

# LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES Y SU APLICACION EN VIROLOGIA\*

DAVID KIRSH, Ph.D.

*Centro de Enfermedades Transmisibles, Servicio de Salud Pública, Secretaría de Salud, Educación y Bienestar, Atlanta, Georgia, Estados Unidos*

Landsteiner (1) fue el primero que utilizó productos "marcados" en la inmunología. Este investigador y sus colaboradores utilizaron azoproteínas para estudiar la especificidad serológica de las proteínas. Reiner (2) modificó el suero antineumocócico con diazoatóxilo y observó que se retenía su especificidad. Heidelberger (3) alteró la proteína de huevo con la sal de bencidina por medio del diazoencadenamiento. Todos estos y otros investigadores utilizaron un tratamiento químico drástico que modifica en cierto modo la estructura química del antígeno. A Coons (4) y sus colaboradores les cabe el mérito de emplear el isocianato de fluoresceína para conjugar las proteínas sin perjudicar seriamente la especificidad de sus materiales. Estos investigadores conjugaron antisuero antineumocócico con isocianato a fin de estudiar el destino y localización de los polisacáridos neumocócicos en animales experimentales. En la conjugación de las proteínas se utilizaron solventes orgánicos, o sea, dioxano y acetona. Riggs (5) dio cuenta de que la sal de isotiocianato de fluoresceína fue muy superior, en el sentido de que el producto marcado tenía más estabilidad en almacenamiento que la proteína marcada con isocianato. Este reactivo se disuelve con facilidad, con más que el isocianato de fluoresceína.

Se han empleado otros fluorocromos, en especial la lisaminarodamina B200 (6), pero

\* Trabajo basado en una serie de conferencias y demostraciones de laboratorio organizadas en el Instituto Nacional de Virología, México, D. F., México, en marzo de 1962, bajo los auspicios de la Oficina Sanitaria Panamericana.

Los nombres comerciales que aparecen en este artículo sólo se utilizan con fines de identificación y su empleo no significa aprobación por la Oficina Sanitaria Panamericana ni por el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos.

el isotiocianato de fluoresceína sigue siendo el compuesto preferido para marcar, debido a que este colorante ha resultado muy apropiado para las radiaciones ultravioleta, por ser fluorescente a un color al que el ojo es muy sensible, y también por el hecho de que el color verde-amarillo rara vez se encuentra como autofluorescencia en tejidos normales.

Recientemente se han publicado trabajos donde se dice cómo se marcaron los anticuerpos con ferritina, un compuesto de hierro que contiene proteína (7). Este procedimiento ha sido utilizado en la microscopía electrónica para determinar la localización del anticuerpo/antígeno. Otros materiales de gran densidad en electrones que se han utilizado son las sales de mercurio y de plomo.

No obstante, para los fines corrientes, se considera que el método del isotiocianato de fluoresceína es el más adecuado por el hecho de que el anticuerpo permanece física y químicamente inalterado, y por ofrecer un medio de localizar las reacciones de antígeno/anticuerpo con gran precisión y de una manera relativamente sencilla.

## EL SISTEMA OPTICO

La microscopía por fluorescencia es más complicada que por la luz blanca ordinaria, porque la alineación mecánica y óptica es más difícil cuando la imagen está relativamente borrosa.

### 1. Microscopio

Un microscopio corriente basta. Los objetivos acromáticos son apropiados, si bien con las lentes apocromáticas o de fluorita se puede obtener una imagen más clara. Un condensador de campo obscuro es indispensable porque la fluorescencia se puede distinguir más fácilmente sobre un fondo obs-

curo. Además, la fluorescencia es más intensa con un condensador de campo obscuro. Sin embargo, un condensador de campo translúcido es de utilidad en el emplazamiento del campo. El empleo de un microscopio monocular o binocular sigue siendo cuestión de preferencia personal. Recuérdese, sin embargo, que el binocular pierde casi el 40% de la intensidad de la luz.

## 2. Fuente luminosa y filtros

Es preferible utilizar una lámpara de vapor de mercurio, a alta presión, dentro de una cámara de cuarzo, porque produce una alta emisión de energía en la banda ultravioleta y azul del espectro.

El brillo de la fluorescencia es baja en comparación con la luz excitante. Para no atenuar la fluorescencia, hay que eliminar esta luz excitante, lo que se consigue colocando un filtro primario entre la lámpara y el objeto, de suerte que sólo pasen las longitudes de onda que excitan la fluorescencia, es decir, 360  $\mu$  y 490  $\mu$  (verde-azul).

Un filtro secundario (filtro de barrera) se coloca entre el objeto y el observador, de suerte que sólo puedan verse longitudes de onda características de la fluorescencia, y también para proteger la vista del observador. Muchos investigadores utilizan:

a) Una luz excitante azul-violeta entre 400 y 450  $\mu$  con un filtro secundario decididamente amarillo;

b) Una luz excitante combinada ultravioleta y azul-violeta, entre 350 y 450  $\mu$  y un filtro secundario distintamente amarillo;

o bien,

c) Una luz excitante ultravioleta entre 350 y 400  $\mu$ , que es la utilizada con más frecuencia con virus FA.

La Fig. 1 representa el sistema óptico.

Un aspecto crítico para obtener una visibilidad satisfactoria de la fluorescencia es la apropiada alineación de los sistemas óptico y de iluminación. Cuando se utiliza el sistema de Reichert, es conveniente proceder de la siguiente manera:

a) Abrase la cámara de la lámpara e insértese

la bombilla de arco de mercurio. Para montar el aparato Reichert, se utiliza un Osram HBO 200, L1. Es importante examinar los cables del transformador y manejar con cuidado la bombilla para no dejar huellas digitales de grasa, porque éstas se queman y embeben en el vidrio y merman la eficacia de la bombilla. Círrrese la cámara de la lámpara.

b) Colóquense todas las manecillas de los portafiltros en posición vertical y quítense los tornillos de mano de la parte superior de la cámara del filtro. Levántese la montura y háganse funcionar las palancas, y márchense con 5840 (violeta obscuro) ó con 5970 (azul-violeta).

c) Colóquese el enchufe de tres clavijas conectado a la lámpara dentro del receptáculo del transformador que, a su vez, se ha enchufado en el circuito del laboratorio. Enciéndase la lámpara y déjense transcurrir 15 minutos para que alcance su plena intensidad.

Cuando se apague la lámpara hay que esperar por lo menos 30 minutos antes de volverla a encender.

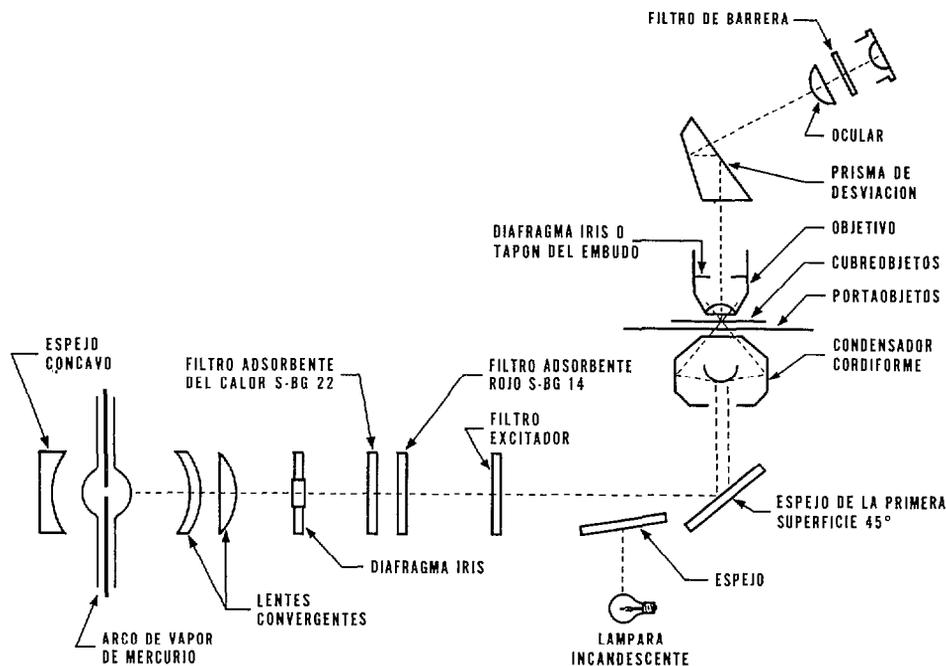
d) Redúzcase la intensidad de la luz cerrando el obturador de la montura de la lámpara. Colóquese un pedazo de papel blanco sobre la abertura de la luz situada en la base del microscopio. La imagen de los electrodos debe aparecer en el papel blanco. Enfóquese claramente por medio de las lentes convergentes (la palanca está en la parte delantera de la montura de la lámpara). Fúndase la verdadera imagen de los electrodos con la imagen de los mismos en el espejo, ajustando los tornillos que centran la bombilla en la parte superior de la cámara de la lámpara. En cuanto las dos imágenes coincidan, apriétense las tuercas en posición. Seguidamente ajústese el espejo para que el haz luminoso pase verticalmente por el centro de la abertura de luz en la base del microscopio.

e) Colóquese el tapón centrador (un disco de metal que se ajusta sobre el espejo) en posición. Este disco metálico tiene un pequeño orificio en el centro sobre la apertura de salida de luz. Colóquese en posición el adaptador del microscopio de manera que el haz de luz penetre por el centro del fondo del condensador.

f) Súbase el condensador todo lo posible. Después de fijar el anillo centrador del condensador, céntrese el condensador por medio de los tornillos a ambos lados. Colóquese en posición el objetivo de baja potencia (10 $\times$ ).

g) Aplíquese una gota de aceite de inmersión (aceite de inmersión "Cargille" no secante, tipo

FIG. 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL EQUIPO PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA



A, de muy baja fluorescencia) al condensador, evitando las burbujas de aire. Colóquese el portaobjetos en la plataforma y céntrese el espécimen sobre los lentes del condensador. Muévase arriba y abajo el condensador mientras se abre y cierra el obturador de la montura de la luz. Debe aparecer centrada en el campo obscuro un área circular muy fluorescente.

h) Aplíquese una gota de aceite a la preparación y cámbiense al objetivo de inmersión en aceite (40X). Enfóquese y ajústese el diafragma hasta obtener un buen contraste.

i) Aflójese el cierre del espejo y ajústese éste al centro del área circular fluorescente. Abrase al máximo el obturador. Ajústese el condensador para obtener una imagen más clara y conseguir la máxima intensidad de luz.

#### PROCEDIMIENTOS PARA MARCAR

Se puede utilizar suero integral o globulinas precipitadas, aunque preferimos estas últimas porque resulta más económico en el empleo de isotiocianato y, en segundo lugar, tiende a reducir las manchas no específicas.

Para obtener buenas preparaciones de globulina se pueden emplear varios métodos, tales como la precipitación de metanolacetato, de Dubert (8), la media saturación

con sulfato de amoníaco o el fraccionamiento de D.E.A.E. (9). Nosotros utilizamos el método del sulfato de amoníaco porque es sencillo y resulta muy satisfactorio. En resumen, este método consiste en añadir un volumen de sulfato de amoníaco saturado frío a un volumen igual de suero, lo cual se hace lentamente y sin dejar de revolver la mezcla mientras se encuentra en un baño de hielo. Para obtener buenos resultados, se debe utilizar un agitador magnético. Continúese revolviendo la mezcla por 30 minutos. Luego, el precipitado se pasa por un centrifugador Spinco a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos. Se retira el sobrenadante. Lávese el precipitado 2X con sulfato de amoníaco frío al 50%, centrifugándolo en el Spinco después de cada lavado. Disuélvase el precipitado en un mínimo de H<sub>2</sub>O destilada y fría. Dialícese la globulina disuelta a 0-4° C. con NaCl al 0,85% utilizando frecuentes cambios de solución salina. Se continúa la diálisis hasta que ya no se perciba el sulfato en el dialisato por medio de BaCl<sub>2</sub>. El contenido de proteína se determina mediante la reacción de Biuret. La solución

de globulina puede almacenarse en estado de congelación hasta que se vaya a utilizar.

*El marcado de globulina con isotiocianato de fluoresceína*

Según el contenido de proteína, se añade isotiocianato de fluoresceína en la razón de 1:20, o sea, 1 parte de isotiocianato en 20 partes de proteína. Se ha informado de que la antiglobulina de rabia puede conjugarse satisfactoriamente en una razón comprendida entre 1:40 y 1:80. No tenemos noticia de que esto se haya determinado para otros sistemas, aunque en trabajos con suero anti-ratón de conejo, conjugamos la globulina en la razón de 1:40, resultando satisfactoria para uso en la prueba indirecta. Por lo común, la concentración de proteína se ajusta al 2% mediante la dilución con NaCl al 85%, y se agrega el 10% del volumen total a 0,5 M. de carbonato-bicarbonato como estabilizador, pH 9. A continuación figura un ejemplo de los cálculos:

Para marcar 5 ml. de globulina al 3,4%  
 $3,4 \text{ g. \%} = 34 \text{ mg./ml.}$

Es necesario ajustar el volumen a 8,5 ml. a fin de obtener una solución de proteína al 2%. Sin embargo, en vista de que el 10% del volumen total debe actuar como estabilizador carbonato-bicarbonato, se añaden 0,425 ml. de 0,5 M.  $\text{NaHCO}_3$  y 0,425 ml. de 0,5 M.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Se añaden 2,8 ml. de solución salina a los 5 ml. de solución proteínica al 3,4% que contiene 0,85 ml. de estabilizador. Con ello se obtiene un volumen total de 8,5 ml. de solución proteínica al 2% con un pH 9. Para lograr un marcado óptimo, se agregan también 8,5 mg. de isotiocianato de fluoresceína a razón de 1 mg. de isotiocianato por cada 20 mg. de proteína. A los efectos de calcular la cantidad de isotiocianato de fluoresceína que debe añadirse a una solución proteínica al 2%, se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$(\text{volumen total en ml.}) \times (\text{total de mg. de proteína}) \times 0,05 = \text{mg. de isotiocianato de fluoresceína que ha de emplearse}$$

(En el caso mencionado, esto correspondería a  $8,5 \times 20 \times 0,05 = 8,5 \text{ mg.}$ )

A este porcentaje de proteína, y puesto que se utilizan 0,05 mg. de isotiocianato por mg. de proteína, una simple regla práctica consiste en añadir 1 mg. de isotiocianato a cada ml. de solución de globulina al 2% a un pH 9,0. Es conveniente ajustar el pH a 9 puesto que el isotiocianato es más soluble y se une más fácilmente a la proteína. Coons (10) afirma que el isotiocianato de fluoresceína se une a los residuos de lisina de la molécula de proteína. La de globulina y el isotiocianato se mezclan dejándolos toda la noche en un agitador magnético en el refrigerador. Luego se dializa el material con frecuentes cambios de PBS (solución salina a un pH 7,2 estabilizada con 0,01 M. de fosfato) en frío hasta que el dializado queda libre de fluoresceína. Esto puede observarse colocando una muestra en la trayectoria de la luz de la montura del microscopio de lámpara. Si se observa un color amarillo-verdoso, se continuará la diálisis hasta que la solución deje de emitir la fluorescencia característica de la fluoresceína (amarillo-verdoso o verde manzana). Al llegar a este punto, es conveniente hallar la razón fluoresceína/proteína (11). El conjugado ideal tiene una razón comprendida entre  $10 \times 10^{-3}$  y  $20 \times 10^{-3}$ . Sin embargo, cabe señalar que el conjugado cuya razón no esté dentro de estos límites, no por ello ha de ser insatisfactorio para su uso. Esto sólo puede determinarse comprobando el conjugado con antígenos homólogos y heterólogos. La razón fluoresceína/proteína sólo indica eficacia de la conjugación. Uno de los grandes problemas que se plantean con la técnica de anticuerpos fluorescentes, especialmente en virología, es la coloración no específica de las células tisulares. Se han descrito varios métodos para eliminar este problema. El primero consiste en la absorción del conjugado con polvos de tejido desecado en acetona. De acuerdo con este método, por cada ml. de conjugado se emplean 100 mg. de polvo tisular preparado con hígado de

mono, o cualquier otro órgano apropiado. El polvo se coloca en un tubo de plástico con varios ml. de PBS, y se mezcla totalmente para que el polvo se humedezca bien. Luego se coloca en la centrifugadora Spinco a 15.000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se saca cuidadosamente y el conjugado se añade al tejido sedimentado; esto se mezcla completamente y se coloca en el refrigerador durante una hora, agitándolo con frecuencia. Después se centrifuga igual que antes. El sobrenadante es, entonces, el conjugado absorbido. Tal vez sea necesario repetir esta operación. En el empleo de sistemas de cultivo tisulares, como en el campo de la virología, ha resultado útil emplear un volumen húmedo compacto de 0,5 ml. de células de cultivo tisular sin infectar para absorber el conjugado. Otro método consiste en el empleo de Dowex 2-X4 (forma de cloruro, malla 20-50). Conforme a este método, se mezcla un volumen igual de Dowex y conjugado en un recipiente de boca ancha y se coloca en el refrigerador durante una hora, donde se revuelve con frecuencia. A continuación se centrifuga el material y se saca cuidadosamente el sobrenadante. Se puede dializar con P.B.S., o ponerlo a prueba tal como esté.

Un tercer método de eliminar manchas no específicas consiste en pasar el conjugado por una celulosa de dietilaminoetilo (D.E.A.E.). Los efluentes de gradiente por medio de creciente molaridad de cloruro de sodio se recogen y ponen a prueba para determinar la especificidad (12). Puede ser necesario concentrar los efluentes. El empleo de Carbowax constituye un método satisfactorio de concentración (13).

Tal vez sea necesario combinar los métodos descritos para eliminar la coloración no específica. Esto sólo puede determinarse ensayando el sistema particular que se estudie.

#### MÉTODOS DE COLORACION

##### 1. Método directo

En este método, el anticuerpo que primero se ha conjugado con isotiocianato de fluo-

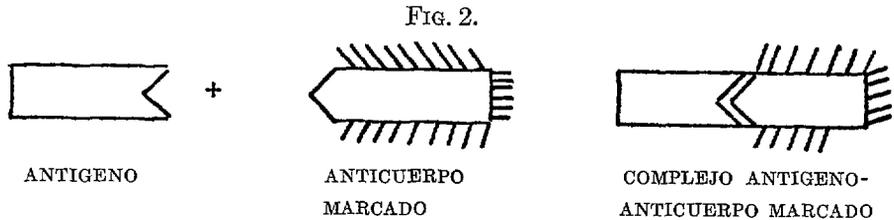
resceína se pone en contacto directo con el antígeno mezclándolo en la superficie del portaobjetos o, como en el campo de la virología, mediante la aplicación directa al cubreobjeto de tejido tisular de Leighton, que se haya secado al aire y fijado en acetona. Después de un período adecuado de incubación, el portaobjetos o el cubreobjetos se lavan en P.B.S. y después en H<sub>2</sub>O destilada. El portaobjetos se seca al aire, se monta y se examina. El líquido para montar puede ser glicerina estabilizada (90 % de glicerina y 10 % P.B.S., pH 7,2), o Elvanol grado 51-05, Dupont de Nemours, Dep. de Electroquímica). La ventaja del método del Elvanol (14) es que ofrece un medio de montaje semipermanente. El almacenamiento y el envío de los portaobjetos no deben presentar dificultades. Esta reacción se puede representar como aparece en la Fig 2.

En el microscopio fluorescente, este complejo antígeno-anticuerpo marcado tiene la característica fluorescencia verde-amarilla. Por supuesto, en preparaciones de cultivo tisular sólo se puede afirmar que este complejo representa antígeno de virus, más esto no implica que sea la propia partícula de virus. Además, hay que estar seguro de que este complejo antígeno-anticuerpo marcado es intracelular en el sistema de tejido tisular que se estudie.

En el supuesto de que haya coloración, es indispensable demostrar su especificidad, lo que se hace estableciendo los controles siguientes:

a) Portaobjetos de cultivo tisular sin infectar coloreado con el conjugado. Este no debe mostrar ninguna coloración. Si en este control se obtiene coloración no específica, es necesario reabsorber el conjugado.

b) Inhibición de la coloración. Esta se logra, aplicando primero suero inmune no conjugado homólogo y, después de un período adecuado de incubación y del lavado, aplicando el suero homólogo conjugado. Una vez hecho esto, no debe haber coloración, o si la hay, debe haberse atenuado notablemente.



## 2. Método indirecto

El método directo es más sencillo porque supone la interacción de dos reactivos, el anticuerpo fluorescente y el antígeno, con la consecuente formación del complejo fluorescente anticuerpo-antígeno que procede en una sola etapa. Si hay que examinar, como ocurre en toda encuesta serológica, anticuerpos de numerosos sueros, se requerirá la conjugación de cada uno de los sueros, lo que resulta costoso en tiempo y materiales.

Esta dificultad se ha vencido mediante la adopción de un tercer reactivo: una antiglobulina específica marcada con fluoresceína. En otras palabras, mediante el empleo de una reacción del tipo de la de Coombs modificada, en la que el anticuerpo marcado desempeña un doble papel: 1) actúa de anticuerpo dirigido contra el agente vírico específico y 2) actúa de antígeno de la antiglobulina.

Para producir la antiglobulina, se precipitan las globulinas de suero normal de la misma especie que proporciona el suero inmune. Esta globulina se administra por vía subcutánea a otra especie, en coadyuvante, 80 mg. por inyección. Se administran cuatro inyecciones a intervalos de 10 ó 12 días con un total de 320 mg. de proteína. Se extrae sangre del animal 14 días después de la última inyección. Esta se administra en depósitos múltiples en vez de un sólo depósito. El coadyuvante que empleamos consta de creamalina (gel de hidróxido de aluminio, Winthrop Laboratories, Nueva York 18, N. Y.) que ha sido lavada en varios volúmenes de solución salina y reconstituida a su volumen original con solución salina. Acostumbramos comprobar nuestro suero de antiglobulina por doble difusión en el tipo Oudin de difusión en gel, antes de la precipi-

tación y conjugación con isotiocianato de fluoresceína.

Este método indirecto consta de dos etapas. Después de fijar el portaobjetos de cultivo de tejidos, el suero inmune homólogo se aplica, se incuba y se lava en P.B.S. Luego se aplica la antiglobulina marcada con fluoresceína y, después de un segundo período de incubación y lavado, se examina el portaobjetos para determinar la coloración específica. También en este caso hay que establecer controles adecuados que consisten en lo siguiente:

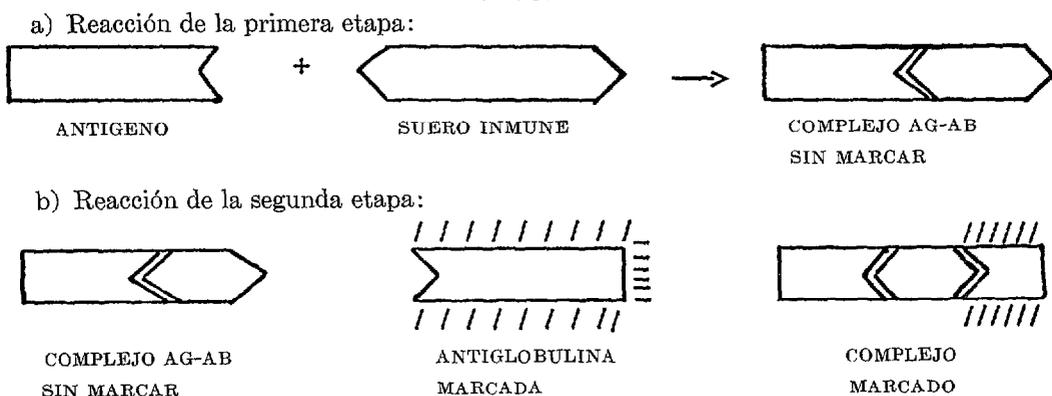
- a) Portaobjetos de cultivo de tejidos sin infectar coloreado con suero inmune y con antiglobulina marcada.
- b) Portaobjetos de cultivo de tejidos infectado, coloreado con suero normal y con antiglobulina marcada.
- c) Portaobjetos de cultivo de tejidos sin infectar, coloreado con sólo antiglobulina marcada.
- d) Portaobjetos de cultivo de tejidos infectado, coloreado con sólo antiglobulina marcada.

Ninguno de estos controles debe presentar fluorescencia específica.

La coloración indirecta se puede representar como aparece en la Fig. 3.

Con bastante frecuencia, especialmente en sistemas de cultivo de tejidos, es difícil eliminar la coloración no específica de la células de cultivo de tejidos por los procedimientos de absorción acostumbrados. En este caso se puede aplicar Rhodamine como contracolorante. Es posible conseguir suero de ternera normal que haya sido conjugado con Rhodamine. Hemos observado que una concentración final de 1:20 de suero conjugado con Rhodamine en nuestra antiglobulina conjugada con fluoresceína reduce considerablemente la coloración no específica.

FIG. 3.



### 3. Coloración de complemento (11)

La coloración de complemento es similar al método indirecto con la excepción de que el conjugado de antiglobulina va dirigido contra las especies que proporcionan el complemento. En resumen, si examinamos suero humano en busca de anticuerpos contra un agente específico de virus o rickettsias, aplicaremos el suero inmune más una gota, poco más o menos, de suero normal de cobayo a 1:10. Para que la coloración sea satisfactoria han de estar presentes todos los elementos integrantes del complemento. Después de un período adecuado de incubación y del lavado habitual en P.B.S., se aplica un suero anticobayo conjugado. El lavado y examen finales se hacen en la forma descrita en el caso de los demás métodos. Es esencial, en esta modificación, que el sistema de antígeno-anticuerpo que se estudia fije el complemento de cobayo. Además de los controles enumerados en relación con el método indirecto, hay que hacer otra prueba de especificidad, a saber:

Omisión del complemento de cobayo a 1:10 en los procedimientos de coloración. Este procedimiento tampoco debe mostrar coloración específica. Por supuesto, se puede comprobar previamente el suero de cobayo para tener la seguridad de que no contiene anticuerpos homólogos al sistema que es objeto de estudio. La coloración de complemento se puede representar por el diagrama que aparece en la Fig 4.

El procedimiento de coloración del com-

plejo permite obtener una fluorescencia mucho más brillante que mediante el empleo de los métodos habituales. Una modificación de esta técnica, para aumentar la fluorescencia, consiste en añadir una gota de suero normal de cobayo a 1:10 en la primera etapa del procedimiento indirecto.

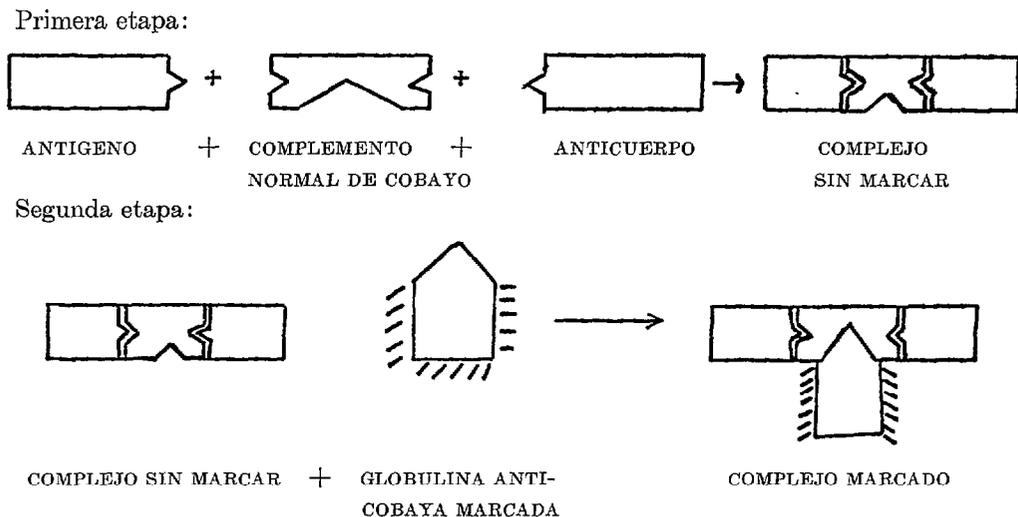
#### EL EMPLEO DE LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES EN LA IDENTIFICACION Y LOCALIZACION DE VIRUS

Las técnicas de anticuerpos fluorescentes tratan de resolver la cuestión de la localización y destino de los antígenos. Numerosos investigadores han estudiado la cinética de la infección, en el plano celular. Watson, utilizando huevos fecundados, estudió el curso de la infección de virus de parotiditis y de influenza, mientras que Liu, en su estudio sobre el virus de la influenza, empleó hurones. La técnica de anticuerpos fluorescentes, utilizando sistemas de cultivo de tejidos, ha sido aplicada al estudio de la vaccinia (15); a la fiebre hemorrágica epidémica (16); al dengue (17); a la enfermedad de Newcastle (18); al virus Sendai (19); y a la poliomieltis (20). Esta es sólo una lista representativa de los agentes víricos estudiados. En los trabajos de Coons (10) y de Cherry *et al.* (21) se encontrará un amplio estudio, no sólo de los agentes víricos estudiados, sino también de la técnica de anticuerpos fluorescentes.

La localización de antígeno de virus se divide en tres categorías principales:

1) La localización citoplásmica, repre-

FIG. 4



sentada por el virus poliomiéltico (20); 2) la nuclear, presentada con el "agente espumoso" de origen símico (22); y 3) la localización nuclear y citoplásmica como la que se observa en la influenza (23).

El estudio de la cinética de la infección viral en un plano celular revela que el virus de la enfermedad de Newcastle (18) y el virus poliomiéltico (24) se propagan por la fase extracelular, mientras que el virus de herpes simplex (25), de varicela (24) y el sarampión (26) se propagan de célula a célula sin descargar en el medio extracelular.

La secuencia del desarrollo de antígenos víricos ha sido también estudiada con la ayuda de la técnica de anticuerpos fluorescentes. Así, Loh y Riggs (15) encontraron que en células infectas de vaccinia, el antígeno termolábil (L) y el termoestable (E) podían demostrarse cuatro horas después de la infección, seguidos por la aparición del antígeno de nucleoproteína (NP) a las seis horas. El antígeno hemaglutinante (HA), producto derivado de la interacción virus-célula, sólo se demuestra después de la aparición de virus maduro. Una variable en este tipo de estudio es la multiplicidad de infección. Las variaciones de la cantidad y calidad del virus de influenza inyectado dió lugar a diferencias, no sólo de la producción de virus, sino también en la histoquímica de la infección (23).

Por último, la aplicación de los métodos de anticuerpos fluorescentes al diagnóstico en el campo de la virología puede tenerse en consideración en el caso de dos virus, el de la influenza y el de la poliomiéltis.

Liu (27) aplicó la técnica de FA a los lavados nasales de pacientes de enfermedades de las vías respiratorias. En un estudio de 20 pacientes, se obtuvieron resultados positivos en 12, o sea, el 71 % de los casos, diagnosticados finalmente como casos de influenza A mediante las pruebas HI cuando se pudo obtener suero de convaleciente. En fecha posterior, en otro estudio de 21 casos, sólo el 38 % se diagnosticó como influenza B, a partir de casos serológicamente positivos.

Hatch *et al* (28), en un estudio de 85 especímenes fecales para determinar la presencia de virus poliomiéltico, identificaron 34 con la técnica de FA, en comparación con 38 determinados por los métodos habituales (neutralización) para identificar el virus poliomiéltico. Los demás 47 especímenes fueron negativos a la vez por los métodos habituales y los de FA. Es alentador observar la ausencia de reacciones positivas falsas.

Antes de poder aplicar la técnica de anticuerpos fluorescentes en virología como medio de diagnóstico (que no sea el de la rabia), conviene proceder a una amplia evaluación sobre el terreno.

## REFERENCIAS

- (1) Landsteiner, K.: Uber Komplexe Antigene, *Klin. Woch.*, 1:103-107, 1927.
- (2) Reiner, L.: On the chemical alteration of purified antibody protein, *Science*, 72:483-484, 1930.
- (3) Heidelberger, M.; Kendall, F. E., y Soo Hoo, C. M.: Quantitative studies on the precipitation reaction. Antibody production in rabbits injected with an azo-protein, *Jour. Exp. Med.*, 58:137-152, 1933.
- (4) Coons, A. H.; Creech, H. J., y Jones, R. N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 47:200-202, 1941.
- (5) Riggs, J. L.; Seiwald, R. J.; Burckhalter, J. R.; Downs, C. M., y Metcalf, T. G.: Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum, *Am. Jour. Path.*, 34:1081-1097, 1958.
- (6) Silverstein, A. M.: Contrasting fluorescent labels for two antibodies, *Jour. Histochem. y Cytochem.*, 5:94-95, 1957.
- (7) Singer, S. J., y Schick, A. F.: The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with Ferritin, *Jour. Biophys. and Biochem. Cytol.*, 9:519-537, 1961.
- (8) Dubert, J. M.: Nouvelle method de separation de proteines serotiques pas le methanol: application ou serums des lapins et cheval., *Ann. Inst. Past.*, 84:370-375, 1953.
- (9) Peters, J. H.: Purification of fluorescent conjugates by column chromatography, *Fed. Proc.*, 20:17, 1961.
- (10) Coons, A. H.: Histochemistry with labelled antibody, *Int. Rev. Cytol.*, 5:1-23, 1956.
- (11) Goldwasser, R. A., y Shepard, C. C.: Staining of complement and modifications of fluorescent antibody procedures, *Jour. Immunol.*, 80:122-131, 1958.
- (12) Goldstein, G.; Slizys, I. S., y Chase, M. W.: Studies on fluorescent antibody staining. I. Non-specific fluorescence with fluorescein-coupled sheep anti-rabbit globulins, *Jour. Exp. Med.*, 114:89-110, 1961.
- (13) Konn, J.: A simple method for the concentration of fluids containing protein, *Nature*, 11 abril 1955.
- (14) Rodriguez, J., y Deinhardt, F.: Preparation of a semi-permanent mounting medium for fluorescent antibody studies, *Virology*, 12:316-317, 1960.
- (15) Loh, P. C., y Riggs, J. L.: Demonstrations of the sequential development of vaccinia antigens and virus in infected cells: Observations with cytochemical and differential fluorescent procedures, *Jour. Exp. Med.*, 114:149-160, 1961.
- (16) Rapp, F., y Buckley, S. M.: Studies with the etiologic agent of Argentinian epidemic hemorrhagic fever (Junin virus), *Am. Jour. Path.*, 40:63-75, 1962.
- (17) Wiebenga, N. H.: Cultivation of Dengue 1 (Hawaiian) virus in tissue culture. I. Carrier culture of human skin cells infected with Dengue 1 virus, *Am. Jour. Hyg.*, 73:350-364, 1961.
- (18) Wheelock, E. F., y Tamm, I.: Enumeration of cell infecting particles of Newcastle disease virus by the fluorescent antibody technic, *Jour. Exp. Med.*, 113:301-316, 1963.
- (19) Osato, T., y Ishida, N.: The development of Sendai virus in Earle's L cells as revealed by fluorescent antibody staining, *Tohoku Jour. Exp. Med.*, 73:201-214, 1961.
- (20) Buckley, S. M.: Visualization of poliovirus by fluorescent antibody, *Arch. f. Gesamt Virus*, VI:388-400, 1956.
- (21) Cherry, W. B.; Goldman, M., y Carski, T. R.: Fluorescent antibody technics. Secretaria de Salud, Educacion y Bienestar, Estados Unidos, Servicio de Salud Pública, Centro de Enfermedades Transmisibles, Atlanta, Georgia, 1960.
- (22) Carski, T. R.: A fluorescent antibody study of the simian foamy agent, *Jour. Immunol.*, 84:426-433, 1960.
- (23) Watson, B. J.: Immunocytological effects of varied inocula of influenza virus, *Jour. Exp. Med.*, 114:13-28, 1961.
- (24) Black, F. L., y Melnick, J. L.: Micro-epidemiology of poliovirus and herpes-B infections. Spread of the viruses within tissue culture, *Jour. Immunol.*, 74:236-241, 1955.
- (25) Farnham, A. E.: The formation of microscopic plaques by herpes simplex virus in HeLa cells, *Virology*, 6:317-323, 1958.
- (26) Rapp, F.; Gordon, I., y Baker, R. F.: Observations of measles virus infection of cultured human cells. I. A study of development and spread of virus antigen by means of immunofluorescence, *Jour. Biophysic and Biochem. Cytol.*, 7:43-52, 1960.
- (27) Liu, C.: Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluorescein labelled antibody, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 92:883-887, 1956.
- (28) Hatch, M. H.; Kalter, S. S., y Ajello, G. W.: Identification of poliovirus isolates with fluorescent antibody, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 107:1-4, 1961.