

IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS DE LA LENGUA AZUL POR LA TECNICA DE INMUNODIFUSION EN GEL DE AGAR

Rossana Allende S.¹, Gonçala M. Arita², Magnus S. Söndahl¹, Albino Alonso F.¹

RESUMEN

Se preparó un antígeno soluble del virus de la lengua azul (VLA) para ser utilizado en pruebas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Dicho antígeno es grupo específico, y es capaz de detectar anticuerpos inducidos por cualquiera de los 24 serotipos del VLA. Fue producido a partir del VLA serotipo 4 y controlado en IDGA frente a antígenos y sueros de referencia (NVSL, Ames, EUA; LARA, Campinas, Brasil; Veterinary Diagnostic Technology, Inc., EUA) y por la técnica inmunoenzimática (ELISA) con anticuerpo monoclonal 3-17-A3 (IADR, Pirbright, Inglaterra). Todas las pruebas mostraron una reacción de total identidad con los reactivos controles.

INTRODUCCION

La lengua azul (LA) es una enfermedad viral de los rumiantes, transmitida por artrópodos y caracterizada por congestión, edema y hemorragia. El agente etiológico pertenece a la familia *Reoviridae*, género *Orbivirus*, del cual se reconocen 24 serotipos.

La enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo. Afecta principalmente a los ovinos, donde se observa la siguiente sintomatología clínica: inflamación de mucosas digestiva y respiratoria anteriores que proporciona una tonalidad azulada a las mismas. En casos graves puede

evolucionar a ulceraciones, y puede observarse inflamación en las patas y deformaciones fetales. La mortalidad es baja. En las otras especies de rumiantes, generalmente no se observan síntomas clínicos, y pueden actuar como reservorios del virus por largos períodos (2).

DIAGNOSTICO

El aislamiento del virus de la lengua azul (VLA) se hace por inoculación intravenosa de embriones de pollo de 8-12 días de edad con muestras de sangre recolectadas de animales en etapa de viremia.

El diagnóstico serológico (identificación de anticuerpos en el suero) se hace por fijación del complemento (FC), inmunodifusión en gel de agar (IDGA), seroneutralización en células (SN) y recientemente también por la técnica inmunoenzimática (ELISA). Las pruebas de FC, IDGA y ELISA revelan la presencia de anticuerpos grupo específicos de LA.

Actualmente el movimiento de exportación-importación de animales entre diferentes áreas se realiza con el estudio previo de los sueros para detectar la presencia de anticuerpos anti-VLA. Para tal fin, una de las pruebas utilizadas es la IDGA.

La prueba de IDGA detecta anticuerpos en el suero a partir de 10 días postinfección. Los anticuerpos detectados son grupo específicos, es decir, han sido inducidos por cualquiera de los 24 serotipos del VLA. Pueden observarse reacciones cruzadas con sueros de animales que han padecido la enfermedad hemorrágica epizootica del ciervo.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno (Ag): Botellas rolantes con células BHK₂₁, Clon 13 mantenidas en estufa a 37°C fueron inoculadas con VLA serotipo 4 (1) y nuevamente colocadas en estufa a 37°C. Trans-

¹ Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA, HPV/OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA), Caixa Postal 5538, 12100 Campinas, SP, Brasil.

curridas 72 horas se observó efecto citopático, y fueron tratadas con 3% de cloroformo, congeladas, descongeladas y clarificadas por centrifugación a 10.000g durante 30 minutos. Seguidamente fueron inactivadas con 5 mM de etilenimina bina-ria a 26°C durante 24 horas.

A continuación la suspensión de virus inactivada fue concentrada con filtro Amicon de 100.000 NMWL, seguido de una ultracentrifugación durante 2 horas a 200.000 g. Al sobrenadante, que constituye el Ag, se le agrega 0,02% de NaN_3 y se conserva a 4°C en fracciones de 2 ml.

Previo a la titulación, se realizan los controles de especificidad de grupo y se estudia el Ag producido frente a Ags y sueros de referencia. El Ag fue controlado por IDGA con reactivos de referencia de NVSL, Ames, EUA, LARA, Campinas, Brasil, y Veterinary Diagnostic Technology, Inc., EUA; y en ELISA frente al anticuerpo monoclonal específico 3-17-A3, según protocolo de IADR, Pirbright, Inglaterra. Una vez confirmada la especificidad de grupo se procede a la titulación del Ag.

Suero control positivo (SCP): El SCP es una mezcla de sueros de bovinos del estado de Rio de Janeiro, Brasil, positivos a LA por IDGA, los cuales fueron concentrados cuatro veces por precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio. Después se agregó 0,02% de NaN_3 , conservándose a -20°C en fracciones de 2 ml.

Agar al 2%: Se disuelven 20 gramos de agar purificado (Difco) en 1100 ml de agua destilada desmineralizada y se esteriliza a 15 libras de presión durante 15 minutos. Seguidamente se vierte en una bandeja, se deja solidificar, se corta en cubos de aproximadamente 2 cm de lado, se sumergen en agua destilada y se conservan a 4°C, hasta su uso.

Tampón borato (TB): Se prepara 0,05 M de hidróxido de sodio (NaOH), 0,15 M de ácido bórico (H_3BO_3), 1% de NaN_3 , pH 8,6.

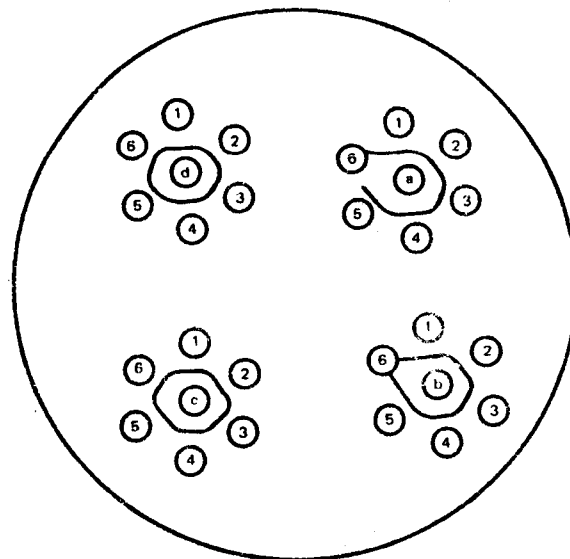
Preparación de placas con agar al 1%: El agar al 2% es mezclado en partes iguales con TB y fundido por calentamiento en baño María. A continuación se vierten 16 ml de la mezcla agar-TB en placas de Petri descartables de plástico o de vidrio de 90 mm de diámetro, las cuales se mantienen semidestapadas a temperatura ambiente (25 a 30°C) durante un mínimo de dos horas, para garantizar una adecuada gelificación del agar. Las placas que

no son usadas inmediatamente pueden conservarse en heladera a 4°C durante una semana.

Las cavidades en el agar son hechas con un molde que tiene siete perforadores dispuestos uno en el centro y seis en la periferia, de 4 mm de diámetro externo cada uno, equidistantes 2 mm entre sí y del central. En cada placa pueden hacerse siete moldes. El agar de las cavidades se extrae por succión con bomba de vacío inmediatamente antes de colocar los reactivos en la placa.

Titulación del Ag y del SCP: Cada partida de Ag y de SCP es titulada para determinar la dilución óptima de uso. El Ag y SCP son diluidos en base 2 (1:1 a 1:8) en TB, y cada dilución de Ag se coloca en las cavidades centrales de cada molde y las diluciones de SCP son depositadas en cuatro cavidades de la periferia. En las dos cavidades restantes de la periferia se coloca un SCP de referencia (Fig. 1). Al depositar los reactivos ha de tenerse la precaución de llenar las cavidades hasta el borde.

FIGURA 1. Titulación de antígeno (Ag) y suero control positivo (SCP) para lengua azul



a, b, c y d = Diluciones de Ag 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8, respectivamente.

1 y 4 = Suero positivo de referencia.

2, 3, 5 y 6 = Diluciones de SCP 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 respectivamente.

Una buena distribución de los mismos se consigue con micropipetas graduadas o con pipetas Pasteur.

Las placas se incuban por 48 horas a temperatura ambiente en una superficie nivelada. Posteriormente se realiza la lectura y se elige las diluciones óptimas de uso que son aquellas que, analizadas conjuntamente, proporcionan la reacción más nítida.

Especificidad y sensibilidad de Ag y SCP: Después de determinar la dilución de uso de cada lote de Ag y SCP, ambos son analizados comparativamente con Ag y SCP padrones, frente a una serie de sueros positivos y negativos de varias especies, con diferente intensidad de reacción, para determinar su especificidad y sensibilidad.

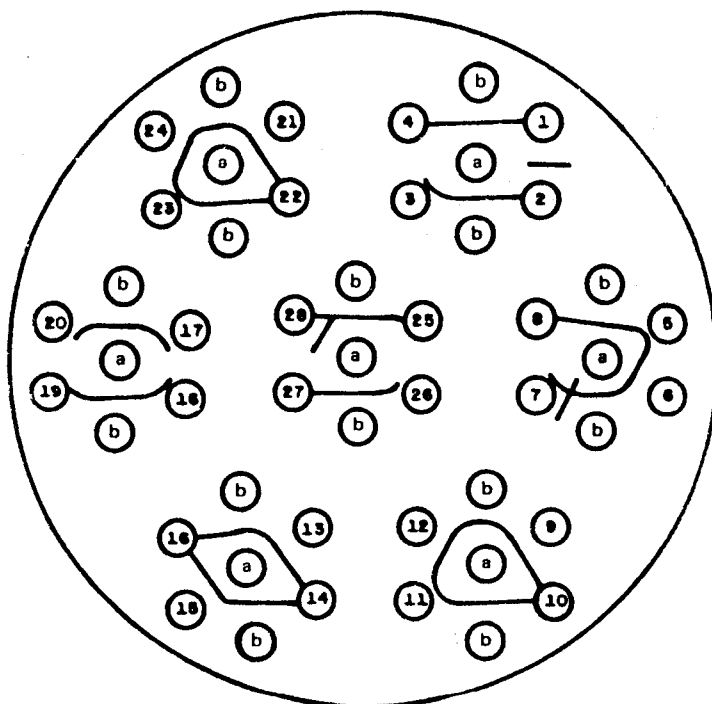
Análisis de sueros: Los sueros a ser examinados, después de registrados y numerados convenientemente, son colocados en las placas debidamente identificadas. La distribución de los sueros

se hace en el sentido de las agujas del reloj en los moldes y en la placa. En cada molde se colocan cuatro sueros sin diluir en cuatro cavidades de la periferia. En las dos restantes se añade el SCP. El Ag es depositado en la cavidad central conforme el esquema indicado en la Fig. 2. Seguidamente, las placas son incubadas a temperatura ambiente en una mesa nivelada.

Lectura de las placas: Las placas se colocan sobre una frente de luz indirecta, con fondo oscuro y la lectura se hace entre 24 y 48 horas después de haber adicionado los reactivos en las placas. En este tiempo las líneas de precipitación son nítidas. Lecturas realizadas después de las 48 horas son difíciles de interpretar, debido a que las líneas se tornan difusas.

A veces, cuando se trabaja con sueros muy hemolizados o que tienen altas concentraciones de lípidos u otras sustancias, aparecen líneas de difusión no específicas, las cuales dificultan la lectu-

FIGURA 2. Distribución de sueros a ser analizados, Ag y SCP en una placa de Petri y reacción de los mismos



a y b = Ag y SCP respectivamente.
1 a 28 = Sueros en estudio.

CUADRO 1. Interpretación de las reacciones proporcionadas por los sueros analizados en la Fig. 2.

Nº suero	Result.	Nº suero	Result.
1	-	15	++
2	-	16	-
3	+	17	+
4	-	18	+
5	+	19	?
6	++	20	+
7	+	21	++
8	-	22	-
9	++	23	+
10	-	24	++
11	+	25	?
12	++	26	+
13	++	27	-
14	-	28	-

- negativo, + positivo,
++ positivo intenso, ? dudoso.

ra. Este inconveniente puede subsanarse lavando el agar con solución fisiológica 10x antes de hacer la lectura.

RESULTADOS

Todos los sueros a ser examinados están contiguos al SCP, lo que permite observar si las líneas de precipitación originadas mantienen la identidad con la del SCP. Ha de tenerse presente que algunos sueros dan líneas o reacciones de no identidad o inespecíficas para el Ag de la LA, siendo aquellas que cruzan o tocan la línea de precipitación específica originada por el Ag y SCP de la LA (ver Fig. 2 y Cuadro 1):

a) **Suero negativo (-)**: Son aquellos en la línea de referencia, es decir, la originada por el Ag y el SCP, entra en la cavidad del suero en estudio.

b) **Suero positivo (+)**: La línea de referencia presenta una pequeña curvatura próxima al suero en estudio.

c) **Suero positivo intenso (++)**: La situación y apariencia de la línea de precipitación originada por el suero en estudio son similares en intensidad a la del SCP.

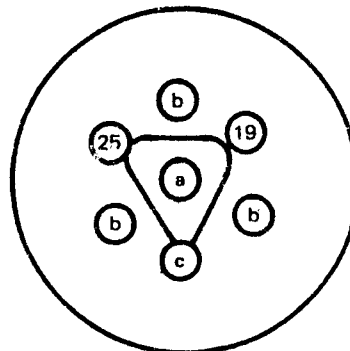
d) **Suero dudoso (?)**: Los sueros que por cualquier motivo no pueden encuadrarse como -, + o ++ son reexaminados usando el siguiente procedimiento:

Repetición de los sueros dudosos. Los sueros son analizados nuevamente por IDGA, colocando el SCP en tres cavidades alternadas de la periferia, en dos restantes los sueros dudosos y en la tercera un suero negativo. De esta manera se observa la reacción en las dos líneas de referencia contiguas y en comparación con el suero negativo (ver Fig. 3).

La interpretación se hace de la manera indicada en el apartado anterior.

Con los sueros que nuevamente no permiten ser catalogados en la categoría + o - es aconsejable repetir la prueba con una nueva muestra de suero.

FIGURA 3. Análisis de sueros que proporcionaron resultados dudosos en la prueba mostrada en la Fig. 2 (sueros N° 19 y 25)



a y b = Ag y SCP respectivamente.

c = Suero control negativo.

19 y 25 = Sueros en estudio (19+ y 25?).

Pedir nueva muestra suero N° 25.

REFERENCIAS

1. GROOCCOCK, C.M., CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. S. Comp. Med.*, 46:160-164, 1982.
2. OBDEYN, I.M. Bluetongue. A review of the disease. Rio de Janeiro, Pan American Foot-and-Mouth Disease Center, 1987. (*Scien. Tech. Monog.*, 16).