Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

ISSN 0101–5296

SERIE DE MANUALES DIDACTICOS
Nº 15

MANUAL DE DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES VESICULARES

organización panamericana de la salud
oficina sanitaria panamericana, oficina regional
de la organización mundial de la salud

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (OPS/OMS)
Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

1 9 8 6

MANUAL DE DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES VESICULARES

A. ALONSO FERNÁNDEZ[1]

1 9 8 6

[1] JEFE DEL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA, CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (CPFA/OPS), CAIXA POSTAL 589, 20001 RIO DE JANEIRO, RJ, BRASIL.

CONTENIDO

Pag.

INTRODUCCION 7

1. ESTRUCTURA DEL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES VESICULARES EN AMERICA DEL SUR 9

1.1 Laboratorios Nacionales de Diagnóstico 9
1.2 Laboratorio de Referencia para las Américas (CPFA/OPS, Rio de Janeiro, Brasil) 9
1.3 Laboratorio Mundial de Referencia (LMR, AVRI, Pirbright, Inglaterra). 11

2. COLECTA, PREPARACION Y ENVIO DE MUESTRAS AL LABORATORIO . . . 11

2.1 Recolección de muestras 11
2.2 Preparación de muestras 12
2.3 Envío de muestras al Laboratorio 12

3. REGISTRO DE LABORATORIO 13

4. TECNICAS DE DIAGNOSTICO 13

4.1 Fijación del complemento 50% 13
4.1.1 Antígeno 13
4.1.2 Sueros hiperinmunes 14
4.1.3 Complemento 17
4.1.4 Sistema hemolítico 17
4.1.5 Exigencia complementaria del antígeno 19
4.1.6 Tipificación por FC_{50} 20
4.1.7 Titulación por FC_{50} 20
4.1.8 Subtipificación por FC_{50} 21
4.1.9 Relaciones (r) y parentesco (R) serológicos por FC_{50} . 21

4.2 Seroneutralización en microplacas 21

4.2.1 Principios 21
4.2.2 Células 22
4.2.3 Virus 22
4.2.4 Sueros 22
4.2.5 Mezcla suero-virus 22
4.2.6 Inoculación de las microplacas 22
4.2.7 Controles 22
4.2.8 Lecturas 23
4.2.9 Cálculo del título neutralizante 23
4.2.10 Interpretación 23

4.3 Seroprotección en ratones lactantes 23

4.3.1 Principios 23
4.3.2 Ratones 23
4.3.3 Virus 23
4.3.4 Inoculación del suero 24

Pág.

4.3 Seroprotección en ratones lactantes (Cont.)

4.3.5 Diluciones del virus 24
4.3.6 Inoculación del virus 24
4.3.7 Controles 25
4.3.8 Lectura de las titulaciones 25
4.3.9 Cálculo de las DL_{50} 25
4.3.10 Resultados 25
4.3.11 Interpretación 25

4.4 Clasificación del virus de la FA y EV 25

4.4.1 Preparación del cepario 26
4.4.2 Identificación de nuevas cepas 27

4.5 Inmunodifusión en gel de agar para identificar anticuerpos de EV 27

4.5.1 Antígeno 27

4.6 Procesamiento del material esofágico-faríngeo (EF) 28

4.6.1 Obtención del material EF 28
4.6.2 Procesamiento en el laboratorio 28

ANEXOS 29

1. Ecosistemas de fiebre aftosa. América del Sur-1984 31
2. Laboratorios oficiales de diagnóstico de las enfermedades vesiculares. América del Sur, 1984 33
3. Tampón de glicerina fosfatada (TGF) 35
4. Etiqueta para enviar materiales al CPFA 36
5. Informe epidemiológico 37
6. Antígenos 38
7. Sueros 39
8. Medio de Earle 40
9. Tampón Barbital 41
10. Titulación de complemento 50% 42
11. Solución de Alsever 43
12. Preparación de sistemas hemolíticos para titulación de hemolisina 44
13. Exigencias complementarias 45
14. Tipificación por FC_{50} en tubos de Kahn (volumen en ml) . . 46
15. Simposio Internacional sobre Fiebre Aftosa. Variantes e Inmunidad. 47

16 y 17. Medio de Eagle 49

INTRODUCCION

La imposibilidad de hacer un diagnóstico diferencial de las enfermedades vesiculares, fiebre aftosa (FA), estomatitis vesicular (EV) y enfermedad vesicular del cerdo (EVC), a partir de la sintomatología en los animales enfermos, exige que la identificación de estas enfermedades y la confirmación diagnóstica se realicen en el laboratorio.

El hecho de que la FA y la EV sean causadas por varios tipos de virus, sólo diferenciables por pruebas de laboratorio, hace aún más necesaria la confirmación de laboratorio.

La alta contagiosidad de estas enfermedades, principalmente la FA, unida a la elevada capacidad de variación del virus, a los diferentes ecosistemas de la enfermedad en los países afectados (Anexo 1) y a la existencia de muchas áreas en el continente, y hasta países libres de las enfermedades vesiculares, imponen la necesidad de un diagnóstico rápido y seguro.

La actividad de diagnóstico es realizada por muchos laboratorios, los cuales usan diferentes metodologías y técnicas de diagnóstico. Una excepción es la Red de Laboratorios de Diagnóstico de las Enfermedades Vesiculares de América del Sur (Anexo 2). Por otra parte, la relativa complejidad de la clasificación de los virus y el apoyo que los laboratorios deben proporcionar a las diferentes campañas de prevención, control y erradicación de estas enfermedades, con énfasis en la FA, imponen la necesidad de una padronización de la metodología usada en los diferentes laboratorios dedicados al diagnóstico de las enfermedades vesiculares. Este Manual de Diagnóstico de Laboratorio de las Enfermedades Vesiculares pretende satisfacer los aspectos discutidos anteriormente.

Se llama la atención para el hecho de que la actividad de diagnóstico del laboratorio está íntimamente ligada a la vigilancia epidemiológica y es su soporte. Por tanto, la eficacia en detectar inmediatamente los focos de campo, en recolectar muestras de buena calidad e impedir la difusión de la enfermedad es primordial para el diagnóstico de laboratorio y para el buen funcionamiento de los diferentes programas.

1. ESTRUCTURA DEL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES VESICULARES EN AMERICA DEL SUR

La estructura del diagnóstico de las enfermedades vesiculares en América del Sur consta de tres escalones: Laboratorios Nacionales de Diagnóstico, Laboratorio de Referencia para las Américas y Laboratorio Mundial de Referencia (LMR).

1.1 Laboratorios Nacionales de Diagnóstico

La red de Laboratorios Nacionales de Diagnóstico de las Enfermedades Vesiculares en América del Sur (Anexo 2) recibe las muestras de campo y es la responsable por la identificación y caracterización, a nivel nacional de los virus causantes de las enfermedades vesiculares. Los laboratorios están en condiciones de identificar los virus de FA, EV y EVC. También pueden determinar el nivel de anticuerpos en sueros de animales afectados por las enfermedades y tipos de virus identificados en el país.

Estos laboratorios de diagnóstico tienen condiciones para:

a) aislar virus por inoculación de ratones y/o cultivos celulares;

b) caracterizar antigénicamente los virus por medio de la fijación del complemento 50% (FC_{50}). Algunos están incorporando la técnica de ELISA, y

c) identificar y determinar niveles de anticuerpos por la inmunodifusión en gel de agar, la seroprotección y/o la seroneutralización.

Las muestras de virus de campo con características antigénicas diferentes a las identificadas habitualmente y que tienen importancia epidemiológica son eviadas al Laboratorio de Referencia para las Américas, es decir al CPFA.

El Laboratorio de Referencia para las Américas proporciona sistemáticamente y de forma gratuita los sueros hiperinmunes y otros reactivos de EVC y de todos los tipos de FA y EV, incluyendo sueros de las cepas de importancia epidemiológica de la región.

1.2 Laboratorio de Referencia para las Américas (CPFA/OPS, Rio de Janeiro, Brasil)

Como Laboratorio de Referencia regional debe completar, en América, el estudio de los virus de las enfermedades vesiculares enviados por los Laboratorios Nacionales de Diagnóstico. Para ejercer esta actividad debe disponer de una metodología apurada y tener una amplia gama de técnicas que permitan el trabajo de referencia.

Ejerce las siguientes funciones:

1.2.1 Mantener el cepario de los virus de la FA y EV aislados en la región y otros de fuera de ella que sean de interés político o comercial para América. En la actualidad está constituido por más de 200 cepas, de las que se dispone los siguientes materiales:

a) virus de la especie en que se presentó la enfermedad en el campo (bovino, equino, porcino, etc.);

b) virus adaptado a cobayo y cultivos celulares. Algunas cepas están, además, adaptadas a ovino, porcino, ratón, etc.;

c) sueros hiperinmunes preparados en cobayos con todas las cepas del cepario;

d) sueros de bovinos vacunados y revacunados con las cepas de virus usadas en América del Sur para la elaboración de vacunas, y

e) virus y sueros hiperinmunes de otras regiones que interesan a América.

1.2.2 Caracterizar antigénica, inmunogénica y bioquímicamente de las cepas de importancia epidemiológica en la región.

1.2.3 Estandarizar la metodología y actualizar a los responsables por la actividad de diagnóstico de la red de laboratorios nacionales mediante:

a) adiestramiento en servicio continuo;

b) cursos anuales de tres meses de duración;

c) seminarios cada tres años, y

d) preparación de manuales técnicos.

1.2.4 Proveer a la red de laboratorios nacionales los reactivos de referencia de las cepas clásicas y de las nuevas variantes para facilitar y acelerar la identificación y caracterización de las cepas de campo.

1.2.5 Enviar al LMR virus, sueros hiperinmunes y estudios pertinentes de las nuevas variantes identificadas en la región y que tengan expresión epidemiológica.

1.2.6 Colaborar en la ejecución de trabajos entre países del área o fuera de ella que envuelvan estudios relacionados con el diagnóstico de las enfermedades vesiculares de virus identificados en la región.

1.2.7 Actuar como Laboratorio de Diagnóstico para los países de la región libres de FA y para cualquier uno de la red de laboratorios de diagnóstico de la región que lo requiera.

1.2.8 Informar sobre la distribución geográrica de las enfermedades vesiculares en la región, indicando la presencia de las enfermedades, de tipo y de subtipos.

1.2.9 Asesorar a los gobiernos de los países de la región en todo lo relacionado con la actividad de diagnóstico de las enfermedades vesiculares y sus implicaciones.

1.3 Laboratorio Mundial de Referencia (LMR, AVRI, Pirbright, Inglaterra)

Como Laboratorio Mundial de Referencia debe completar el estudio de las cepas a nivel mundial, para lo que debe disponer de una estructura que garantice esa actividad.

Ejerce las siguientes funciones:

1.3.1 Informar sobre la situación mundial del diagnóstico de la FA indicando la distribución geográfica de los tipos y subtipos de la enfermedad.

1.3.2 Dictar normas para el diagnóstico y la clasificación del virus de la FA.

1.3.3 Clasificar los virus de la FA e informar de los resultados de esos estudios.

1.3.4 Orientar a los Laboratorios Regionales de Referencia en el trabajo de clasificación de virus.

1.3.5 Proporcionar reactivos de referencia a los Laboratorios Regionales de Referencia, incluyendo sueros y antígenos de los tipos exóticos de cada región.

1.3.6 Mantener actualizado el cepario mundial.

2. COLECTA, PREPARACION Y ENVIO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

2.1 Recolección de muestras

Para efectos de diagnóstico de las enfermedades vesiculares, tienen prioridad las muestras de epitelio lingual, podal, mamario, etc. del animal enfermo. En su defecto deberá recogerse material esofágico-faríngeo (EF). De no conseguirse las muestras indicadas anteriormente, se recolectarán muestras de suero de animales convalecientes.

Cuando se trata de un área libre de la enfermedad, una única sangría de varios animales es suficiente. Cuando se trata de áreas endémicas o esporádicas, pero sometidas a vacunaciones sistemáticas, deben recolectarse muestras de suero, y los mismos animales entre dos y cuatro semanas más tarde serán nuevamente sangrados. Las diferentes muestras de

epitelio, EF o suero de cada animal serán enviadas al laboratorio en frascos separados.

Los tejidos epiteliales deberán ser extraídos de una o más vesículas frescas y depositados en frascos de boca ancha provistos de tapa de rosca, que contengan tampón de glicerina fosfatada (TGF) (Anexo 3) en suficiente cantidad para que el epitelio quede sumergido. Los frascos serán cerrados con esparadrapo o lacre y tendrán una etiqueta que contenga las siguientes informaciones:

a) propiedad, lugar de recolección de la muestra, estado o provincia y país;

b) especie, edad y sexo;

c) tipo de material recolectado, y

d) fecha de la extracción.

Esta información también debe acompañar a las demás muestras (EF, suero, etc.).

2.2 Preparación de muestras

Seguidamente, los frascos serán sumergidos en una solución alcalina o ácida fuerte, posteriormente en agua limpia.

A continuación deben ser acomodados adecuadamente en un recipiente de pared consistente, envolviéndolos en algodón u otro material absorbente y dentro de una bolsa de plástico para prevenir daños, posibles roturas y dispersión de su contenido.

Este pequeño recipiente con las muestras debe ser adecuadamente inmovilizado en otro recipiente mayor, en el que se colocará la fuente de frío (hielo común, seco, substancias refrigerantes, etc.) acomodadas de tal manera que no se vierta su contenido.

Todo esto debe ser nuevamente inmovilizado adecuadamente para evitar que se deterioren las muestras.

2.3 Envío de muestras al laboratorio

Antes del envío al laboratorio los recipientes, interno y externo, serán desinfectados con una solución alcalina o ácida fuerte.

El recipiente externo tendrá una etiqueta con la dirección del CPFA (Anexo 4). Además se escribirán las siguientes palabras:

MUESTRA BIOLOGICA PERECIBLE - ENTREGA PREFERENCIAL
URGENTE - SIN VALOR COMERCIAL - FRAGIL

BIOLOGICAL SPECIMEN - PERISHABLE - URGENT
NO COMMERCIAL VALUE - FRAGILE

Cada envío estará acompañado del respectivo informe epidemiológico (Anexo 5).

El envío se hará utilizando el medio de transporte más rápido y seguro.

El laboratorio de diagnóstico será informado inmediatamente de los detalles del envío, por teléfono y/o telex.

3. REGISTRO EN EL LABORATORIO

El laboratorio de diagnóstico dispondrá de un esquema capaz de identificar y retirar material recibido, independientemente de haber sido o no avisado con antecedencia del envío, de los lugares donde habitualmente llegan las muestras (aeropuertos, estaciones de ómnibus, tren, etc.).

Los recipientes que contienen material para el laboratorio serán abiertos y manipulados en cámaras de flujo laminar.

Las muestras serán registradas en un libro específico para ese fin y recibirán un número de orden cronológico, se evaluará su calidad y se determinarán los análisis a los que serán sometidas (Anexos 6 y 7).

4. TECNICAS DE DIAGNOSTICO

Se describen las siguientes técnicas: fijación del complemento 50% (FC_{50}), seroneutralización en microplacas (SN), seroprotección en ratones lactantes (SP), clasificación de virus de la FA y EV, inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y material esofágico-faríngeo.

4.1 Fijación del complemento 50%

La realización de una prueba de FC_{50} requiere el uso de antígeno (Ag), suero hiperinmune (Sh), complemento (C) y sistema hemolítico (SH).

4.1.1 Antígeno

Pueden ser muestras epiteliales, cultivos celulares o tejidos de pequeños animales de laboratorio; normalmente se usan ratones muertos después de haber sido inoculados con virus de las enfermedades vesiculares. Todos ellos tendrán una etiqueta indicando el número cronológico, el tipo de material, número de pasaje, dilución y fecha de preparación.

4.1.1.1 Antígenos de muestras epiteliales: Las muestras epiteliales al igual que todos los demás antígenos serán manipulados, siempre que sea posible, en cámaras de flujo laminar.

a) los tejidos epiteliales de cada muestra se depositarán en un mortero refrigerado, lavándose con solución salina, fraccionándose de ser posible. Una parte será guardada en TGF de -20 a -70°C para estudios eventuales, y otra será procesada para estudios inmediatos.

b) Pesar.

c) Triturar con arena o vidrio molido estéril.

d) Agregar medio de Earle (Anexo 8) hasta alcanzar la dilución 1:5. Cuando la cantidad de material es insuficiente se añadirá la cantidad de Earle necesaria para realizar el trabajo (FC_{50} y/o inoculación), anotando la dilución aproximada preparada.

e) Fraccionar la suspensión de antígeno en dos alícuotas. Una será tratada con 20% de cloroformo para ser usada en pruebas de FC_{50} y la otra de aproximadamente un ml, será reservada para pruebas biológicas (inoculación de cultivos celulares o pequeños animales de laboratorio).

El tratamiento con cloroformo tiene la ventaja de que elimina anticomplementaridad de los antígenos. No obstante, tiene el inconveniente de degradar los virus que poseen envelope, eliminando el poder de replicación y disminuyendo la capacidad de fijar el complemento. Todo esto es de suma importancia cuando se manipula virus de la EV.

f) Agitar y congelar las dos muestras indicadas en el paso "e".

g) Descongelar la muestra destinada a FC_{50}, clarificar por centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 2000 g. Recoger el sobrenadante (antígeno) en un tubo de hemólisis (12 x 100 mm).

h) Sumergir todo el material utilizado en la preparación del antígeno en un recipiente con una solución ácida (ácido cítrico 2% + ácido acético glacial 1%), donde permanecerá hasta el día siguiente.

4.1.1.2 Antígeno de cultivos celulares: Los cultivos celulares previamente congelados o no y con o sin tratamiento de cloroformo, son centrifugados en las mismas condiciones indicadas para los antígenos de muestras epiteliales (ver 4.1.1.1). El sobrenadante es colocado en un tubo de hemólisis.

4.1.1.3 Antígeno de pequeños animales de laboratorio: Los ratones, hamsters, etc., desprovistos de piel, patas, cabeza y vísceras son triturados en mortero, siguiendo el mismo esquema y proceso de preparación indicado para las muestras epiteliales.

En el caso de estar trabajando con virus de la EV, se debe considerar que el cerebro es rico en virus, por lo que la masa encefálica debe ser incorporada en la preparación del antígeno. También puede preparse antígeno exclusivo de cerebro.

4.1.2 Sueros hiperinmunes

Para el diagnóstico de los virus de las enfermedades vesiculares se debe utilizar sueros hiperinmunes con el mayor espectro antigénico posible; por este motivo se utilizan los sueros polivalentes, concentrados o monovalentes, conforme indicado en el siguiente cuadro:

Enfermedad Vesicular	Tipo suero hiperinmune	Laboratorio Productor
FA	O Polivalente	CPFA[a]
FA	A Polivalente	CPFA[a]
FA	C Concentrado	CPFA[a]
FA	SAT_1 Monovalente	LMR[b] o PIADC[c]
FA	SAT_2 Monovalente	LMR[b] o PIADC[c]
FA	SAT_3 Monovalente	LMR[b] o PIADC[c]
FA	$Asia_1$ Monovalente	LMR[b] o PIADC[c]
EV	New Jersey Monovalente	CPFA
EV	Indiana-1 Concentrado	CPFA
EVC	EVC Monovalente	LMR o PIADC

[a]CPFA = Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

[b]LMR = Laboratorio Mundial de Referencia.

[c]PIADC = Plum Island Animal Disease Center (Estados Unidos de América).

Los estudios de caracterización antigénica de virus de las enfermedades vesiculares requieren el empleo de sueros monovalentes y en el caso de FA aquellos preparados con antígeno inactivado 140S son preferibles a los elaborados por inoculación e hiperinmunización de los cobayos con virus vivo.

4.1.2.1 Sueros hiperinmunes monovalentes: La metodología usada para la producción de los sueros hiperinmunes es la misma para FA y para EV. En ambos casos se utilizan cobayos de más de 4 meses de edad, preferentemente machos.

El virus, normalmente de origen bovino, es pasado dos veces en células BHK-21, Clon 13, cultivadas en frascos "roller".

Una vez determinada la especificidad de tipo y subtipo y la característica antigénica de la cepa por FC_{50}, la suspensión virulenta es inoculada en 5 cobayos por vía intradermoplantar en las dos patas, a razón de 0,1 ml por pata.

De 24 a 72 horas después de la inoculación se recolecta el epitelio de las vesículas de las patas inoculadas y se prepara un antígeno 1:5 en medio de Earle, y nuevamente se inoculan otros 5 cobayos, igual a como se hizo anteriormente.

Estos pasajes se continúan hasta conseguir lesiones de generalización en las manos, entre 48 y 72 horas después de la inoculación.

El último pasaje en el proceso de adaptación, dependiendo de la importancia del Sh, es inoculado en 20 a 100 cobayos.

Con el material de este pasaje se prepara un antígeno 1:5 en Earle, se agrega 0,1% de saponina, se fracciona en partes iguales en dos frascos y se conserva a -70°C para las hiperinmunizaciones.

Todos los pasajes anteriores, al igual que este último, son analizados por FC_{50} para verificar si conservan las características antigénicas del material original.

Todos los cobayos que presentaron generalización podal, 4 a 6 semanas después, son reinoculados por vía intradermoplantar y subcutánea en una pata, con 0,2 ml de la suspensión de antígeno más saponina preparada anteriormente.

Una semana después los cobayos son inoculados nuevamente en la otra pata y transcurrida una semana más son sangrados por punción intracardíaca.

La mezcla de suero después de inactivado a 56°C durante 30' es tratada con 10% de cloroformo, centrifugada, filtrada en filtros de 0,80 micrón, fraccionada en alícuotas de 3 ml y conservada a -20°C.

4.1.2.2 Sueros hiperinmunes concentrados: Los sueros hiperinmunes concentrados son los mismos sueros monovalentes usados en la dilución que contienen entre 5 y 10 unidades fijadores de complemento 50% (UFC_{50}). Los sueros monovalentes normalmente son usados en la dilución que contiene 3 UFC_{50}. Antes de determinar la dilución de uso de un suero que se desea utilizar más concentrado se debe conocer la especificidad de tipo para asegurar que el suero en la dilución elegida sigue manteniendo la especificidad requerida. Es aconsejable seleccionar los sueros que tienen espectro antigénico más amplio para usar en diluciones más concentradas.

4.1.2.3 Sueros hiperinmunes polivalentes: Una vez seleccionadas de 6 a 10 cepas de virus del tipo que se desea preparar el suero hiperinmune polivalente, eligiendo aquellas con espectros antigénicos que se complementan, se adapta cada una individualmente a cobayo, de igual manera a como se ha indicado para los sueros monovalentes. La diferencia con la preparación de los sueros hiperinmunes monovalentes radica en que las hiperinmunizaciones en los sueros polivalentes se hacen con la mezcla de los antígenos recolectados en el último pasaje de la adaptación. Estas hiperinmunizaciones se realizan de la misma manera y con los mismos intervalos indicados para los sueros monovalentes. Los demás detalles de obtención y conservación son iguales a los descritos anteriormente.

4.1.2.4 Dilución de uso de los Sh: Los sueros hiperinmunes monovalentes y polivalentes son utilizados en la dilución que contiene aproximadamente 3 UFC_{50} obtenidas por titulación frente a diluciones de los antígenos usados en la producción, en presencia de 4 unidades hemolíticas de complemento 50% (UHC_{50}), con tiempos de incubación y de hemólisis de 30' a 37°C. Las diluciones de los sueros y antígenos son hechas en la base 2. La prueba es realizada en tubos de Kahn (12 x 75 mm) y utilizando 0,2 ml de Ag, Sh y C, y 0,4 ml de SH. Todas las diluciones de estos reactivos son realizadas en tampón barbital (TB) (Anexo 9).

4.1.3 Complemento

Es una mezcla de suero fresco de cobayos de preferencia machos de más de cuatro meses de edad. Previamente a la sangría por punción cardíaca son mantenidos durante 24 horas en ayunas.

La mezcla de suero de aproximadamente 30 cobayos es conservada a -70°C, en alícuotas de 5 ml, sin ningún conservador.

4.1.3.1 Determinación de las UHC_{50}:

El complemento es diluido 1:10 (dilución de uso) y 1:100 en TB.

Seguidamente se realiza una doble titulación de acuerdo con el esquema descrito en el Anexo 10.

Transcurridos 30' de incubación a 37°C, los tubos son centrifugados durante 5 minutos a 800 g y se determina la hemólisis por lectura en el espectrofotómetro Coleman Junior Modelo 6A, longitud de onda de 545 mμ y se transforma en porcentaje. Los porcentajes son expresados gráficamente para determinar la cantidad de complemento de 1:100 necesaria para producir el 50% de hemólisis (Anexo 10). Después es transformada en la dilución 1:10. Por tanto, una UHC_{50} representa la cantidad de complemento de la dilución 1:10, necesaria para proporcionar el 50% de hemólisis.

Para calcular diferentes UHC_{50} es necesario tener en cuenta que la titulación del complemento ha sido hecha en 2 ml, por lo que a cada uno de los 5 reactivos que componen la FC le corresponde 0,4 ml. Por tanto, la cantidad de complemento de la dilución 1:10 que porporciona 1 UHC_{50} es depositada en un tubo y es completado el volumen de 0,4 ml con TB.

Si se desea preparar 2, 3, 4, etc. UHC_{50} se deposita dos, tres, cuatro, etc. veces más de C 1:10 y se completa a 0,4 ml con TB.

Si se desea preparar complemento para 100 tubos se coloca 100 veces más de C 1:10 y TB que el determinado para las unidades deseadas anteriormente.

La dilución final de complemento se debe hacer inmediatamente antes de usarla.

El complemento es titulado diariamente y se admite una variación de +/- 0,01 ml (en C 1:100) con relación al valor obtenido en una media de seis titulaciones, realizadas al día siguiente de haber sido preparado el lote.

4.1.4 Sistema hemolítico

4.1.4.1 Glóbulos rojos (GR): Se obtiene por sangría de carneros, mezclando la sangre a partes iguales en solución de Alsever (Anexo 11). Después es fraccionada y conservada a 4°C. Antes de usarla es conveniente dejarla estacionar durante 4 días.

4.1.4.2 Hemolisina (H): Es una mezcla de sueros de conejos que han sido inoculados repetidamente con estroma (membranas de GR) de varios carneros.

El estroma, reconstituido al volumen que tenía la sangre cuando se inició el proceso de su preparación, es inoculado en varios conejos, en la marginal de la oreja, cada tres días, 5 veces, con volúmenes crecientes: 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 y 4,5 ml.

Tres días después de la última inoculación los conejos son sangrados y el suero, una vez inactivado a 56°C durante 30 minutos, es fraccionado en alícuotas de 2 ml y conservado a -20°C.

La dilución de uso de la hemolisina es determinada por titulación. Para tal fin, diluciones base 2 de H en TB, iniciando en 1:1000 son depositadas en volúmenes de 0,2 ml en tubos de Kahn.

Seguidamente se agrega 0,2 ml de una suspensión de glóbulos rojos en TB con una densidad óptica (DO) de 66 y se incuban 30' a 37°C.

A continuación se agregan 0,2 ml con 4 UHC_{50} y se completa el volumen de los tubos de la titulación y de los controles de los reactivos a 1 ml con TB.

Transcurridos 30' de incubación a 37°C, la prueba es centrifugada, leída al espectrofotómetro y se determina la dilución de hemolisina que proporciona el 50% de hemólisis. Para este cálculo se utiliza el método de Spearman-Kärber.

La dilución de uso se obtiene dividiendo por 10 el título 50%. Es decir, se trabaja con 10 unidades hemolíticas 50%.

El título de hemolisina también puede ser determinado por titulación del complemento frente a 10 sistemas hemolíticos preparados con las diluciones 1:400, 1:600, 1:800, 1:1200, 1:1600, 1:2400, 1:3200, 1:4800, 1:6400 y 1:9600. Para tal fin, 5 ml de cada una de estas diluciones son mezclados con 5 ml de una suspensión de GR que tiene una DO de 66 (Anexo 12). Después, con cada sistema hemolítico se hace una titulación de complemento, siguiendo el procedimiento indicado en 4.1.3.1.

El título de uso de la hemolisina se establece representando en un eje de coordenadas el volumen en ml de la dilución 1:100 de complemento que proporciona 1 UHC_{50} y la dilución de hemolisina correspondiente. La dilución de uso es la que corresponde con el último valor de 1 UHC_{50} que permanece en el "plateau" de la curva obtenida en la representación gráfica anterior.

La hemolisina que en la representación gráfica no proporcionó una curva con un nítido "plateau" debe ser deshechada.

4.1.4.3 Preparación de sistema hemolítico

a) Suspensión de GR: Se prepara una suspensión de GR lavados, la cual, en la proporción de 0,2 ml más 0,8 de agua destilada o corriente proporcione una DO de 66 leída en espectrofotómetro, longitud de onda 545 mμ.

La preparación de la suspensión de GR requiere lavarlos tres veces con solución salina y centrifugar a 500 g durante 5 minutos. Un cuarto lavado es realizado con TB. Este tampón es usado para preparar las suspensiones finales de GR.

Para ajustar la suspensión a 66 de DO se utiliza la siguiente fórmula:

$$VF = \frac{VI \times DO}{66}$$

Donde: VF = Volumen final de la suspensión, necesario para que tenga la lectura de 66.

VI = Volumen inicial de la suspensión que se está midiendo.

DO = Densidad óptica de VI.

b) Dilución de H: Se prepara una dilución de hemolisina en el título de uso en TB. El volumen de H será igual al volumen final de la suspensión de GR.

c) Preparación del SH: Para preparar el SH se mezclan y homogeinizan los GR y la dilución de hemolisina y se incuba a 37°C durante 30 minutos para garantizar la unión del antígeno (GR) y de los anticuerpos (H). El SH debe proporcionar una DO de 66 ± 2, en la proporción de 0,4 ml de SH más 0,6 de agua destilada o corriente.

4.1.5 Exigencia complementaria del antígeno

Los antígenos de epitelios frescos y adecuadamente conservados normalmente requieren 4 UHC_{50}. Los de pequeños animales de laboratorio (ratones, hamsters, etc.) y cultivos celulares normalmente necesitan 3 UHC_{50}.

Las muestras de campo con frecuencia no son recolectadas en condiciones ideales e igualmente el envío al laboratorio no es hecho en las condiciones deseadas. Todo eso repercute en las exigencias en complemento de los antígenos preparados con esas muestras.

Las necesidades en complemento se establecen colocando 0,2 ml de cada antígeno en su dilución original, frente a 4 y 6 UHC_{50} contenidas también en 0,2 ml. Seguidamente se añaden 0,2 ml de TB en substitución del Sh. Después de una incubación de 30 minutos a 37°C se colocan 0,4 ml de SH y se incuba nuevamente durante 30' a 37°C.

La lectura de la hemólisis se hace por observación visual en el Baño María a cada 5 minutos a partir del décimo después de haber colocado el SH, según está indicado en el Anexo 13.

Se considera cantidad de complemento adecuada aquella que proporciona más del 90% de hemólisis a los 20' después de haber colocado el SH.

Cuando es muy urgente la obtención del resultado de tipo, es factible hacer la prueba de tipificación por FC_{50} junto con las exigencias complementarias. Para tal fin, se preparan las diluciones 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40 de la muestra epitelial de campo y con cada una se realiza la prueba de tipificación descrita en 4.1.6, usando para todas ellas 4 UHC_{50}.

El criterio para interpretar la prueba es el mismo utilizado en la prueba de tipificación por FC_{50}.

4.1.6 Tipificación por FC_{50}

Los antígenos en la dilución original, 1:5 para los procedentes de muestras epiteliales y pequeños animales de laboratorio, y 1:1 para los cultivos de células, son analizados por FC_{50} según el procedimiento descrito en el Anexo 14.

Normalmente se utiliza el esquema de dos pruebas consecutivas. En la primera son utilizados los sueros hiperinmunes correspondientes a las enfermedades y tipos identificados en la región. Ante resultados negativos y material suficiente se enfrentan a los tipos exóticos y también a suero de la EVC, si es una muestra de porcinos. Cada antígeno es probado frente a las UHC_{50} determinadas en la prueba de exigencias complementarias. En los controles de Sh, C y SH se colocan las UHC_{50} del antígeno menos anticomplementario.

Un antígeno es considerado positivo cuando proporciona el 50% o más de FC_{50}. Los antígenos que presentan una fijación entre el 20 y el 50% son repetidos aumentando el tiempo de incubación a 60 minutos.

En todos los casos la FC_{50} es determinada por lectura en el espectrofotómetro.

Para que la prueba tenga valor, todos los controles deben tener el comportamiento esperado.

4.1.7 Titulación por FC_{50}

Los antígenos que han proporcionado una FC_{50} en la tipificación mayor del 70% son titulados frente al Sh tipo correpondiente, haciendo diluciones base 2 en TB. Los demás detalles son iguales a los indicados en la tipificación.

La FC_{50} se determina por lectura en el espectrofotómetro y el título 50% es establecido por el método de Spearmann-Kärber.

4.1.8 Subtipificación por FC_{50}

Los antígenos, en la dilución que contiene aproximadamente 2,5 UFC_{50}, son enfrentados a los sueros monovalentes correspondientes a los subtipos y cepas del tipo a que pertenece el referido antígeno. Para este propósito, son preferibles los sueros hiperinmunes monovalentes preparados con antígeno inactivado 140S. Los demás detalles son iguales a los indicados en la tipificación.

La selección de los Sh a ser utilizados en la subtipificación de los antígenos se hace de acuerdo con los antecedentes de la región de donde procede el referido antígeno.

Las UHC_{50} y los tiempos de incubación y hemólisis son los mismos que fueron utilizados para ese antígeno, en la titulación (4.1.7).

4.1.9 Relaciones (r) y parentescos (R) serológicos por FC_{50}

Se establece titulando los sueros hiperinmunes en diluciones base 2, frente a los antígenos homólogos y heterólogos, en la dilución que contiene 2,5 UFC_{50}. Los demás detalles de la prueba son los mismos descritos en la prueba de tipificación. Todos los antígenos han sido titulados previamente en presencia de 4 UHC_{50} frente a sus Sh homólogos. Esta cantidad de complemento también es usada en esta prueba.

El título FC_{50} se establece por el método de Spearmann-Kärber.

Las relaciones se calculan aplicando la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\text{Recíproca título Sh frente antígeno heterólogo}}{\text{Recíproca título Sh frente antígeno homólogo}}$$

Los R se calculan aplicando la fórmula:

$$R = 100 \sqrt{r_1 \times r_2}$$

La interpretación de los valores de las r y R para FA están indicados en el Anexo 15. Este criterio también se utiliza para clasificar los virus de la EV.

4.2 Seroneutralización en microplacas

4.2.1 Principios

El título de seroneutralización de un suero está definido por la recíproca de la dilución de dicho suero, expresado en logarítmos de base 10, que protege al 50% de monocamadas de células IBRS-2 frente a $10^2 DI_{50}$ de virus. Por tanto, esa dilución contiene una unidad neutralizante 50% (UN_{50}). La recíproca de esa dilución representa a la vez las unidades nuetralizantes contenidas en 0,1 ml de suero sin diluir.

4.2.2 Células

Células IBRS-2, Clon 17, cultivadas en monocamadas en botellas de Roux, son tratadas con 1% de tripsina a pH 7,7 y después son suspendidas en medio de crecimiento (Anexo 16). La suspensión con 300.000 células por ml es colocada en las cavidades de placas para microprueba (Falcon 3040 o similares), a razón de 0,1 ml por cavidad. Seguidamente las placas, cubiertas con una tapa de vidrio o plástico que permita la circulación del aire, son colocadas en atmósfera húmeda con 5% de CO_2, a 37°C durante 24 horas.

4.2.3 Virus

Las cepas de virus son de origen bovino, con el menor número posible de pasajes en células BHK-21, Clon 13, cultivadas en monocamadas en frascos "roller". En caso de virus de EV también se usan cepas de origen equino.

Las suspensiones virulentas, después de tituladas en microplacas con monocamadas preformadas de células IBRS-2, Clon 17, son fraccionadas en alícuotas de 1 ml y conservadas a -170°C en nitrógeno líquido. Estas suspensiones deben de tener como mínimo las DI_{50} necesarias para realizar las pruebas de seroneutralización.

4.2.4 Sueros

El suero a ser analizado se diluye: si es para prueba de "screening" 1:10 y si es para determinar el título final se prepara las diluciones 1:8, 1:32, 1:128, 1:512 y mayores si es necesario. Como diluyente se utiliza el medio de Eagle de mantenimiento (Anexo 17).

4.2.5 Mezcla suero-virus

A 0,5 ml de cada dilución de suero se agrega 0,5 ml de una suspensión de la cepa de virus deseada que contiene $10^{3,3}DI_{50}$ cc/ml diluido en medio Eagle de mantenimiento. La mezcla suero-virus se incuba a 37°C durante 1 hora.

4.2.6 Inoculación de las microplacas

El medio de crecimiento de las células se elimina invirtiendo las placas y secándolas con papel absorbente. Seguidamente, 0,1 ml de cada dilución de la mezcla suero-virus es colocado en seis cavidades. A continuación se cubren con una tapa de vidrio o plástico y se incuban durante 48 horas a 37°C en estufa húmeda de CO_2.

4.2.7 Controles

Cada prueba de seroneutralización consta de controles de células y de una titulación base 2 de la suspensión de virus utilizado. Además, se incluye una seroneutralización de un suero positivo conocido y de otro negativo.

4.2.8 Lectura

La lectura de las microplacas se realiza a las 48 horas de incubación. Para tal fin, las placas se invierten para eliminar el medio y se sumergen durante 15 minutos en una solución acuosa con 5% de formol y 0,1% de cristal violeta para fijar y teñir las células. Seguidamente se enjuagan en agua corriente y se hace la lectura por observación directa. Las cavidades con la camada de células que no presentan efecto citopático son consideradas protegidas.

4.2.9 Cálculo del título neutralizante

El título neutralizante se calcula a partir de las cavidades protegidas mediante el método de Spearmann-Kärber.

4.2.10 Interpretación

La prueba es válida cuando los controles de células, virus, suero positivo y suero negativo han tenido un comportamiento normal.

Se admite una variación del título de virus de prueba de $\pm 10^{0,3} DI_{50}$.

Los sueros que proporcionan para cualquier cepa de FA y EV un título neutralizante igual o mayor a $10^{1,3}$ (1:20) es positivo para esa cepa.

La conversión de los títulos de seroneutralización (TN) en expectativas porcentuales de protección (EPP) para el virus de la FA está indicada en el Cuadro 1.

4.3 Seroprotección en ratones lactantes

4.3.1 Principios

El índice de seroprotección (ISP) esta definido por la relación: $ISP = \frac{T}{S}$ en la cual T es el título del virus de comprobación en ratones sin suero y S es el título del mismo virus en ratones inoculados con suero.

El ISP representa las dosis letales 50% ratón lactante ($DL_{50}RL$) neutralizadas por 0,1 ml de suero sin diluir inoculado por vía subcutánea en ratones lactantes de 5 a 7 días de edad.

4.3.2 Ratones

Se utilizan ratones lactantes blancos suizos de 5 a 7 días de edad.

4.3.3 Virus

Las cepas de control son de epitelio bovino. También pueden utilizarse suspensiones virulentas pasadas en cultivos de células BHK-21,

CUADRO 1. Expectativas porcentuales de protección (EPP) en bovinos vacunados con vacunas antiaftosa con base en la seroneutralización en microplacas

TN	EPP	TN	EPP	TN	EPP	TN	EPP
0,1	8	1,1	30	2,1	71	3,1	92
0,2	9	1,2	34	2,2	74	3,2	93
0,3	10	1,3	38	2,3	77	3,3	94
0,4	11	1,4	42	2,4	80	3,4	95
0,5	13	1,5	46	2,5	82	3,5	95
0,6	15	1,6	50	2,6	84	3,6	96
0,7	17	1,7	56	2,7	86	3,7	96
0,8	19	1,8	60	2,8	88	3,8	98
0,9	22	1,9	64	2,9	90	3,9	99
1,0	26	2,0	68	3,0	91	4,0	99

TN = Título neutralizante de sueros bovinos obtenidos en microplacas con camadas pre-formadas de células IBRS-2, inoculando 10^2 DI_{50} de virus.

FUENTE: Sutmöller, P., de Freitas Costa, K., Gomes. I. Prueba de seroneutralización por microtécnica: cálculo de la expectativa porcentual de protección. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 39-40*:31-36, 1980.

Clon 13, usando el pasaje más bajo posible. Dichas cepas se conservan a una temperatura de -70°C, o en nitrógeno líquido, en forma de suspensiones monovalentes virulentas fraccionadas. Estas suspensiones deben tener como mínimo las $DL_{50}RL$ necesarias para realizar correctamente la prueba.

4.3.4 Inoculación del suero

Cada suero sin diluir y previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos, es inoculado por vía subcutánea en 24 ratones a la dosis de 0,1 ml por ratón.

4.3.5 Diluciones del virus

Los ratones con suero son inoculados con las diluciones que contienen 10^4, 10^3, 10^2 y 10^1 $DL_{50}RL$/ml y los testigos con las diluciones que tienen 10^3, 10^2, 10^1 y 10^0 $DL_{50}RL$/ml.

4.3.6 Inoculación del virus

Transcurrida una hora, los 24 ratones inoculados con suero son divididos en 4 grupos de 6. Cada grupo es inoculado por vía intraperitoneal con una dilución de virus, a la dosis de 0,05 ml por ratón. A la vez, las suspensiones virulentas preparadas para los testigos son inoculadas cada una en 6 ratones que no han recibido suero. El procedimiento que se sigue para la titulación es igual al que fue descrito en la seroprotección.

4.3.7 Controles

En cada prueba se incluye un suero bovino sin anticuerpos de FA y otro con un ISP entre 1,5 y 3,5.

4.3.8 Lectura de las titulaciones

La prueba es leída diariamente durante 7 días, anotando los ratones muertos y con síntomas de parálisis.

4.3.9 Cálculo de las DL_{50}

Las DL_{50} de las titulaciones en los ratones con y sin suero se calculan según el método de Spearmann-Kärber, a partir de los ratones muertos hasta el séptimo día.

4.3.10 Resultados

El ISP de un suero es la diferencia entre el log DL_{50} de los ratones testigos (T) e inoculados con suero (S), es decir:

$$ISP = \log DL_{50}RL\ T - \log DL_{50}RL\ S$$

4.3.11 Interpretación

Los datos de una prueba sólo son válidos cuando la titulación del virus y los controles de los sueros positivos y negativos han presentado el comportamiento esperado.

Los sueros que proporcionan, para cualquier cepa de FA, un valor de ISP igual o mayor a 1 son positivos para esa cepa.

La conversión de los títulos de ISP en EPP para el virus de la FA está indicada en el Cuadro 2.

4.4. Clasificación de los virus de la FA y EV

En el Simposio Internacional sobre Variantes e Inmunidad realizado en Lyon, Francia, en 1967, el LMR dictó las normas para la clasificación del virus de la FA, las cuales se basaban en la obtención de los parentescos serológicos mediante la FC (Anexo 15). Debido a la dificultad de aplicarlas por la existencia de muchos subtipos, a su vez integrados por varias cepas, nuevamente en el Simposio de Variantes e Inmunidad realizado en 1976, se propuso analizar únicamente las r frente a los diferentes subtipos existentes. Cuando el valor de ambas r era inferior a 0,25 la cepa en estudio era un nuevo subtipo. Además, se indicó que sólo deberían ser clasificadas las cepas con importancia epidemiológica. Las propuestas existentes no han resuelto el problema, ya que no han sido clasificados nuevos subtipos a partir de 1970, cuando se identificó el A_{32} Venezuela/70.

CUADRO 2. Expectativas porcentuales de protección (EPP) en bovinos vacunados con vacunas antiaftosa del índice de seroprotección (ISP)

ISP	EPP	ISP	EPP	ISP	EPP	ISP	EPP
0,0	20	1,0	51	2,0	81	3,0	96
0,1	23	1,1	55	2,1	84	3,1	97
0,2	25	1,2	58	2,2	86	3,2	97
0,3	28	1,3	61	2,3	87	3,3	98
0,4	31	1,4	65	2,4	89	3,4	98
0,5	34	1,5	68	2,5	91	3,5	98
0,6	38	1,6	71	2,6	92	3,6	99
0,7	41	1,7	74	2,7	93	3,7	99
0,8	44	1,8	76	2,8	94	3,8	99
0,9	48	1,9	79	2,9	95	3,9	99

FUENTE: Gomes, I. & Astudillo, V. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 17-18*:9-15, 1975.

El CPFA, como Laboratorio de Referencia para las Américas, juntamente con la red de laboratorios nacionales de diagnóstico (Anexo 2) ha procurado resolver la situación para los países de la región, mediante la aplicación del siguiente procedimiento:

4.4.1 Preparación del cepario

a) Identificar las cepas existentes en el campo y las manipuladas por los laboratorios oficiales y privados de la región.

b) Designar la cepa representativa de cada subtipo reconocido.

c) Elaborar antígenos y sueros hiperinmunes de las cepas de virus relacionados en los dos puntos anteriores para pruebas de FC_{50} y ELISA.

d) Preparar suspensiones virulentas para pruebas de potencia.

e) Obtener los mapas de RNase y T_1 resistentes (mono y bidimensional "Fingerprinting").

f) Mantener actualizado el "Banco de Sueros" de bovinos vacunados y revacunados con vacunas elaboradas con las distintas cepas vacunales usadas en América del Sur.

g) Obtener las relaciones serológicas.

h) Determinar la cobertura inmunológica de las cepas vacunales por seroprotección y/o seroneutralización con sueros del "Banco de Sueros" de bovinos vacunados y revacunados y por pruebas directas.

4.4.2 Identificación de nuevas cepas

a) Recolectar muestras de todos los focos de campo.

b) Caracterizar antigénicamente por subtipificación las muestras de campo.

c) Obtener las relaciones frente a las cepas patrones usadas para preparar vacunas.

d) Establecer la cobertura inmunológica de los sueros del "Banco de Sueros" de bovinos vacunados y revacunados con las cepas vacunales usadas en la región.

e) Información epidemiológica.

f) Cuando la cepa persiste en el campo es incluida en el cepario y se completa todo el trabajo mencionado en el punto 4.4.1. Si la cepa usada en la vacuna proporciona una protección en bovinos revacunados igual o mayor al 75% será encuadrada en el mismo subtipo al que pertenece la cepa vacunal.

4.5 Inmunodifusión en gel de agar para identificar anticuerpos de EV

4.5.1 Antígeno

Para la IDGA el antígeno de cada cepa es elaborado de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Diez litros de una suspensión de virus de EV obtenidos en células BHK-21 cultivadas en frascos "roller", son tratados con 10% de cloroformo y después clarificados por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos.

Seguidamente se añade 0,5 g de DEAE Sephadex A_{50} por litro de suspensión.

Después de sometida a agitación magnética durante 48 horas a 4ºC, la mezcla es transferida a través de un jeringa de 50 ml, en la que previamente se colocó en el fondo una camada de lana de vidrio sobre una tela metálica fina.

Una vez formada la columna de Sephadex, se lava con una solución A (0,15M NaCl y 0,02M Tris, pH 7,6).

Seguidamente se pasa la solución B (1M NaCl y 0,02M Tris, pH 7,6) para liberar el antígeno, el cual, después de precipitado con una solución saturada de sulfato de amonio, es recogido por centrifugación a 8000 g durante 20 minutos.

El sedimento es resuspendido en 10 ml de tampón glicina y clarificado por centrifugación a 3000 g por 20 minutos.

Como suero control positivo se utiliza suero hiperinmune monovalente de cada cepa de EV obtenido en cobayo, inoculándolo por vía intradermoplantar en las patas con una suspensión virulenta de células BHK-21. De cuatro a seis semanas después de la infección los animales son hiperinmunizados dos veces, con intervalo de una semana, por inoculación intradermoplantar y subcutánea, cada vez en una pata, con 0,2 ml de una suspensión de virus adaptado a cobayo al que se le agrega 0,1% de saponina. Una semana después de la última hiperinmunización son sangrados por punción intracardíaca. El suero es inactivado a 56°C durante 30 minutos y conservado a -20°C.

Las diluciones de uso del antígeno, del suero control positivo y de los sueros para diagnóstico son establecidas, analizadas e interpretadas por IDGA de acuerdo con el procedimiento utilizado para identificar anticuerpos anti-VIA de la FA (Alonso Fernández, A.; Söndahl, M.S.; Giacometti, H. y Ferreira, María E.V. - Identificación de anticuerpos por VIA de la fiebre aftosa. Ser. Man. Técn. Nº 6. CPFA, 1984).

4.6 Procesamiento del material esofágico-faríngeo (EF)

4.6.1 Obtención del material EF

El raspado EF es obtenido al introducir el colector en la faringe del animal y es vertido en un frasco al que se coloca un volumen igual de medio de Eagle tratado con antibióticos y fungizón. Este material es enviado congelado o refrigerado, lo más rápido posible, al laboratorio.

4.6.2 Procesamiento en el laboratorio

Caso no lo haya sido previamente, al llegar al laboratorio el material es congelado, descongelado y clarificado por centrifugación a 2000 g por 10 minutos. Seguidamente, para identificación de virus de la FA, es tratado con trifluortricloroetano (TTE) en una proporción del 70%. La suspensión es homogeneizada en Omni-Mixer o en un vaso de liquidificador durante 1 minuto a 10.000 rpm.

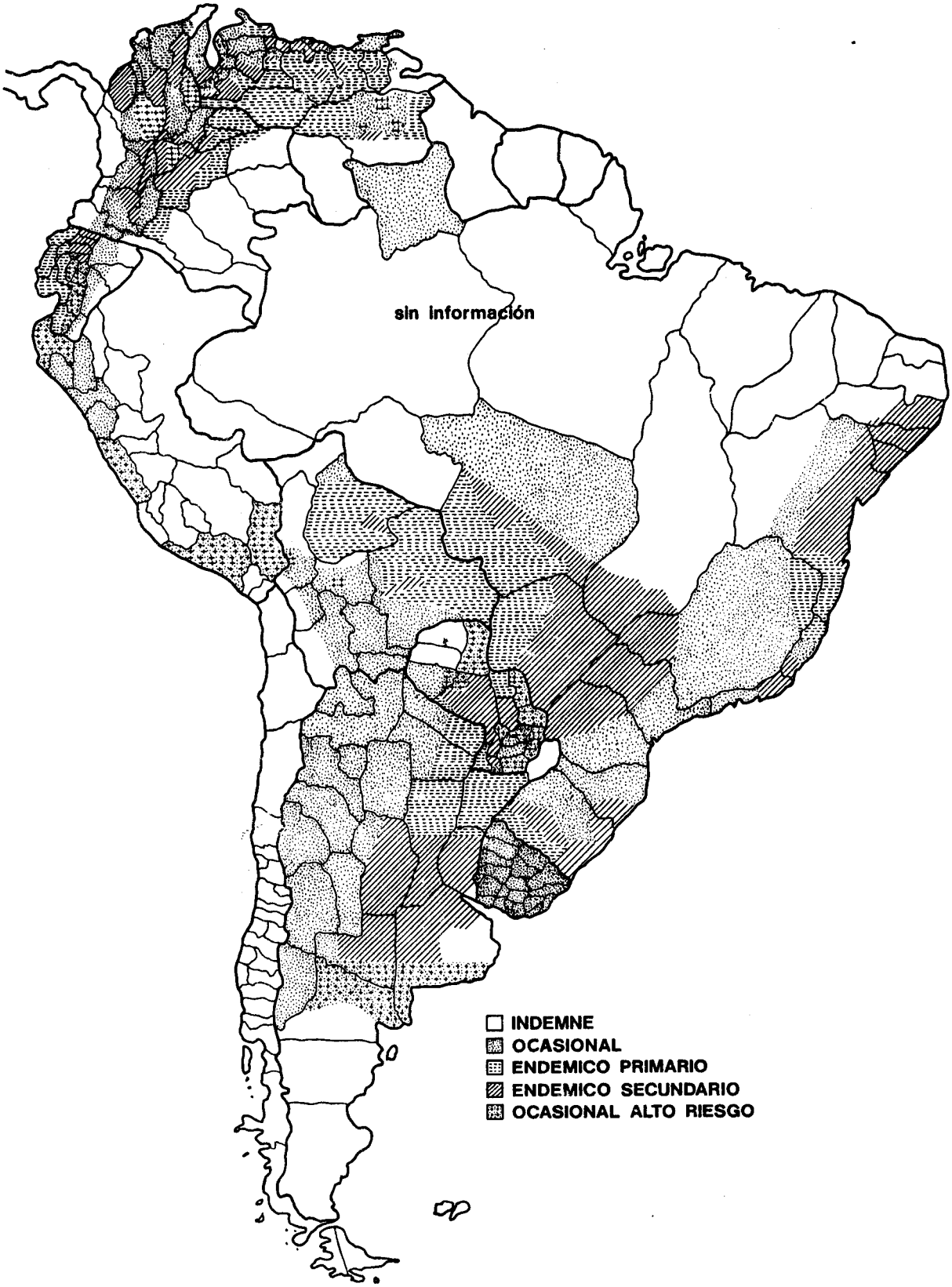
La parte acuosa es inoculada en células de BHK o IBRS-2 cultivadas en botellas "Roller", Roux o Milk, a razón de 8, 8 y 5 ml de suspensión respectivamente. En su defecto pueden inocularse no menos de 24 ratones lactantes con 0,1 ml por vía intraperitoneal.

Los pasajes en cultivos celulares y/o ratones lactantes muertos son tipificados por FC. En caso positivo son subtipificados. Cuando son negativos se realiza un nuevo pasaje.

Una muestra de material EF es considerada negativa cuando no presenta efecto citopático después de tres pasajes en cultivos de células y también es negativa en FC.

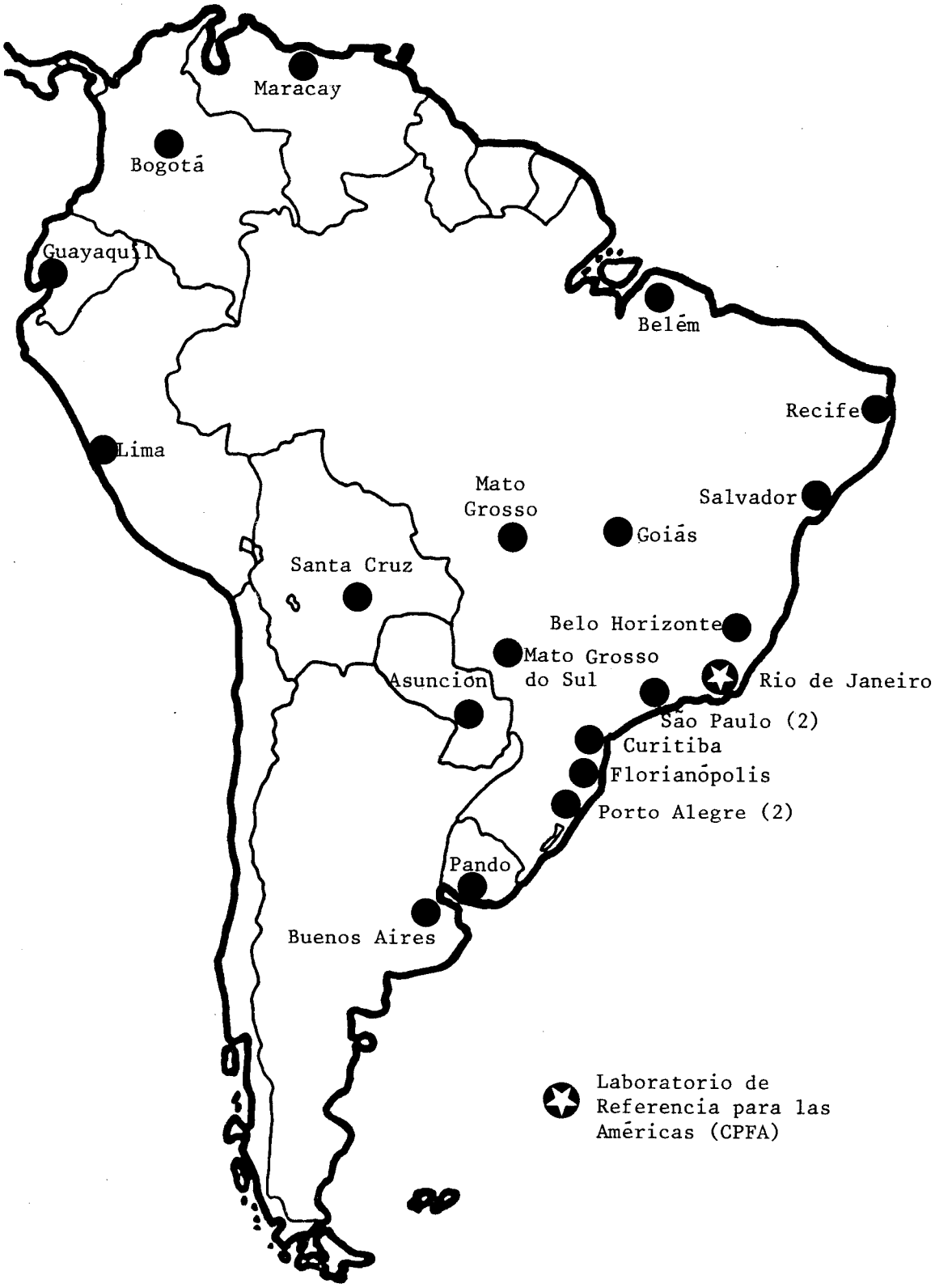
A N E X O S

ECOSISTEMAS DE FIEBRE AFTOSA
AMERICA DEL SUR — 1984



ANEXO 2.

LABORATORIOS OFICIALES DE DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES VESICULARES. AMERICA DEL SUR, 1984



ANEXO 3.

TAMPON DE GLICERINA FOSFATADA (TGF)*

1. Fórmula

Fosfato potásico monobásico ($KH_2 PO_4$)	1,80 g
Fosfato potásico dibásico ($K_2 H PO_4$)	2,30 g
Agua destilada	1.000 ml

2. Añadir a esta solución igual cantidad de glicerina neutra.

3. Agregar 2 ml de rojo fenol al 1%.

4. Este TGF normalmente tiene un pH entre 7,4 y 7,8. Si el pH es más alto, se debe añadir más $KH_2 PO_4$.

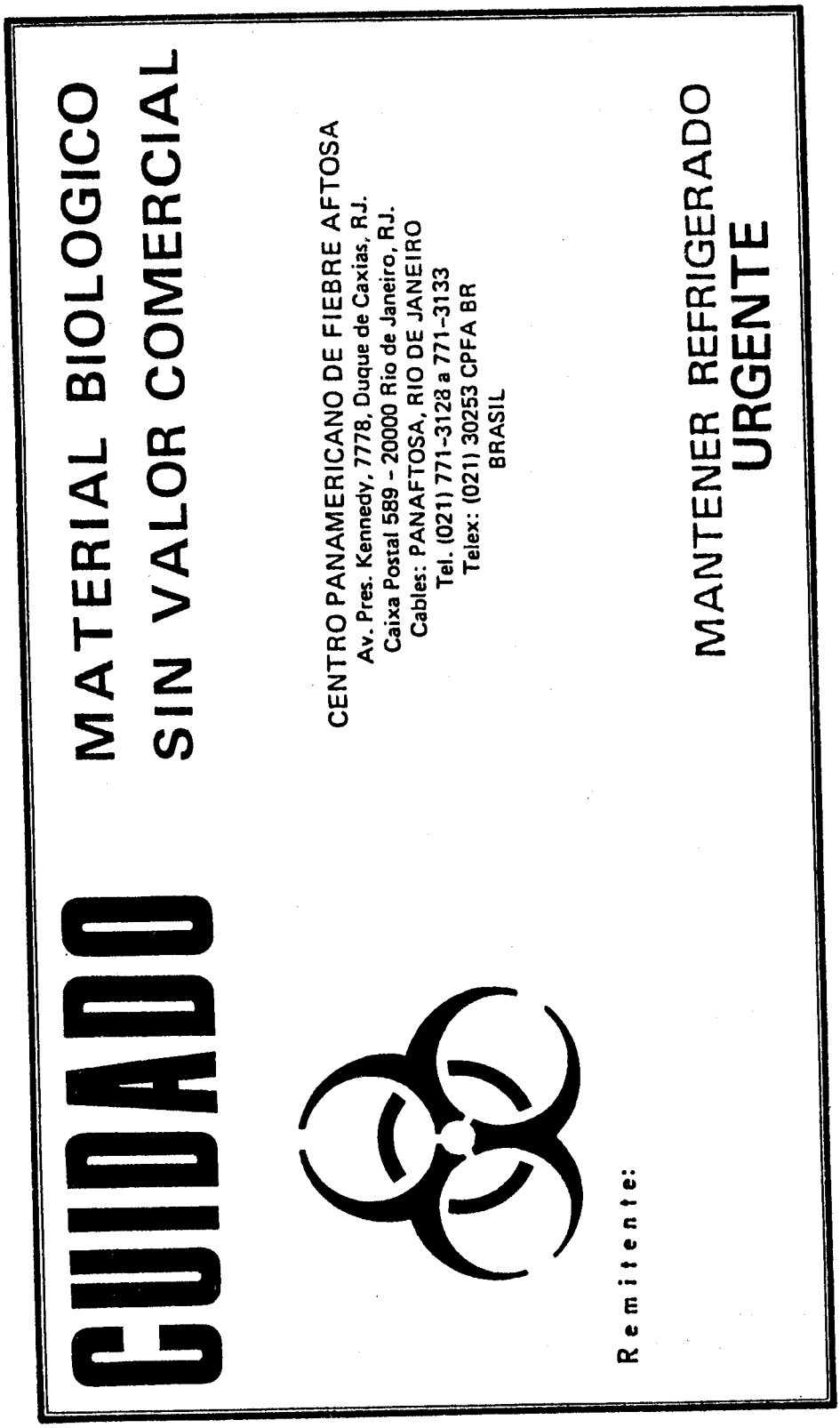
Esta fórmula puede reemplazarse por otra glicerina fosfatada que tenga el pH entre 7,4 y 7,8.

---

*El TGF es recomendado para conservar tejidos con virus.

ANEXO 4.

ETIQUETA PARA ENVIAR MATERIALES AL CPFA



INFORME EPIDEMIOLOGICO

INFORME EPIDEMIOLOGICO	Nombre del veterinario	Fecha del informe	Fecha observada por el propietario	Fecha de la investigación	Fecha del primer informe al Coordinador General

Nombre y dirección del propietario de los animales	Nombre y dirección del propietario del establecimiento

Ubicación del establecimiento	Cuartel/Distrito	Munic./Parroquia/Región	Distancia de la ciudad más cercana	Informante:

Descripción del examen de los animales

ESPECIES	ANIMALES						LESIONES										
	Número total	AFECTADOS			NUMERO		BOCA				PATA				UBRES		Tiempo de la lesión
		Número	Edad	Temperatura	Muertos	Restablecidos	Vesicular		Necrótic.		Vesicular		Necrótic.				
							Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	
Vacunos																	
Cerdos																	
Caballos																	
Ovejas																	
Cabras																	
Otras (especific.)																	

Otras lesiones	Diagnóstico presuntivo

Fecha de inicio de la infección

Origen de los animales afectados	Fecha de adquisición
Medio de transporte	
Origen de los animales recientemente adquiridos	Fecha de adquisición
Medio de transporte	

Detalle de las posibles fuentes de infección

Datos sobre diseminación para el control de la enfermedad

Detalle de todos los animales y subproductos de origen animal, desechos alimenticios (que puedan haberse contaminado) sacados del establecimiento durante las tres semanas anteriores a los síntomas iniciales

Posible diseminación por vectores u otros medios, por ejemplo predios vecinos, pasturas, vehículos, predadores, pájaros, roedores, etc.

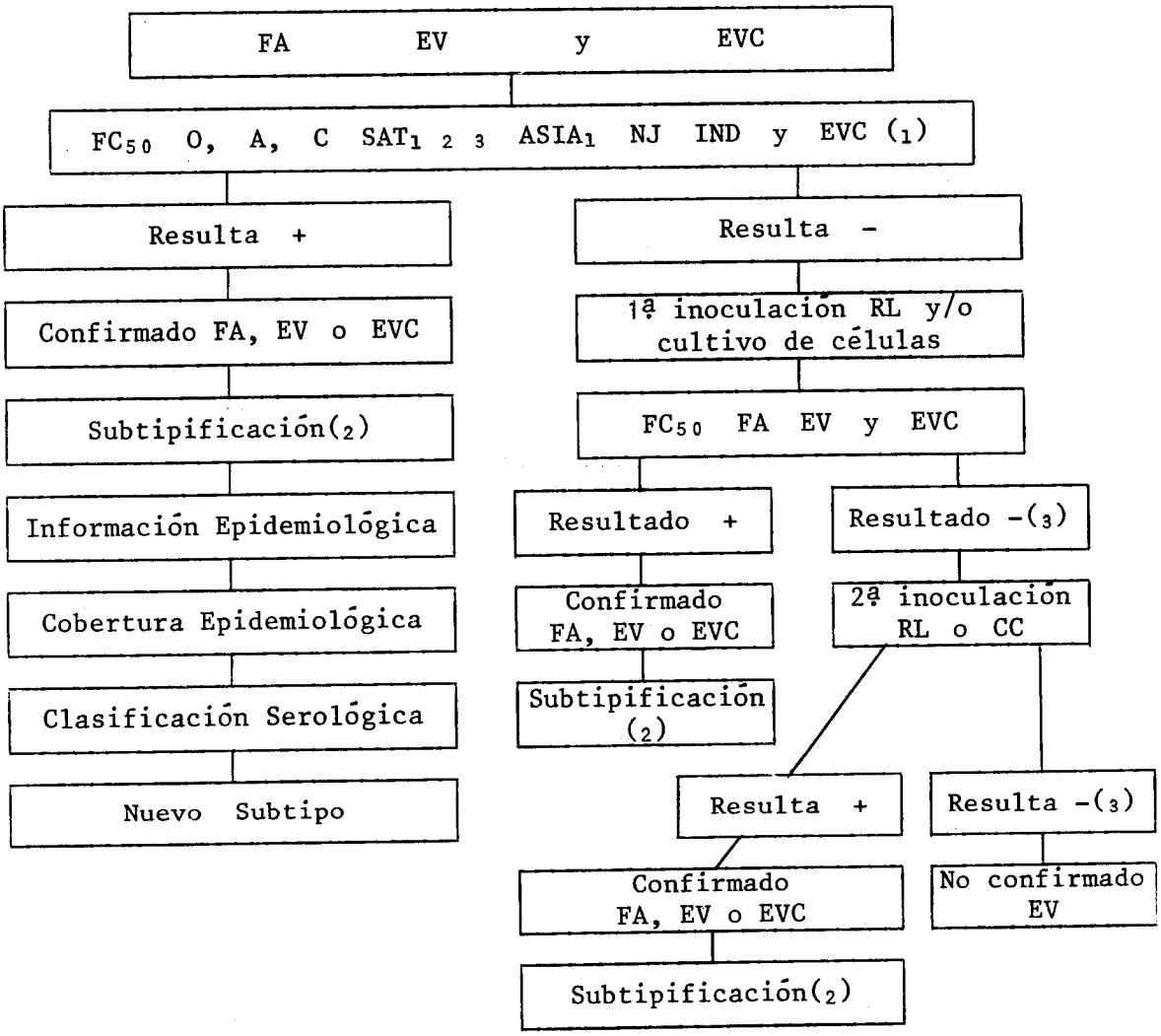
Control de la enfermedad — Desinfección — Cuarentena

Detalle de las medidas de desinfección y de cuarentena establecidas

ANEXO 6.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
LABORATORIO DE REFERENCIA

ANTIGENOS



(1) Primera prueba. Tipificación frente a los Sh de los tipos de las enfermedades de la región.

Segunda prueba. Ante resultados negativos tipificar frente a los sueros de las enfermedades y tipos exóticos.

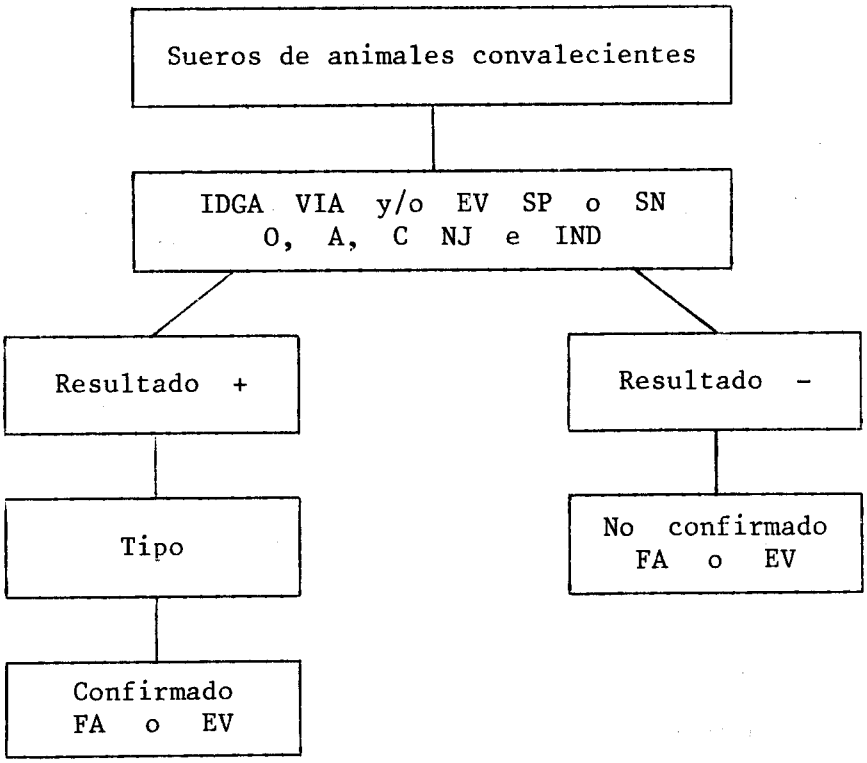
(2) Sólo con resultados positivos de FA y EV.

(3) Resultados negativos indican ausencia de infectividad y FC.

ANEXO 7.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
LABORATORIO DE REFERENCIA

SUEROS



En áreas endémicas o bajo vacunación sistemática contra FA o EV se recomienda recolectar suero del mismo animal 15 días después de la primera sangría.

En áreas libres, una única muestra de suero es suficiente.

ANEXO 8.

MEDIO DE EARLE

El medio Earle se utiliza habitualmente para diluir el virus cuando se pretende determinar su infecciosidad.

Fórmula de preparación

Na Cl	7,30 g
K Cl	0,40 g
Mg SO_4 7 H_2O	0,20 g
Dextrosa	1,00 g
Na H_2PO_4 H_2O	0,15 g
Hidrolizado de Lactalbúmina	5,00 g
Ca Cl_2 H_2O	0,20 g
Extrato de levadura	1,00 g
Na H CO_3	0,80 g
Penicilina	5 x 10 UI
Estreptomicina	0,60 g
Fungizón	2,50 g
Agua demineralizada	1.000,00 ml

Ajustar pH a 7,6, filtrar por Seitz y conservar a $4^{o}C$.

ANEXO 9.

TAMPON BARBITAL

El tampón barbital (TB) es el diluyente de los reactivos que son utilizados en la prueba de fijación del complemento y son conservados a $4^{o}C$. Los reactivos diluidos en TB no deben congelarse, ya que este diluyente precipita en ese estado.

Fórmula y Preparación

Solución Ca-Mg

$Ca\ Cl_2\ 2H_2O$	4,41 g
$Mg\ Cl_2\ 6H_2O$	20,33 g
Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 ml

Solución TB 5x

Na Cl	83,00 g
$Na\ C_8\ H_{11}\ N_2\ O_3$ (Dietil Barbiturato)	10,19 g
Solución de Ca-Mg	5,00 ml
Agua desmineralizada c.s.p.	2.000,00 ml

Ajustar el pH a 7,6 con HCL 1N y conservar a temperatura ambiente.

El tampón barbital para uso se prepara con una parte de la solución TB 5x más cuatro partes de agua desmineralizada.

ANEXO 10.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
LABORATORIO DE REFERENCIA

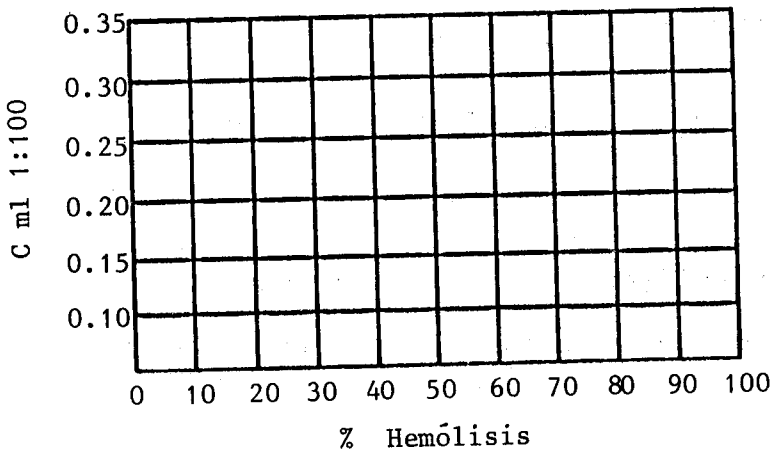
TITULACION DE COMPLEMENTO 50%

Compl: lote nº _____ Fecha _____

Complemento 1/100							Complemento 1/10			
C ml	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,30	0,30	0,30	Media
DO										
% Hemó-lisis										

Completar volumen a 1,2 ml con TB. Añadir 0,8 ml de SH.

Incubar 30' a 37°C.



1 UCH_{50} } 1:100 =
1:10 =

Sólo considerar valores entre 10 y 90% de hemólisis.

ANEXO 11.

SOLUCION DE ALSEVER

Para preservar glóbulos rojos de carnero.

Dextrosa	4,10 g
Citrato Sódico ($NaCHO_7.2HO$)	1,60 g
Acido Cítrico ($HC\ HO_7.HO$)	0,11 g
Cloruro Sódico (NaCl)	0,84 g
Agua Destilada	200,00 ml

Ajustar el pH con 1N HCR. Esterilizar y filtrar.

ANEXO 12.

PREPARACION DE SISTEMAS HEMOLITICOS PARA TITULACION DE HEMOLISINA

	Dilución de Hemólisis									
	1:100			1:1000						
H. ml	1.25	0.83	0.63	4.17	3.13	2.08	1.56	1.04	0.78	0.52
TB.ml	3.75	4.17	4.37	0.83	1.87	2.92	3.44	3.96	4.22	4.48
GR.ml	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
DIL.H.	1:400	1:600	1:800	1:1200	1:1600	1:2400	1:3200	1:4800	1:6400	1:9600

NOTA: Sensibilizar en Baño María a 37°C durante 30 minutos.

ANEXO 13.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
LABORATORIO DE REFERENCIA

EXIGENCIAS COMPLEMENTARIAS

____/____/19___

Antígenos	4 UHC_{50}					6 UHC_{50}					UHC_{50}
	10'	15'	20'	25'	30'	10'	15'	20'	25'	30'	
Controles											

ANEXO 14.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
LABORATORIO DE REFERENCIA

TIPIFICACION POR FC_{50} EN TUBOS DE KAHN (VOLUMEN EN ML)

Reactivos	Tipificación Ag	Control Ag	Control Sh	Control C	Control SH
Tampón Barbital	-	0.2	0.2	0.4	0.6
Antígeno	0.2	0.2	-	-	-
Suero Hiper.FA, EV, EVC	0.2	-	0.2	-	-
Complemento (4 UHC_{50})	0.2	0.2	0.2	0.2	-
Glóbulos Rojos	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Incubación, fijación y tiempo de hemólisis

1. Inactivación de los Sh 30 min. a 56°C.
2. Sensibilización SH 30 min. a 37°C.
3. Tiempo de fijación 30 min. a 37°C.
4. Tiempo de hemólisis 30 min. a 37°C.

ANEXO 15.

SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE FIEBRE AFTOSA

VARIANTES E INMUNIDAD

XIX SIMPOSIO ORGANIZADO POR LA SECCION PERMANENTE DE ESTANDARIZACION MICROBIOLOGICA

Lyon, Francia, 13 a 14 de julio de 1967

RESOLUCION

Para la designación de virus de la fiebre aftosa y con el objeto de simplificar la terminología, se propone el uso exclusivo de los términos "tipos" y "subtipos". Los tipos y subtipos pueden estudiarse tanto por métodos serológicos como inmunológicos.

Las diferencias entre los métodos de manera alguna significan diferencias de naturaleza entre un subtipo denominado serológico y un subtipo llamado inmunológico.

Los métodos inmunológicos, a pesar de la dificultad de realización, son fundamentales.

Los métodos serológicos, en particular los de fijación del complemento, son más fáciles de aplicar.

Para ubicar con exactitud la posición de los diversos subtipos, es necesario establecer los valores de sus "relaciones" y de su "parentesco".

La relación está representada por la razón:

$$r = \frac{\text{intensidad de la reacción heteróloga}}{\text{intensidad de la reacción homóloga}}$$

de tal modo que las relaciones entre dos cepas se expresan por dos razones r_1 y r_2.

El parentesco expresa las reacciones bilaterales entre dos cepas por la razón $R = r_1 \times r_2$. Para evitar una confusión entre las relaciones y parentesco, se sugiere la siguiente fórmula:

$$R = 100 \sqrt{r_1 \times r_2}$$

En consecuencia, las relaciones r se expresarán por valores comprendidos entre 0 y 1 y los parentescos R por porcentajes de 0 a 100.

Los límites definidos en el informe de J. B. Brooksby serán:

		$R = r_1 \times r_2$	$R = 100 \sqrt{r_1 \times r_2}$
1.	Tipos	0,01	< 10%
2.	Subtipos muy diferentes	< 0,01 a 0,1	10 a 32%
	Subtipos diferentes	< 0,1 a 0,5	< 32 a 70%
3.	Cepas	< 0,5 a 1	> 70%

Para la clasificación de cada subtipo se recomienda utilizar las cepas de referencia del Laboratorio Mundial de Referencia, dentro de las medidas aplicables para restringir la difusión de cepas desconocidas en el país considerado y en los países vecinos.

Es evidente que en la práctica, cuando aparece un subtipo, el riesgo que representa está en relación directa con el número de animales que no están inmunizados contra él.

Frente a un país, este peligro puede evaluarse en base a las tres informaciones siguientes:

1. establecimiento de una eficacia mínima para las vacunas antiaftosa, expresada en un porcentaje de protección;
2. cálculo del rango de cobertura inmunológica del subtipo, es decir, la razón entre la inmunidad heteróloga y la inmunidad homóloga, al nivel de la eficacia mínima; y
3. conocimiento de la eficacia de cada vacuna, en el momento de la aparición del subtipo derivado del control anterior de un número suficientemente grande de lotes de vacuna.

Con estos tres datos, el peligro del subtipo puede estimarse por el porcentaje de lotes de vacuna que no poseen suficiente eficacia entre él.

Las medidas a ser aplicadas dependerán del grado de peligro del subtipo, de la situación epidemiológica y de los métodos profilácticos de cada país.

ANEXOS 16 y 17.

MEDIO DE EAGLE

El medio Eagle con 10% de suero bovino (medio de mantenimiento) es comúnmente utilizado para cultivar células, y sin suero (medio de mantenimiento) para mantenerlas y para diluir el virus a ser inoculado.

Fórmula y Preparación

MEM concentrado GIBCO (Earle's sin CO_3H Na)	95,30 g
Solución de vitaminas	18,00 ml
Glucosa	31,50 ml
Nitrato férrico 9 H_2O (solución al 1°/oo)	0,90 ml
PO_4 Triptosa (29,5 g/L)	1.000,00 ml
CO_3H Na	24,75 g

H_2O desmineralizada completar hasta 10 litros.

NOTA: Antes de la filtración por placas esterilizantes, el medio debe ser burbujeado con CO_2 hasta alcanzar un pH de 6,8. En el momento de uso añadir 1 ml por litro de la solución de antibióticos.

Solución de Vitaminas para el Medio Eagle

Colina Cl	0,5 g
Acido fólico (disolver en NaOH 1/N)	0,5 g
Nicotinamida	0,5 g
Pantotenato de Ca-D	0,5 g
Piridoxal-HCl	0,5 g
Tiamina-HCl	0,5 g
Riboflavina (0,005 g/ml)	10,0 ml

Disolver en 1 litro de H_2O desmineralizada, filtrar por placas esterilizantes, fraccionar en alícuotas de 18 ml y congelar a -20°C.

Solución de Antibióticos

Penicilina	10×10^6 UI
Estreptomicina	10 g

Disolver en 100 ml de H_2O desmineralizada, filtrar por placas esterilizantes, fraccionar en alícuotas de 5 ml y congelar a -20°C.

SIGLAS UTILIZADAS EN EL MANUAL DE DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES VESICULARES

Ag	Antígeno
AVRI	Animal Virus Research Institute, Pirbright, Inglaterra
C	Complemento
CPFA	Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
DI_{50}	Dosis infectante 50%
$DL_{50}RL$	Dosis letales 50% ratón lactante
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbencias ligado con enzimas
EF	Esofágico-faríngeo
EPP	Expectativas porcentuales de protección
EV	Estomatitis vesicular
EVC	Enfermedad vesicular del cerdo
FA	Fiebre aftosa
FC_{50}	Fijación del complemento 50%
GR	Glóbulos rojos
H	Hemolisina
IDGA	Inmunodifusión en gel de agar
ISP	Indice de seroprotección
LMR	Laboratorio Mundial de Referencia, Pirbright, Inglaterra
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PIADC	Plum Island Animal Disease Laboratory, New York, EUA
r	Relaciones serológicas
R	Parentescos serológicos
Sh	Suero hiperinmune
SH	Sistema hemolítico
TB	Tampón barbital
TGF	Tampón de glicerina fosfatada
TN	Título de seroneutralización
TTE	Trifluortricloroetano
UFC_{50}	Unidades fijadoras del complemento 50%
UHC_{50}	Unidades hemolíticas de complemento 50%
UN_{50}	Unidad neutralizante 50%

Editado e impreso en el
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (OPS/OMS)
Noviembre de 1986.