

# UN METODO SIMPLIFICADO PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA LA FIEBRE PORCINA AFRICANA, MEDIANTE LA INMUNOELECTROOSMOFORESIS<sup>1</sup>

Deam Hunter Ferris,<sup>2</sup> Douglas Andrew Gregg<sup>2</sup> y Ahmed Hamid Dardiri<sup>2</sup>

*Se han elaborado equipos con nuevo diseño y procedimientos que permiten detectar con mayor rapidez las precipitinas contra el virus de la fiebre porcina africana. La metodología se puede aplicar también en el diagnóstico de la hepatitis y en otros procedimientos electroforéticos. La gran reducción de los costos hace estos métodos accesibles a los laboratorios pequeños.*

## Introducción

La fiebre porcina africana (FPA) se está convirtiendo rápidamente en una grave amenaza para la cría del cerdo y la elaboración de productos porcinos en todo el mundo (1). Durante 1978 aparecieron nuevos focos de FPA en América Latina, Malta y Cerdeña (2). Los brotes latinoamericanos no parecen haber seguido el curso de una epidemia anterior en Cuba (3), durante la cual se eliminó la enfermedad de manera relativamente rápida. Por el contrario, la FPA se ha establecido ahora en forma endémica en las Américas.

La protección contra la FPA endémica debe basarse en el diagnóstico rápido y preciso. Por desgracia, la FPA endémica puede no parecerse ya a la enfermedad descrita en los libros de texto (4) que produce una mortalidad elevada y, en la práctica, se elimina a sí misma. La existencia de cerdos portadores, unida al estableci-

miento del virus en garrapatas susceptibles, ha vuelto problemática la erradicación de las formas crónicas y endémicas.

Para complicar aún más el problema, las formas clínicas y crónicas más recientes de FPA son difíciles de distinguir del cólera porcino y otras enfermedades (5). Incluso el diagnóstico en laboratorio puede resultar difícil. Algunas cepas no se pueden identificar mediante la prueba de hemadsorción, generalmente digna de confianza (6). También puede ser difícil aislar el virus y la prueba de anticuerpos fluorescentes (AF) no lo detecta en muchos casos (7).

Afortunadamente, los anticuerpos que fijan el complemento (FC) y las precipitinas se producen muy pronto en casi todos los animales infectados. Es muy probable que se encuentren concentraciones elevadas de esos anticuerpos en animales con infecciones crónicas y subclínicas; precisamente los animales en los que pueden resultar elusivos los virus y antígenos víricos. Estas concentraciones de anticuerpos continúan siendo elevadas, aun en presencia del virus, y persisten cuando este ya no se detecta (8, 9).

Probablemente el método más práctico

<sup>1</sup> Se publica en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, Vol. 14, No. 3, 1980.

<sup>2</sup> Centro de Zootopatología de Plum Island; Administración Federal de Investigaciones, Ciencia y Educación; Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Greenport, Nueva York 11944, EUA.

y sensible para detectar anticuerpos contra la FPA sea la prueba de inmunoelectroosmoforesis (IEOF); es mucho más sensible que la prueba de precipitinas de difusión doble en gel de agar e incluso más sensible que la prueba de fijación del complemento (FC) (10).

Mientras hacíamos demostraciones de la aplicación de la prueba de IEOF durante los últimos años en cursos de zoopatología foránea, no encontramos laboratorios que utilizaran la prueba, aunque muchos expresaron su interés por ella. Los directores de laboratorios generalmente se mostraban reacios a invertir en el equipo necesario para efectuar esta única prueba.

Hace poco, en las visitas que realizaron científicos y técnicos del Centro de Zoopatología de Plum Island a laboratorios de veterinaria en América del Norte y del Sur, encontraron pocos que estuvieran equipados para efectuar la prueba. El personal de cursos recientes de zoopatología foránea—tanto del extranjero como de laboratorios de diagnóstico estadounidenses—informa que las presiones inflacionarias han hecho que el costo del equipo necesario y de algunos materiales sea un factor limitante para el empleo de la prueba de IEOF. Por ejemplo, ninguno de los laboratorios en cuestión tenía comúnmente existencias de agarosa y algunos consideraban prohibitivo el precio de esta sustancia.

En los últimos años se han intentado elaborar procedimientos más simples que permitan a un laboratorio efectuar la prueba de IEOF con equipo improvisado y el material disponible, con un costo muy inferior al del sistema convencional. Recientemente, ante el aumento de la FPA y por el deseo de las autoridades de veterinaria de equipar pequeños laboratorios móviles (11) para el diagnóstico de la FPA, se ha intentado diseñar, construir y probar equipo muy simplificado que utilice materiales de muy poco costo, con el propósito de lograr

que la prueba de IEOF y otras relacionadas con ella estén al alcance de cualquier laboratorio o curso docente. En este trabajo informamos de los resultados obtenidos.

## Materiales y métodos

### *Reactivos*

La preparación de la solución de antígenos necesaria para la prueba de IEOF ya se ha descrito antes (10). Se usaron antisueros obtenidos de casos encontrados en el terreno y de otros provocados experimentalmente. Se emplearon como testigos sueros porcinos normales y sueros obtenidos de cerdos infectados con otras enfermedades.

### *Procedimientos de la prueba convencional de IEOF*

Con anterioridad se han descrito los procedimientos básicos requeridos (10). También se han publicado, en forma de manual y microfichas, una guía muy minuciosa para la producción de solución de antígenos y una explicación detallada de la metodología de la prueba de IEOF (12) que pueden solicitarse al Director del Centro de Zoopatología de Plum Island.

En síntesis, la prueba convencional requiere una solución de antígenos (en la actualidad solo puede obtenerse en el Centro de Plum Island, si el laboratorio local no la produce) y antisueros porcinos positivos y normales para usarlos como testigos. Se uniformó la prueba para emplearla con equipo Gelman<sup>3</sup> que incluía una fuente de energía, matrices de inmunización, soportes, tanques y otros accesorios. Para pro-

<sup>3</sup> Gelman Instrument Company, Ann Arbor, Michigan 48106, EUA. La especificación de marcas comerciales o productos registrados no significa que el Departamento de Agricultura de Estados Unidos avale esos productos ni implica su aprobación con exclusión de otros que pueden también ser adecuados para los fines propuestos.

bar los antisueros contra la FPA, tres matrices de inmunización cubiertas con agarosa al 0.6% en un amortiguador inmunolectrosmoforético fueron sometidas a una corriente directa de entre 300 y 450 V durante 30 minutos. Según el modelo particular y el tamaño de las perforaciones, los pocillos de 3 mm de diámetro se separaron por espacios de 10 a 12 mm.

A veces es necesario eliminar las bandas de precipitinas no específicas. Ciertos lotes de antígeno, en combinación con ciertos sueros normales, pueden producir bandas aparentes de precipitinas. Generalmente no se parecen a las verdaderas bandas inmunolectrosmoforéticas, si bien en ocasiones extraordinarias esas bandas "falsas" pueden causar dificultades a un operario inexperto.

No obstante, nuestra experiencia indica que todas esas bandas "falsas" se pueden eliminar fácilmente sumergiendo la matriz de inmunización en una solución de cloruro de sodio al 2% durante un período de 15 minutos a tres horas. Este tratamiento salino hace que desaparezcan todas las bandas no específicas y que se vean con mayor claridad las específicas. Además de aplicar este tratamiento salino, se realizaron experimentos con antisueros normales y con antisueros contra la FPA, algunos de los cuales no se sometieron a ningún tratamiento mientras que otros se sumergieron en un baño de agua a 56°C durante 30 minutos; tratamiento que convencionalmente no se requiere para la prueba.

#### *Experimentos en los que se usó una fuente de energía con voltaje variable y portaobjetos de vidrio*

Se elimina una proporción muy grande del costo del equipo para inmunolectrosmoforesis si se utiliza una fuente de energía de fabricación casera u otra fuente de corriente directa variable, capaz de sumi-

nistrar un voltaje de 200 a 500 V y una corriente de 2 a 3 amperes. Se construyó esa fuente de poder empleando electrodos preparados con las barritas de carbón de baterías de pilas secas ya usadas; se utilizaron recipientes de tinción en lugar de la cámara convencional (12).

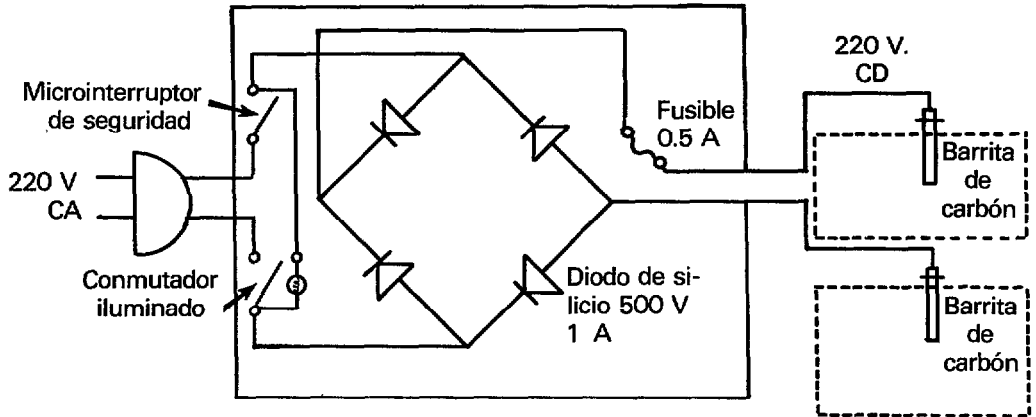
Se cubrieron con agarosa o con agar portaobjetos comunes y cubiertas de vidrio para diapositivas, para usarlos en este sistema improvisado. En numerosas pruebas y demostraciones efectuadas en clase, usamos portaobjetos de vidrio simples de 2.5 × 7.5 cm y portaobjetos "dobles" de 3.8 × 7.5 cm, además de cubiertas de vidrio para diapositivas grandes, que medían 8.2 × 10.0 cm. Se determinaron las cantidades adecuadas de agar o agarosa calientes, necesarias para cubrir los portaobjetos y cubiertas, así como los voltajes y tiempos requeridos. Simultáneamente se efectuaron pruebas utilizando equipo de fabricación comercial.

#### *Experimentos en los que se empleó una fuente simplificada de energía*

Los resultados obtenidos en estos experimentos sirvieron como guía para diseñar el equipo más sencillo posible, adecuado para la prueba de IEOP. La figura 1 muestra el esquema del circuito eléctrico de un dispositivo construido totalmente con partes compradas en una pequeña tienda de repuestos para aparatos de radio. Con cuatro diodos rectificadores de silicio, que permitían un voltaje de 500 V, y una corriente de un ampere, se construyó un puente rectificador de onda completa, capaz de convertir 220 V de corriente alterna en 220 V de corriente directa. La salida de corriente directa del circuito se protegió con un fusible de 0.5 amperes y un potenciómetro con un rango de 0 a 100,000 ohms. Este último elemento, considerado optativo, evitaba cortocircuitos si se tocaban accidentalmente los electrodos. Las

**FIGURA 1**—Esquema del circuito eléctrico de la fuente de energía en el dispositivo simplificado para la prueba de inmunolectrosmoforesis. Se utilizaron elementos comprados en una pequeña tienda de repuestos para aparatos de radio y pilas secas usadas. El costo total no llegó a EUAS\$10.00. Se fijó un microinterruptor de seguridad a la cubierta para que al retirar esta se interrumpiera la corriente.

Fuente de energía para la inmunolectrosmoforesis



barritas de carbón de pilas secas usadas, con alambres soldados a los casquillos de bronce, sirvieron como electrodos. Como alternativa, se emplearon alambres de platino proporcionados por los autores; dieron muy buenos resultados pero posiblemente no sea fácil por lo general disponer de ese tipo de alambres.

En las pruebas iniciales se emplearon dos recipientes de tinción que contenían el amortiguador inmunolectrosmofórico; se colocó el portaobjetos a través de los recipientes y a los lados de cada uno de estos se aseguraron con cinta aisladora los electrodos. Luego se cubrieron los recipientes de amortiguador con una caja de plástico, de las usadas para zapatos; se montaron entonces los electrodos sobre soportes de material plástico y se conectó un microinterruptor de seguridad para que el dispositivo funcionara únicamente cuando estaba colocada la cubierta (figura 1).

Las pruebas preliminares se efectuaron empleando el dispositivo simplificado conectado a una línea común de 220 V; al mismo tiempo se realizaron pruebas usan-

do los mismos reactivos y equipo convencional. Se sometieron a prueba numerosos sueros de cerdos infectados experimentalmente con virus de la FPA, sueros de casos recientes encontrados en el terreno en Brasil y sueros de otros casos en el terreno. Se efectuaron titulaciones en bloque con ambos sistemas, empleando diluciones de antisueros y antígenos que oscilaban de 2:1 a 128:1 (se había diluido previamente el antígeno para un empleo óptimo en el diagnóstico) (fotografía 1).

#### *Pruebas comparativas con agarosa y agares lavados*

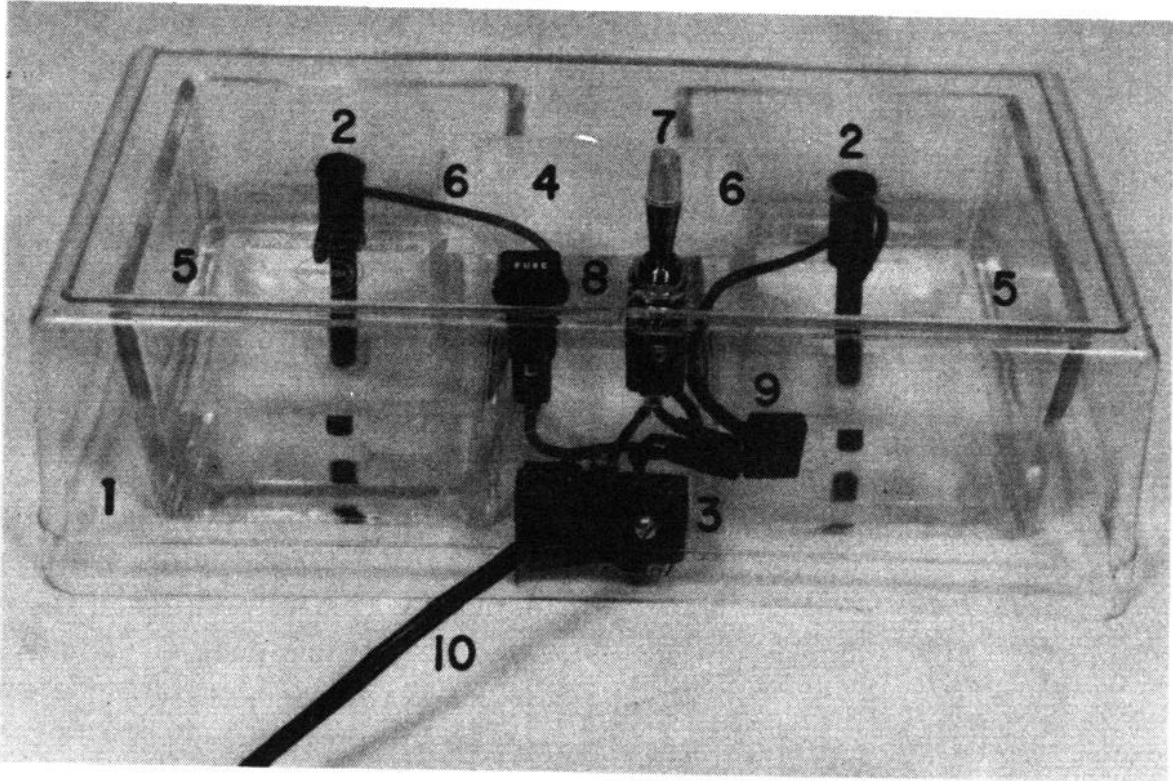
Como la agarosa,<sup>4</sup> una sustancia cara, puede estar fuera del alcance del presupuesto de los laboratorios más pequeños, se efectuaron muchas pruebas con agares lavados, que incluían los que se utilizan con fines bacteriológicos, *Special Noble Agar*<sup>5</sup> e *Ionagar*.<sup>6</sup> Se prepararon los aga-

<sup>4</sup> VSR Scientific Inc., Nueva York, Nueva York 10025, EUA.

<sup>5</sup> DIFCO, Detroit, Michigan 48106, EUA.

<sup>6</sup> Colab Laboratories, Inc., Chicago Heights, Illinois 60411, EUA.

**FOTOGRAFIA 1**—Funcionamiento del dispositivo simplificado para inmunoelectroosmoforesis. El dispositivo con voltaje de línea fijo alimentado por un rectificador está formado por las siguientes partes: 1) una cubierta constituida por una caja de material plástico, a la que se fijan los elementos principales; 2) electrodos de carbón sacados de pilas secas usadas; 3) un microinterruptor de seguridad que interrumpe la corriente al levantar la cubierta; 4) una cubierta de vidrio para diapositivas, revestida con agar o agarosa; los pocillos contienen los reactivos y el antígeno ocupa los más cercanos al cátodo; 5) recipientes de vidrio que contienen el amortiguador; 6) mechas (dos tiras de papel de filtro) que comunican el agar o la agarosa con la solución amortiguadora; 7) un conmutador iluminado para encendido y apagado; 8) un receptáculo para fusibles; 9) diodos rectificadores; 10) línea de 220 V.



res a concentraciones de 2.4%, se cortaron en piezas cuadradas de 1.5 cm de lado que se lavaron con agua del grifo durante dos días y se enjuagaron por último con agua destilada. Se prepararon agarosa y agares lavados a concentraciones finales de 0.6% para ser vertidos en una solución amortiguadora inmunoelectroosmoforética (con fuerza iónica de 0.1 y un pH de 8.6), que se obtuvo mediante la combinación de 13.38 g de barbitol sódico, 8.83 g de acetato de sodio ( $3H_2O$ ), 2.25 ml de azida sódica al 10% y agua destilada en cantidad suficiente para llegar a un volumen de 1.50 litros; con ácido clorhídrico se graduó el pH de la solución a 8.6.

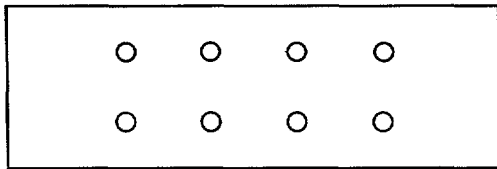
Cuando se enfrió la solución de agarosa

o agar, se colocaron los recipientes en un refrigerador durante 30 minutos como mínimo. Se cortaron entonces los pocillos en el gel (figura 2) con un troquel común de 3 mm o una cánula aguzada de calibre 12. Las pruebas con agarosa y agares lavados se efectuaron con el sistema inmunoelectroosmoforético de fabricación comercial y con el simplificado.

#### *Pruebas adicionales*

Se realizaron pruebas empleando cámaras Gelman con y sin amperímetros; alrededor de estos se colocó hielo molido para que actuara como refrigerante cuando el voltaje era elevado. Además, en el

**FIGURA 2**—Modelo en escala para cortar los pocillos. El diámetro interior de cada uno de ellos es de aproximadamente 2.5 mm si se hace la perforación con una cánula de calibre 12 (3 mm son también aceptables). Los pocillos están separados entre sí por un espacio de 10 mm desde un borde a otro. La parte recortada se elimina con facilidad aspirándola con la boca mediante un tubo de goma unido a una pipeta Pasteur.



dispositivo simplificado se utilizaron como refrigerante cubos congelados del amortiguador inmunoelectrosmoforético, que se agregaron a la solución amortiguadora no congelada. Por último, se usaron transformadores sencillos para hacer funcionar el dispositivo simplificado con 440 y con 220 V.

## Resultados

Se encontró que los volúmenes más adecuados de agar o agarosa para recubrir los portaobjetos y cubiertas de vidrio para diapositivas eran los siguientes: 2.3 ml para un portaobjetos simple de 2.5 × 7.5 cm (superficie: 19 cm<sup>2</sup>); 3.5 ml para un portaobjetos "doble" de 3.8 × 7.5 cm (superficie: 29 cm<sup>2</sup>) y 10.0 ml para una cubierta para diapositivas de 8.2 × 10.0 cm (superficie: 82 cm<sup>2</sup>).

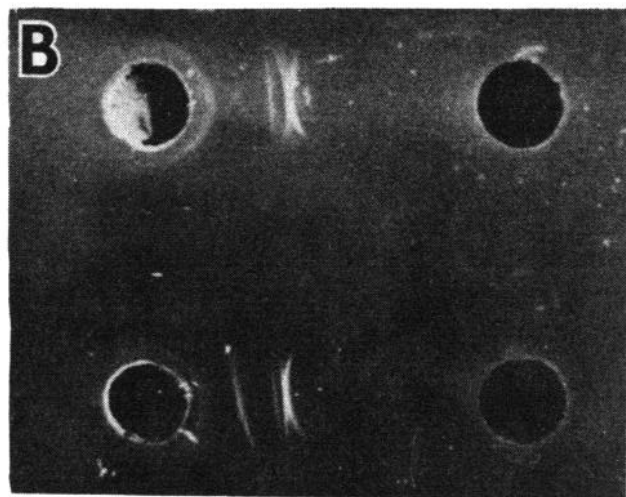
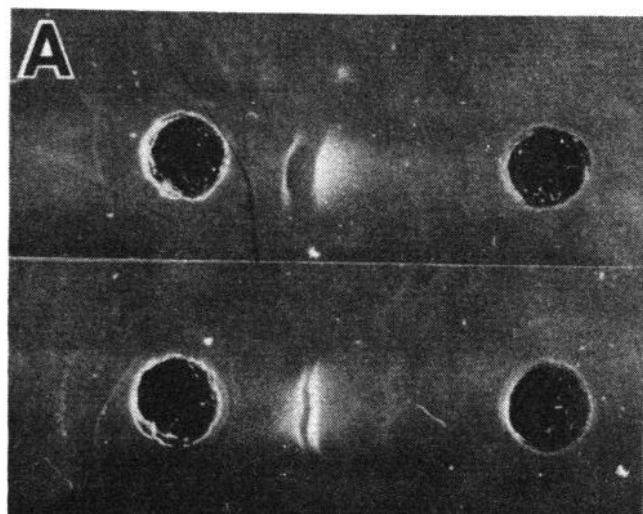
Cuando se emplearon cubiertas para diapositivas en la cámara convencional con energía de red industrial, se aplicaron 220 V a una sola cubierta y 200 V a otras dos, para evitar quemar con una sobrecarga el amperímetro de nuestra cámara Gelman "DeLuxe", que tenía un límite de 50 miliamperes. Si se usaba hielo molido como refrigerante colocado debajo de otra cámara sin amperímetro, se podían apli-

car 220 V a tres placas. Las cubiertas de vidrio para diapositivas ya revestidas tenían mayor resistencia que las matrices de inmunización convencionales. Se podía efectuar el mismo número de pruebas (24) en una cubierta para diapositivas que en una matriz de inmunización. La figura 2 muestra el modelo comúnmente usado para perforar los pocillos para cuatro pruebas; no obstante, el tamaño de estos se puede reducir y los espacios entre ellos variaron entre 2 y 4 mm sin que se produjeran diferencias notables en los resultados.

Mientras funcionaba el dispositivo simplificado, se comprobó con mediciones que el voltaje de la línea era de 220 V y que la corriente oscilaba entre 15 y 18 miliamperes. Tanto con el dispositivo convencional como con el simplificado la resistencia aumentó a medida que avanzaba la prueba.

En la fotografía 2 se muestra una comparación de los resultados de las pruebas efectuadas con el equipo convencional (A) y el simplificado (B). Puede haber una variación considerable en la apariencia de las bandas cuando se emplea el sistema convencional, pero generalmente un técnico experto no tiene dificultades para identificar una reacción específica. En más de 100 pruebas efectuadas con los mismos procedimientos empleados para las muestras obtenidas en el terreno, el dispositivo simplificado (con una corriente de línea de 220 V) dio resultados que podían incluirse en los mismos parámetros de los resultados obtenidos con el equipo convencional. En algunos experimentos, uno u otro sistema produjo bandas "mejores" (es decir, más largas, más densas o más rectas); pero en todas las pruebas con ambos sistemas, todas las bandas obtenidas con antisueros positivos podrían identificarse como reacciones típicas inmunoelectrosmoforéticas positivas. Se presentaron bandas "falsamente positivas" en las pruebas, tanto con el sistema convencional como con el simplifi-

**FOTOGRAFIA 2**—Comparación de los resultados obtenidos con el aparato convencional (A) y el dispositivo simplificado (B). En estas pruebas se utilizaron idénticos antígenos (en los pocillos de la derecha, más cercanos al cátodo) y antisueros (en los pocillos de la izquierda, más cercanos al ánodo). El aparato convencional funcionó con 350 V durante 30 minutos y el dispositivo simplificado, con 220 V durante 15 minutos. En ambos casos los resultados fueron positivos. No desaparecieron las bandas después de la inmersión en una solución salina al 2%, durante toda una noche.



cado, pero se eliminaron mediante el tratamiento salino. Algunos antígenos mostraron tendencia a producir esas falsas bandas positivas con ciertos sueros normales. A una temperatura de 56°C se vuelven inactivos los antisueros y sueros normales y se logró así eliminar una tercera parte de esas reacciones falsas sin modificar las reacciones positivas.

Las pruebas con antisueros porcinos contra microorganismos patógenos que no eran virus de la FPA, dieron resultados negativos; lo mismo ocurrió cuando se hicieron pruebas con sueros porcinos normales.

El cuadro 1 muestra los resultados típicos de una prueba de titulación en bloque en la que se duplicó progresivamente el grado de dilución de las diluciones de antígeno y de antisueros. Con el sistema simplificado, con 220 V, se obtuvo generalmente un resultado positivo con un grado de dilución inferior al requerido para obtener un resultado positivo con el sistema convencional, alimentado por 350 a 450 V. En algunas pruebas donde se

**CUADRO 1**—Resultados típicos de una prueba inmunoelectroosmofórica de titulación en bloque, obtenidos con el sistema convencional y con el simplificado.

Diluciones de antisueros	Diluciones del antígeno <sup>a</sup>							
	Sd	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Sistema convencional								
Sd	+	+	+	+	-	-	-	-
1:2	+	+	+	+	+	-	-	-
1:4	+	+	+	+	+	-	-	-
1:8	+	+	+	+	+	-	-	-
1:16	-	+	+	+	+	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-	-
1:128	-	-	-	-	-	-	-	-
Sistema simplificado								
Sd	+	+	+	+	-	-	-	-
1:2	+	+	+	+	-	-	-	-
1:4	+	+	+	+	+	-	-	-
1:8	+	+	+	-	-	-	-	-
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-	-
1:128	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Se diluyó previamente el antígeno para el empleo sobre el terreno, en la proporción de 1:6.

+ = Positivo, con bandas típicas de precipitinas.

- = Negativo, sin bandas de precipitina.

Sd = Sin diluir (en realidad había sido diluido previamente 1:6 para el empleo sobre el terreno o como solución madre).

empleó el equipo simplificado con un transformador de alta que elevó el voltaje a 440 V, ya no hubo diferencias entre ambos sistemas.

Como se esperaba, la agarosa, que no contiene las pectinas ionizantes de los agares, dio mejores resultados que cualquiera de estos. Con los agares más comunes usados para la siembra bacteriológica, no se obtuvieron bandas antes del lavado y aparecieron solo algunas muy tenues o poco definidas después de un lavado minucioso; cuando se experimentó con antisueros débiles en un gel preparado con estos agares, no se produjeron reacciones. Con *Special Noble Agar*, los resultados fueron deficientes antes del lavado y, después de este proceso, apenas aceptables. Tampoco fueron definidos los resultados obtenidos con *Ionagar* antes del lavado. Sin embargo, este producto dio resultados satisfactorios después de un lavado minucioso, que en muchas pruebas fueron tan buenos como los que se obtuvieron con la agarosa.

Los resultados obtenidos en numerosas pruebas con el sistema convencional y el simplificado revelaron que podían presentarse anomalías en forma de bandas extrañas, tenues o, incluso, ausentes. Esto podía ocurrir cuando se congelaban y descongelaban los reactivos muchas veces, cuando se había usado el amortiguador a un pH inadecuado o cuando no se tomaron en cuenta variables similares.

## Discusión

Existen muchas variables en la prueba de IEOF y se requiere una meticulosa atención a los detalles si se pretende que la prueba sea eficaz. Al efectuar la prueba convencional, puede variar en muchos aspectos la apariencia de las bandas de precipitinas. Las bandas pueden ser tenues y resultar visibles solo mediante tinción; su número puede variar entre uno y seis;

pueden ser rectas, oblicuas, onduladas o curvadas hacia uno u otro pocillo; también pueden ser precisas y marcadas o (en raras ocasiones, con reactivos débiles) borrosas e indefinidas. Estas variaciones se relacionan con muchos factores; inclusive la precisión con que se recubrieron las placas, la desecación del agar o agarosa después de ese recubrimiento, el grado de *maduración* y el pH del amortiguador, la calidad y temperatura de conservación del antígeno (que se conserva mejor a  $-70^{\circ}\text{C}$  o una temperatura inferior) y la calidad y temperatura de conservación de los antisueros. Esta última temperatura no debe sobrepasar los  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El congelamiento y descongelamiento en repetidas ocasiones tienen un efecto perjudicial. Tanto el antígeno como los antisueros positivos que se usan como reactivos deben distribuirse en pequeñas alícuotas y congelarse. Después de las pruebas, se subdivide el antígeno adecuadamente diluido en alícuotas de 0.3 ml que se conservan a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ciertos antisueros contra la FPA que son reactivos muy poderosos, se subdividen también en alícuotas de 0.5 ml que se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser usadas como antisueros positivos en la prueba. El suero porcino normal se divide del mismo modo en alícuotas que se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  para emplearlas como suero normal testigo.

Antes de comenzar una prueba con cualquiera de los dos sistemas, es preciso que el investigador se familiarice con todo el equipo que usará y que conozca los voltajes y tiempos adecuados que se requieren. Puesto que el equipo simplificado funciona con voltajes inferiores a los generalmente empleados en la prueba convencional, tiene especial importancia establecer el tiempo necesario para la prueba en las condiciones locales. Comprobamos que los fracasos eran frecuentes cuando el voltaje era inferior a 200 V. Con 220 V, por lo general se lograron resultados satisfactorios en 15 minutos; si se prolongaba



el tiempo a 20 ó 25 minutos, algunas veces se obtenían bandas más marcadas.

Con uno u otro sistema, se encontró que diferentes lotes de solución de antígeno tenían características ligeramente distintas. Según nuestra experiencia, el antígeno preparado con células Vero producía menos bandas positivas falsas o ninguna de ellas y mejores bandas de precipitinas auténticas. La dilución del antígeno es muy importante. Cuando se recibe un nuevo lote, antes de realizar la dilución recomendada para la solución madre es conveniente efectuar una titulación en bloque semejante a la que se muestra en el cuadro 1. De esta manera se puede establecer cuál es la dilución óptima para las condiciones del laboratorio local. También es preciso determinar la calidad del agar que se emplee en la prueba de IEOF. Si la agarosa tiene un costo excesivo para un empleo general, se puede conservar una cantidad pequeña con propósitos de comparación. Las pruebas con distintos agares cuidadosamente lavados, comparadas con otras efectuadas con agarosa, indicarán cuáles de esos agares pueden sustituir a esta última sustancia.

También son importantes las condiciones de los sueros que se utilizan para la prueba. Muchos sueros obtenidos en el terreno deben ser sometidos a un proceso de centrifugación para eliminar los eritrocitos, impurezas y bacterias contaminantes de la cápsula. Probablemente sea mejor, como procedimiento de rutina, someter los sueros a una temperatura de 56°C durante 30 minutos para lograr su inactivación.

Al analizar la prueba de IEOF con el personal de los pocos laboratorios que la efectuaban, llegamos a la conclusión de que los resultados poco satisfactorios de dicha prueba generalmente se relacionaban con la falta de precisión en la metodología, cuyos detalles no siempre se encuentran en la literatura disponible. No

obstante, hace poco nos hemos enterado de que con algunos sueros porcinos supeuestamente normales se obtuvieron bandas inmunolectrosmoforéticas que no desaparecieron con el tratamiento salino (13). Es teóricamente posible que cuando se trata de cerdos vacunados con antígenos contra el cólera porcino, preparados con el mismo tipo de cultivo celular empleado para la solución de antígenos contra la FPA, aparezcan en la prueba bandas de precipitinas que no son específicas de los anticuerpos contra la FPA. En consecuencia, es preciso tener los antecedentes de todos los antisueros que se someten a la prueba.

### Observaciones finales

Hemos indicado tres métodos básicos que permiten a un laboratorio efectuar la prueba de IEOF. El primero y más conveniente consiste en comprar y emplear el equipo convencional. El segundo es la construcción u obtención de equipo que incluya una fuente de energía de 500 V y 125 miliamperes, electrodos de platino o carbón, cámaras de vidrio improvisadas con vasos de precipitado o recipientes de tinción, y portaobjetos recubiertos con agar. El tercer método consiste en emplear una línea con un voltaje de 220 V (o una de 110 V con un transformador elevador de voltaje) con nuestro dispositivo simplificado. Para proteger los intereses del gobierno de Estados Unidos de América, hemos solicitado una patente para el dispositivo, pero incitamos a todos los laboratorios que carecen de los medios para efectuar la prueba de IEOF, a construir y probar ese equipo.

Creemos que con este dispositivo simplificado cualquier laboratorio podrá realizar pruebas inmunolectrosmoforéticas de rutina para el diagnóstico con muestras de suero, cuando se sospecha la presencia de FPA. El equipo puede ser armado por cualquier electricista u operador

de radio no profesional y se pueden obtener los materiales en casi todos los laboratorios. No conocemos el número de posibles aplicaciones de este equipo recientemente diseñado ni sugerimos que pueda reemplazar a un equipo más complicado con propósitos de investigación.

Deseamos también señalar que puede resultar peligroso el empleo directo de la corriente de línea. En consecuencia, es muy importante tomar todas las precauciones al probar y usar equipo construido en el lugar. Entre otras cosas, es preciso incorporar un dispositivo de seguridad al diseño y construcción de este u otro rectificador de corriente similar.

## Resumen

Este artículo describe la construcción y funcionamiento de un equipo simplificado para la detección de los anticuerpos contra la fiebre porcina africana (FPA) mediante la inmunoelectroosmoforesis (IEOF).

Se construyó un puente rectificador de onda completa para convertir la corriente alterna de 220 V en otra directa con el mismo voltaje; para eso se emplearon cuatro diodos rectificadores de silicio que

permitían un voltaje máximo de 500 V y una corriente máxima de un ampere. Además de un rectificador de bajo costo, se utilizaron en el sistema portaobjetos o cubiertas de vidrio para diapositivas, revestidas ya fuera con agarosa o agar, y una línea con un voltaje de 220 V o una de 110 V que, mediante un transformador elevador de voltaje alcanzaba los 220 V requeridos. Se agregó un microinterruptor de seguridad.

Se comprobó que con este sistema era posible efectuar pruebas de IEOF en menos tiempo y con voltajes inferiores a los requeridos por los sistemas que emplean fuentes de energía, cámaras y accesorios para matrices de inmunización convencionales para la IEOF. Con las diluciones empleadas para las pruebas convencionales, el equipo simplificado dio resultados casi tan buenos como los de los sistemas de IEOF de fabricación comercial. Además, uno de los agares lavados dio resultados muy semejantes a los obtenidos con la agarosa, sustancia de mayor precio; no obstante, otros agares fueron menos adecuados. El costo total del equipo simplificado no llegó a EUA\$10.00; de este modo, los procedimientos de IEOF descritos son viables y están al alcance de los laboratorios pequeños. ■

## REFERENCIAS

- (1) African swine fever: Why there is concern. *Vet Rec* 103:127, 1978.
- (2) African swine fever-an emerging problem (a statement from Pirbright and Tolworth). *Vet Rec* 103:129, 1978.
- (3) Oropesa, C. Preliminary report on the African swine fever epizootic in Cuba: methods of diagnosis and control. *Bull Off Int Epizoot* 75:1415-1437, 1971.
- (4) Maurer, F. D., R. A. Griesemer y T. C. Jones. African swine fever. En: H. W. Dunne (Ed.), *Diseases of Swine* (2ª edición), Ames, Iowa State University Press, 1965. Págs. 187-212.
- (5) Rabot, L. G. Properties of the Virus of Classical Swine Fever and Differential Diagnosis of Classical and African Swine Fever. Joint Report, Commission of the European Communities, Directorate-General for Agriculture. Luxemburgo, 1971. Pág. 103.
- (6) Hess, W. R. African swine fever. *Virology* 9:1-33, 1971.
- (7) Colgrove, G. S. Diagnosis of African swine fever by fluorescent antibody staining of

- blood films and buffy coat smears. *Bull Epizoot Dis Afr* 17:39-44, 1969.
- (8) DeBoer, C. J., I. C. Pan y W. R. Hess. Immunology of African swine fever. *J Am Vet Med Assoc* 160:528-532, 1972.
- (9) Pan, I. C., C. J. DeBoer y W. P. Heuschle. Hypergammaglobulinemia in swine infected with African swine fever virus (34794). *Proc Soc Exp Biol Med* 134:367-371, 1970.
- (10) Pan, I. C., C. J. DeBoer y W. R. Hess. African swine fever: Application of immunoelectrosmoporesis for detection of antibody. *Can J Comp Med* 36:309-316, 1972.
- (11) Report of the USAHA committee on epizootic attack plans. *J Am Vet Med Assoc* 174(5):449, 1979.
- (12) Ferris, D. H., I. C. Pan, W. R. Hess y A. H. Dardiri. The immunoelectrosmoporesis (IEOP), Agar Gel Diffusion Precipitation (AGDP) and Fluorescent Antibody (FA) Tests for African Swine Fever. Greenport, Nueva York, Plum Island Animal Disease Center, 1973. Microficha No. PIL-M-4.
- (13) Colgrove, G. S. Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Nueva York. Comunicación personal.

### A simplified method for detection of African swine fever antibodies by immunoelectrosmoporesis (Summary)

This article describes the construction and operation of simplified equipment for detection of African swine fever antibodies by immunoelectrosmoporesis (IEOP).

A full-wave bridge rectifier to convert 220-volt alternating current to 220-volt direct current was constructed; four silicone rectifier diodes rated at 500 volts and 1 ampere were used for this purpose. Besides an inexpensive rectifier, the system made use of microscope slides or lantern-slide cover glasses coated with either agarose or agar and either 220-volt line current or 110-volt current and a step-up transformer. A safety microswitch was incorporated into the design.

This system proved capable of performing the IEOP test using less time and lower voltages than systems incorporating conventional IEOP power sources, chambers, and immunoframe accessories. At dilutions used for conventional tests, the simplified equipment performed nearly as well as commercial IEOP systems. Also, one washed agar yielded results nearly as good as those obtained with more expensive agarose, though other agars proved less suitable. The total cost of the simplified equipment was less than US\$10.00, a fact which makes the IEOP procedures described feasible and affordable for small laboratories.

### Método simplificado para a detecção de anticorpos contra a febre porcina africana por meio da imunoelctrosmoforese (Resumo)

Este artigo descreve a construção e funcionamento de um equipamento simplificado para a detecção dos anticorpos contra a febre porcina africana por meio da imunoelctrosmoforese (IEOF).

Construiu-se uma ponte retificadora de onda completa para a conversão da corrente alternada de 220 V a 220 V corrente contínua; usaram-se quatro diodos retificadores de silício à razão de 500 V e um ampere para esse objetivo. Além de um retificador pouco custoso, o sistema aproveitou lâminas de microscó-

pio ou chapas de vista para lanterna mágica revestidas de agarose ou ágar e usando ou uma corrente de 220 ou bem de 110 V e um transformador de intensificação de voltagem. Incorporou-se também um microinterruptor ao plano.

Esse sistema demonstrou sua capacidade de fazer testes de IEOF em menos tempo e com voltagens inferiores comparados com sistemas que empregam fontes de potência ou energia para IEOF de tipo convencional, câmaras, e acessórios com armações especiais para imuni-

zação. Nas diluições usadas para testes convencionais, o equipamento simplificado desempenhou sua função quase tão bem como os sistemas comerciais para IEOF. Observou-se também que uma lavagem do ágar produzia resultados quase tão bons como os obtidos usando agarose mais cara apesar de que outros

tipos de ágar demonstraram ser menos apropriados. O custo total do equipamento simplificado chegou a menos de U.S.\$10.00, fato que confirma a exequibilidade dos procedimentos aqui descritos para IEOF, ao mesmo tempo que provam ser financeiramente possíveis para pequenos laboratórios.

### **Méthode simplifié pour la détection d'anticorps contre la fièvre porcine africaine par immuno-électroosmophorèse (Résumé)**

Cet article décrit la construction et le fonctionnement d'un équipement simplifié pour déceler les anticorps contre la fièvre porcine africaine par immuno-électroosmophorèse (IEOP).

On construisit un pont rectificateur d'onde complète pour convertir un courant alternatif de 220 V à un courant continu de 220 V; on utilisa dans ce but quatre diodes rectificateurs de silicium permettant un voltage maximum de 500 V et un courant maximum de 1 ampère. A part un rectificateur peu coûteux, on utilisa dans le système des porte-objets de microscope ou des couvercles de verre pour projecteur de diapositives revêtus d'agarose ou d'agar et soit une ligne de courant de 220 V soit de 110 V en faisant passer le courant par un transformateur survolteur. On installa un micro-interrupteur de sécurité.

Il fut possible avec ce système d'effectuer des tests IEOP en moins de temps et avec des voltages inférieurs qu'avec les systèmes utilisant des sources d'énergie, chambres et accessoires pour cadres d'immunisation IEOP conventionnels. Avec les dilutions utilisées pour les tests conventionnels, l'équipement simplifié fournissait des résultats presque aussi bons que les systèmes IEOP de fabrication commerciale. De plus, un des agars lavé donna des résultats presque semblables à ceux obtenus avec l'agarose, substance d'un prix supérieur, quoique d'autres agars donnèrent des résultats moins acceptables. Le coût total de l'équipement simplifié fut de moins de 10 dollars américains, fait qui rend le système IEOP décrit réalisable et accessible financièrement pour de petits laboratoires.