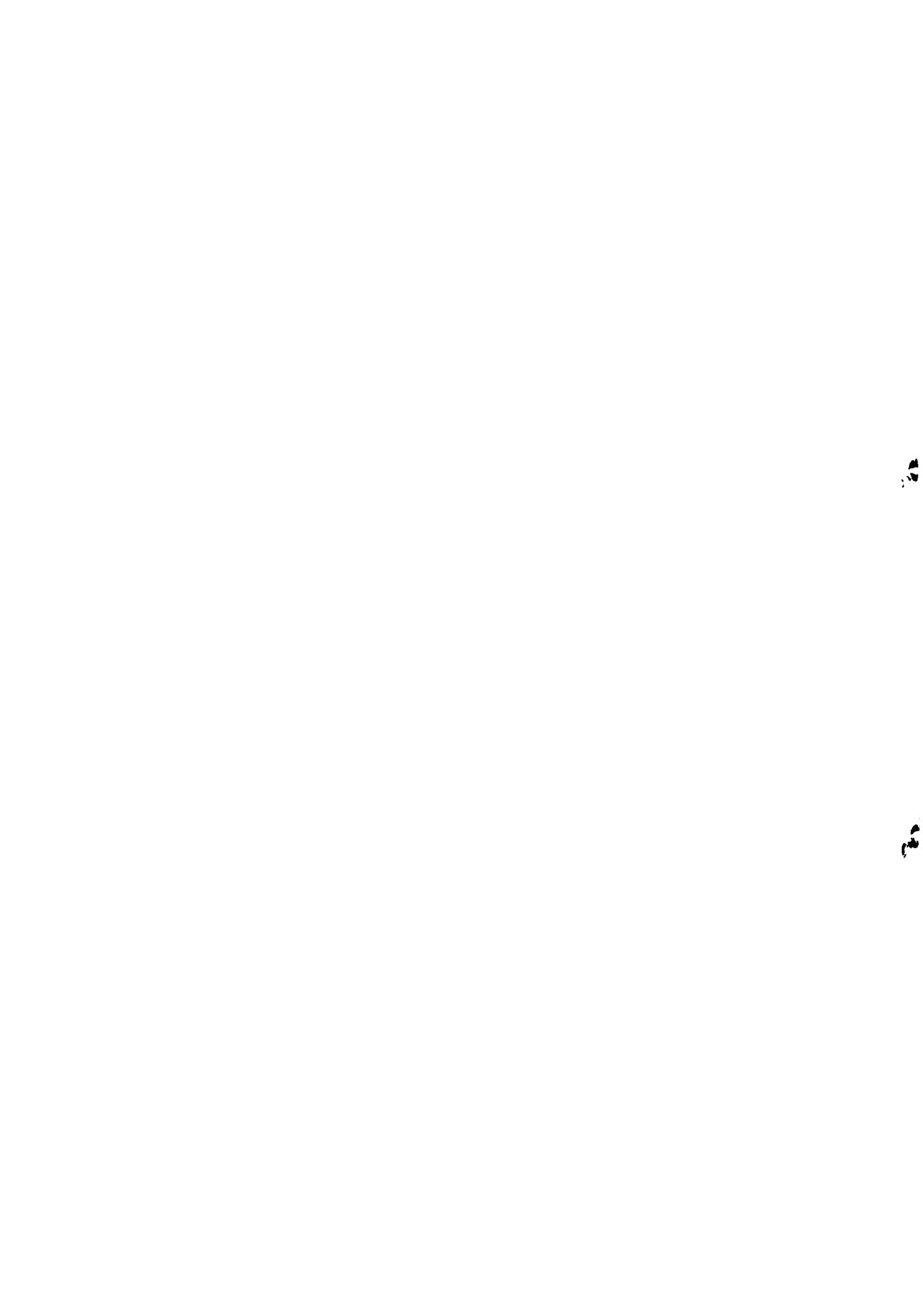
En el caso de PPD bovino o humano se efectúa una dilución del preconcentrado hasta alcanzar 4 veces su volumen de proteínas. El PPD aviar se diluye, en cambio, a 20 veces su volumen de proteínas.

Se considera como *volumen de proteínas* (c), a la diferencia entre el *volumen total obtenido* (b) y el *volumen de solvente alcalino empleado* (a).

Volumen de proteínas: $b - a = c$

Volumen final (para PPD bovino o humano): $c \times 4 = d$

Para la dilución se agregan las soluciones siguientes (cuyas fórmulas aparecen en el anexo 4.a) en los volúmenes que se indican:



Solución reguladora M/3: $\frac{(d - a)}{10}$

Solución antibacteriana 5 veces concentrada: : $\frac{d}{5}$

Se mide el volumen obtenido y se completa con agua destilada hasta el volumen final **d**.

El pH de esta solución, denominada en adelante “PPD concentrado” está entre 7.0 - 7.4.

A continuación se ejemplifica la aplicación del método en el lote de **PPD bovino CPZ 5 -79**:

- Frascos “tipo Penicilina” : 63
- Volumen de solvente alcalino empleado en la disolución del precipitado : 184 ml. (a)
- Volumen de “preconcentrado” obtenido : 580 ml. (b)
- Volumen de proteínas (b - a = c) : 396
- pH del “preconcentrado” : 7.0
- Dilución del “preconcentrado” a 4 veces su volumen de proteínas (c x 4 = d)

Solución reguladora M/3 $\frac{(d - a)}{10}$: 140 ml.

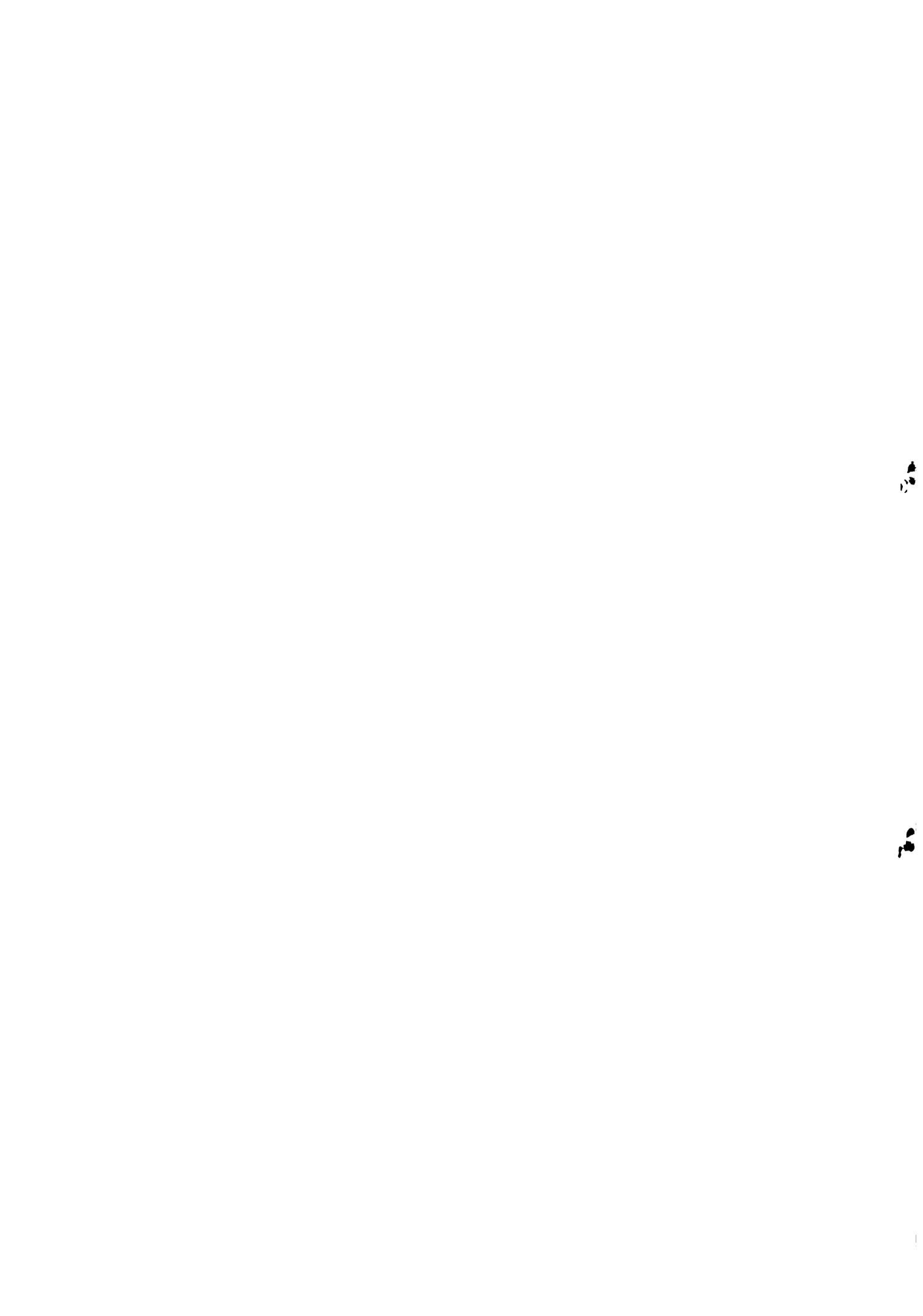
Solución antibacteriana x 5 (d/5) : 317 ml.

- Volumen final (d) : 1584 ml.
- Agua destilada 1584 - (140 + 317 + 580) : 547 ml.
- el pH de esta solución será de 7.0

2.2.8 Controles químicos del “concentrado”

2.2.8.1 Contenido Proteínico

El contenido proteínico se controla mediante diluciones apropiadas del “concentrado”, hasta que sean comparables con el “Patrón”, o sea, un PPD de referencia de concentración 2 mg/ml. Se emplea la reacción del biuret.



También se debe controlar el contenido de fenol mediante el método de Folin Ciocalteau, con un patrón constituido por una solución fenólica acuosa 0.5% (p/v).

2.2.8.2 Determinación de Proteínas en el PPD según la prueba del Biuret modificada.

Fundamento

Las reacciones coloreadas son la base de diversas pruebas para la detección de proteínas: la mayoría de ellas son específicas para algunos grupos particulares de ciertos aminoácidos, más que para las proteínas mismas.

La prueba del biuret, así llamada porque identifica a la sustancia biuret ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) permite detectar todas las sustancias que contienen por lo menos 2 grupos peptídicos ($-\text{CO}-\text{NH}-$) o sea, las proteínas y los polipéptidos.

Cuando se agregan un álcali y una solución diluida de sulfato de cobre a una solución proteínica, se produce un color violáceo característico. Este fenómeno es empleado en el método cuantitativo descrito a continuación para determinar rápidamente el PPD en tuberculinas.

Reactivos

Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).....	1.5 gr.
Tartrato doble de sodio y potasio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).....	6.0 gr.
Hidróxido de sodio 1N (NaOH 4%).....	400 ml.
Agua destilada c.s.p.....	1 000 ml.

Se disuelven el sulfato de cobre y el tartrato doble de sodio y potasio en 200 ml. de agua destilada. Cuando se hayan disuelto por completo, se agrega lentamente y agitando constantemente la solución de hidróxido de sodio. Se lleva a 1 lt. con agua destilada.

El reactivo debe conservarse en un recipiente cerrado de vidrio neutro sin contacto con la luz natural.



Solución Estándar

Debe ser del mismo origen biológico que la muestra sometida a prueba; su concentración se habrá determinado con exactitud por el método Kjeldahl u otro. Debe conservarse a 4°C.

Método

Con 2 - 4 mg. de PPD se obtiene una densidad de color satisfactoria. El volumen de la muestra depende de su concentración aproximada, por ejemplo:

<i>Concentración aproximada</i>	<u>2 mg/ml.</u>	<u>0.5 mg/ml.</u>
Volumen de la muestra	2 ml.	5 ml.
Volumen de agua destilada	3 ml.	-
Volumen del reactivo biuret	5 ml.	5ml.

Las soluciones más concentradas se diluirán en la medida necesaria para que caigan dentro de esta escala.

Se mezclan estos componentes y se dejan a temperatura ambiente durante 10 minutos a fin de permitir el pleno desarrollo del color.

Siguiendo el mismo procedimiento, se prepara una solución estándar, a partir de la solución patrón.

Se prepara, además, un “blanco” mezclando 5 ml. de agua destilada con 5 ml. del reactivo de biuret. Las densidades ópticas de la solución estándar y de la muestra problema se leen en un fotocolorímetro con filtro verde (625 nm.), que haya sido llevado a cero previamente con el “blanco”.

La concentración de la muestra en mg/ml. está dada por:

$$\frac{DO \text{ muestra} \times \text{concentración estándar en mg/ml. y factor de dilución (si lo hay)}}{DO \text{ estándar}}$$

2.2.8.3 Determinación de fenol en tuberculinas

En la producción de tuberculinas, la determinación de la concentración de fenol debe ser realizada tanto en los lotes recién preparados de diluyente para asegurarse que se



ha mezclado completamente, como en los productos finales a fin de verificar la exactitud del valor requerido (0.5%).

El método más conveniente para la estimación de fenol en productos biológicos es el de Folin y de Ciocalteau. Un complejo ácido molíbdico - fosfotúngstico es reducida en solución alcalina a un coloide azul, permitiendo la comparación del color desarrollado en un estándar conocido con el de la solución en prueba.

Método

Se diluye con agua destilada un volumen de 2 ml. de la solución sometida a prueba hasta 100 ml., reduciendo así la concentración, considerada del 0.5%, a 0.01% e igualándola con la de la solución estándar de fenol.

Se toman 3 frascos volumétricos de 50 ml. en los que se colocan los siguientes reactivos:

	<u>Frasco 1</u> (blanco)	<u>Frasco 2</u> (prueba)	<u>Frasco 3</u> (estándar)
• muestra diluída 1:50	-	2 ml.	-
• solución estándar de fenol al 0.01%	-	-	5 ml.
• reactivo de Folin Ciocalteau	5 ml.	5 ml.	5 ml.
• solución de carbonato de sodio al 20% (Na ₂ CO ₃)	12.5 ml.	12.5 ml.	12.5 ml.

El contenido de cada frasco se lleva a un volumen de 50 ml. con agua destilada, se mezcla bien y se incuba a 37°C durante 1 hora, para permitir el desarrollo del color.

$$\frac{\text{lectura prueba}}{\text{lectura estándar}} \times 0.5\%$$

Nota: La solución de Na₂CO₃ al 20% se guarda a 37°C para prevenir la precipitación, y el reactivo de Folin y Ciocalteau a 4°C para evitar su deterioro.

Como ejemplo, se presentan los resultados de los controles efectuados en el mismo lote PPD bovino CPZ-5-79:

Concentración proteínica del "concentrado"	8.3 mg/ml.
Concentración de fenol	0.55%



2.2.9 Dilución del “concentrado” y filtración esterilizante

Los “concentrados” de los PPD bovino y humano se diluyen hasta 3 mg/ml. y el del PPD aviar hasta 1.0 mg/ml., empleando para ellos “diluyente de PPD” (Anexo 4.a). Se efectúa su filtración esterilizante mediante placas del calibre adecuado, para extracción de soluciones acuosas no contaminadas, bien de asbesto celulosa HP-EK de Carlson Ford, EK o EKS de Seitz o similares o del tipo Millipore, en equipo filtrante constituido por membranas de 3.0 o 2.0; 0.9 y 0.45 μ . Se toma estérilmente una muestra de la solución filtrada, de volumen suficiente para los controles descritos en la sección 2.2.10, y la eventual repetición de los mismos. La solución filtrada se guarda en frascos de vidrio que deberán llenarse totalmente, en refrigeración (1 - 10°C), sin contacto con la luz natural.

2.2.10 Control de calidad de la solución filtrada

Se efectúan nuevamente las pruebas del biuret (proteínas) y de Folin Ciocalteau (fenol) (secciones 2.2.8.2 y 2.2.8.3).

Se efectúan controles de esterilidad para bacterias y hongos, de acuerdo con las normas recomendadas por los Comités de Expertos de la OMS

2.2.10.1 Control de esterilidad

Medios de Cultivo

- Medio para la detección de bacterias aerobias y anaerobias: caldo tioglicolato, envasado en frascos de tapón de rosca con 80 - 100 ml. de medio.
- Medio para la detección de bacterias aerobias: caldo tripticasa soja, envasado en frascos de 80 - 100 ml. de medio.
- Medio para la detección de hongos y levaduras: caldo Sabouraud, envasado en frascos de 80 - 100 ml. de medio.

Procedimiento

Se inocula 1 ml. de producto sometido a control de cada uno de estos medios. Si el producto está fraccionado en varios envases, se toma una muestra de cada uno de

2

2

ellos. Se incuban por un período de 14 días a 37°C el caldo tioglicolato y el caldo tripticosa soja y a 22°C el caldo Sabouraud. Se examinan a intervalos regulares y el último día de incubación.

2.2.11 Estandarización de Tuberculina PPD (derivado proteínico purificado)

2.2.11.1 Patrones internacionales para tuberculinas y especificación de la actividad biológica

Existe un patrón internacional de cada una de las tres preparaciones, tuberculina antigua, PPD de tuberculina mamífera y PPD de tuberculina aviar, cada una de ellas con su propia unidad internacional.

- El tercer patrón internacional de tuberculina antigua (establecido en 1965) se distribuye en ampollas que contienen 2 ml. de tuberculina antigua. La unidad internacional (UI) se ha definido como la actividad correspondiente a 0.011111 µl. del patrón internacional. Por consiguiente, cada mililitro del patrón internacional contiene 90 000 UI.
- El patrón internacional de derivado proteínico purificado de tuberculina mamífera establecido en 1952 se distribuye en forma de polvo en ampollas que contienen 10 mg. de PPD y 4 mg. de sales. La unidad internacional se ha definido como la actividad correspondiente a 0.000028 mg. del patrón internacional. Por consiguiente, cada ampolla contiene 500 000 UI.
- El patrón internacional de derivado proteínico purificado de tuberculina aviar (establecido en 1954) se distribuye en forma de polvo en ampollas que contienen 10 mg. de PPD y 26.3 mg. de sales. La unidad internacional se ha definido como la actividad correspondiente a 0.0000726 mg. del patrón internacional. Por consiguiente, cada ampolla contiene 500 000 UI.

Los patrones mencionados se conservan en el Laboratorio Internacional de Patrones Biológicos del Statens Seruminstitut (Copenhague), que facilita gratuitamente muestras a cuantos laboratorios nacionales de inspección u otros laboratorios competentes las necesitan.

La unidad internacional de una tuberculina es una unidad de actividad biológica y representa la actividad correspondiente a una cantidad definida (peso o volumen) de

3

7

la respectiva preparación patrón internacional. Este peso o volumen no tiene significación particular en relación a otras tuberculinas.

La especificación de potencia de cualquier tuberculina deberá basarse en el patrón internacional correspondiente, y la potencia se expresará siempre en términos de unidades internacionales. Ninguna otra especificación tiene significado. Sin embargo, la equivalencia con el patrón internacional, establecida mediante un ensayo biológico, no será válida para todas las condiciones de uso.

De cada producto tuberculínico fabricado, se apartará una muestra representativa que se empleará como preparación de referencia del laboratorio. Esta preparación de referencia se normaliza comparando su actividad con la del patrón internacional correspondiente, en las especies animales y en las condiciones en que será usada en la práctica. Esta calibración permite que la dosis de la preparación de referencia para ese conjunto de circunstancias pueda ser expresada en equivalentes de unidades internacionales. Así, se podrá efectuar el control de potencia de lotes sucesivos del mismo producto mediante valoraciones biológicas en el cobayo, para lo cual se empleará como material de referencia la preparación calibrada en la forma descrita.

Es necesario uniformar las distintas preparaciones de tuberculina y definir normas específicas aplicables a cada tipo, de acuerdo con el propósito para el que se las empleará. Varios países han adoptado normas nacionales para el control de las preparaciones de tuberculinas, pero estas preparaciones varían considerablemente de un país a otro.

En vista de la amplia utilización de las tuberculinas en el diagnóstico de las tuberculosis humana y animal, la OMS ha formulado una serie de normas aplicables a las tuberculinas para guía de los fabricantes y autoridades nacionales encargadas del control. Se recomienda que las autoridades oficiales correspondientes de cada país adopten estas normas como base para sus reglamentaciones nacionales relativas a la tuberculina.

Pruebas de valoración biológica

Cada lote de producción de PPD se comparará con el correspondiente PPD de referencia en cobayos para determinar su actividad relativa. El cálculo y los procedimientos estadísticos para la valoración biológica de la actividad relativa se ejemplifican en el Anexo 2.b.



Descripción general de la valoración biológica de tuberculina en cobayos

Para cada ensayo se emplean no menos de 6 cobayos (generalmente 12) albinos machos, de peso entre 400-600 gr., de tipo uniforme y del mismo origen. Se distribuyen los animales en jaulas en grupos de 3 y se los somete a una dieta uniforme, que contenga vitamina C. La habitación se mantiene a temperatura constante, entre 20-25°C.

Sensibilización de los cobayos

Los cobayos deben ser sensibilizados no menos de 3 semanas antes de efectuar las pruebas de valoración biológica de las tuberculinas mediante la inyección intramuscular de bacilos tuberculosos muertos por el calor y desecados, suspendidos en parafina líquida estéril. Para el ensayo de PPD bovino se emplean bacilos de la cepa AN5, del PPD humano, bacilos de la cepa DT y del PPD aviar, bacilos de la cepa D4. Generalmente, la prueba de valoración se realiza transcurridas de 3-8 semanas de efectuada la sensibilización, aunque ésta persiste durante 6 o más meses. El período de sensibilización puede ser importante en los ensayos de actividad relativa cuando existen pequeñas diferencias cualitativas entre las tuberculinas. Debe tenerse presente que la pendiente en la curva de dosis - respuesta disminuye en función del tiempo transcurrido desde la sensibilización. Es conveniente utilizar los cobayos sólo una vez, ya que pueden aparecer reacciones más intensas en los sitios de inyecciones previas. Si se usaran más de una vez, deberá transcurrir un intervalo de no menos de 4 semanas entre uno y otro ensayo.

Seguidamente se detalla el método de preparación de la suspensión sensibilizante. Se recomienda el uso de máscara protectora.

Colocar 100 mg. de bacilos en un mortero; agregar 100 mg. de polvo de piedra pómez y moler cuidadosamente. Agregar algunas gotas de parafina líquida y repetir la molienda. Agregar lo que resta de los 25 ml. de parafina y continuar mezclando para asegurar una suspensión de bacilos uniforme.

La suspensión contiene 4 mg. de organismos/ml.; a cada cobayo se le inyectarán 0.5 ml. por vía intramuscular.

Es conveniente tener siempre disponibles los siguientes materiales para poder utilizarlos toda vez que sea necesario:



- **Morteros:** para preparar suspensiones de bacterias, es aconsejable utilizar morteros de 10 cm. de diámetro. Los morteros se deben mantener esterilizados y autoclavar inmediatamente después de su uso. La viscosidad de la parafina se reduce con el calor, lo que facilita la limpieza.

Puesto que al retirarlos del autoclave los morteros están aún calientes, bastará enjuagarlos con abundante agua caliente. Una vez limpios y secos se envuelven en papel de aluminio y se esterilizan, estando en condiciones de ser usados nuevamente.

- **Polvo de piedra pómez:** una vez esterilizado durante 1 hora a 160°C en horno Pasteur, guardar el polvo de piedra pómez en cantidades de 100 mg. en tubos de vidrio Pyrex (50 x 15 mm) con tapón de rosca.
- **Parafina líquida:** mantener volúmenes de 25 ml. de parafina líquida estéril en frascos cónicos de 100 ml. cubiertos con papel de aluminio.
- **Jeringas:** es recomendable que las jeringas para inoculación de animales estén provistas de un adaptador de rosca (tipo Luer-lock). Para sensibilizar a los cobayos se debe usar una jeringa con camisa y émbolo de vidrio de 1 ml. y aguja de 20 SWG x 18 mm. (18 x 20), adecuada para la inoculación de suspensiones de parafina líquida.

Esterilizar una cantidad suficiente de jeringas limpias para un ensayo, además de algunas de repuesto. Generalmente se usa una misma jeringa para los cobayos de cada jaula. La esterilización se efectuará hirviendo las jeringas en agua destilada durante 20 minutos, o por aire caliente en un horno a 160°C durante 1 hora. Inmediatamente después de utilizadas, hervir las jeringas durante 20 minutos en agua destilada. Cuando se ha usado una suspensión de microorganismos en aceite, se las retirará del agua mientras estén calientes y se las limpiará con acetona, empleando un cepillo pequeño para quitar los residuos de aceite si fuera necesario. Seguidamente se las enjuagará con agua destilada caliente, se las dejará secar y se guardarán.

Preparaciones de tuberculinas PPD de referencia

Las preparaciones de referencia de PPD pueden ser almacenadas, liofilizadas en ampollas, o como soluciones concentradas en solución salina tamponada a pH 7.0, con 10% de glicerol y 0.5% de fenol con preservador, en frascos llenos hasta el tope. Las soluciones de referencia de PPD bovino, humano y aviar se preparan en la misma concentración que los lotes de producción de las respectivas tuberculinas PPD: 1.0,

10

11

2.0 y 0.5 mg/ml. Las preparaciones de referencia de los PPD humano y aviar igualadas a los patrones internacionales contienen respectivamente 100 000 UI/ml. y 25 000 UI/ml. Como aún no se ha fijado un patrón internacional para el PPD bovino, no se le puede asignar un valor en unidades internacionales a la preparación de referencia.

Preparación de las diluciones de tuberculina de referencia y en prueba

Para efectuar la primera prueba de valoración biológica, se empleará una alícuota de la solución de PPD filtrada estéril (item 2.2.9), que se llevará a la misma concentración proteínica del PPD de referencia, es decir, 2 mg/ml. el PPD humano, 1 mg/ml. el PPD bovino y 0.5 mg/ml. el PPD aviar. A partir de esas concentraciones se prepararán las diluciones que se han de emplear en el control de actividad biológica.

Para el ensayo de lotes de producción de tuberculinas PPD humanas se usan las siguientes diluciones quintuples de ambos productos, de referencia y en prueba:

1:200 1:1 000 1:5 000

El ensayo de los lotes de producción de PPD aviar requiere la preparación de las siguientes diluciones quintuples de ambos productos, de referencia y en prueba:

1:100 1:500 1:2 500

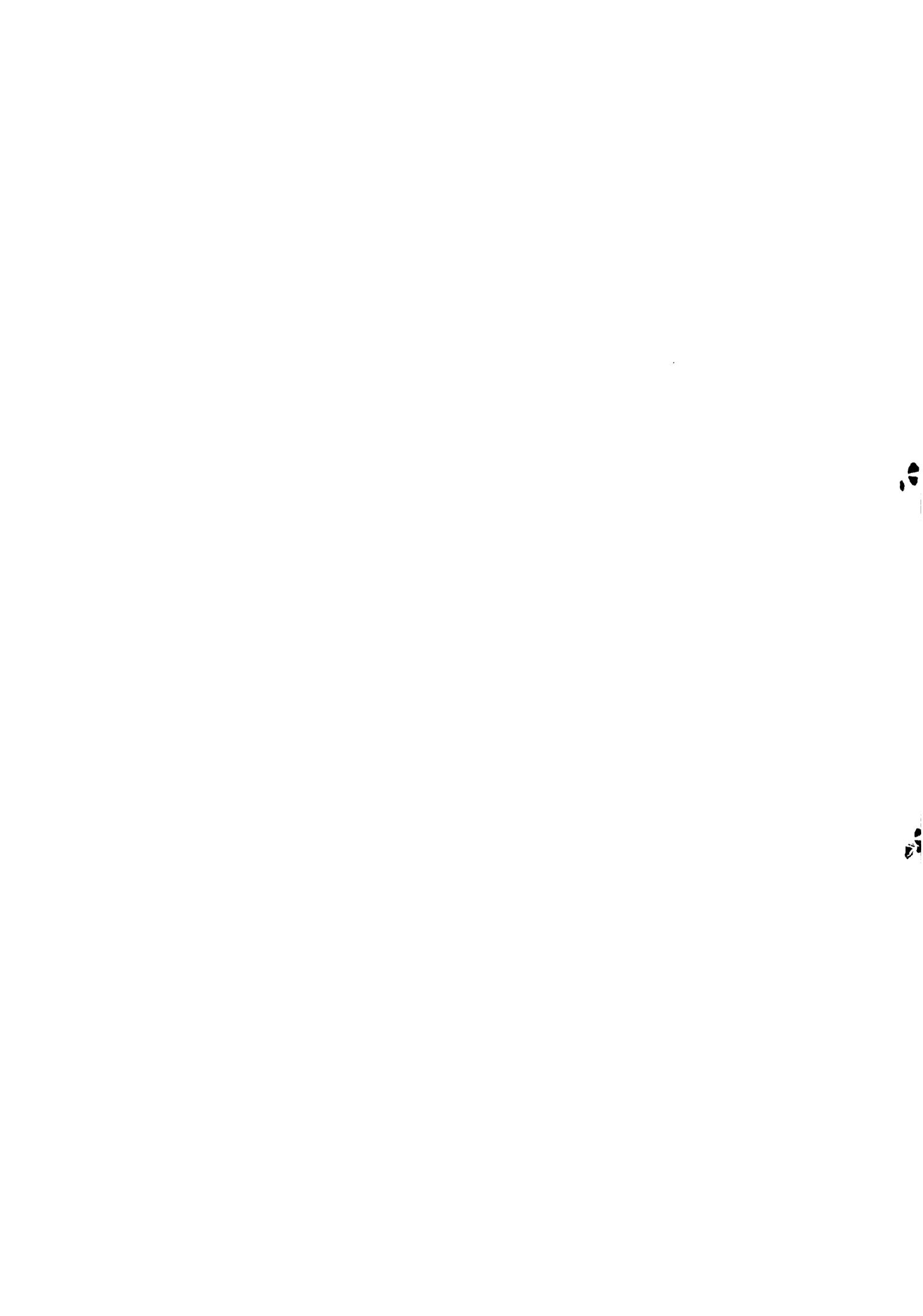
Para el ensayo de lotes de producción de tuberculinas PPD bovino se usan las siguientes diluciones quintuples de ambos productos, de referencia y en prueba:

1:200 1:1 000 15 000

Estas diluciones se prepararán inmediatamente antes del ensayo, con solución salina isotónica estéril, tamponada con fosfatos, pH 7.38:

- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 1.45 gr.
- Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)..... 7.60 gr.
- Cloruro de sodio (NaCl)..... 4.80 gr.
- Agua destilada estéril.....1 000 ml.

Passar a través del filtro de vidrio poroso (porosidad 1.0-1.5 μ) y luego esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras) durante 30 minutos.



El mayor porcentaje de error al preparar diluciones de tuberculinas ocurre en el primer paso del proceso de dilución. Por lo tanto, la medida de los volúmenes se debe efectuar con la mayor precisión posible, particularmente del pequeño volumen inicial de tuberculina concentrada.

En el caso de PPD humana o bovina, se toman 2.5 ml. de la solución concentrada, con una pipeta volumétrica y se transfieren a un frasco volumétrico de 500 ml., que se habrá llenado previamente hasta la mitad con solución diluyente.

El contenido se mezcla cuidadosamente con agitación suave. Luego se llena hasta el aforo y se cierra con un tapón adecuado, por ejemplo, de vidrio esmerilado. Se mezcla el contenido por inversión repetida del frasco. Se obtiene así una dilución 1:200 de la tuberculina mamífera.

Para preparar la dilución 1:100 de la tuberculina aviar se sigue el mismo procedimiento, excepto que los 2.5 ml. de la muestra se transfieren a un frasco volumétrico de 250 ml.

En la misma forma se preparan las siguientes diluciones quintuples. Se transfieren 20 ml. de la primera dilución, preferentemente con pipeta volumétrica, a una probeta graduada de 100 ml. Luego se llena esta probeta hasta el aforo de 100 ml. con solución diluyente y se cierra con una hoja de aluminio si no tiene tapa. Se mezcla el contenido por inversión repetida de la probeta. Luego se transfieren 20 ml. de esta dilución a una segunda probeta graduada de 100 ml., que se lleva a ese volumen con solución diluyente. Se mezcla nuevamente.

Una parte de cada una de estas 3 diluciones se pasa a tubos de vidrio neutro provistos de tapa de rosca. Estos tubos se llenan completamente a fin de reducir al mínimo el efecto de adsorción de la tuberculina a las paredes de vidrio. Las jeringas de tuberculina se llenan con el contenido de estos tubos. Cada jeringa se lava 2 veces sucesivas con la dilución correspondiente antes de llenarla con dicha dilución para efectuar la prueba.

Jeringas para tuberculina

Actualmente el tipo de jeringa más satisfactoria para el ensayo de tuberculinas en cobayos es la jeringa hipodérmica para tuberculina Microstat de 1 ml. (Omega Precision Medical Instrument Co., Inc.). Esta jeringa posee un anillo de goma sintética en el extremo del émbolo, que ajusta perfectamente y que, de haber pérdida de líquido, puede sustituirse por uno nuevo. En la boquilla del cilindro de las jeringas

2

2

Microstat sólo encajan agujas de cono Luer. Para el ensayo de tuberculina se emplean agujas de ese tipo de 26 SWG x 4 mm. con refuerzo tubular y bisel medio.

Se preparará una jeringa para cada una de las diluciones de tuberculina incluidas en el ensayo, además de algunas de repuesto para reemplazar a las que fallen. Las puntas de las agujas se controlarán antes del llenado; una aguja con la punta dañada resulta completamente inservible para estas pruebas y debe ser reparada. Las agujas se deben colocar en los cilindros antes de la esterilización y en forma tal que la cara del bisel quede en sentido opuesto a la escala en ml. del cilindro. Los émbolos y los cilindros con las agujas, separados los unos de los otros, se esterilizarán hirviéndolos en agua destilada durante 20 minutos en un recipiente tapado. Con este método es menos probable que las agujas se desprendan durante el ensayo. Además, se evita manipularlas luego de la esterilización.

Una vez utilizadas, las jeringas se enjuagarán con agua fría, luego se tratarán con detergente líquido para eluir la tuberculina adsorbida en las paredes de vidrio y, por último, se enjuagarán con agua destilada y se las dejará secar. Las agujas deben acondicionarse con cuidado para que no se dañen.

Distribución al azar de los sitios de inoculación

Los 6 sitios de inoculación de cada cobayo son designados, en sentido oral a caudal, con las letras a, b, c, para el flanco izquierdo y e, f, g, para el derecho. La dilución de PPD que se aplicará en cada sitio se determina mediante el empleo de números aleatorios. Se sigue el mismo procedimiento para cada uno de los animales y se prepara el protocolo de trabajo (Cuadro 6), dejando un espacio al lado del número que identificará la dilución de la tuberculina para anotar la respuesta correspondiente.

En un ensayo de 6 puntos usando 12 cobayos, las diluciones para cada sitio de inoculación se asignan empleando 2 cuadrados latinos de 6 puntos por lado (6 x 6). Con esta distribución, cada dilución es asignada en un mismo sitio en solo 2 cobayos.



CUADRO 6

**REGISTRO DE LOS SITIOS DE INOCULACIÓN DE LAS
DILUCIONES EN COBAYOS Y DE LAS LECTURAS DE LOS DIÁMETROS
MEDIOS DE LAS REACCIONES DÉRMICAS**

Fecha: _____

Jaula	Cobayo	Izquierda				derecha				Estándar:
		a	b	C	d	e	f	g	h	
										Prueba: Sensibilización:

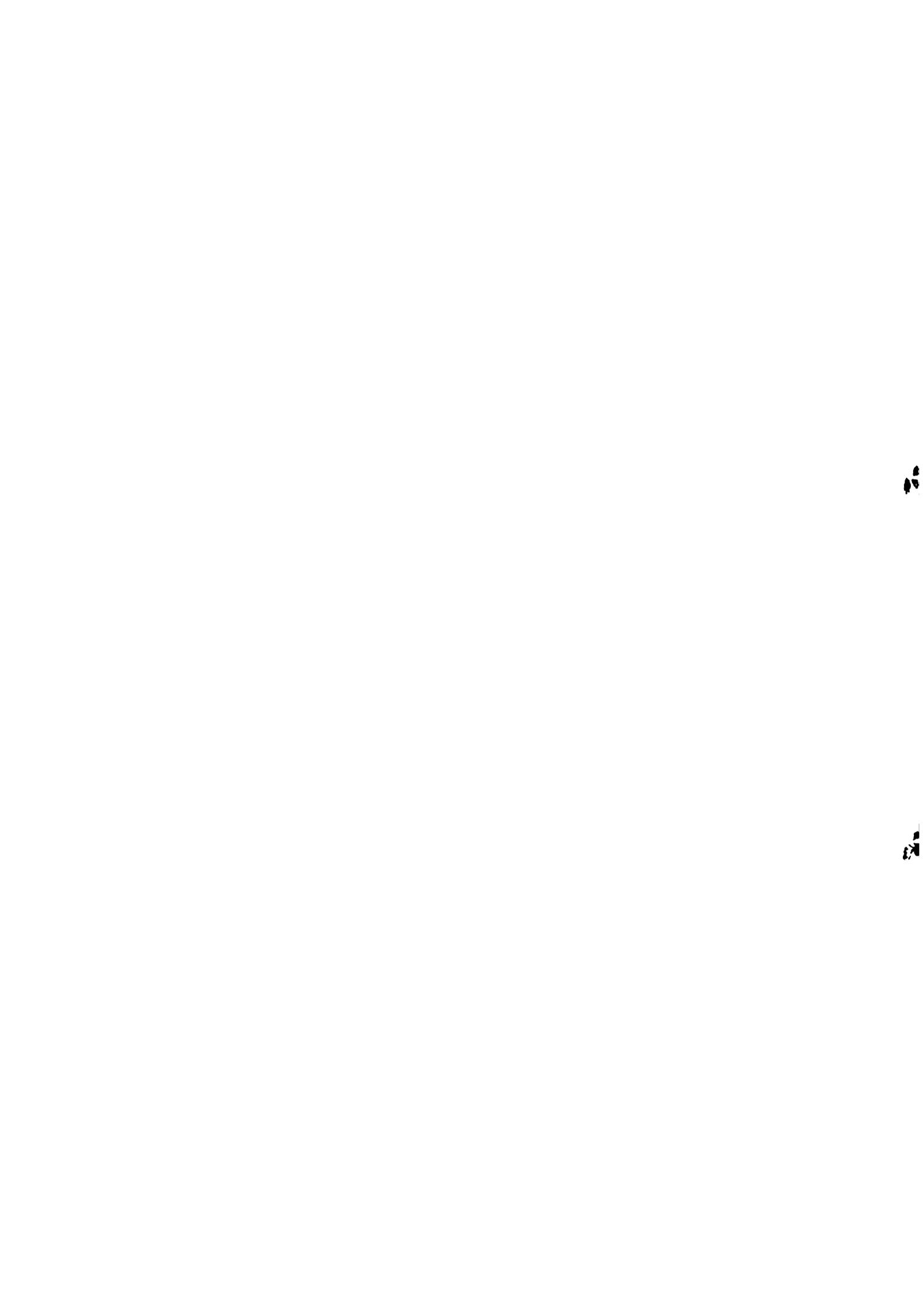
Inoculación de las diluciones de PPD

Dos horas antes de la valoración, se depila a los cobayos en ambos flancos con afeitadora eléctrica. Se identificará a cada cobayo con una pincelada de color. Se inyectan por vía intradérmica en cada cobayo las 6 diluciones de tuberculina en dosis de 0.2 ml. en 3 sitios de la línea media de cada flanco, en el orden de distribución indicado y se anota cualquier falla observada en ese momento.

Antes de emplear cada jeringa, se controlará su descarga. Las agujas deben estar bien afiladas para asegurar una correcta y fácil aplicación. En un mismo flanco, la inyección aplicada en el plano dorsal provocará una mayor reacción que la aplicada en el plano ventral.

Medidas de las reacciones

Las pruebas se leen sin conocer las diluciones empleadas en cada sitio midiendo el diámetro de las reacciones 24 horas después de aplicadas las inyecciones. Para la lectura se empleará una placa de material transparente con circunferencias grabadas,



de diámetros entre 6 - 26 mm. o una regla transparente graduada en mm. Un asistente debe anotar las lecturas en el protocolo, al lado del número de orden de la dilución.

Resultados de la valoración de la actividad relativa

Se ordenan las lecturas de acuerdo a las diluciones (Anexo 4.b), obteniéndose por adición la reacción total para cada dilución. Los resultados correspondientes a inyecciones defectuosas y las reacciones débiles no deben ser considerados en la evaluación. Se traza un gráfico con las reacciones medias en la ordenada y las dosis, a intervalos logarítmicos, en la abscisa. Las 2 líneas obtenidas representan la curva logaritmo de dosis - respuesta para cada tuberculina. Para que el ensayo se considere válido, estas líneas deben ser razonablemente paralelas, tener pendiente adecuada y no presentar una curvatura significativa.

Se calcula luego la potencia relativa con sus límites de confianza y se efectúa un nivel de significación de las diferencias entre las tuberculinas, dosis y cobayos, y también de las pendientes medias, del paralelismo y de la curvatura de las líneas dosis - respuesta.

Las estimaciones más seguras de potencia relativa se obtienen cuando las reacciones totales de cada tuberculina son aproximadamente iguales.

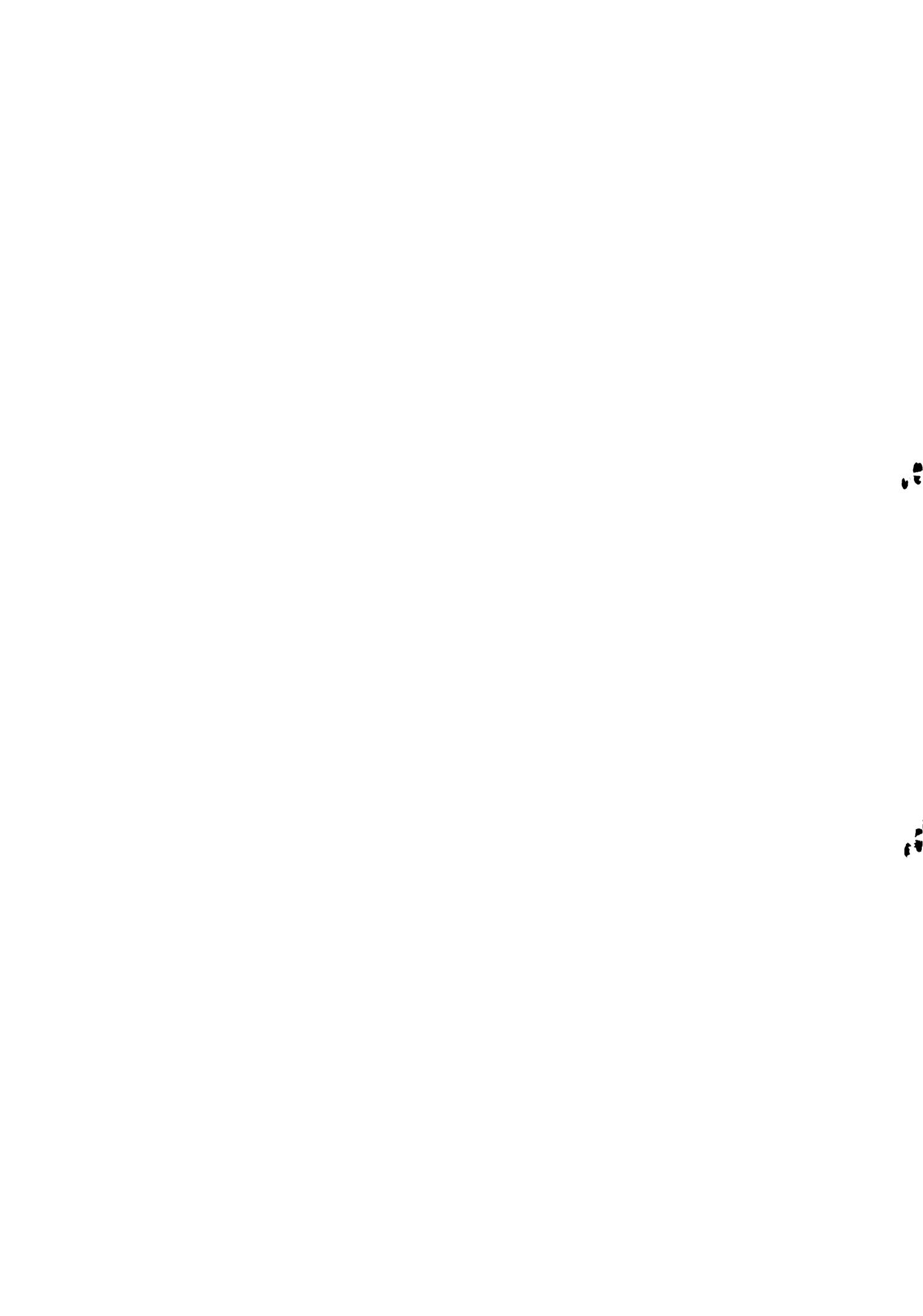
De ser posible se realizará una valoración estadística del ensayo. Sólo de esa manera se podrá obtener una estimación exacta de la potencia relativa con límites de confiabilidad del 95% y realizar las pruebas de validez.

2.2.12 Dilución de la solución filtrada

Una vez efectuados los controles químicos, de esterilidad y de potencia biológica, se realiza la dilución de la solución filtrada hasta alcanzar las concentraciones siguientes:

PPD humano: 2 mg/ml. (100 000 UI/ml.) De ser necesario, se ajustará la concentración de acuerdo con el resultado del ensayo biológico para obtener 100 000 UI/ml.

PPD bovino: 1 mg/ml., o concentración equivalente al 100% de potencia de la tuberculina PPD patrón de referencia.



PPD aviar: 0.5 mg/ml. (25 000 UI/ml.). De ser necesario se ajustará la concentración, de acuerdo con el resultado del ensayo biológico, para obtener 25 000 UI/ml.

Luego de la dilución se controlan nuevamente las concentraciones proteínica y fenólica del lote.

Los lotes de PPD bovino y aviar para uso animal constituyen en esta etapa el “producto acabado a granel”, que será envasado directamente para ser utilizado en la prueba tuberculínica.

El PPD humano destinado a la prueba tuberculínica intradérmica en el hombre, deberá ser previamente diluido a 2 UI/0.1 ml., o a la dosis que indiquen las normas nacionales respectivas.

2.2.13 Agregado de colorantes

Por lo general, a la tuberculina PPD aviar se le agrega colorante Ponceau 2R Xilidine Red (Ponceau de Xilidina).

El procedimiento es el siguiente: se prepara la cantidad necesaria de una solución de colorante al 2% en agua destilada, calentando para disolver completamente. Se filtra a través de capas filtrantes esterilizantes, Seitz EKS o Carlson Ford HP/EK.

La solución colorante puede ser usada inmediatamente o conservada en frascos con tapa de rosca, en cantidades convenientes. En este último caso debe esterilizarse en autoclave a 115°C (10 libras) durante 15 minutos.

Se agrega un volumen de esta solución colorante a 400 volúmenes de tuberculina PPD aviar para obtener una concentración final del colorante de 0.005%. Si la tuberculina PPD bovina es empleada en 2 concentraciones diferentes (1 y 2 mg/ml.) según los requerimientos de la prueba, se puede agregar a una de ellas Azul de Evans, de concentración final aproximadamente de 1 en 100 000.

2.2.14 Control final de la potencia biológica

Antes del envasado debe realizarse un nuevo control de la potencia biológica de la solución filtrada y diluida del PPD, con el método descrito anteriormente (2.2.11.1). Los resultados obtenidos en el segundo ensayo deberán coincidir con los del primero.

13

14

2.2.15 Envasado

Se distribuye el producto final a granel en frascos-ampolla, de vidrio neutro, transparente u oscuro, de 5 ml. de capacidad, con tapones de goma, sellados con sobretapa de aluminio. Los envases se llenarán completamente.

Se hará una inspección visual de los envases y se rechazarán aquellos que presenten alguna anomalía.

2.2.16 Control del producto final envasado

Se efectúa un control de esterilidad (2.2.10.1) en una muestra de frascos de número igual o mayor a $4/10\sqrt{N}$, donde N es el número total de frascos.

2.2.17 Etiquetado

El producto final envasado debe llevar los siguientes datos en la etiqueta:

Tuberculina PPD

Origen: (M. tuberculosis, M. avium, M. bovis u otro)

Datos del productor:

Nº de lote:

Vencimiento:

Concentración proteínica y número de unidades internacionales:

Dosis:

Indicaciones de conservación: conservar refrigerado (entre 1-10°C y sin contacto con la luz natural).

2.2.18 Conservación

Las tuberculinas PPD, en concentraciones mayores de 0.5 mg/ml., pueden conservarse en las condiciones descritas en el punto 19 durante 2 años. Al cabo de ese lapso, deberá repetirse su control de potencia.

2.2.19 Tuberculina PPD de *M. tuberculosis* para pruebas tuberculínicas en seres humanos

Se debe diluir el PPD de 2 mg/ml. (100 000 UI/ml.) a la concentración empleada en la prueba de Mantoux.



Se utilizará como diluyente solución fisiológica estéril tamponada con fosfato, de pH 7.38, con el agregado de Tween 80 (Sorbitan mono-oleato de polioxietileno) al 0.05% como estabilizante.

Su composición es la siguiente:

- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4).....1.45 gr.
 - Fosfato disódico (Na_2HPO_4).....6.06 gr.
 - Cloruro de sodio (NaCl).....4.80 gr.
 - Agua destilada c.s.p.....1000 ml.
 - Tween 80 (solc. acuosa al 1%)0.5 ml.
- pH = 7.38

A esta solución se le agrega fenol al 0.5% o bien chinisol al 0.1% como conservadores. Si se emplea chinisol se deberá controlar muy especialmente que no exista formación de un precipitado oscuro por combinación de este antiséptico con impurezas de hierro.

Envasado

Se aplican las normas indicadas en el punto 2.2.15 Es condición fundamental que los envases sean llenados por completo a fin de reducir al mínimo la adsorción de las proteínas a las paredes del vidrio.

2.2.20 Control del producto final diluido y envasado

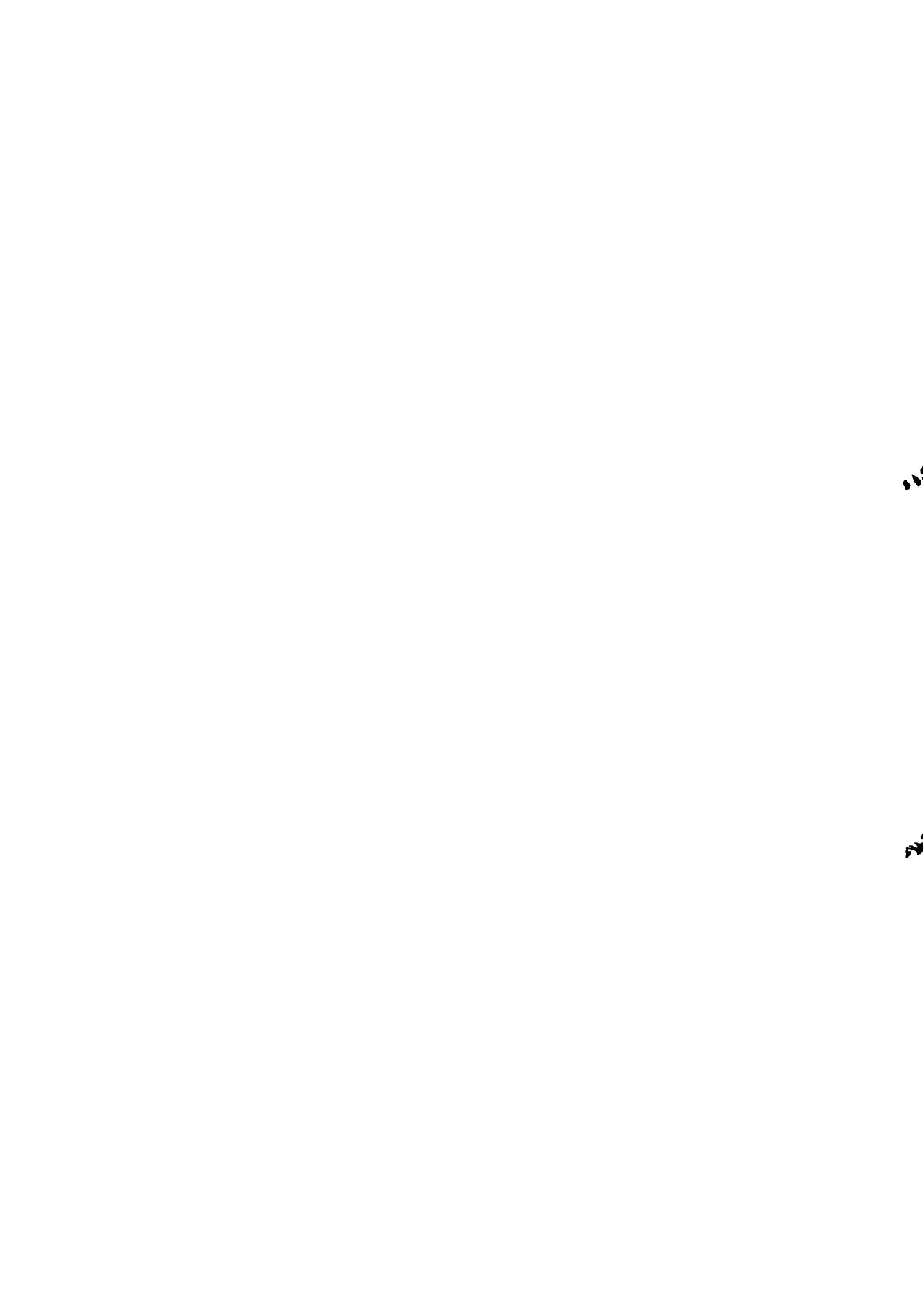
Se efectúa un control de esterilidad, en una muestra de frascos tomados al azar, de número igual o mayor a $4/10\sqrt{N}$, de donde N es el número total de frascos.

Etiquetado

Se aplica lo dicho en el ítem 2.2.16

Conservación

La tuberculina PPD diluida para la prueba de Mantoux (1-5 UI/0.1 ml.), según lo indicado en el punto 2.2.18 puede emplearse hasta 6 meses después de su dilución, si es conservada refrigerada ($1-10^\circ\text{C}$) y sin contacto con la luz natural.



3. LITERATURA CONSULTADA

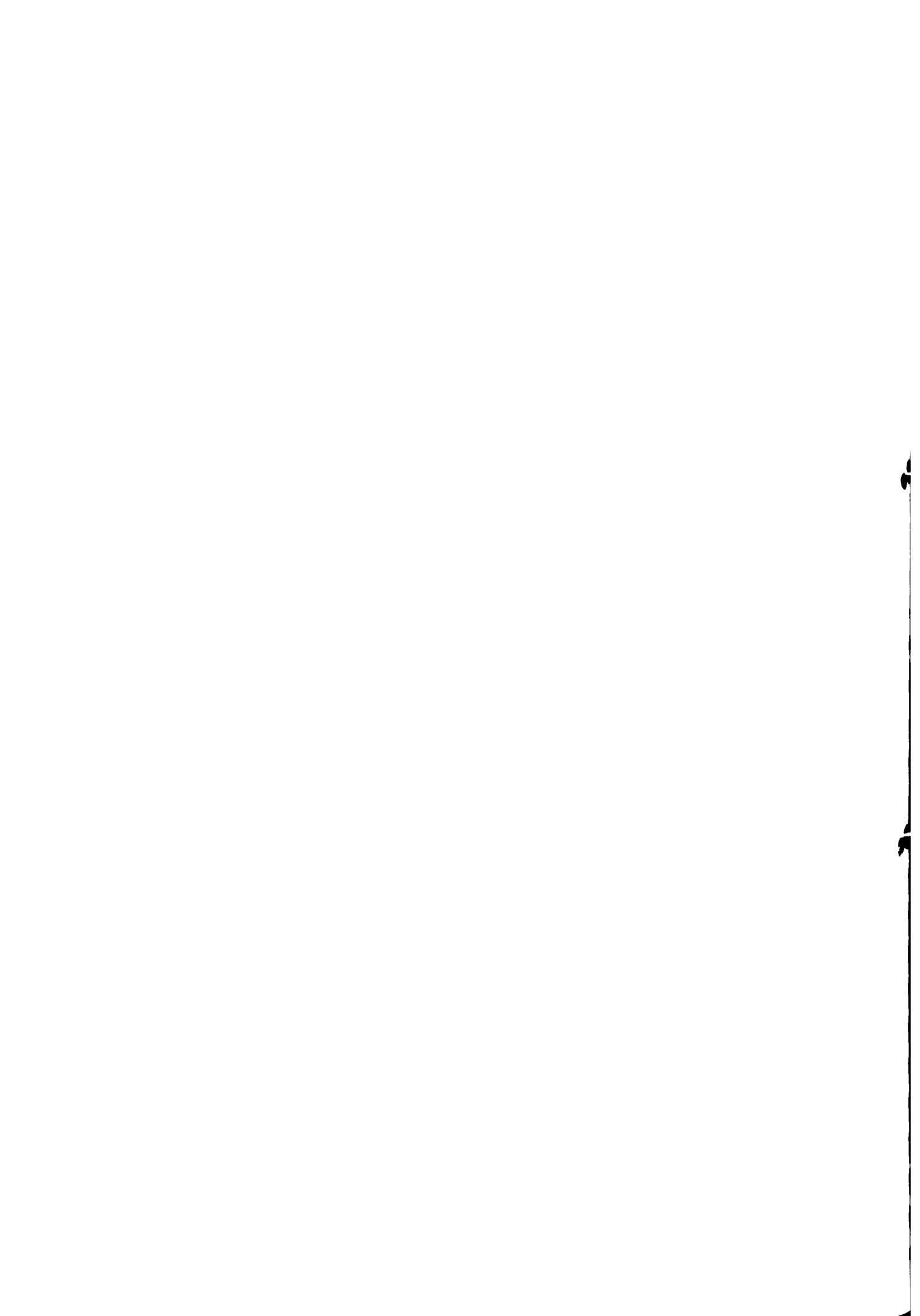
- OFICINA PANAMERICANA SANITARIA / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1979. *Bacteriología de la Tuberculosis*. 63 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. 1980. *Preparación y Estandarización de Tuberculinas PPD*. Nota técnica No. 17, Rev. 1. 44 p.

»

»

VIII. ANEXOS

**MANUAL DE TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO
EN SALUD ANIMAL**



ANEXO 1. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

- **Fórmula del agar gel 1% pH 8.6**

Agar noble	1 gr.
Hidróxido de sodio.....	0.2 gr.
Acido bórico	0.9 gr.
Agua destilada	100 ml

Nota: Se acepta el empleo de ácida sódica como conservante.

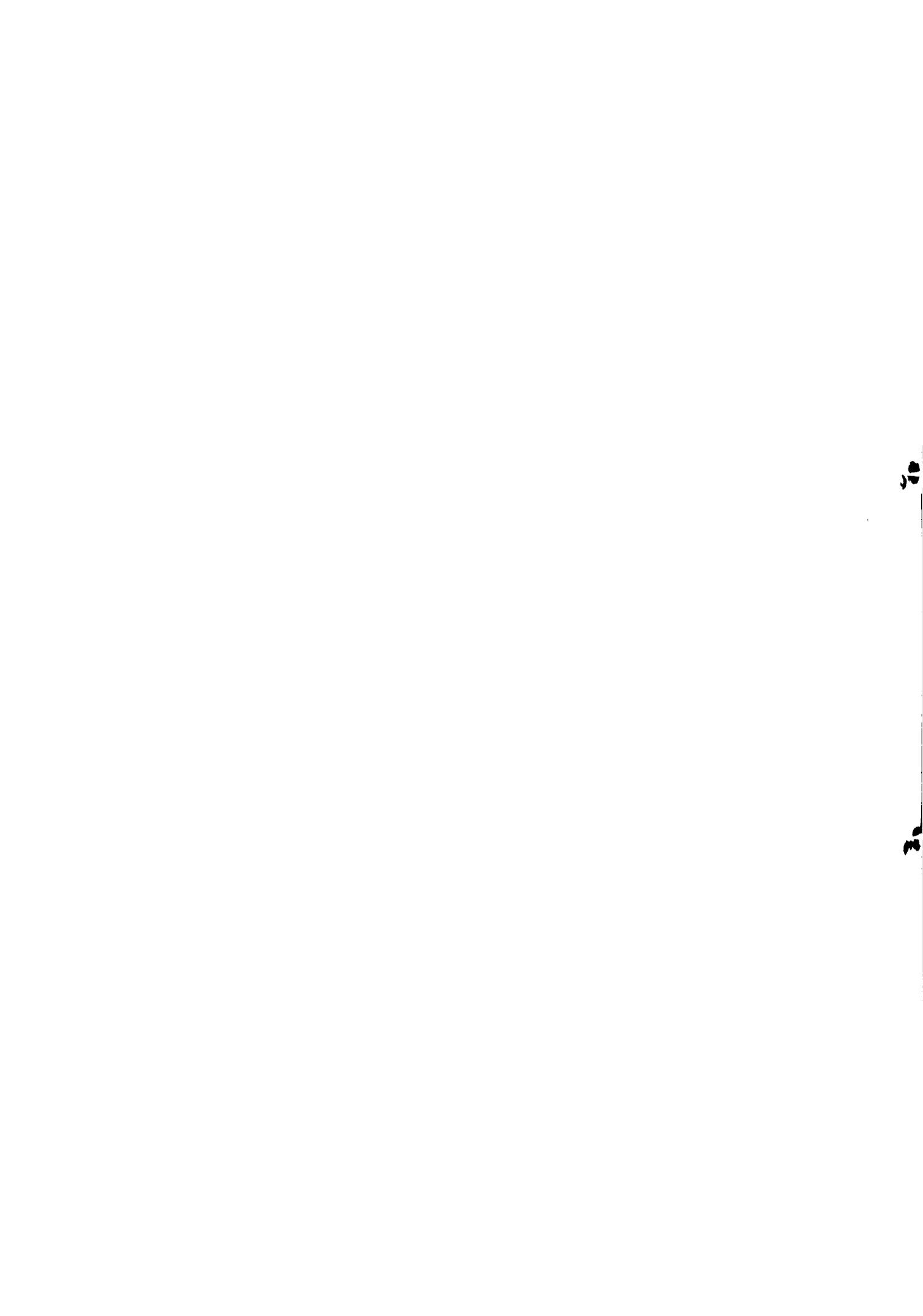
- **Solución saturada de sulfato de amonio**

Sulfato de amonio.....	45 gr.
Agua destilada.....	100 ml.

- **Buffer de Sorensen**

Fosfato disódico (Na_2HPO_4 anhidro)	8.33 gr.
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	1.09 gr.
Agua destilada	1 000 ml.

pH = 7.6



ANEXO 2. BRUCELOSIS

Anexo 2.a

- **Preparación de la Solución Salina Tope con Veronal Sódico (SVB)**

Fórmula de la solución madre (5x)

Cloruro de sodio	85	gr
5-5 dietil-barbiturato de sodio.....	3.75	gr
Acido 5-5 dietil-barbitúrico.....	5.75	gr
Solución concentrada de Mg-Ca.....	5	ml
Agua destilada.....	2 000	ml

Preparación

- En un matraz aforado de 2 000 ml, disolver 85 gr de NaCl y 3.75 gr de 5-5 dietil-barbiturato de sodio en 500 ml de agua destilada caliente; agregar a la solución anterior y enfriar a temperatura ambiente.
- Agregar 5 ml de una solución 1M de MgCl₂ y 0.3M de CaCl₂, que se prepara en la forma siguiente:

MgCl ₂	9.5	gr (igual a 20.3 g MgCl ₂ .6H ₂ O)
CaCl ₂	3.33	gr (igual a 4.4 gr aCl ₂ .2H ₂ O)
Agua destilada c.s.p.....	100	ml

- Completar hasta la marca de 2 000 ml y mezclar bien.
- Controlar el pH de la solución madre haciendo una dilución 1:5 en agua destilada. El pH de la solución diluida debe estar entre 7.3 y 7.4. Si o estuviese entre estos valores se debe descartar la solución madre y preparar una nueva.

Solución de gelatina

Disolver 1 gr. de gelatina en 200 ml de agua destilada, calentando hasta el punto de ebullición para asegurar la dilución completa. Completar hasta 2 litro con agua destilada y enfriar en refrigerador. No debe usarse después de transcurrida 1 semana de su preparación.

Como alternativa, se puede preparar una gelatina al 2% que se distribuye en frascos tipo penicilina de 50 ml y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos. La solución estéril se conserva en refrigeración durante varios meses. Un frasco (50 ml) es necesario para cada 2 lt. de solución SVB.

Solución SVB lista para el uso

A cada volumen de solución madre. Agregar 4 volúmenes de solución de gelatina (o bien 400 ml de solución madre, 50 ml de gelatina al 2% y 1 550 ml de agua destilada). El pH deberá estar entre 7.3 y 7.4. La solución se debe usar dentro de las 24 horas

- **Preparación de la Solución Salina Tope con Veronal Sódico y Acido Clorhídrico (SVC)**

Fórmula de la solución madre (5x)

NaCl	83	gr
Na 5-5 dietil barbiturato.....	10.19	gr
Acido clorhídrico 1N (*).....	34.58	gr
Solución concentrada de Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	5	ml
Agua destilada c.s.p.	2 000	ml

(*) De la solución de ácido clorhídrico comercial (PM = 36.46; 31 a 32%; densidad 1.16) se miden 99.77 ml y se llevan a 1 000 ml con agua destilada.

Preparación

- En un matraz aforado de 2 000 ml, disolver el NaCl y el barbiturato en 500 ml de agua destilada.
- Agregar el ácido clorhídrico.
- Agregar 5 ml de la solución concentrada de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, la cual se prepara en la forma siguiente:

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	4.4	gr
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20.3	gr
Agua destilada.....	100	ml

- Completar el volumen hasta 2 000 ml con agua destilada y mezclar.



- Controlar el pH que debe estar entre 7.3 y 7.4, después de diluida la solución madre 1:5 en agua destilada.

Solución SVC lista para el uso

A cada volumen de solución madre se agregan 4 volúmenes de solución de gelatina. Controlar el pH que debe estar alrededor de 7.3.
Descartar esta solución después de transcurridas 24 horas

- **Preparación de la Solución Salina Tope de Borato (SSB)**

Fórmula de la solución madre (10x)

Acido bórico H_3BO_3	12.4 gr
Hidróxido de sodio sol. normal NaOH 1N.....	105.0 ml
Acido clorhídrico sol. normal HCl 1N(*).....	103.0 ml
Cloruro de sodio NaCl.....	153.0 ml
Sulfato de magnesio 1.04M ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).....	9.6 ml
Cloruro de calcio 1.25M ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$).....	2.4 ml
Agua destilada c.s.p.....	2 000 ml

(*) *La solución normal de ácido clorhídrico se puede preparar como sigue:*

Preparación

- Colocar el ácido bórico en un vaso de precipitado y agregar el NaOH.
- Mezclar bien y agregar el HCl. Mezclar de nuevo, agregar 180 ml de agua destilada y agitar hasta que el ácido bórico se haya disuelto.
- Poner el NaCl en un matraz volumétrico de 2 000 ml y disolver con 600 ml aproximadamente de agua destilada.
- Agregar la solución de ácido bórico, usando pequeñas cantidades adicionales de agua destilada para enjuagar el vaso.
- Agregar las soluciones de $MgSO_4$ y $CaCl_2$ al matraz que contiene los otros componentes y cantidad suficiente de agua destilada para completar 2 lt.
- Para el uso en la prueba de fijación del complemento, diluir esta solución madre 10 veces (1/10) en agua destilada.
- El pH de la solución diluida debe ser 7.2-7.3. Cualquier diferencia que pueda existir en el pH se corrige agregando a la solución madre HCl o NaOH.
- En un matraz volumétrico de 1 lt, colocar 500 ml de agua destilada. Agregar con cuidado 83.7 ml de ácido clorhídrico concentrado (37%, densidad 1.19) y

•

•

completar con agua destilada hasta los 1 000 ml (Para otro ácido clorhídrico, hay que calcular las cantidades adecuadas).

- **Preparación de la Solución Alsever para Conservación de los Glóbulos Rojos de Oveja**

Fórmula

Dextrosa	20.5	gr
Citrato de sodio.....	8.0	gr
Cloruro de sodio.....	4.2	gr
Acido cítrico.....	0.55	gr
Agua destilada.....	1 000	ml

Preparación

La solución se esteriliza por filtración. También se puede esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, evitando que llegue a caramelizarse; en caso de que ello ocurra la solución debe descartarse.

Conviene seleccionar 4 ovejas sanas que suministren eritrocitos de fragilidad normal. Cada semana se sangra una oveja, de modo que la misma oveja será sangrada a la quinta semana.

La sangre se recogerá asépticamente en un recipiente que contenga un volumen de solución Alsever similar al de la sangre que se va a tomar. Se mezclan bien y se conservan en refrigerador.

La sangre de cada oveja se empieza a utilizar 1 semana después de su recolección y en condiciones normales se la puede emplear durante un período de 2-6 semanas a temperatura de 4°C, siempre que no aparezca contaminada.

- **Preparación y Conservación del Complemento**

Los cobayos adultos y bien nutridos con verduras dan complemento de buena calidad. Para obtener lotes de complemento similares entre sí, se debe utilizar cada vez un número grande de cobayos (más de 20 animales, preferiblemente 50), que se mantendrán en ayunas desde 12 horas antes, para evitar la presencia de quilo en el suero, si bien pueden beber toda el agua que deseen.



La sangría se hace por punción cardíaca sin anestesia. Colocar la sangre en placas de petri estériles y dejar reposar 1 hora aproximadamente para permitir la retracción del coágulo.

Con la ayuda de una espátula estéril, recoger los coágulos y colocarlos junto con el suero en frascos grandes de centrífuga. Sin pérdida de tiempo centrifugar a 1 000 xg durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C.

Con todos los sueros sobrenadantes (libres de hematíes) hacer una mezcla (que constituye un lote de complemento) y distribuirla seguidamente en frascos pequeños de liofilización o en ampollas para congelación a -70°C, según las disponibilidades del laboratorio.

Liofilización por complemento

La liofilización es el mejor método de conservación del complemento. Distribuir el suero de cobayo en frascos especiales para liofilización, congelar y desecar al vacío, según las técnicas normales de liofilización, hasta que la desecación sea total.

El complemento liofilizado resiste algún tiempo a temperatura ambiente, aunque se recomienda almacenarlo a 4°C. A esta temperatura se conserva durante 1 año o más, sin pérdida apreciable de actividad.

Conservación del complemento congelado

Para conservar el complemento congelado, distribuirlo en ampollas en cantidades aproximadas a las necesidades de un día de trabajo.

Mantiene su actividad durante mucho tiempo en congelador a -60°C o por debajo de esta temperatura (a -20°C pierde rápidamente su poder hemolítico). Una vez descongelado el complemento, no se le debe congelar nuevamente porque baja su actividad.

Conservación del complemento en solución de Richardson

Preparar una solución salina saturada disolviendo 60 gr de NaCl en c.s.p. 200 ml de agua destilada caliente. Agitar periódicamente durante el día. Deben quedar algunos cristales de sal sin disolver. Si la dilución fuera completa, agregar más NaCl, agitar y dejar reposar durante la noche.



Fórmula de Richardson

Bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).....	1.53 gr
Acido bórico H_3BO_3	0.49 gr
Sorbitol $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	5.28 gr
Azida sódica NaN_3	0.39 gr
Sol. salina saturada c.s.p.....	100 ml

Es muy importante usar productos químicamente puros pro análisis.

A cada 8 partes de complemento, agregar 2 partes de solución de Richardson. Mezclar bien y conservar en refrigeración a 4°C.

Para emplear el complemento conservado en solución de Richardson, diluir 1 ml en 7 ml de agua destilada, con lo cual se consigue una solución isotónica de complemento diluido 1:10. Las diluciones siguientes se hacen solución tope isotónica en la forma habitual.

- **Titulación Gráfica del Complemento sobre papel Logarítmico/Probabilidad**

Para ajustar a una línea recta la curva sigmoide de la hemólisis se puede usar un papel especial, cuya ordenada es una escala logarítmica de 2 ciclos y la abscisa es una escala probabilística. Ofrece la ventaja de que permite trabajar directamente con los porcentajes de hemólisis sin necesidad de calcular los factores ($Y:100 - y$) de la fórmula de Von Krogh.

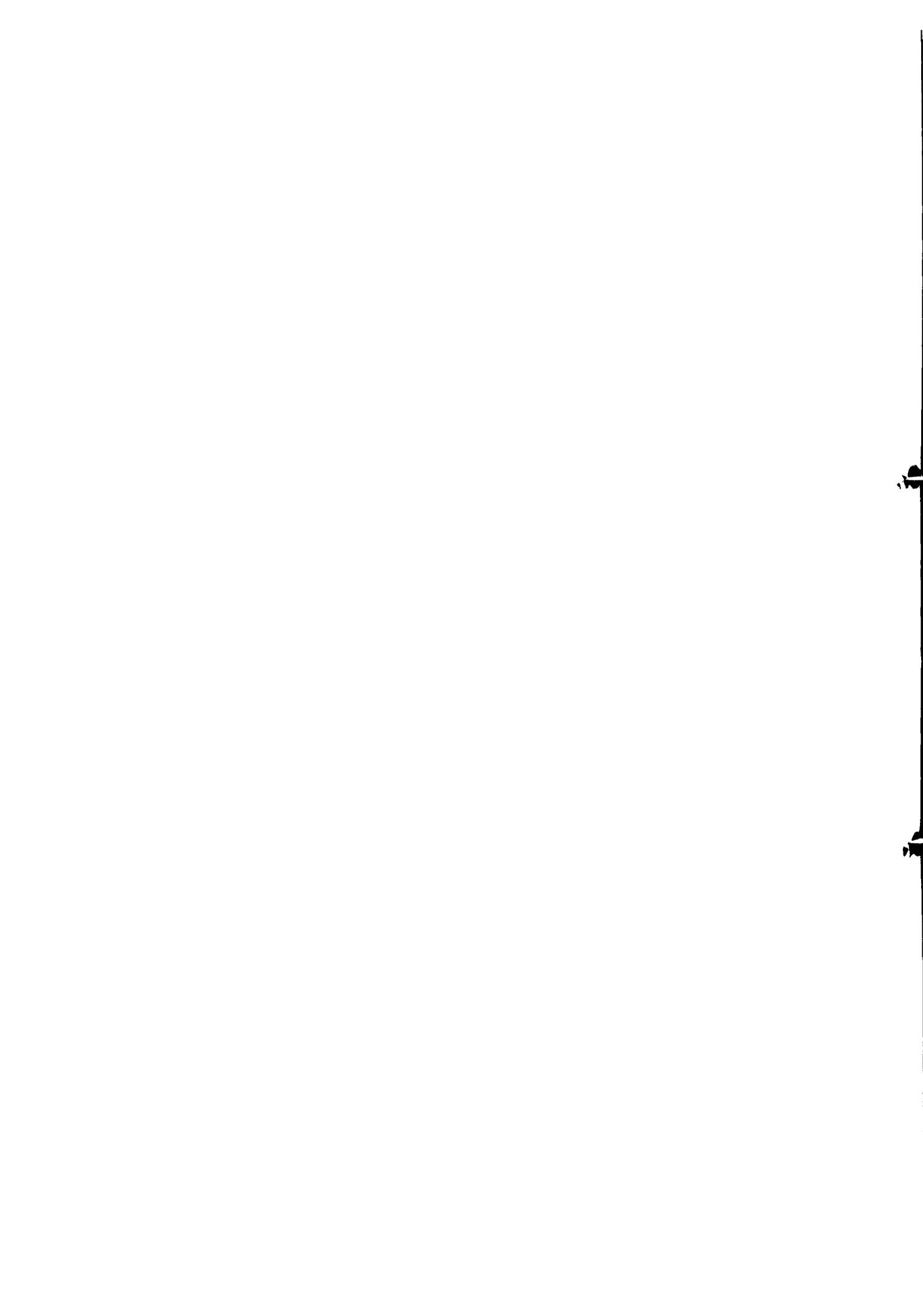
La técnica de titulación del complemento se hace en la misma forma descrita para el uso del papel logarítmico de 2 x 2 ciclos.

Es preferible trabajar con cantidades triples para ganar en exactitud. Se procede de acuerdo con el sistema descrito en el Cuadro 5 del texto (pág. 38).

- **Producción del Suero Hemolítico (Hemolisina)**

Preparación de los estromas

Cantidades para inmunizar 4 conejos grandes.



- Mezclar partes aproximadamente iguales de sangre de 5 ovejas conservada en Alsever hasta un volumen de 300 ml. Distribuir en 2 frascos de centrifuga de 1 000 ml y complétese los volúmenes con solución salina fisiológica.
- Centrifugar a 1 000 xg durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante y repetir 3 veces los lavados.
- Después del último lavado, suspender el sedimento de cada frasco con 50 ml de solución salina y agregar 5 ml de hemolisina pura y 15 ml de complemento sin diluir. Mezclar bien e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Agregar 500 ml de solución salina y mezclar bien. Completar el volumen de los frascos con más solución salina y centrifugar a 500 xg durante 10 minutos (1 395 rpm en SORVALL RC-3 con cabezal HG-4L).
- Transferir el sobrenadante que contiene los estromas a otros frascos de centrifuga y descartar el sedimento.
- Centrifugar a 5 000 xg durante 30 minutos (aprox. 4 730 rpm en SORVALL RC-3 cabezal HG-4L).
- Descartar el sobrenadante y suspender el sedimento con salina. Repetir 3 veces los lavados.
- Después del tercer lavado, suspender el sedimento de cada frasco con 40 ml de solución salina y mezclar el contenido de ambos frascos.
- Agregar 1 ml de mertiolate al 1% (para concentración final 1:8 000) y colocar la suspensión de estromas en un frasco apropiado para cargar las jeringas.
- Conservar en refrigeración.

Esquema de inoculación de los conejos

Día	0	1 ml de solución estromas vía endovenosa
	1	2 ml de solución estromas vía intraperitoneal
	2	1 ml de solución estromas vía endovenosa
	3	2 ml de solución estromas vía intraperitoneal
	4	1 ml de solución estromas vía endovenosa
	5	2 ml de solución estromas vía intraperitoneal
	7	1 ml de solución estromas vía endovenosa
	8	2 ml de solución estromas vía intraperitoneal
	14	Sangría total de los conejos por punción cardíaca

Titulación

- Separar el suero de los coágulos en forma independiente para cada conejo.
- Inactivar el suero a 56°C durante 30 minutos y hacer una prueba de titulación de hemolisina en la forma descrita en el texto.



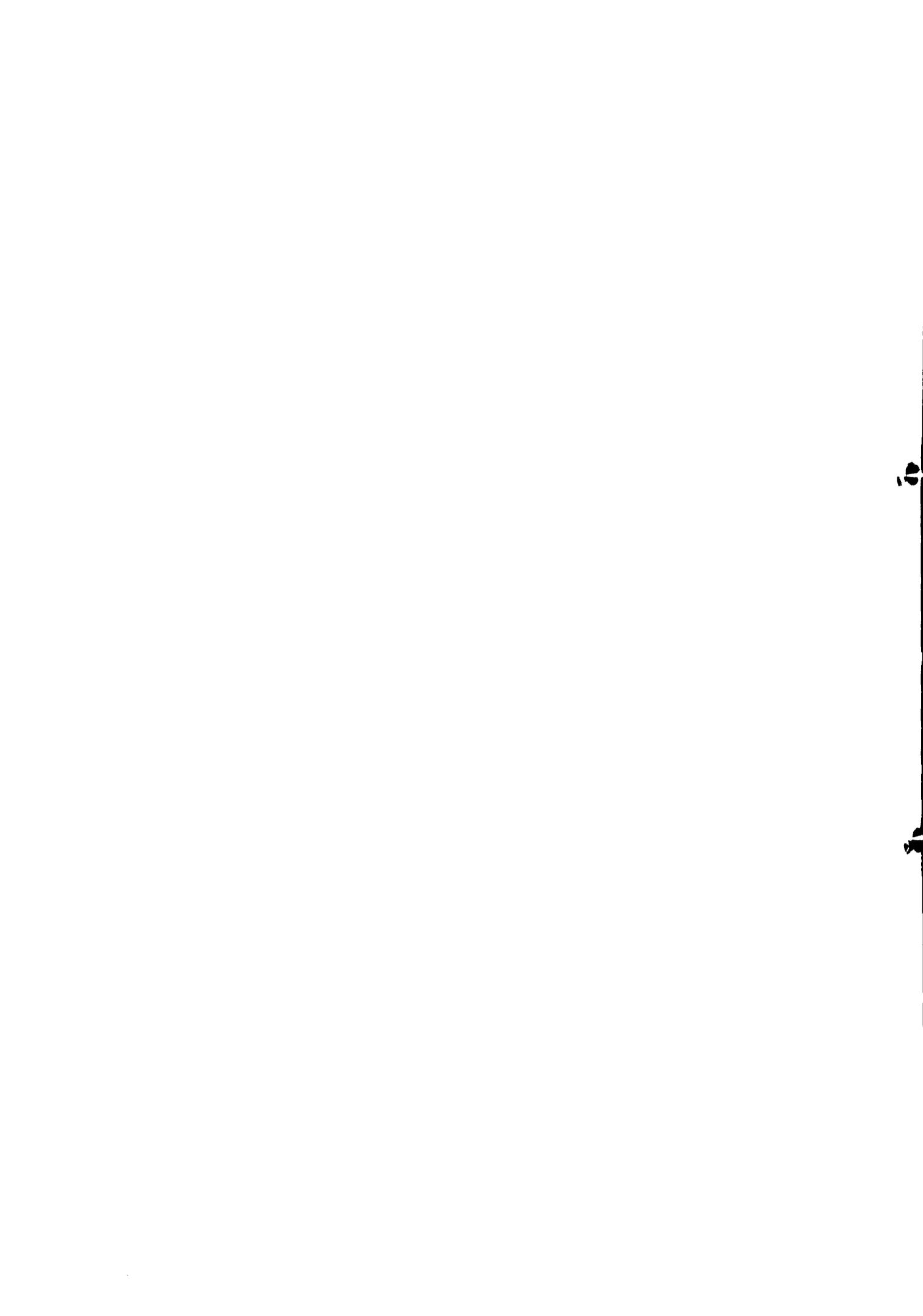
Se consideran satisfactorios los sueros que muestran actividad hemolítica óptima en la dilución 1:2 000 o superior.

- Determinar la actividad aglutinante del suero. Para ello, se preparan diluciones del suero 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1 600. A cada 0.4 ml de dilución de suero, agregar 0.2 ml de suspensión de glóbulos rojos estandarizada al 2.8% e incubar a 37°C durante 30 minutos y en refrigeración durante una noche.

Una hemolisina es satisfactoria cuando no presenta indicios de aglutinación en la dilución 1:1 600 y es preferible que su actividad aglutinante sea inferior a 1:800.

- Los sueros satisfactorios se mezclan y se hace un lote de hemolisina.

El suero obtenido se liofiliza sin ningún otro diluyente. Si esto no es factible, se agrega un volumen igual de glicerina y se conserva en refrigeración.



Anexo 2.b

- **Preparación de caldo dextrosado de Andrade para la prueba de esterilidad**

Fucsina ácida.....	0.5	gr.
Agua destilada.....	100	ml.
Sol. normal (N/1) de Na OH.....	16	ml.

La solución debe prepararse por lo menos 24 horas antes del uso. Manténgase en refrigeración.

El indicador debe tener un color rojo oscuro.

Preparación del caldo dextrosado de Andrade

Agua destilada.....	1 000	ml.
Extracto de carne.....	3	gr.
Peptona.....	10	gr.
Na Cl A.C.S.....	5	gr.
Dextrosa.....	10	gr.
Indicador de Andrade.....	10	ml.

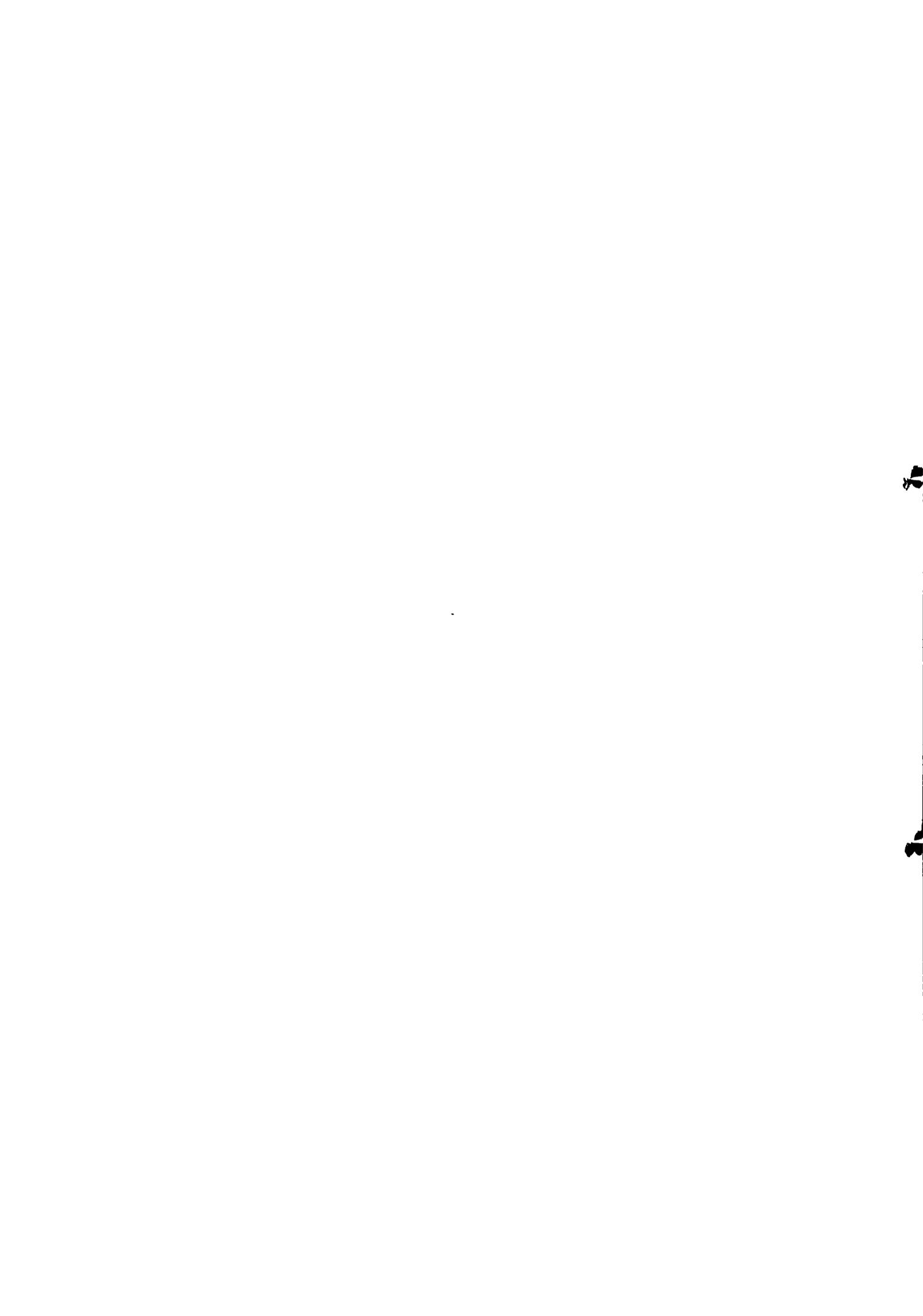
Método de preparación

Mezclar todos los ingredientes con excepción de la dextrosa y del indicador. Ajustar el pH a 7.4 con solución normal de Na OH. Autoclavar a 121°C durante 30 minutos. Filtrar por papel de filtro Whatman N° 2 (o su equivalente). Agregar la dextrosa y el indicador de Andrade. Distribuir 8 ml. en cada uno de los tubos de ensayo que contengan tubitos de fermentación Durham. Autoclavar a 121°C durante 12 minutos. Retirarlo rápidamente.

- **Preparación de solución salina fisiológica bufferada a pH 6.4**

Solución A (Sol. Molar de fosfato dibásico)

Na ₂ HPO ₄ A.C.S. (anhidro).....	141.96	gr.
Agua destilada c.s.p.....	1 000	ml.



Solución B (Sol. Molar de fosfato monobásico)

KH ₂ PO ₄ A.C.S. (anhidro).....	136.09 gr.
Agua destilada c.s.p.....	1 000 ml.

La solución salina bufferada a pH 6.4 se prepara de la siguiente forma:

Solución A.....	26.5 ml.
Solución B.....	73.5 ml.
Sol. Salina al 0.85%.....	1 000 ml.

En el caso de que estas proporciones den un pH 6.4 se puede hacer el ajuste variando las proporciones de las 2 soluciones. Para aumentar el pH se agrega mayor cantidad de la solución A. Un pH más bajo se obtiene aumentando la cantidad de solución B.

Las soluciones madres de fosfatos se suelen precipitar en frío, pero se redisuelven con facilidad mediante un ligero calentamiento.

• **Solución fisiológica con tope de fosfatos (pH 7.2)**

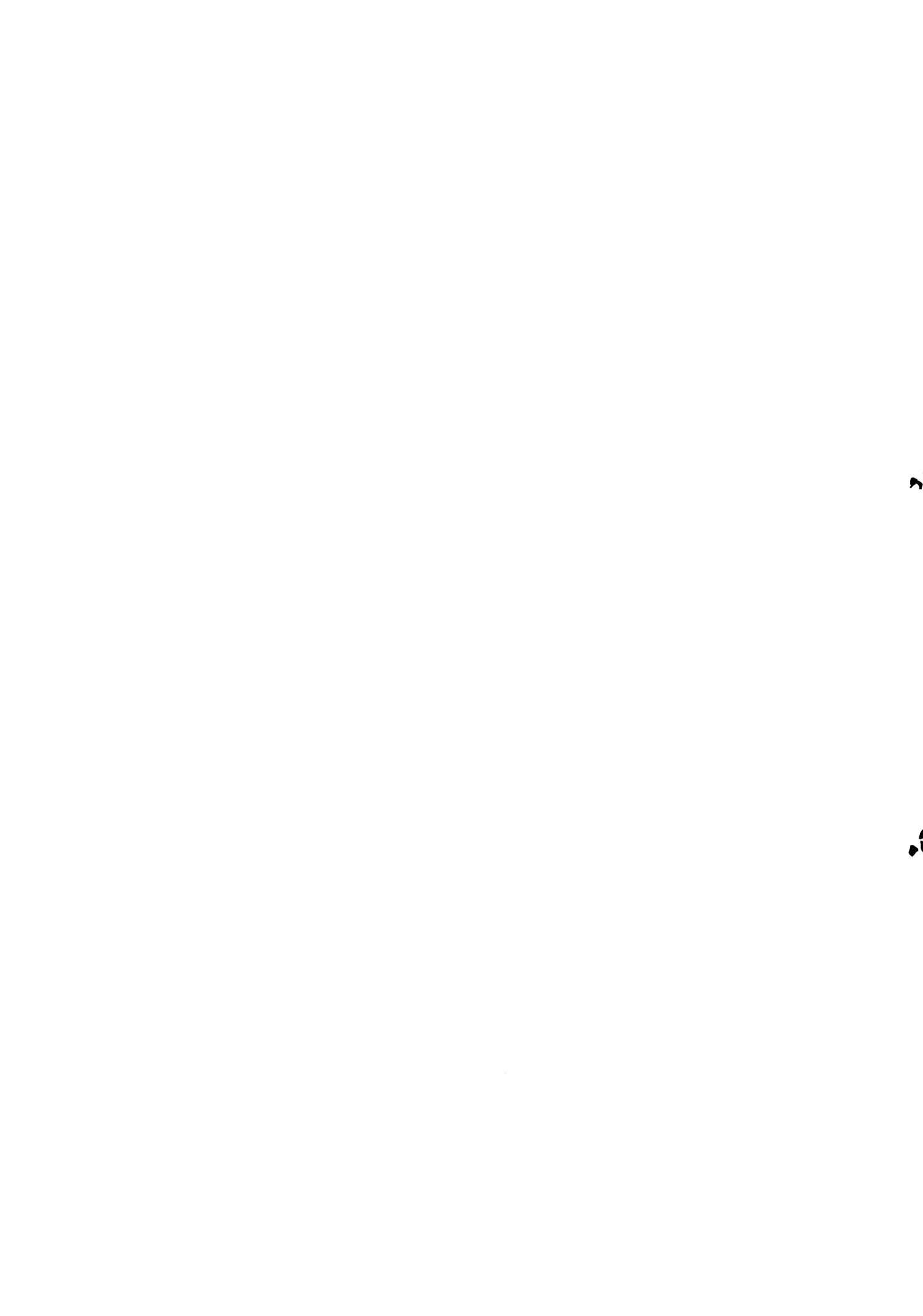
Na Cl.....	8.5 gr.
Solución tope de Sorensen.....	80 ml.
Agua destilada c.s.p.....	1 000 ml.

• **Solución tope de Sorensen (pH 7.2 – 7.3)**

Na ₂ HPO ₄ (anhidro).....	8.0 gr.
KH ₂ PO ₄ (anhidro).....	1.1 gr.
Agua destilada c.s.p.....	1 000 ml.

• **Solución salina al 5% con tope de fosfatos (pH 7.2)**

Solución de NaCl al 5%.....	1 840 ml.
Solución tope Sorensen.....	160 ml.



- **Agar blando para la prueba de difusión en gel**

Agar (DIFCO)..... 1 gr.
Solución salina al 5% con
tope de fosfatos pH 7.2 c.s.p.....100 gr.
Merthiolate 1:10 000 (preservativo)

Calentar en baño maría para disolver el agar y fraccionar en tubos de 16 x 150 mm. con tapa de rosca o tapón de goma, en volúmenes de 9 ml. por cada uno. Mantener a 4°C.

- **Agar suero**

Brucella agar (Albimi)*.....44.1 gr.
Bacto agar.....5 gr.
Agua destilada1 000 ml.
PH 7.0 ± 0.2

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

** El Brucella Agar Albimi contiene 15 gr. de agar por cada 44.1 gr. de polvo. Para llevar la concentración de agar a 20 gr/lit. se agregan 5 gr. de Bacto Agar.

Luego de esterilizado el medio de cultivo, dejar enfriar hasta 42–45°C y agregarle asépticamente 5% de suero estéril de conejo o de bovino inactivado previamente a 56°C (50 ml. por lit.). Dejar solidificar en posición correcta. En cada botella de Roux, distribuir un volumen de 140 ml. de medio de cultivo.

- **Solución de cristal violeta para tinción de colonias (prueba de disociación)**

Cristal violeta certificado.....2 gr.
Alcohol etílico absoluto.....20 ml.

Disolver el colorante en el alcohol empleando un mortero de vidrio. Luego agregar:

Oxalato de amonio.....0.8 gr.
Agua destilada.....80 ml.

La mezcla de ambas soluciones constituye la solución madre, que se debe diluir a 1:40 en agua destilada inmediatamente antes de su uso.

2

3

ANEXO 3. FIEBRE AFTOSA

Anexo 3.a

Materiales y reactivos

- **Placas**

- Nunc, Immunoplate – Maxisorp (fase sólida)
Falcon 3 911 – Flexivel Assay Plate (placa auxiliar)
Thomas Scientific, cat n° 3502 V60 (o similar)
- Falcon 3 913 – Flexible Lid (tapa para placa auxiliar)
Thomas Scientific, cat n° 3502 V85 (o similar)

- **Tampón carbonato/bicarbonato (0.05M - pH 9.6)**

Na ₂ CO ₃ 0.015M.....	0.80 g
NaHCO ₃ 0.035M.....	1.47 g
H ₂ O destilada.....	500 ml

- **Tampón de dilución**

- A. Tampón salina fosfatada pH 7.4 (PBS)**

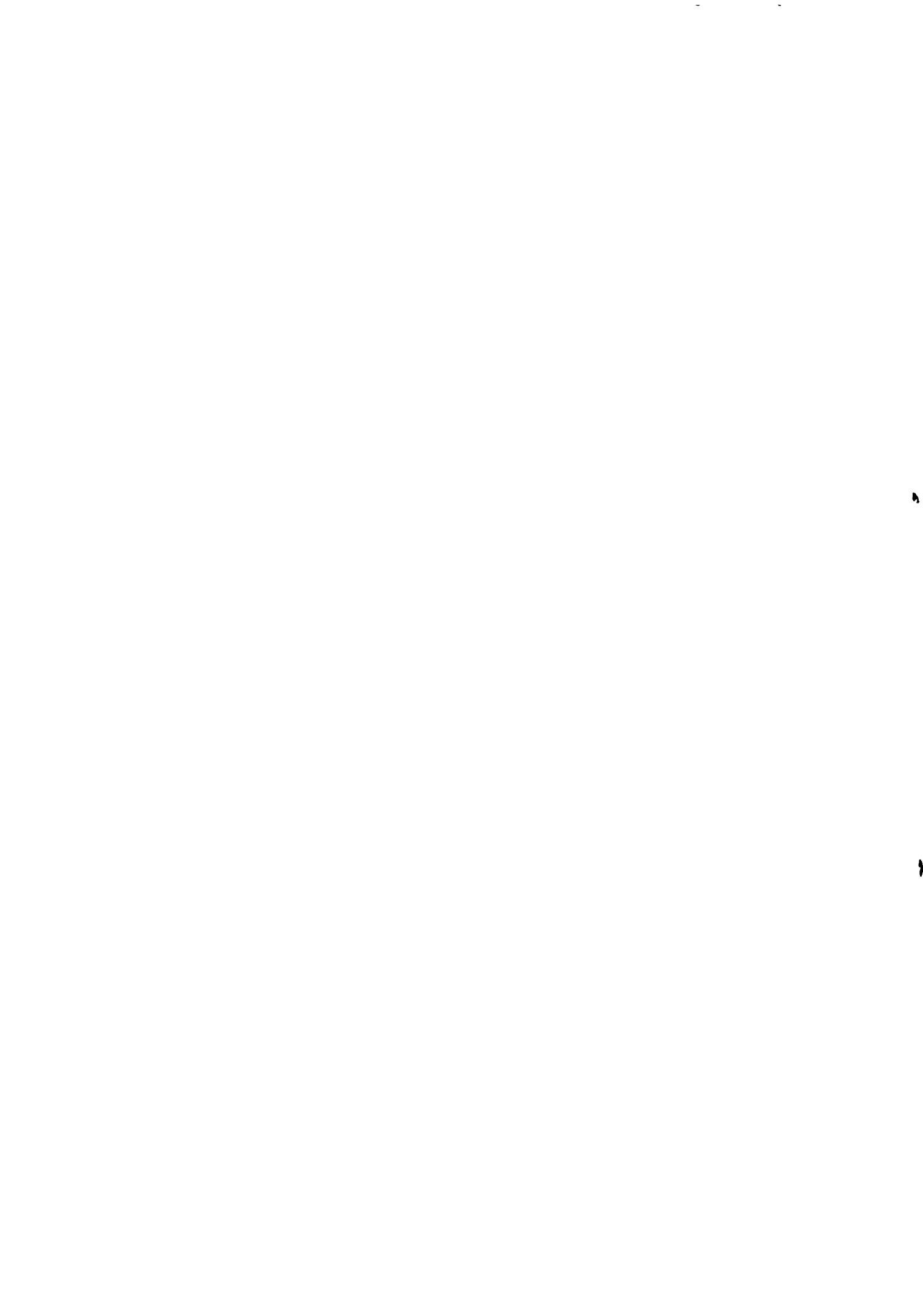
NaCl.....	8.0 g
KCl.....	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
H ₂ O destilada.....	1 000 ml

- B. PBS – Tween 20 (PBST)**

PBS.....	1 000 ml
Twenn 20	0.5 ml

- C. PBST Bloqueador (PBSTB)**

Adicionar al PBST 2% de suero normal de conejo, 2% de suero normal de bovino, 2% de suero normal de la especie en estudio y 1% de ovoalbúmina G II.



- **Sustrato para Peroxidasa**

1. **Acido cítrico - 0.1M**

C₆H₈O₇.H₂O (0.1M)..... 2.10 g
H₂O destilada.....100 ml

2. **Fósforo de sodio - 0.2M**

Na₂HPO₄ (0.2M)..... 2.84 g
H₂O destilada.....100 ml

3. **Peróxido de hidrógeno(*) diluido 1:1150**

H₂O₂ (30%).....100 µl
H₂O destilada.....115 ml

(*) *Cautela: fuerte corrosivo, usar guantes y tener mucho cuidado al trabajar, leer con atención las recomendaciones en las botellas*

Tampón Acido pH 5.0: Diluyente del Orto-Fenil-Diamina (OPD)

1.....6.5 ml
2.....7.0 ml
3.....11.5 ml

Sustrato

OPD(*).....10 g
Tampón ácido.....25 ml

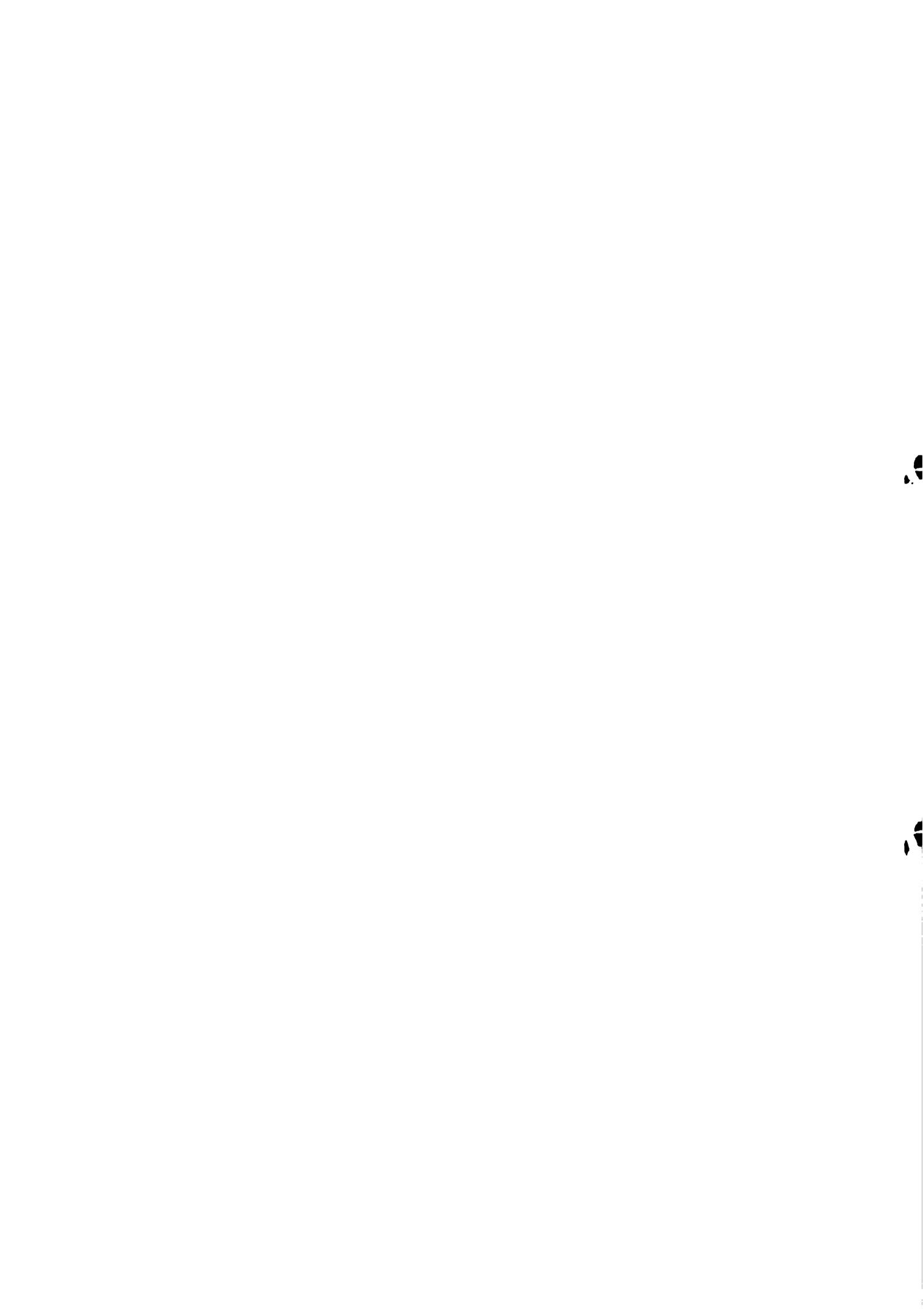
(*) *Cautela: producto peligroso para la salud. Tóxico, alergénico, cancerígeno. Al utilizar proteger los ojos y las manos. Cuidado al desechar, buscar informaciones con las autoridades locales, evitando procedimientos inadecuados.*

- **Solución de Lavado**

- A. **Solución salina fisiológica pH 7.4**

- A. **Solución salina fisiológica pH 7.4 con Tween 20**

Tween 20.....0.5 ml
NaCl.....8.5 g
H₂O destilada.....1 000 ml



- **Ovoalbúmina 1%**

Ovoalbúmina Grado V (Sigma).....1.0 g
PBS.....100 ml

- **Acido Sulfúrico 3N (*)**

H₂SO₄.....84.1 ml
H₂O destilada.....1 000 ml

(*) **Cautela:** fuerte corrosivo, usar guantes y tener cuidado al trabajar. Agregar lentamente el ácido al agua, que debe estar en recipiente con hielo

- **Espectrofotómetro de Placas**

Titertek Multiskan MCC - 340 - FLOW (o similar)

- **Agitador de Placas**

Titertek Flow Laboratories
DSG Titertek/4 Microtiter Plate Rotary Shaker 4 Plates (o similar)

- **Agitador de Tubos**

Super Mixer II - Lab-line (o similar)

- **Micropipetas**

A. *Multicanal:* Digital Multichannel Titertek (o similar)

50 µl – 200 µl

5 µl – 50 µl

B. *Monocanal* Eppendorf (o similar)

2 µl – 10 µl

10 µl – 100 µl

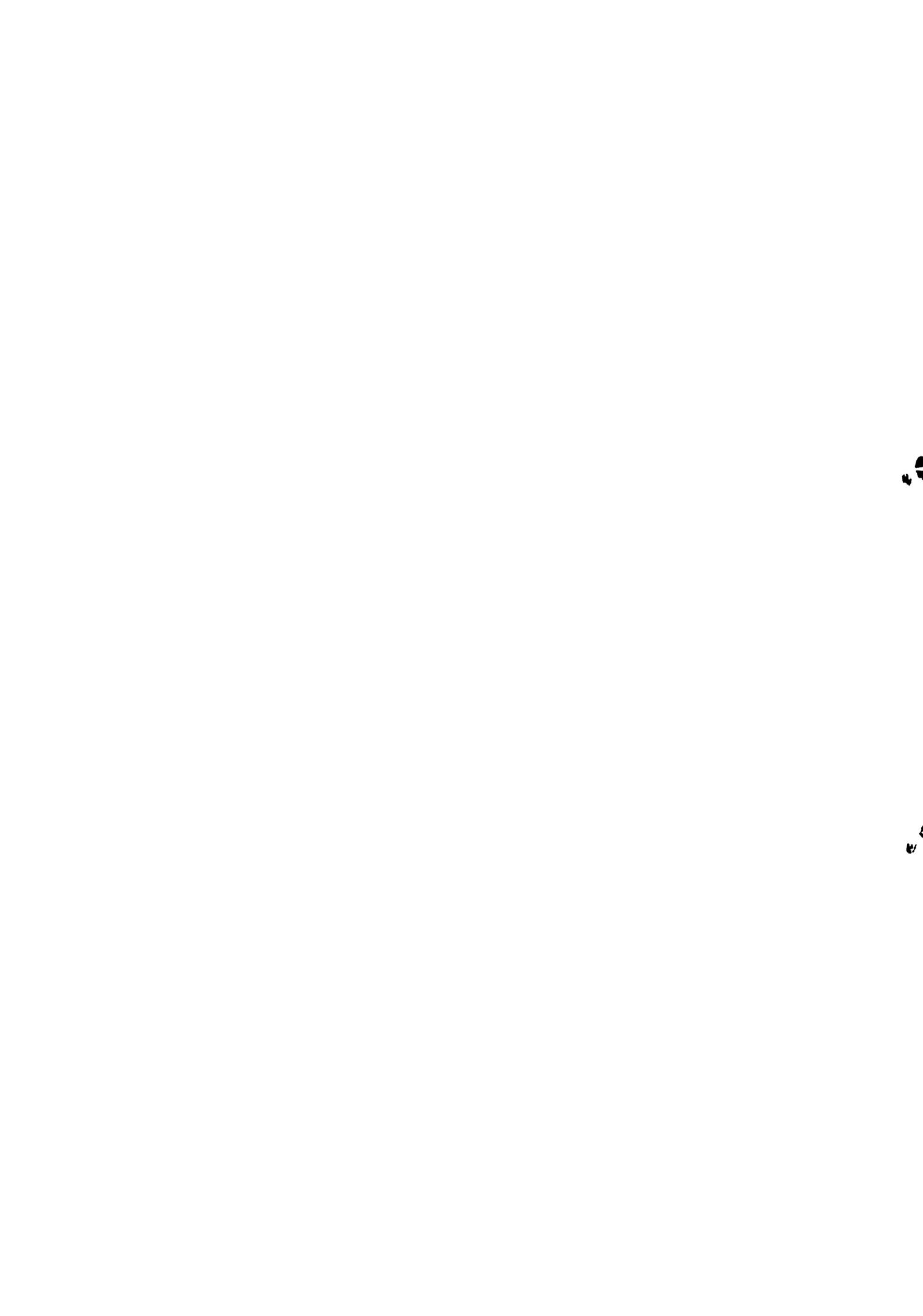
100 µl – 1000 µl



C. *Cubeta de plástico* (reservoir multichannel pipette) Flow Laboratories INC.
(o similares)

- **Lavador de Placas**

Dynadrop SR 2 dispenser
Dynatech Laboratories, INC.
Cat. N° 002-955-2000 (o similar)



Anexo 3.b.

- **Buffer de lavado 10 x**

1,5 M NaCl.....	87.66 g
0,5 M Tris.....	60.5 g
2% Tween 20	20 ml
Agua bidestilada c.s.p.....	1000 ml

Llegar a pH 7,5 con HCl (aproximadamente 40 ml para 1 litro de solución)

- **Buffer de lavado 1 x**

Buffer de lavado 10 x.....	100 ml
Agua bidestilada.....	900 ml
	<hr/>
	1000 ml

- **Buffer sustrato**

100 mM NaCl.....	1.46 g
5 mM MgCl ₂	0.12 g
10 mM Tris	3.05 g
Agua bidestilada c.s.p.....	250 ml

Llegar a pH 9,3 con HCl fumante (aproximadamente 150 μ l)

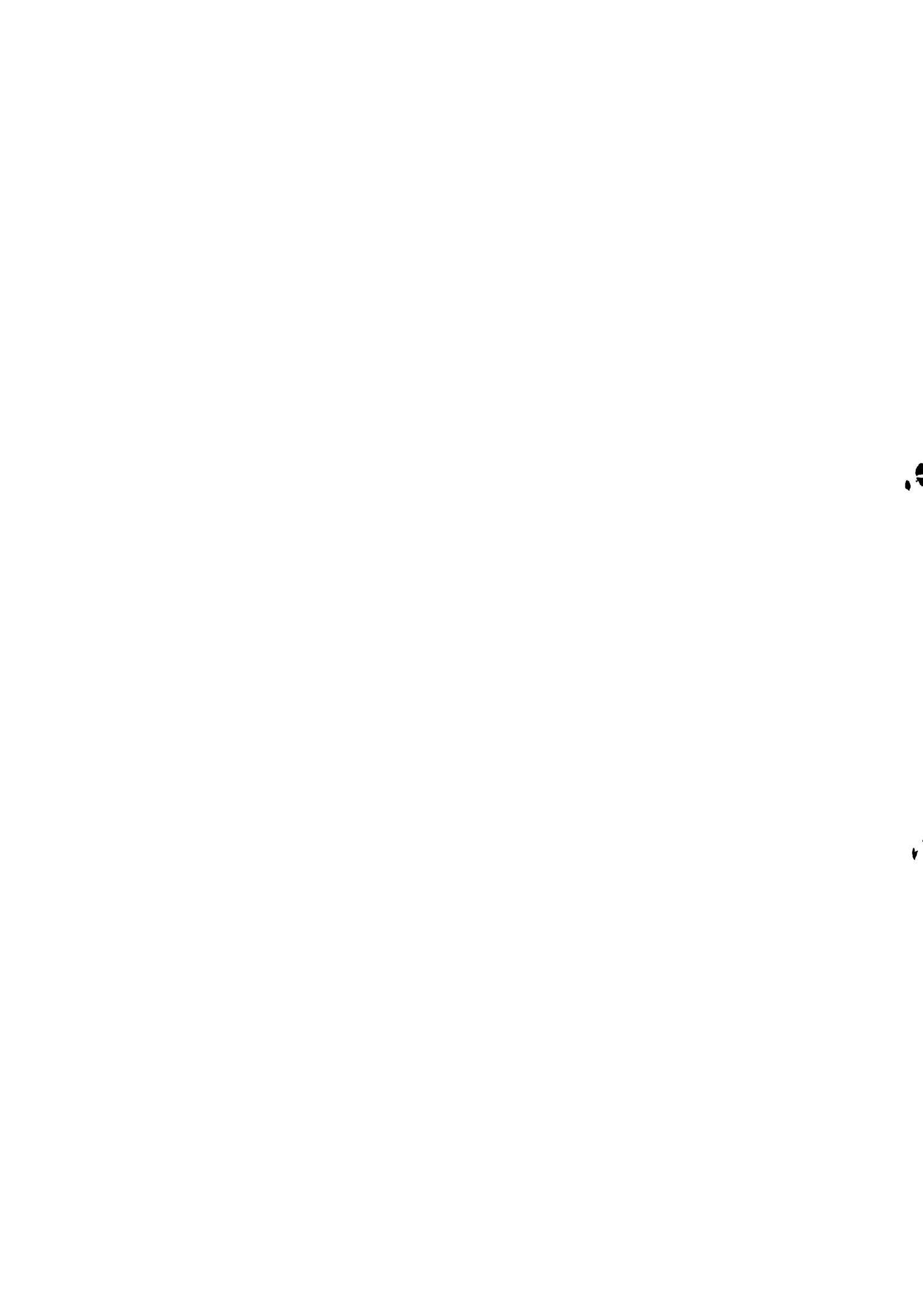
- **Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 5%:**

50 mg NBT
700 μ l Dimetilformamida
300 μ l Agua Bidestilada

Guardar protegido de la luz

- **(4) 5-Bromo, 4-Chloro, 3-Indolyl Phosphatase (BCIP) 5%:**

25 mg BCIP
500 μ l Dimetilformamida



Guardar protegido de la luz

- **Buffer de saturación (preparar en el momento de uso):**

Buffer de lavado 10x	3.5 ml
Leche en polvo (descremada) 5%	1.75 g
Extracto de 537	35 μ l
Agua Bidestilada c.s.p.....	35 ml

- **Lavado de tips**

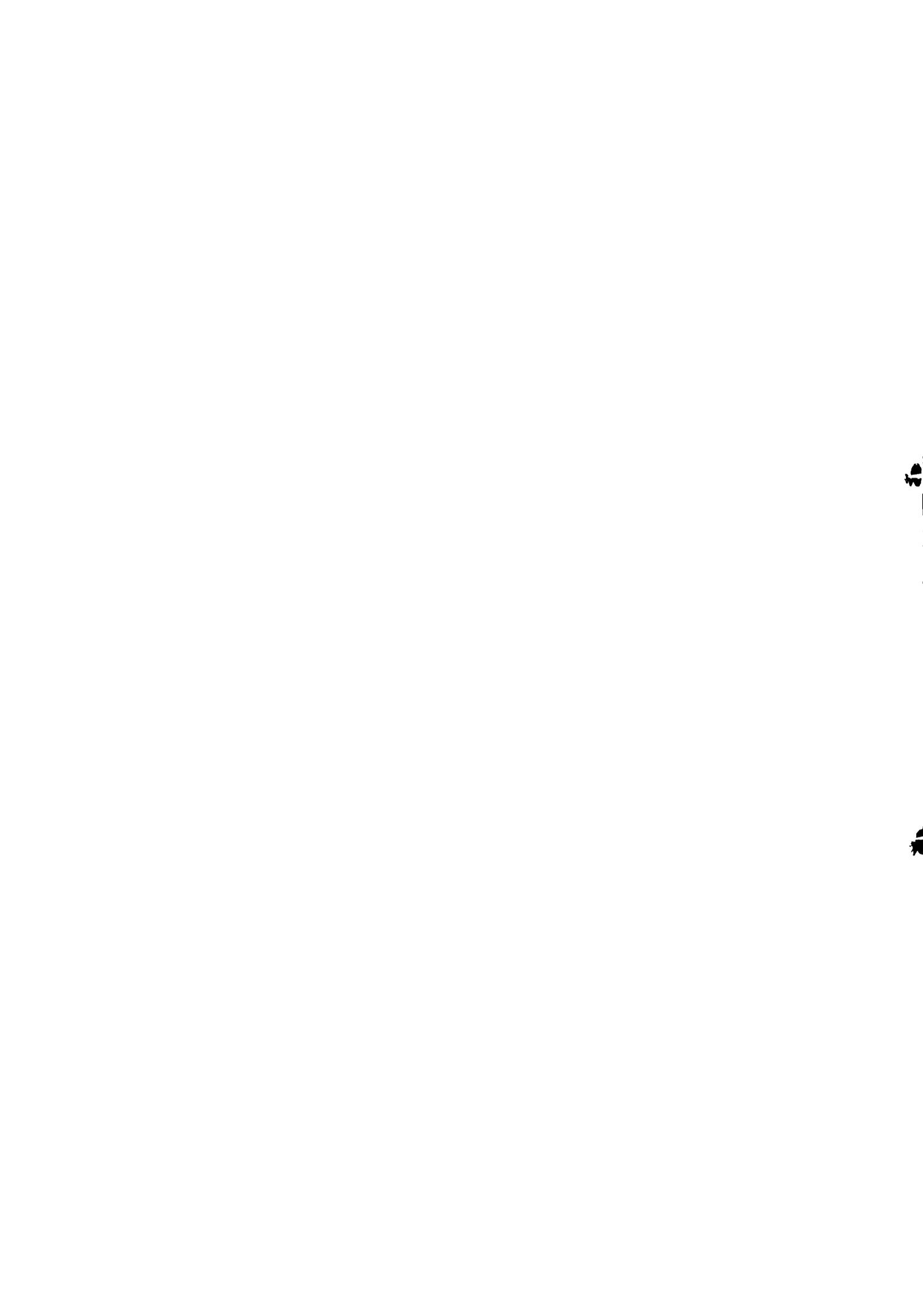
- Luego de usar, enjuagar con agua jabonosa y dejar toda la noche
- Dejar otra noche en solución de hipoclorito al 5%
- Enjuagar exhaustivamente y autoclavar 30 minutos
- Enjuagar exhaustivamente con agua corriente
- Enjuagar exhaustivamente con agua desmineralizada

- **Buffer lavado**

Buffer 10x	50 ml
H ₂ O q.s.p.....	500 ml

- **Buffer para diluir conjugado**

Buffer Saturación.....	15 ml
Conjugado.....	(Título)



ANEXO 4. TUBERCULOSIS BOVINA

Anexo 4.a

Caldo de Carne Glicerinado

- Tomar 1 kg. de carne sin grasa ni aponeurosis, finamente picada. Colocarla en un recipiente con 2 lt. de agua y mezclar bien.
- Cubrir el recipiente y dejar la mezcla durante 15 - 20 horas a 4°C.
- Calentar con agitación continua hasta formación de espuma, luego filtrar por un cedazo.
- Calentar nuevamente, dejar hervir durante 10 minutos, filtrar por papel de filtro de poro grueso.
- Agregar 0.5% de cloruro de sodio y 1% de peptona B123. Verificar el pH y ajustar hasta 7.5 aproximadamente. Filtrar por papel de filtro.
- A 944 ml. de esta solución agregar:

Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄).....	2.0 gr.
Glicerol.....	56.0 ml.
Mezcla de oligoelementos.....	0.7 ml.

- Verificar el pH; de ser necesario ajustarlo a 7.2 con NaOH 4N.
- Envasar y esterilizar 30 minutos a 110°C.

Medio Dorset Henley

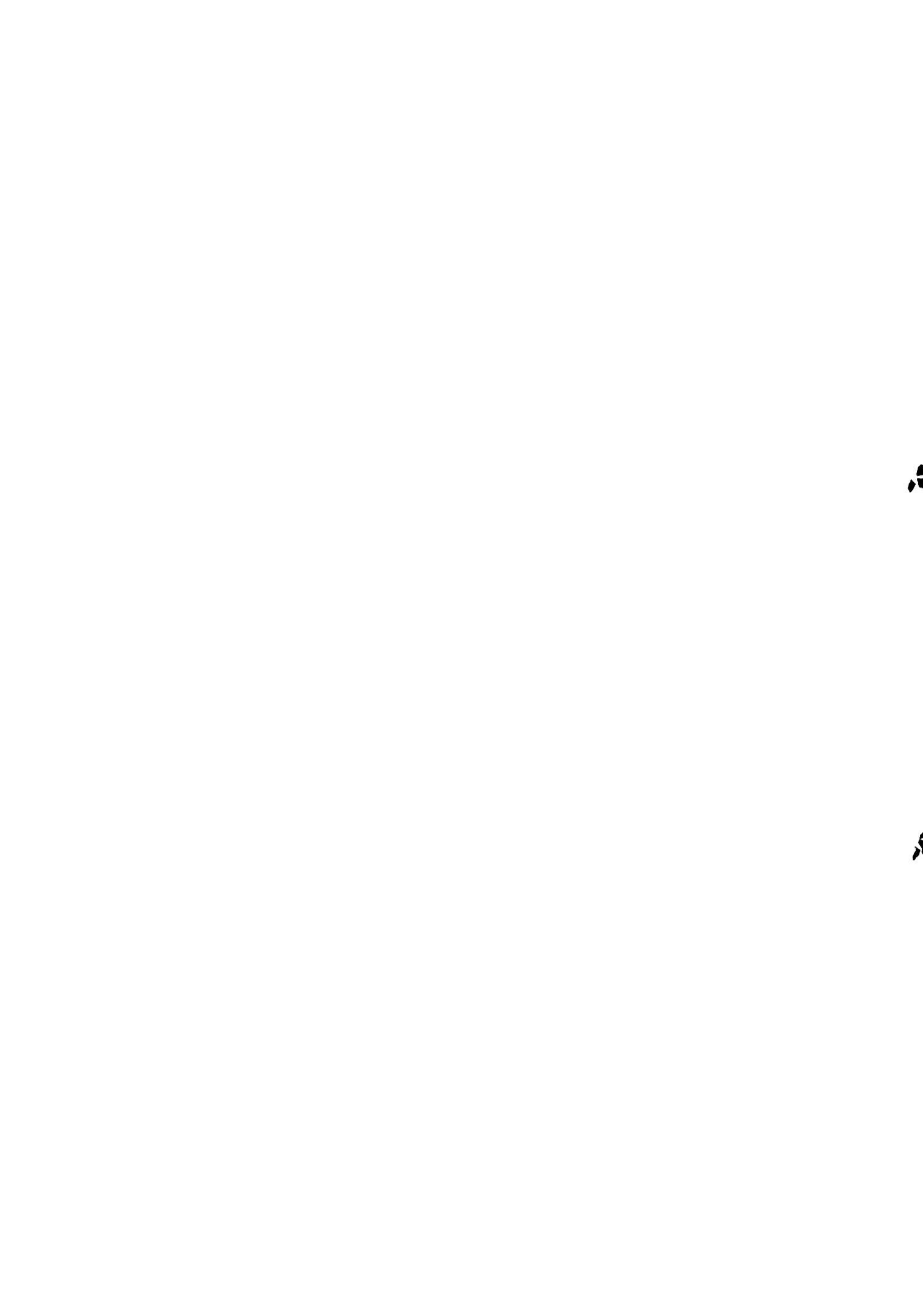
Para 50 lt. de medio:

- Disolver en 10 lt. de agua destilada caliente:

1-Asparagina	700 gr.
--------------------	---------

- Disolver cada droga en 1 lt. de agua destilada caliente:

Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄).....	74.6 gr.
Citrato de sodio, 2H ₂ O.....	37.1 gr.
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	75.0 gr.
Citrato férrico (C ₆ H ₅ O ₇ Fe).....	15.0 gr.



- Las soluciones enumeradas en b se agregan, en el orden indicado, con agitación, a la solución de asparagina.
- Agregar a la solución 500 ml. de glucosa.
- Agregar a la solución 32 lt. de agua destilada y 4 lt. de glicerol.
- Filtrar por algodón con gasa estéril.
- Repartir en frascos “tipo penicilina”, 1 000 ml. por frasco y agregarle a cada uno 1 ml. de la solución de oligoelementos.
- Verificar que el pH se encuentre en 7.0.
- Esterilizar por 15 minutos a 15 libras de presión.

Solución de Oligoelementos

- Disolver en 100 ml. de agua destilada:

Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).....	8.0	gr.
Cloruro de manganeso ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$).....	0.8	gr.
Cloruro de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$).....	0.138	gr.

- Envasar en un erlenmeyer los 100 ml., o bien repartir volúmenes menores en tubos.
- Esterilizar en autoclave.

Solvente Alcalino

Para preparar 100 ml., disolver:

Fosfato disódico ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$).....	17.8	gr.
Hidróxido de sodio (NaOH) 45%.....	2	ml.
Agua destilada c.s.p.	1000	ml.

Esterilizar en autoclave.

Acido tricloroacético al 40%

Agregar 2 kg. de ácido a 5 lt. de agua destilada.

No esterilizar.



Solución Reguladora M/3

Fosfato disódico ($2\text{Na}_2\text{HPO}_4$).....	28.9 gr.
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4).....	18.1 gr.
Agua destilada c.s.p.....	1 000 ml.

Esterilizar en autoclave.

Solución Antibacteriana (concentrada 5 veces)

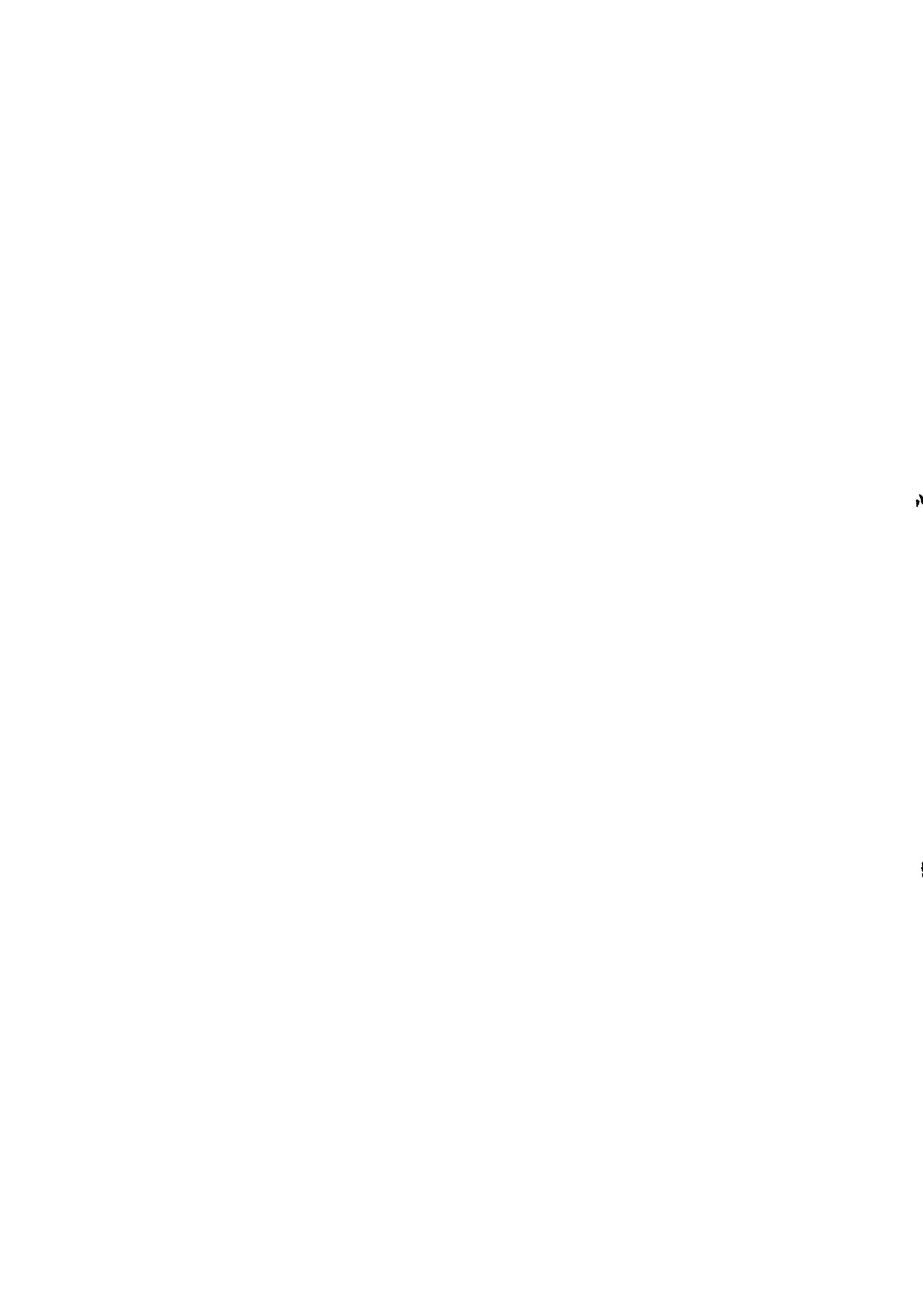
Cloruro de sodio (NaCl).....	25 gr.
Fenol.....	25 gr.
Glicerol.....	500 gr.
Agua destilada c.s.p.....	1 000 ml.

Calentar para disolver. No esterilizar.

Solución Diluyente de PPD

Fenol.....	50 gr.
Cloruro de sodio (NaCl).....	50 gr.
Fosfato disódico (Na_2HPO_4).....	28.4 gr
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4).....	18.1 gr.
Glicerol.....	1 000 gr. (800 ml.)
Agua destilada c.s.p.....	1 000 ml.

Esterilizar por filtración a través de membranas esterilizantes.



Anexo 4.b

Cálculo de la valoración biológica en cobayos de la actividad relativa de una PPD

Notación

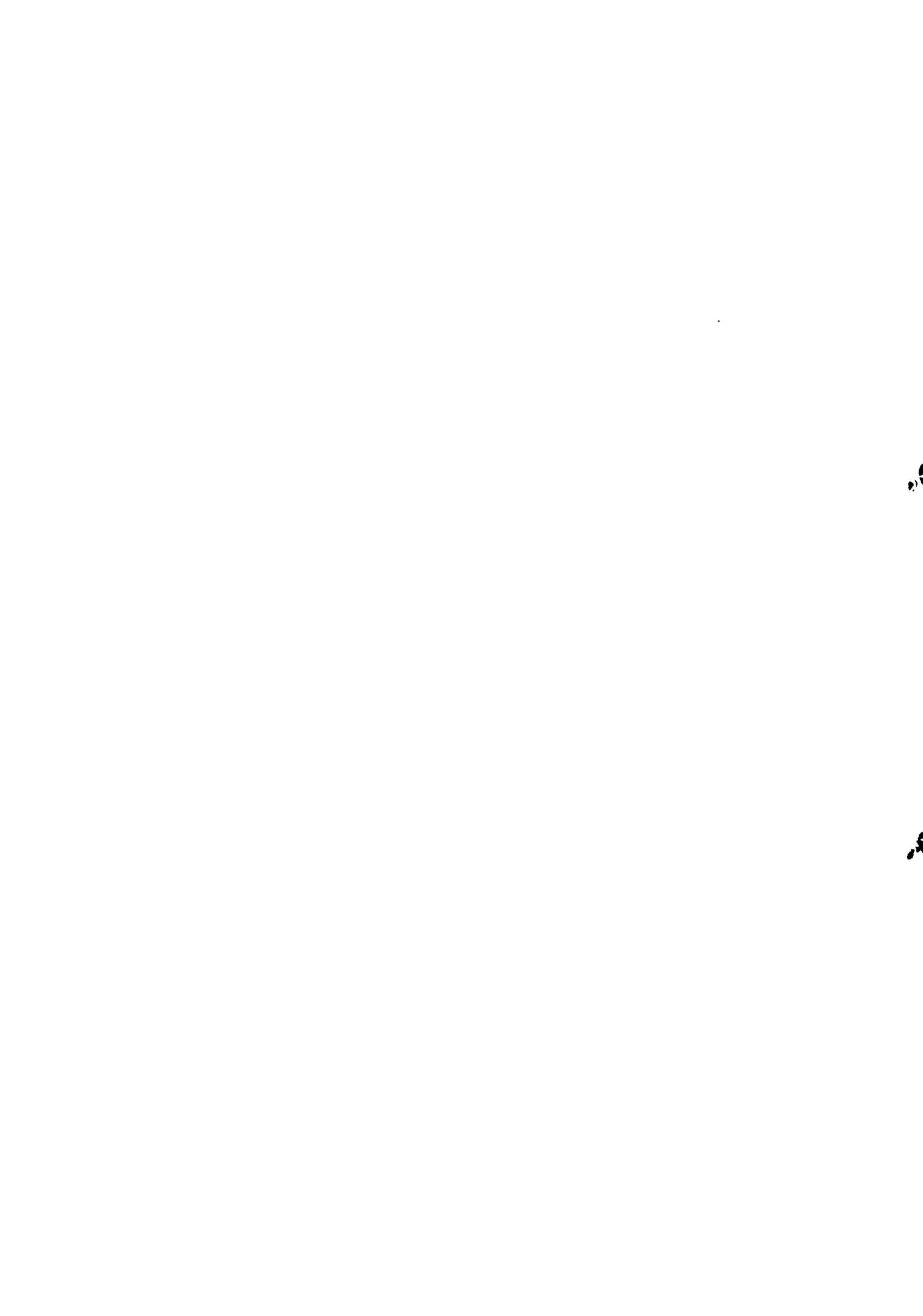
s	=	preparación estándar
p	=	preparación en prueba
N	=	n° de lecturas
x	=	log ₅ dosis
y	=	respuesta en mm. a las inoculaciones
Σx	=	suma de las x
Σy	=	suma de las y
Σxy	=	suma de los productos de cada x por su correspondiente y
\bar{x}	= $\frac{\Sigma x}{N}$	= promedio de las x
\bar{y}	= $\frac{\Sigma y}{N}$	= promedio de las y

$S_{xx} = \Sigma(x - \bar{x})^2$ = suma de las distancias cuadráticas de las x a su media = numerador de la varianza. Se computa con la fórmula equivalente:

$$S_{xx} = \frac{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}{N}$$

$S_{yy} = \Sigma(y - \bar{y})^2$ = suma de las distancias cuadráticas de la y a su media = numerador de la varianza. Se computa con la fórmula equivalente:

$$S_{yy} = \frac{\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{N}$$



$S_{xy} = (x - \bar{x})(y - \bar{y})$ = suma de los productos de las distancias de cada x a su media por la distancia de la correspondiente y a su media.
Se computa con la fórmula equivalente:

$$S_{xy} = \Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{N}$$

Diluciones empleadas por dosis (0.2 ml) y su transformación metamétrica

PPD estándar (PPD _S)	(1)	1.0 mcg.
	(2)	0.20 mcg.
	(3)	0.04 mcg.
PPD en prueba (PPD _P)	(4)	1.0 mcg.
	(5)	0.20 mcg.
	(6)	0.04 mcg.

Si la relación entre las diluciones de las dosis es constante, tal como en este ejemplo, los valores de éstas se pueden transformar en -2.0 y 1 ; se emplean para ello logaritmos de base igual al factor de dilución y se efectúa una resta sencilla, como se muestra a continuación:

Factor de dilución = 1:5

$$x'_1: \log_5 1.0 = \frac{\log_{10} 1}{\log_{10} 5} = \frac{0}{0.69897} = 0$$

$$x'_2: \log_5 0.2 = \frac{\log_{10} 0.2}{\log_{10} 5} = \frac{1.30103}{0.69897} = \frac{-0.69897}{0.69897} = -1$$

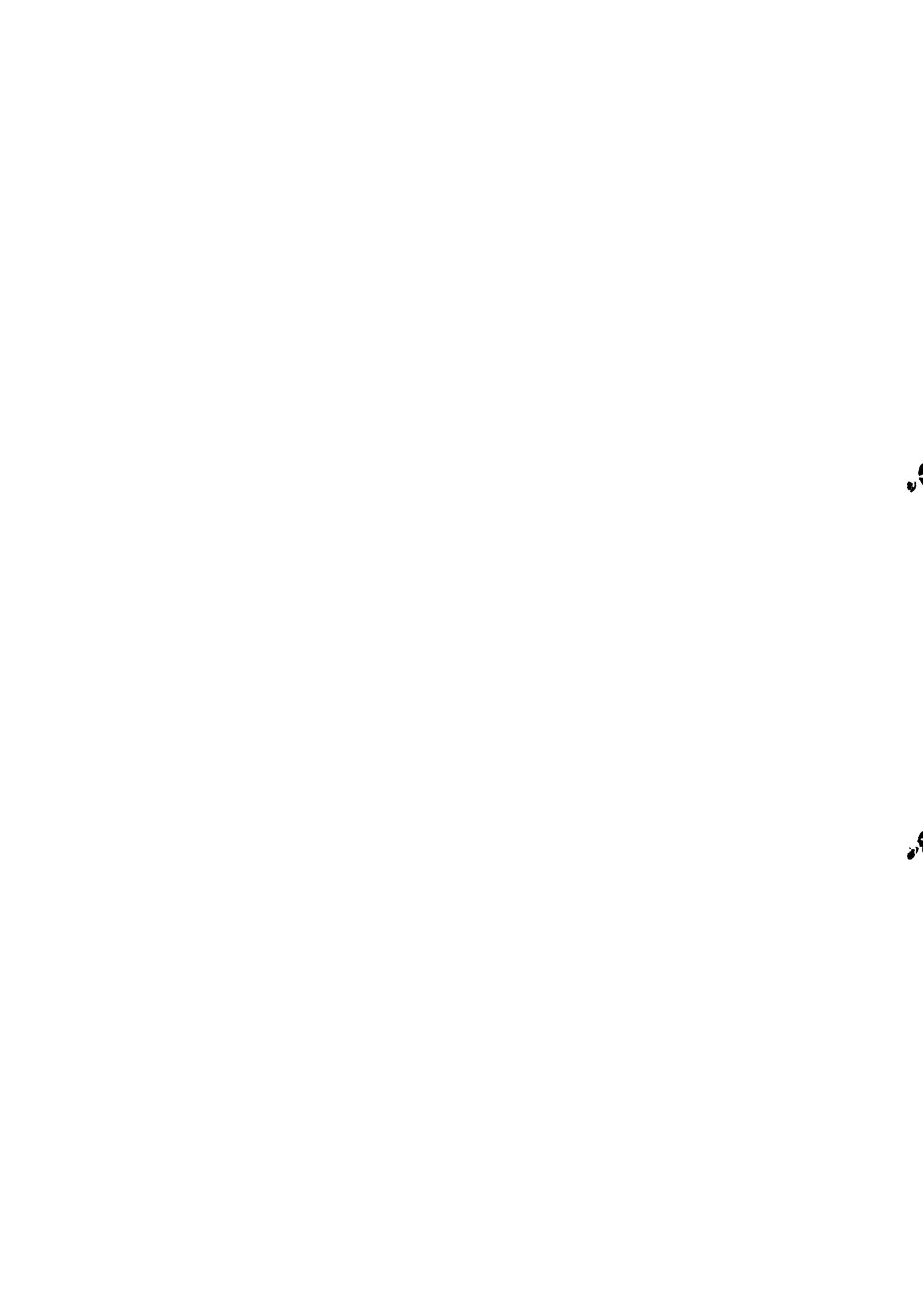
$$x'_3: \log_5 0.04 = \frac{\log_{10} 0.04}{\log_{10} 5} = \frac{2.60206}{0.69897} = \frac{-1.30103}{0.69897} = -2$$

Restando x'_2 a cada x' queda:

$$x_1 = 0 - (-1) = 1$$

$$x_2 = -1 - (-1) = 0$$

$$x_3 = -2 - (-1) = -1$$



Esta transformación facilita la representación gráfica, ya que se puede utilizar ahora papel cuadrículado común, colocando las dosis a intervalos iguales. También simplifica los cálculos para ajustar la recta de regresión a los puntos observados, dado que un término que se usa con frecuencia, la suma de las x, se anula:

$$(\sum x = 1 + 0 + (-1) = 0)$$

Ejemplo de una valoración biológica

Siguiendo la metodología descrita en los puntos 14.3.3.5 a 14.3.3.8, se obtuvieron los siguientes resultados (lectura de las reacciones tuberculínicas en los cobayos, en mm. de diámetro):

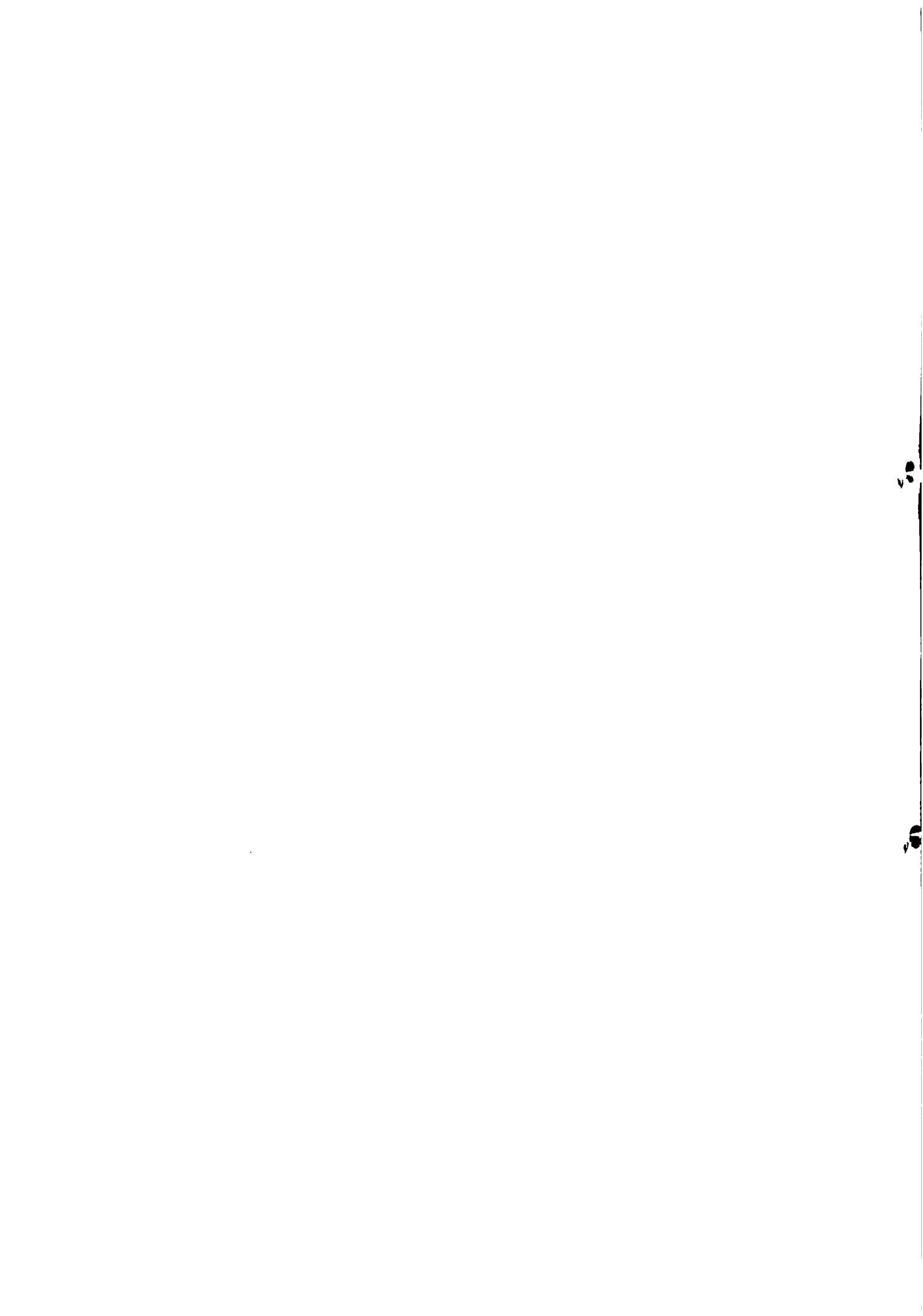
Cuadro 7

RESULTADOS DE LAS INOCULACIONES DEL EXPERIMENTO MODELO

Jaula	Cobayo	ppd standar			PPD prueba		
		1	2	3	4	5	6
41	Rojo cabeza	23	19	13	23	18	10
41	Rojo lomo	20	19	13	22	17	13
41	Rojo cola	22	15	12	21	16	12
42	Amar. Cabeza	24	15	11	21	15	10
42	Amar. Lomo	21	18	9	22	15	10
42	Amar. Cola	22	17	10	21	17	11
Log. Dosis	X	1	0	-1	1	0	-1
Total	$\sum y$	132	103	68	130	98	66
Suma de Cuadrados	$\sum y^2$	2914	1785	784	2820	1608	734
Media	\bar{Y}_i	<u>22.0</u>	<u>17.2</u>	<u>11.3</u>	<u>21.7</u>	<u>16.3</u>	<u>11.0</u>

Representación gráfica

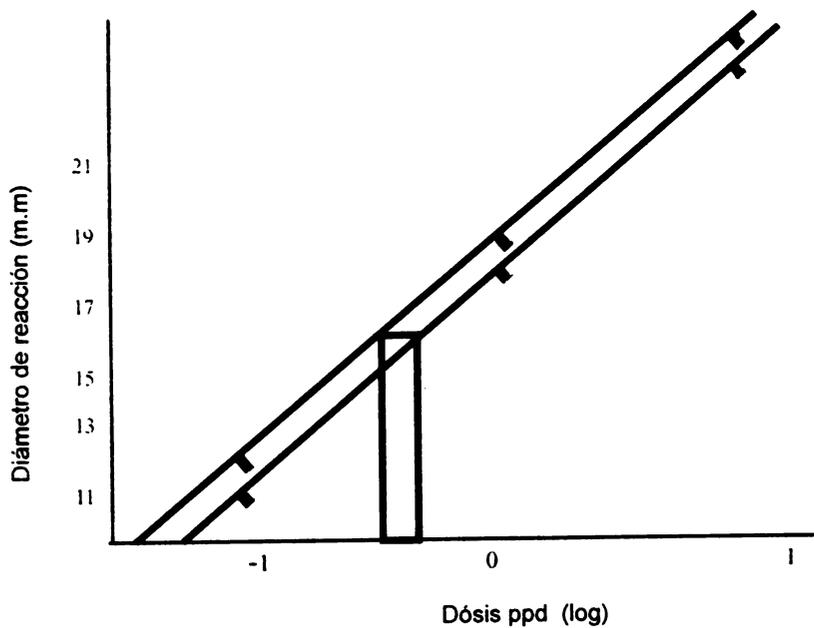
En un sistema de coordenadas se indican en el eje horizontal las dosis utilizadas, espaciadas según la transformación logarítmica señalada antes. En el eje vertical se indica el tamaño de las reacciones. Se marcan entonces los puntos correspondientes a los promedios de las reacciones observadas con cada dosis en los dos grupos. Se logra así una primera apreciación de la calidad de la valoración, porque esos puntos permiten observar



- si el aumento de las dosis provoca un aumento de las respuestas,
- si esos aumentos siguen líneas rectas y
- si estas líneas pueden considerarse paralelas dentro de márgenes aceptables.

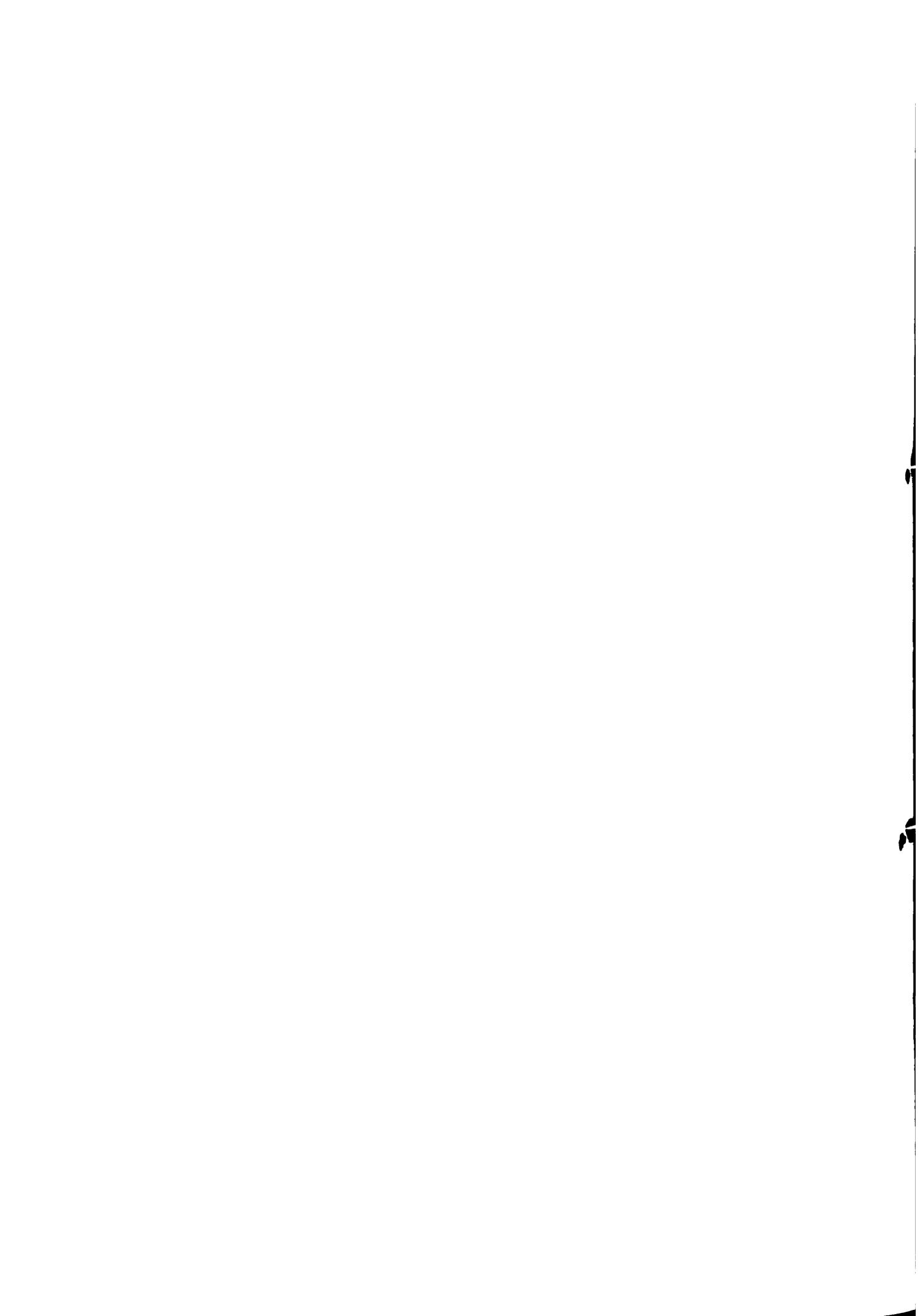
Más adelante se explicará el método para evaluar de manera rigurosa estas condiciones.

Figura 1



Cálculo de las rectas ajustadas por el método de cuadrados mínimos

Con los datos presentados en el ejemplo y usando el método de cuadrados mínimos se pueden calcular dos rectas ajustadas a los puntos observados. Estas rectas reúnen ciertas condiciones deseables desde el punto de vista estadístico; la principal es que la



suma de las distancias verticales de cada punto elevadas al cuadrado, es la mínima posible.

La recta tiene una ecuación general de la siguiente forma:

$$y = a + bx \quad (Y)$$

El coeficiente “a” indica la altura de la recta cuando x es 0, es decir, en el origen de los ejes de coordenadas. El coeficiente “b” indica el cambio de “y” por cada unidad de “x”.

Para este caso particular, se usará una ecuación equivalente a (Y):

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \quad (II)$$

Se la utiliza porque, gracias a la transformación vista en el punto 2, $x = 0$, y porque además no es necesario calcular el valor de “a”.

Procedimiento Numérico para el Cálculo de “b”

Para la Preparación Estándar (PPD_S)

$$\bar{x}_S = \frac{\sum \bar{x}_i}{N} = \frac{6 \times (1) + 6 \times 0 + 6 \times (-1)}{18} = \frac{6 + 0 - 6}{18} = 0$$

$$\bar{y}_S = \frac{\sum \bar{y}_i}{N} = \frac{303}{18} = 16.8$$

$$S_{xx_S} = \frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{N} = \frac{(6 \times 1^2) + (6 \times 0^2) + 6 \times (-1)^2 - 0^2}{18} = 12$$

$$S_{xy_S} = \frac{\sum y^2 - (\sum y)^2}{N} = \frac{(1 \times 132) + (0 \times 103) + (-1) \times 68 - 0 \times 303}{18} = 64$$

$$b_S = \frac{S_{xy_S}}{S_{xx_S}} = \frac{64}{12} = 5.3$$

La ecuación de regresión lineal para el PPD estándar en el intervalo de dosis es, pues:

$$Y_S = \bar{y}_S + b_S(x - \bar{x}_S)$$



$$\begin{aligned}
 &= 16.8 + 5.3 (x - 0) \\
 &= 16.8 + 5.3 x
 \end{aligned}$$

Para la Preparación de Prueba de (PPD_p)

$$\bar{x}_p = \frac{\sum x}{N} = 0$$

$$Y_p = \frac{\sum y_i}{N} = 13$$

$$S_{xx_p} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N} = 6 \times 1^2 + 6 \times 0^2 + 6 \times (-1)^2 - \frac{0^2}{18} = 12$$

$$S_{xy_p} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{N} = 1 \times 130 + 0 \times 98 + (-1) \times 66 - \frac{0 \times 294}{18} = 64$$

$$b_p = \frac{S_{xy_p}}{S_{xx_p}} = \frac{64}{12} = 5.3$$

La ecuación de regresión lineal para el PPD problema es, pues:

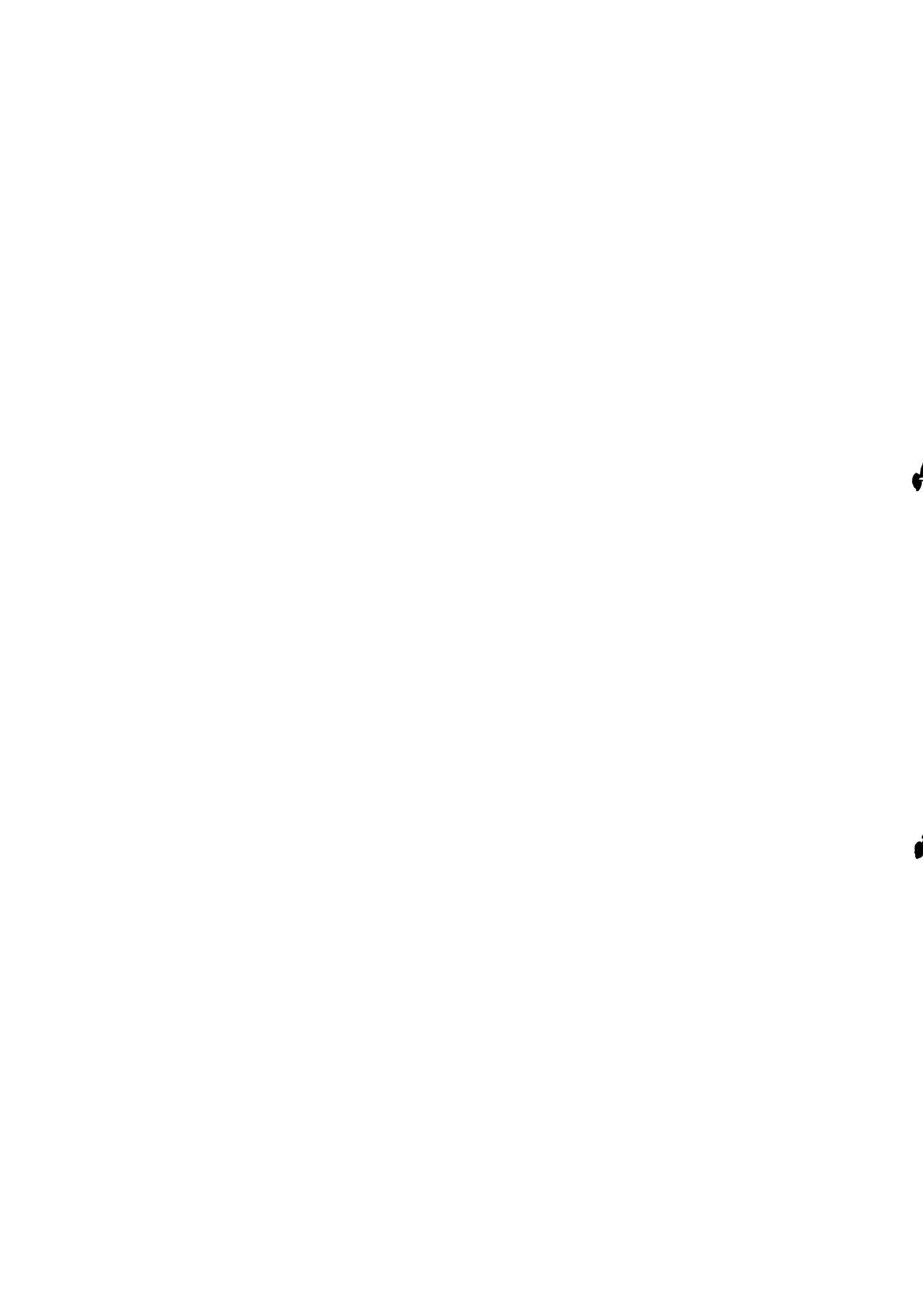
$$\begin{aligned}
 Y_p &= \bar{y}_p + b_p (\bar{x} - x_p) \\
 &= 16.3 + 5.3 (x - 0) \\
 &= 16.3 + 5.3x
 \end{aligned}$$

Las rectas de regresión de los PPD estándar y en prueba tienen el mismo coeficiente de regresión; por consiguiente, son paralelas. En este ejemplo particular, las 2 pendientes ajustadas han resultado iguales, pero esto no sucede habitualmente. El análisis de varianza que se efectúa más adelante indica hasta dónde es estadísticamente aceptable considerar como paralelas esas pendientes cuando no son iguales.

Determinación de la actividad relativa de la PPD_p

Método Gráfico

Se trazan a ojo las 2 líneas paralelas que mejor se ajusten a los puntos observados para cada preparación (Fig. 2).



La diferencia de actividad de las 2 preparaciones está representada por la distancia horizontal entre las 2 paralelas frente a un valor cualquiera de la respuesta "y". Trasladando esa diferencia a la escala de las x, en este caso resulta aproximadamente igual a 0.11. Este valor es la diferencia de los \log_5 de las dosis entre la preparación estándar y la prueba para lograr el mismo efecto. Es sabido que una diferencia en logaritmos implica una división en sus antilogaritmos. Por lo tanto, llevando esa diferencia de 0.11 a su antilogaritmo se tendrá el cociente que resultará de dividir las dosis originales de las 2 preparaciones necesarias para tener el mismo efecto:

$$\frac{\text{dosis PPD}_P}{\text{dosis PPD}_S}$$

Para cambiar un logaritmo de base 5, a base 10, se utiliza la siguiente igualdad:

$$\begin{aligned} \log_{10} a &= \log_5 a \times \log_{10} 5 \\ \log_{10} (\text{actividad relativa}) &= 0.11 \times 0.69897 = 0.07689 \\ \text{antilog } 0.07689 &= 1.194 \end{aligned}$$

$$\frac{\text{dosis PPD}_P}{\text{dosis PPD}_S} = \frac{1.194}{1} = 119\%$$

Este resultado indica que para provocar idéntica respuesta, se debe emplear una dosis de PPD_P 119% mayor que la dosis de PPD_S.

Habitualmente la actividad relativa se expresa como la cantidad de PPD_S necesaria para lograr la misma respuesta que con la PPD_P, o sea, por la relación inversa:

$$\frac{1}{1.19} = 84\%$$

El mismo resultado se obtiene tomando la diferencia en los logaritmos de 0.11 con signo negativo:

$$\begin{aligned} \log (\text{actividad relativa}) &= 0.11 \times 0.69897 = -0.07689 \\ \text{antilog } (-0.07689) &= 1.92310 = 0.84 \\ \frac{\text{dosis PPD}_S}{\text{dosis PPD}_P} (\text{actividad relativa}) &= 0.84 = 84\% \end{aligned}$$

Figura 2

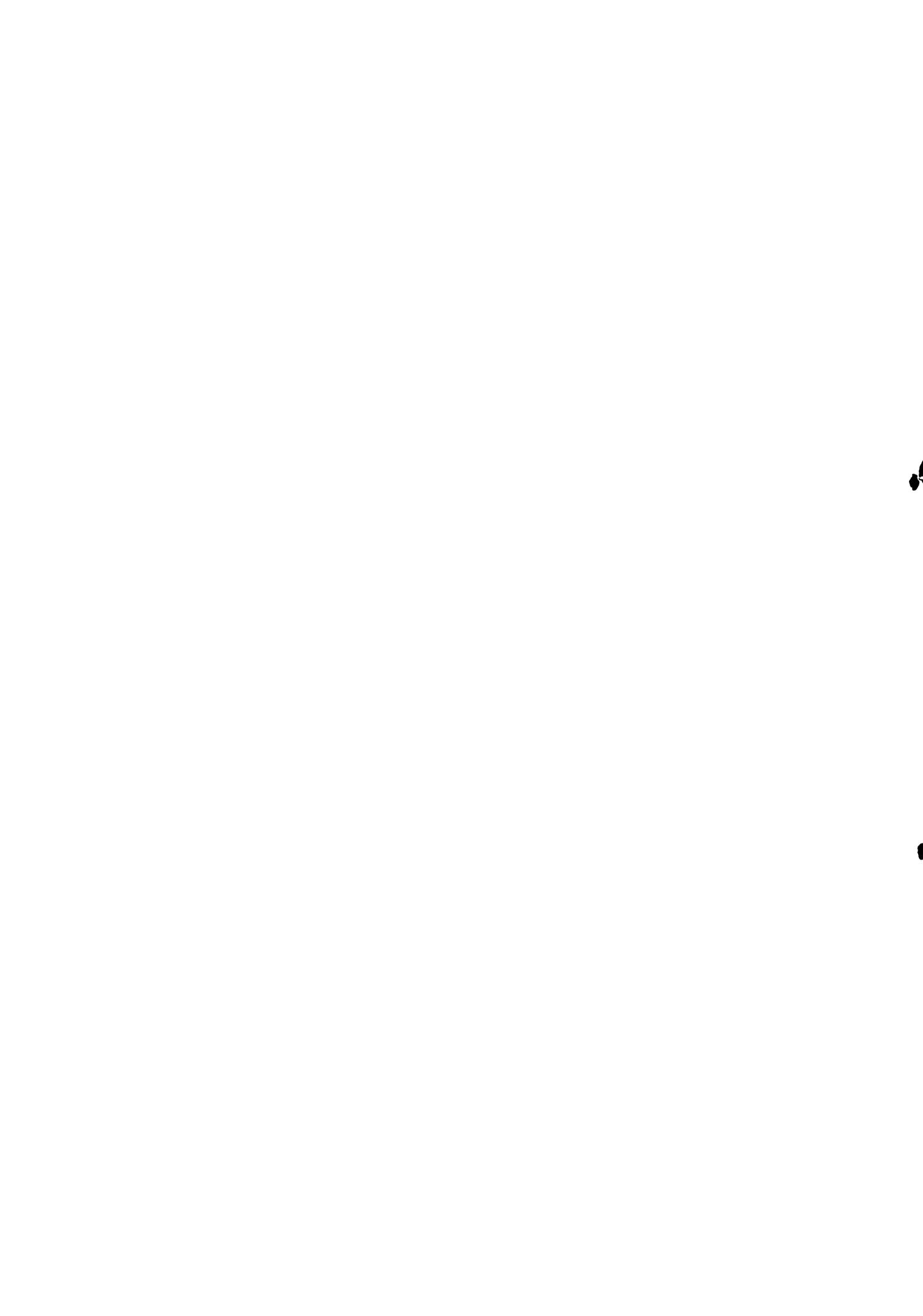
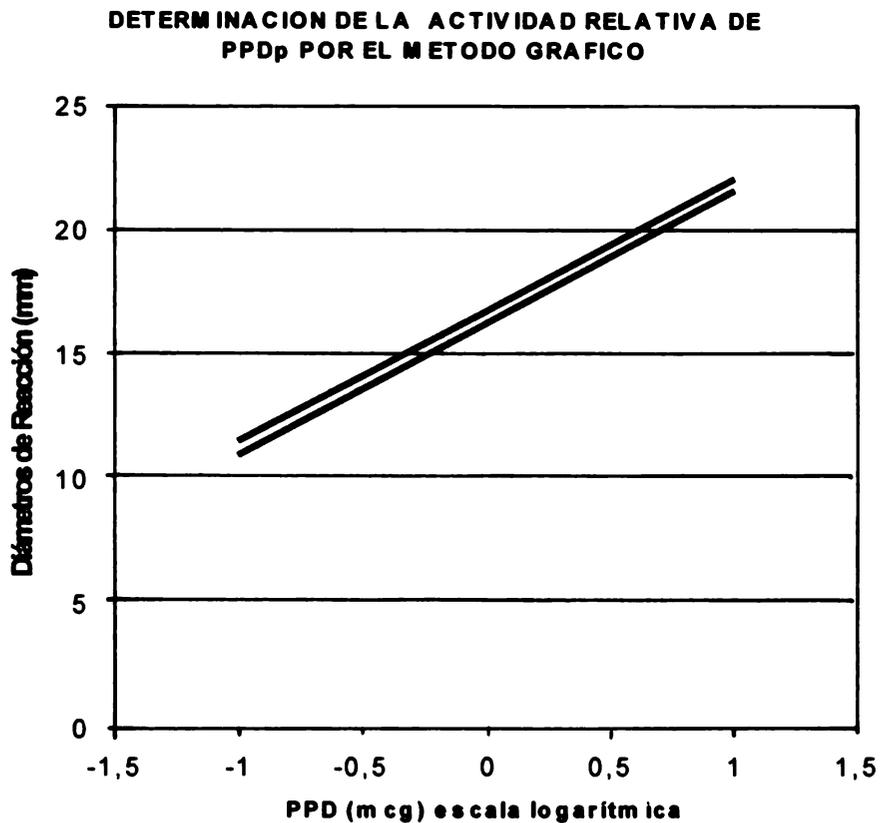


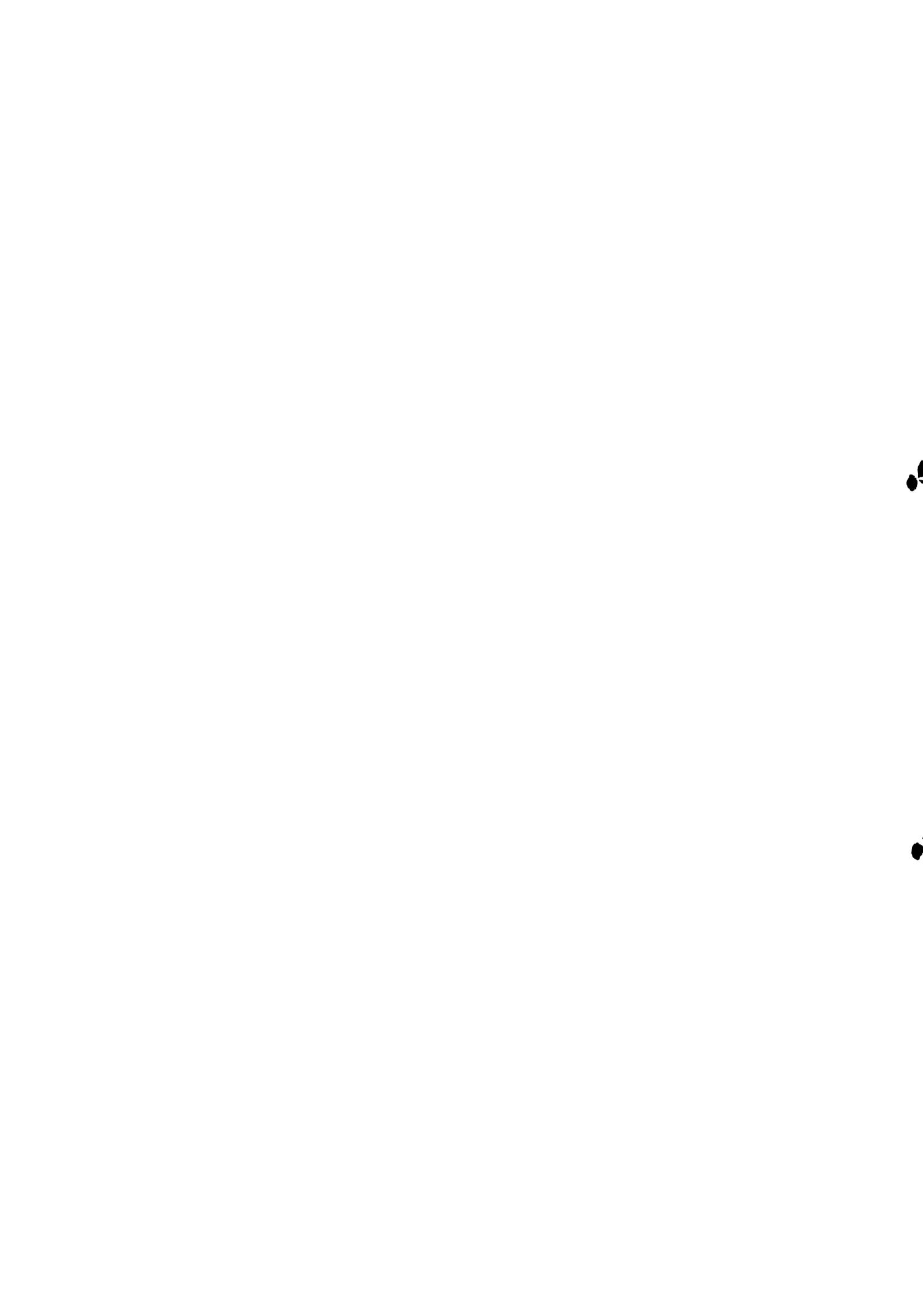
Figura 2



Evaluación estadística: Análisis de varianza

Como los datos obtenidos en el experimento se efectuarán los cálculos que se indican más adelante y cuyos resultados se presentan en el cuadro 8. En dicho cuadro aparecen los diferentes componentes de la variación con sus “suma de cuadrados” correspondientes.

Con pruebas estadísticas adecuadas se pueden evaluar cada una de las características siguientes, consideradas indispensables para que la valoración biológica sea válida.



Preparaciones (diferencia entre las medias del PPD_s y PPD_p):

Un valor bajo indica que las reacciones medias correspondientes a las 2 preparaciones no difieren mucho, condición satisfactoria que aumenta la precisión de la estimación de la actividad.

Regresión o Pendiente (comparación con la horizontal): un valor alto indica que el efecto aumenta a medida que se incrementan las dosis de las 2 preparaciones.

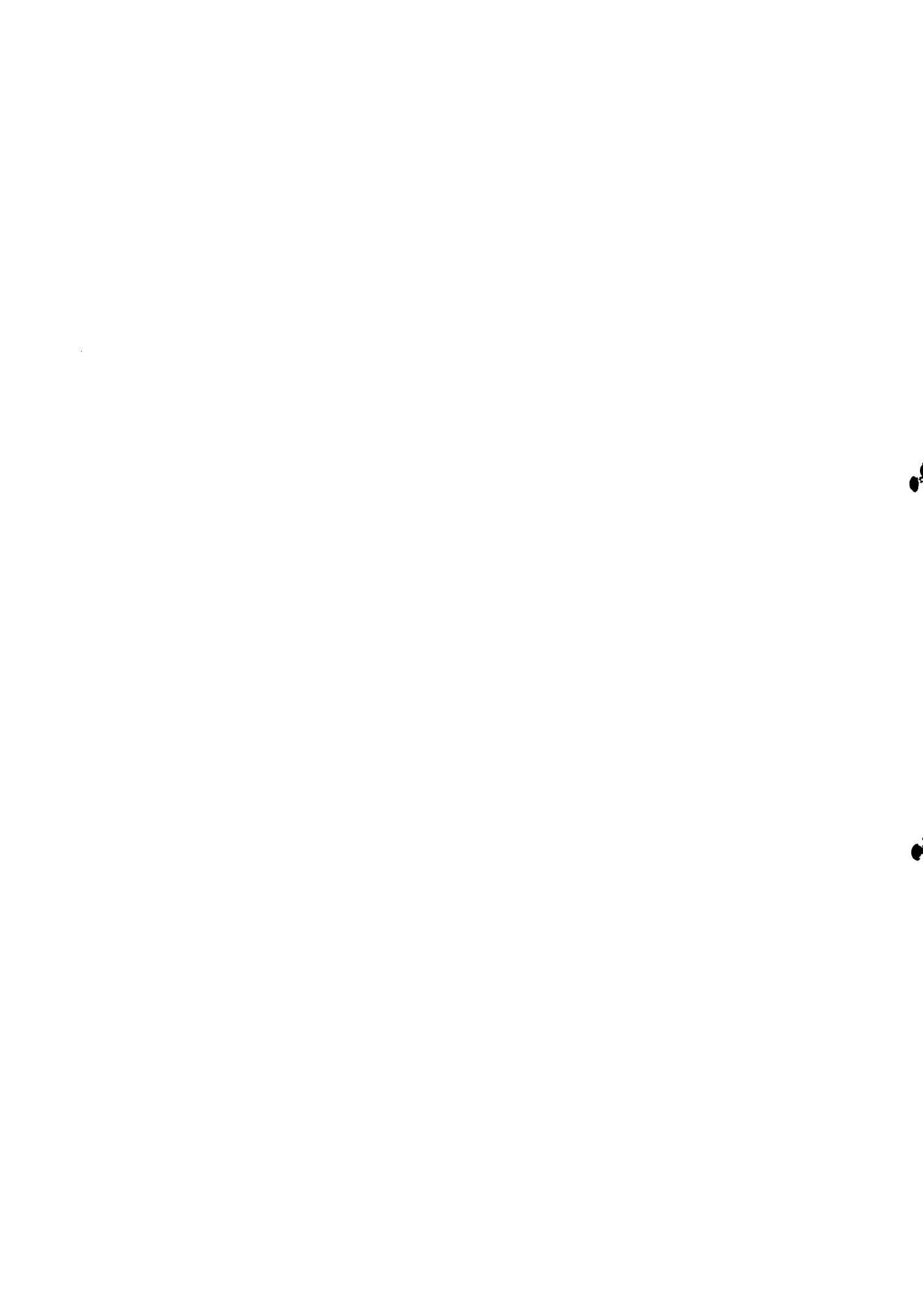
Linealidad (desviaciones de los puntos observados con respecto a la recta): un valor bajo indica que ese crecimiento del efecto se mantiene dentro de una relación lineal con el logaritmo de las dosis. Esa condición es necesaria para aceptar el modelo estadístico aplicado, el cual está basado en la teoría de la regresión lineal.

Paralelismo de las 2 Rectas de Regresión: un valor bajo indica que es lícito considerar las paralelas y, por lo tanto, a una de las preparaciones como dilución de la otra, (“similaridad”) condición necesaria para poder calcular la actividad relativa, según un cociente que debe ser constante dentro de los límites de las dosis usadas.

Las menciones precedentes sobre valores “altos” o “bajos” se explican por el planteo de las hipótesis que se ponen a prueba en el análisis de la varianza. Por razones derivadas de la teoría, esas hipótesis se expresan negando la condición sometida a prueba. Si la prueba estadística de un valor “alto” se rechaza la hipótesis y se “acepta” lo opuesto. Si el valor es “bajo” no se prueba la verdad de la hipótesis planteada, pero tampoco se la puede rechazar.

En el caso que nos ocupa, valores “bajos” en preparaciones, linealidad y paralelismo indican que no hay elementos de juicio suficientes para rechazar la hipótesis. En cambio el valor “alto” en regresión indica que se rechaza la hipótesis de que la pendiente sea igual a cero (horizontal), o sea que hay una relación directa entre las dosis crecientes y sus respuestas.

En resumen, un buen diseño experimental para una valoración biológica debe dar pruebas estadísticas con valores bajos para las comparaciones entre “preparaciones”, “linealidad” y “paralelismo” y alto, para “regresión”.



Cálculos para la Obtención de las Sumas de los Cuadrados

Ajuste de La Media:

$$\frac{(\sum y_P + \sum y_S)^2}{N_{PS}} = \frac{(303 + 294)^2}{36} = 9900.25$$

Total:

$$\sum y^2_1 + \sum y^2_2 + \dots + \sum y^2_6 - \frac{(\sum y_P + \sum y_S)^2}{N_{PS}} = 10645 - 9900.25 = 744.75$$

Variación entre Dosis:

$$\sum_{n_1} y^2_1 + \sum_{n_2} y^2_2 + \dots + \sum_{n_6} y^2_6 - \frac{(\sum y_P + \sum y_S)^2}{N_{PS}} = 10586.17 - 9900.25 = 685.9$$

Variación entre Preparaciones:

$$\frac{\sum (\sum y_P)^2}{N_P} + \frac{\sum (\sum y_S)^2}{N_S} - \frac{(\sum y_P + \sum y_S)^2}{N_{PS}} = 9902.50 - 9900.25 = 2.25$$

Regresión (combinación de las regresiones correspondientes a las 2 preparaciones):

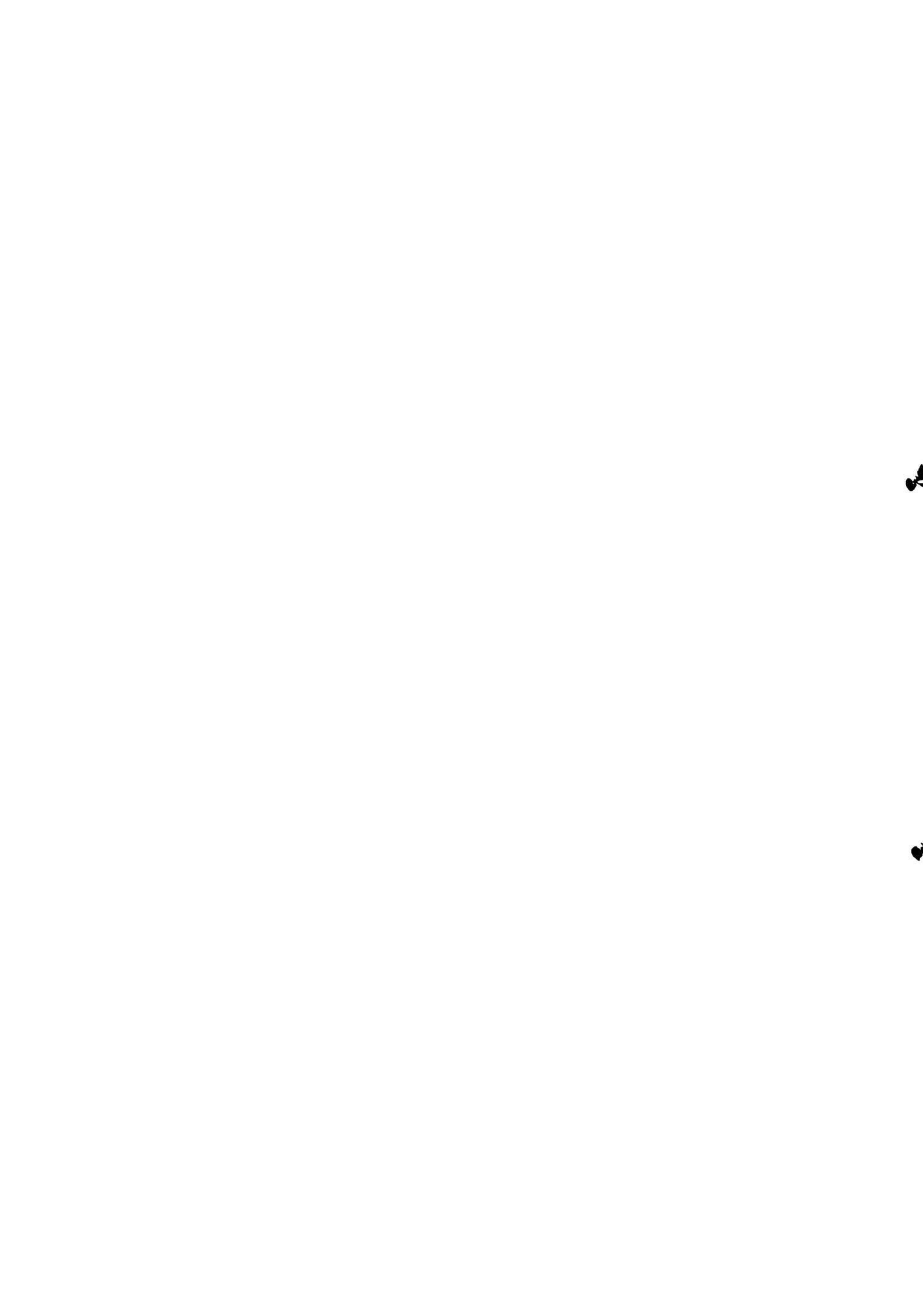
$$\frac{(\sum S_{xy})^2}{\sum S_{xx}} = \frac{(64 + 64)^2}{12 + 12} = 682.7$$

Paralelismo (diferencia entre los coeficientes de regresión de cada preparación y el valor de la regresión combinada):

$$\sum \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}} - \frac{(\sum S_{xy})^2}{\sum S_{xx}} = \frac{64^2}{12} + \frac{64^2}{12} - 682.7 = 0$$

Linealidad (desviación de los puntos observados con respecto a la recta): se calcula por diferencia: Variación entre dosis - (Preparaciones + Regresión + Paralelismo)

$$685.9 - (2.25 + 682.7 + 0) = 0.95$$



Error: se calcula por diferencia: Total - (Variación entre dosis)

$$744.75 - (685.9) = 58.85$$

Cálculos para la Obtención de los Cuadrados Medios: Para calcular los cuadrados medios, se divide cada suma de cuadrados por los grados de libertad correspondientes.

Cuadro 8

ANÁLISIS DE VARIANZA

Naturaleza de la Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
(4) reparaciones	1	2.5	2.25	1.15
(5) Regresión	1	682.70	682.70	348.3
(6) Paralelismo	1	0	0	0
(7) Linealidad	2	0.95	0.475	0.24
(3) Entre dosis	5	685.90	1.96	
(8) Error (dentro dosis)	30	58.85		
(2) TOTAL	35	744.75		

Pruebas Estadísticas. Las pruebas estadísticas para evaluar características del ensayo, a las que se hizo referencia anteriormente, consisten en calcular los cocientes de los cuadrados medios respectivos con el valor del cuadrado medio del “error”.

En este ejemplo, para poder rechazar la hipótesis, los cocientes para “preparaciones”, “regresión” y “paralelismo” deberían exceder de 4.2 ($F_{1, 30}$) y para “linealidad”, de 3.3 ($F_{2, 30}$).

Como se ve, “preparaciones” ($2.25/1.96 = 1.15$), “paralelismo” ($0/1.96 = 0$) y “linealidad” ($0.475/1.96 = 0.24$) son valores “bajos”, mientras que “regresión” ($682.7/1.96 = 348.3$) es un valor “alto”. Se comprueba así que el ensayo ejemplificado es satisfactorio.



Estimación de la Actividad Relativa

Concepto. Como se vio en el punto anterior, los resultados de las pruebas estadísticas no sugieren ningún signo de invalidez del experimento. Por consiguiente, se describirá a continuación el procedimiento adecuado para evaluar la actividad biológica de la preparación estudiada en valor relativo de la preparación estándar. También se estimarán los límites dentro de los cuales deberá aceptarse que se encuentra el “verdadero valor” de esa relación (límites de confianza).

Definición. La actividad relativa está dada por el cociente entre las dosis (o la diferencia entre los logaritmos de las dosis) de las 2 preparaciones, necesarias para obtener el mismo efecto.

Notación

P	= actividad relativa “verdadera”: cociente entre las dosis
R	= estimador de la actividad relativa
M	= $\log \rho$ = diferencia entre los log
M	= estimador de M
V(M)	= varianza de M

$$M + (\bar{x}_P - \bar{x}_S) = \bar{y}_P - \bar{y}_S$$

b

Deducción de la fórmula (Y)

Por la definición de la recta de regresión

$$Y_P = \bar{y}_P + b(x_P - \bar{x}_P)$$

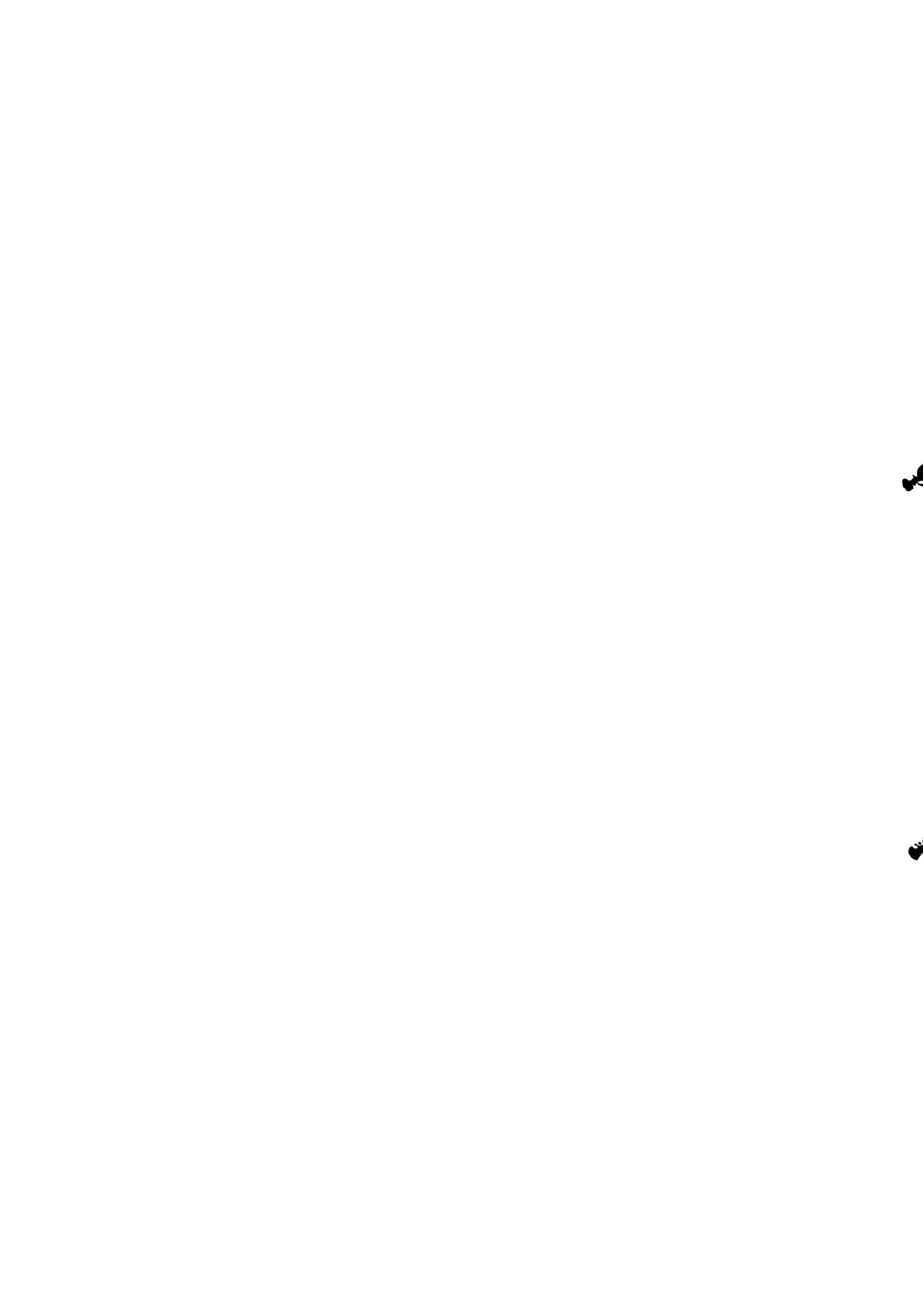
$$Y_S = \bar{y}_S + b(x_S - \bar{x}_S)$$

Como $Y_S = Y_P$, se igualan los términos

$$\bar{y}_P + b(x_P - \bar{x}_P) = \bar{y}_S + b(x_S - \bar{x}_S) \quad \text{trasponiendo términos}$$

$$\bar{y}_P - \bar{y}_S = b(x_S - \bar{x}_S) - b(x_P - \bar{x}_P) \quad \text{y por factor común b}$$

$$\bar{y}_P - \bar{y}_S = [b(x_S - \bar{x}_S) - (x_P - \bar{x}_P)] \quad \text{pasando b al 1° miembro y eliminando paréntesis del 2° miembro}$$



$$\frac{\bar{y}_P - \bar{y}_S}{b} = x_S - \bar{x}_S - x_P - \bar{x}_P \quad \text{reagrupando el 2º miembro}$$

$$\frac{\bar{y}_P - \bar{y}_S}{b} = \underbrace{(x_S - x_P)}_M + (\bar{x}_P - \bar{x}_S) \quad \text{o sea}$$

$$M + (\bar{x}_P - \bar{x}_S) = \frac{\bar{y}_P - \bar{y}_S}{b} \quad \text{o} \quad M - (x_S + x_P) = \frac{y_P - y_S}{b} \quad \text{(III)}$$

Cálculo de la Actividad Relativa

Para calcular la actividad relativa, se aplica la fórmula (III):

$$M - (0 - 0) = \frac{(16.3 - 16.8)}{5.3} = -0.09434$$

Este es un logaritmo de base 5; se transforma en logaritmo decimal multiplicando por 0.69897 (ver el punto 6.1)

$$\log_5 AR \times \log_{10} 5 = \log_{10} AR$$

$$\text{en este caso: } -0.09434 \times 0.69897 = -0.06594$$

$$\text{cuyo cologaritmo es: } 1 - 1 - 0.069434 = 1.93406$$

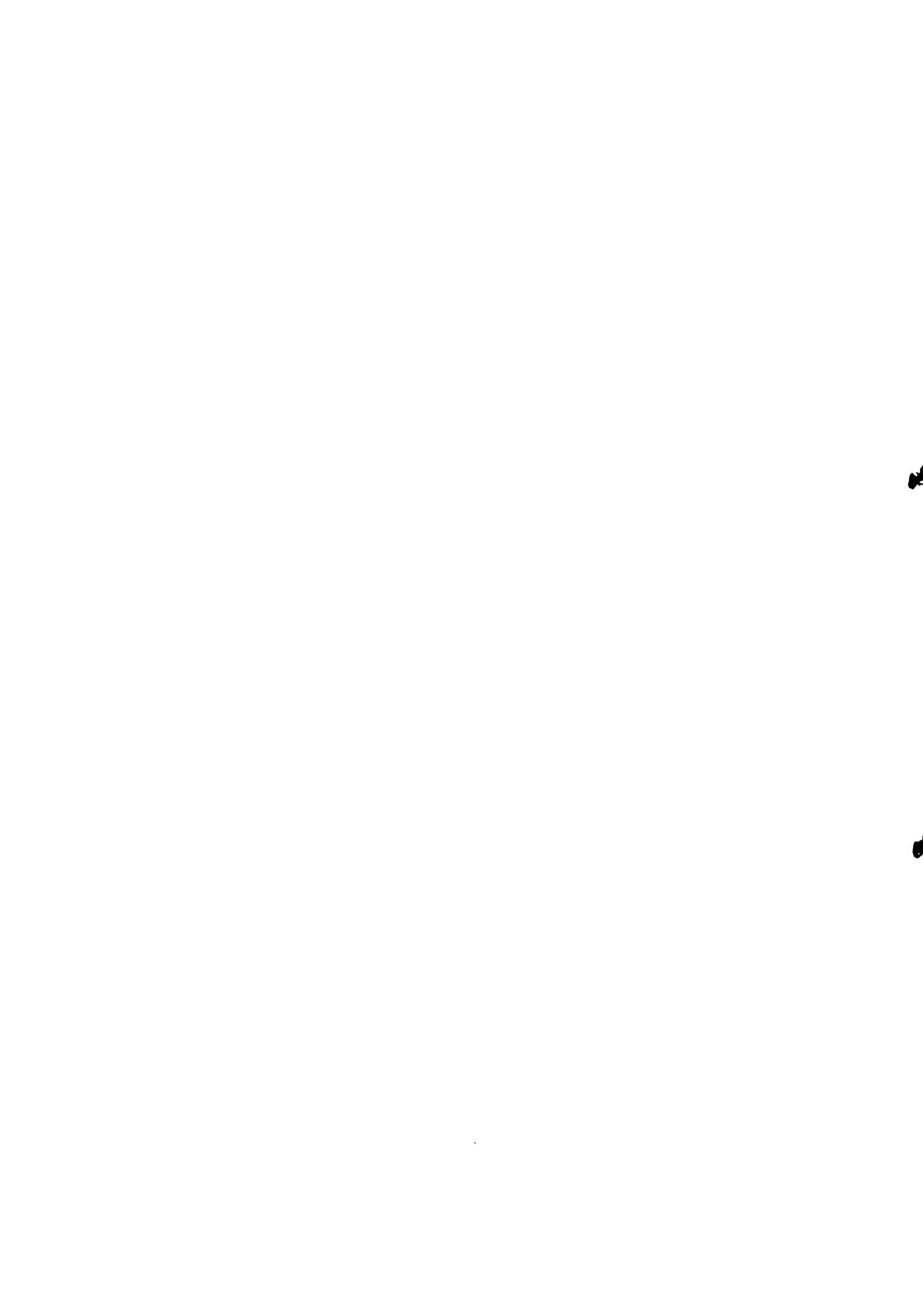
$$\text{y el antilogaritmo (AR): } 0.859$$

Por lo tanto, la actividad relativa del PPD en prueba con respecto al estándar es: 85.9%. Recuérdese que con el método gráfico dio 84%.

Límites de Confianza

$$\text{En la fórmula (III) } M - (\bar{x}_S - \bar{x}_P) = \frac{\bar{y}_P - \bar{y}_S}{b}$$

$(\bar{x}_S - \bar{x}_P)$ es una constante determinada por la elección de las dosis en la experiencia. Por lo tanto, los límites de confianza de M, se hallarán aplicando el teorema de Fieller a la relación $\frac{(\bar{y}_P - \bar{y}_S)}{b}$ y agregando $(\bar{x}_S - \bar{x}_P)$ a los resultados.



La fórmula general para los límites de $(M - \bar{x}_S + \bar{x}_P)$ es:

$$\left[M - \bar{x}_S + \bar{x}_P \pm \frac{t \cdot s}{b} \left\{ (1 - g) \left(\frac{1}{N_S} + \frac{1}{N_P} \right) + \frac{(M - \bar{x}_S + \bar{x}_P)^2}{\sum S_{xx}} \right\} \right]^{1/2} \div (1 - g)$$

donde $g = \frac{t^2 s^2}{b^2 \sum S_{xx}}$. El valor de s^2 es el cuadrado medio del error del cuadro de análisis de varianza (en este caso, 1.96); t es el t de Student, de la tabla de distribución de t , correspondiente a los grados de libertad del error (30, en el ejemplo); por lo tanto, $t = 2.04$ (para otro grado de libertad diferente a 30, consultar la tabla de valores de t en Finney).

$$\text{luego } g = \frac{(2.04)^2 \times 1.96}{(5.3)^2 \times 24} = 0.012099$$

En los casos en que g tenga un valor muy bajo (como en el ejemplo) puede omitirse. Los valores de x_S y x_P serán nulos mientras se emplee la transformación de las dosis usadas en este ejemplo; por lo tanto, también se elimina en el cálculo.

$$\text{La ecuación } V(M) = \frac{s^2}{b^2} \left\{ \frac{1}{N_S} + \frac{1}{N_P} + \frac{(M - \bar{x}_S + \bar{x}_P)^2}{\sum S_{xx}} \right\}$$

puede emplearse como varianza de M .

Aplicando esta fórmula a los datos del ejemplo tendremos:

$$V(M) = \frac{1.96^2}{5.3^2} \left(\frac{1}{18} + \frac{1}{18} + \frac{(-0.06594 - 0 + 0)^2}{24} \right) = 0.052468$$

Los límites de confianza de M , inferior (L) y superior (U), se obtienen restando y sumando este valor multiplicando por t (2.04, en este caso).

$$M_{LU} = -0.06594 \pm (0.0152203 \times 2.04) \begin{cases} M_L = -0.0969896 \\ M_U = -0.034890 \end{cases}$$

$$\begin{array}{llll} M & = \log_{10} R & = 1.93406 & \text{de donde } R & = 85.9 \\ M_L & = \log_{10} R_L & = 1.9030104 & & R_L & = 79.9 \\ M_U & = \log_{10} R_U & = 1.96511 & & R_U & = 92.3 \end{array}$$



Intervalo del 95% de confianza para ρ

$$79.9\% \leq \rho \leq 92.3\%$$

expresión que debe interpretarse así: el “verdadero” valor de la actividad relativa se encuentra entre 79.9% y 92.3%, afirmación hecha con 95% de confianza.



