

## DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-VIA EN SUEROS BOVINOS POR MEDIO DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

*Eduardo R. Centeno<sup>1</sup>; Juan Antonio Obiaga<sup>1</sup>; Kleise de Freitas Costa<sup>1</sup>; Julio A. Mesquita<sup>1</sup>*

### RESUMEN

Se adaptó la técnica de contrainmunolectroforesis (CIEF) para investigar anticuerpos anti-VIA (virus-infection-associated) en sueros de bovinos con el fin de proporcionar una nueva técnica de alta reproducibilidad y sensibilidad suficiente como para detectar dichos anticuerpos en sueros con títulos bajos evitándose los falsos negativos.

Se tomaron sueros de animales que habían sido infectados por vía intranasal con virus atenuado de la fiebre aftosa y cuyos títulos variaban desde los positivos fuertes a los débiles e incluso negativos de acuerdo con los estudios previos efectuados por medio de inmunodifusión doble (IDD) en agar.

Para aumentar la sensibilidad de la técnica los sueros fueron investigados con una serie de diluciones de antígeno VIA, encontrándose que la mayor parte de ellos reaccionaban con una o más de las siguientes diluciones 1/30, 1/50 y 1/75 obtenidas a partir de una solución patrón del antígeno.

Con el objeto de proporcionar dos alternativas se estudiaron dos medios de soporte, esto es, una agarosa de bajo y otra de alto  $\mu_r$  (coeficiente de movilidad catódica), describiéndose en el texto las condiciones electroforéticas óptimas para cada una de ellas.

La sensibilidad, especificidad y correlación entre la CIEF y la IDD fueron estudiadas estadísticamente, encontrándose que aunque ambas técnicas poseen la misma especificidad, la CIEF es mucho más sensible llegando a demostrar casi dos veces más positivos.

Se pone énfasis en el valor epidemiológico que posee una técnica tan sensible como la CIEF y las ventajas de ser rápida, económica en lo que a canti-

dad de antígeno se refiere y el número de muestras que pueden ser analizadas simultáneamente.

### INTRODUCCION

Bussard introdujo en 1959 (3) la técnica de contrainmunolectroforesis (CIEF), a la cual llamó electrosinéresis, con el propósito de detectar reacciones específicas de antígenos y anticuerpos. La simplicidad del método y su sensibilidad hicieron que fuera empleada por numerosos investigadores y para diversos sistemas, pudiéndose encontrar frecuentemente en la literatura científica con otros nombres tales como electroinmunoprecipitación, inmunolectroosmoforesis, etc.

Esta técnica ha sido aplicada comúnmente en el laboratorio para el diagnóstico de la hepatitis B (6, 8, 13) y de una variedad de enfermedades virales (5), virus Coxsackie y ECHO<sup>2</sup> (11), fungales y parasitarias. También ha sido utilizada para la serotipificación de adenovirus (9), estimación de anticuerpos contra ADN nativo y desnaturalizado (1, 14), para detectar la activación del componente C3 del complemento (2), etc.

Básicamente consiste en una combinación de la reacción de inmunodifusión doble (IDD) en agar y electroforesis. En la IDD en agar los reactivos son colocados en sendas cavidades desde las cuales difunden hasta encontrarse en donde forman una línea o banda de precipitación (una o más de acuerdo con la heterogeneidad del sistema) cuya posición, características y tiempo de formación dependerán de la naturaleza y concentración de los antígenos y los anticuerpos. En la CIEF los reactivos no son librados a las leyes de la difusión sino que son "empujados" electroforéticamente hacia una zona común de reacción.

En condiciones ideales, los complejos antígeno-anticuerpos precipitan formando una banda a igual distancia del punto de origen de cada uno de los componentes.

<sup>1</sup>Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS, Caixa Postal 589, 20000-Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

La sensibilidad de esta técnica es mucho mayor que la de la IDD en agar ya que tanto el antígeno como los anticuerpos migran en bloque manteniendo una elevada concentración de los mismos.

En el presente trabajo se describen los estudios realizados para determinar las condiciones adecuadas para el sistema formado por el antígeno VIA (virus-infection-associated) (4) del virus de la fiebre aftosa y sus anticuerpos homólogos y de tal manera ofrecer una técnica de alta sensibilidad, gran reproducibilidad y simplicidad que permite detectar concentraciones muy pequeñas de anticuerpos bovinos anti-VIA en un tiempo relativamente breve.

#### MATERIALES Y METODOS

##### Antígenos

Dos preparaciones, identificadas como VIA-1 y VIA-2, han sido empleadas en el presente estudio. La primera de ellas fue producida de acuerdo con la técnica del Laboratorio de Referencia y Diagnóstico del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (18) y la segunda ha sido preparada siguiendo el método del Centro de Investigaciones de Enfermedades Animales de Plum Island, U.S.A. (17) con algunas modificaciones. Estas consistieron en que la concentración final no fue efectuada por precipitación con sulfato de amonio sino por medio de presión osmótica negativa empleando PEG 20.000<sup>2</sup>. Generalmente el volumen final correspondió a un 200 enésimo del líquido del cultivo original del virus.

Los antígenos fueron titulados por medio de la técnica de electroinmunodifusión de Laurell (10) tomando como referencia el VIA-1 y utilizando un suero hiperinmune de cobayo cedido por el Laboratorio de Serología. Alternativamente fue empleada la IDD en agar según fuera prescripta por McVicar y Suttmöller (12). Posteriormente el VIA-2 fue diluido hasta alcanzar un valor igual, en actividad, al del VIA-1 el cual fue tomado como patrón.

<sup>2</sup>PEG 20.000 Polyethylene Glycol 20.000, J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., U.S.A.

##### Efectos del pH y de la composición de los buffers en la movilidad electroforética

En primer lugar se estudiaron dos buffers con respecto a la influencia de sus componentes sobre el desplazamiento de las proteínas durante la electroforesis y la posterior formación de bandas de precipitación antígeno-anticuerpos en la agarosa. Las fórmulas de los mismos son detalladas a continuación:

a) Acido barbitúrico	0,01 M
Barbiturato de sodio	0,05 M
Acetato de sodio	0,05 M
Acido acético 1 N c.s.p. ajustar pH	

b) Acido barbitúrico	0,026 M
Barbiturato de sodio	0,084 M
HC1 1 N c.s.p. ajustar pH	

El efecto del pH sobre la movilidad del sistema antígeno-anticuerpos fue también investigado empleando los buffers descritos y variando sus pH a intervalos discretos desde 8,0 hasta 8,6. De esta manera se determinó el valor óptimo para que tanto el antígeno como los anticuerpos se desplazaran a una velocidad semejante en el campo electroforético.

Suero bovino fue estudiado electroforéticamente en agarosa al 1% manteniendo constante el pH y variando, desde 0,075 hasta 0,0125 la fuerza iónica del buffer en el cual la agarosa fuera disuelta para obtener el máximo desplazamiento de las inmunoglobulinas con la menor distorsión posible.

##### Medios de soporte

En este estudio fueron empleados dos tipos de agarosa. Uno de ellos, Seakem<sup>3</sup> de baja y otro HEE0<sup>4</sup> de alta actividad electroosmótica.

En ambos casos la agarosa fue preparada al 1% (p/v) de la siguiente manera: en un Erlenmeyer de 125 ml se introdujeron 60 ml de agua destilada sobre la cual se adicionó, lentamente, 1 g de agarosa

<sup>3</sup>Colloid Marine Colloid Industries, U.S.A.

<sup>4</sup>Miles Laboratories Inc. Elkhart, Indiana, U.S.A.

mientras se agitaba el medio con un aparato magnético. La boca del recipiente se cubrió con papel de aluminio para impedir la evaporación y la mezcla fue llevada a su punto de ebullición mientras se la agitaba continuamente manteniéndola en esas condiciones durante un par de minutos para obtener una solución perfecta. Una vez que esta etapa fue alcanzada se le agregó 50 ml de buffer, ya sea barbitol-barbitol sódico o barbitol-acetato de sodio de fuerza iónica 0,11. La solución fue calentada por un breve intervalo, enfriada hasta 50°C, aproximadamente y vertida sobre los porta-objetos como se describe más adelante. Es conveniente preparar la solución de agarosa en el momento de usarla.

### Electroforesis

En este estudio se empleó un equipo Gelman<sup>5</sup>, el cual posee soportes que sostienen seis porta-objetos (2,5 x 5,0 cm) cada uno en dos hileras de tres. La agarosa enfriada a una temperatura de 50°C, aproximadamente, fue vertida a razón de 30 ml por cada soporte en el cual se habían colocado los porta-objetos previamente desengrasados con alcohol. El proceso se llevó a cabo en una mesa nivelada.

Los soportes fueron colocados en la heladera a 4°C durante cinco minutos para asegurar una buena gelificación. Por medio de una punzadora<sup>6</sup>, a la cual se le habían colocado 10 cortadores de 3 mm de diámetro cada uno, se efectuaron 20 perforaciones en la agarosa de acuerdo con el modelo que es presentado en la Fig. 1. Para ello fue necesario cortar primero 10 cavidades por cada porta-objeto, luego desplazar longitudinalmente la punzadora para obtener la distancia requerida entre cavidad y cavidad y efectuar entonces el segundo corte. Los fragmentos de agarosa fueron removidos por medio de una aguja de succión de 2,5 mm de diámetro externo, uno de cuyos extremos fue aplicado sobre la superficie de la agarosa que se deseaba

extraer y el otro a una fuente de succión leve (perilla de goma, aspirador fijado a un grifo de agua corriente, etc.).

Con el fin de investigar la distancia óptima que proporcionara bandas de precipitación en el menor tiempo posible de electroforesis, aun empleando sueros de títulos muy bajos, se hicieron varias placas variando entre 3 y 5 mm el espacio comprendido entre el borde de la cavidad del antígeno y la de los anticuerpos.

Las cavidades, cuyos volúmenes eran de 14  $\mu$ l, fueron llenadas de forma alternada, comenzando por la izquierda, con los sueros sin diluir, ya sea problemas o testigos y las restantes con diluciones de VIA. Al principio las diluciones de VIA fueron efectuadas de una manera arbitraria empezando con la preparación sin diluir y continuando con las diluciones 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90 y 1/100, para determinar la o las diluciones que reaccionaran óptimamente con los sueros empleados. En cuanto a los sueros, se eligió un conjunto proveniente de sangrías obtenidas en diferentes períodos de animales infectados con virus vivo. De esta manera se pudo experimentar con una gama de valores que variaron en grados de positividad desde los fuertes hasta los débiles y negativos. Todos estos sueros habían sido estudiados previamente por medio de la técnica de IDD en agar. Los resultados fueron catalogados como F, fuertes, cuando las bandas de precipitación eran bien evidentes; D, débiles, cuando eran visibles sin mayor esfuerzo y finalmente MD, muy débiles, cuando eran observadas con alguna dificultad o sólo aparecían después de haber sido teñidas con una solución colorante de Ponceau.

Las placas fueron colocadas en la cuba de electroforesis y conectadas a los recipientes que contenían los buffers por medio de puentes de tela de nylon de acuerdo con la técnica descrita en el Manual de la Compañía Gelman. Se aplicó una diferencia de potencial de 160 voltios durante períodos variables de tiempo para obtener el mínimo lapso necesario para producir las bandas de inmuno-precipitación. La cuba de electroforesis contenía el mismo buffer empleado en la preparación de la agarosa pero con una fuerza iónica igual a 0,11. El fenómeno de electroendósmosis fue estudiado en ambas preparaciones de agarosa. En lo que se

<sup>5</sup> Gelman Instruments Company, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.

<sup>6</sup> Gelman Instruments Co. Gel punch, N° de Catálogo 71686.

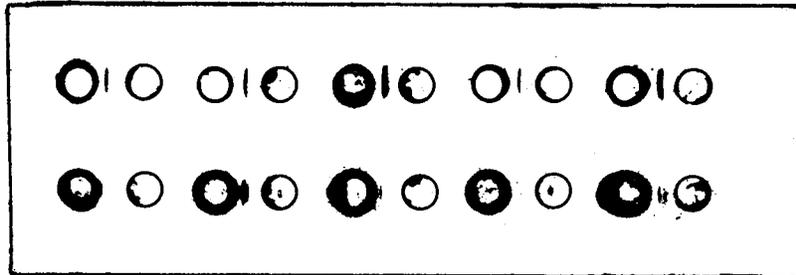


FIGURA 1. Líneas de precipitación obtenidas por medio de la CIEF. La fotografía muestra la distribución de las cavidades en los porta-objetos. El antígeno fue colocado en las cavidades de la derecha (cátodo) y los sueros en las cavidades de la izquierda (ánodo).

refiere a la agarosa HEEO (High-Electro-Endo-Osmosis) se observó que al pH óptimo la velocidad de migración del antígeno y de los anticuerpos hacia sus respectivos polos era prácticamente la misma, formándose la banda de precipitación a igual distancia de las dos cavidades cuando la relación antígeno-anticuerpos era óptima. Como los valores de  $-m_r$  (cociente de movilidad catódica) (9) de la agarosa Seakem eran inferiores a los de la HEEO pudo observarse que el VIA se desplazaba hacia el ánodo más rápidamente que lo que las inmunoglobulinas lo hacían hacia el cátodo, por lo tanto, la banda de precipitación se formaba muy próxima a la cavidad sérica provocando dificultades en la lectura y por consecuencia en la evaluación de la positividad. Para superar este inconveniente se corrieron primero los sueros a 260 voltios por un período de 30 minutos, luego se llenaron las cavidades con el antígeno y se corrió nuevamente el sistema a 160 voltios por un período adicional de 90 minutos. En este caso, cuando la relación antígeno-anticuerpos era óptima, las bandas de precipitación

se formaron a una distancia equidistante entre ambas cavidades, es decir, la que contenía el antígeno y la que contenía los anticuerpos.

Terminada la electroforesis, las placas fueron observadas registrándose la ausencia o presencia de bandas de precipitación. Para evitar precipitaciones inespecíficas debido a la escasa solubilidad de las gamma-globulinas de bovino en medios de baja fuerza iónica, las cavidades fueron llenadas con un buffer fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,15 M,  $\text{NaCl}$  0,40 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,03 M, pH 7,8) 50 minutos después de haberse terminado la corrida y se leyeron nuevamente las placas 10 ó 20 minutos después de haberse completado este procedimiento, tomándose como referencia el momento cuando cualquier precipitado observado previamente en la zona de controles de negatividad hubiera desaparecido. Las bandas fueron registradas de acuerdo con sus intensidades. Para evitar que las placas se secaran fueron conservadas siempre en una cámara húmeda efectuándose una segunda lectura 24 horas más tarde.

Una vez cumplido este requisito las placas fueron lavadas, secadas y teñidas. Con tal fin se cubrieron con una tira de papel de filtro durante cinco minutos para remover cualquier exceso de líquido, una vez retirado el papel se llenaron las cavidades con agarosa empleando el excedente que no fuera utilizado en la preparación de las placas. Luego se cubrió la agarosa con tiras de papel de filtro y sobre éstas se colocaron, primero, cuatro o cinco capas de papel absorbente y después un peso ligero para provocar un contacto íntimo entre el papel y la superficie de la agarosa. A los pocos minutos las placas de agarosa quedaron reducidas a un espesor muy delgado y fueron lavadas en una cuba LKB<sup>7</sup> o similar con el buffer fosfato pH 7,8, ayudando el procedimiento por medio de una agitación mecánica, durante tres horas como mínimo. Posteriormente se lavaron con agua destilada por 30 minutos y finalmente se retiró, repitiendo el proceso descrito, el agua absorbida durante el proceso de lavado.

Las placas fueron secadas completamente en una estufa o con la ayuda del calor proporcionado por una lámpara de 100 vatios. Para evitar que la agarosa se despreque del porta-objetos siempre es conveniente, antes de secarla completamente, sumergir brevemente el porta-objetos en una solución de glicerina al 1% (v/v) en ácido acético al 7% (v/v), para que, de esta manera, el gel retenga una pequeña cantidad de humedad disminuyendo su fragilidad y aumentando su flexibilidad.

Las placas desecadas fueron colocadas durante 30 minutos en una solución de colorante de Ponceau<sup>8</sup> al 0,5% disuelto en ácido tricloroacético al 5% (p/v), luego lavadas con ácido acético al 7% (v/v) hasta que el exceso de colorante hubiera sido retirado.

Finalmente, se trató las placas con una solución de glicerina al 1% en ácido acético al 7% durante media hora. Se dejaron secar al aire. En algunos casos, bandas muy débiles que no pudieron ser observadas previamente a la tinción apa-

recieron con cierta nitidez después de este proceso. Se registraron las lecturas finales.

#### Electroinmunodifusión

Se empleó el método de Laurell (10). Un gramo de agarosa LEO (Low-Endo-Osmosis)<sup>9</sup> fue disuelto en 100 ml de buffer barbital-acetato de sodio cuya composición fue descrita anteriormente, diluido convenientemente para que tuviera una fuerza iónica igual a 0,02 y con el pH ajustado a un valor de 8,6. Las cavidades en las cuales se colocaron las muestras tenían un diámetro de 3 mm y se empleó para ello una pipeta Oxford de 5  $\mu$ l de capacidad. El mismo buffer empleado en la preparación de la agarosa fue colocado en la cuba de electroforesis. Se aplicó una diferencia de potencial de 280 voltios durante cuatro horas a una temperatura de 4°C en una cámara fría. Las diversas preparaciones de VIA fueron consecuentemente diluidas para que todas ellas migraran a igual distancia tomando como referencia el patrón VIA-1.

#### Sueros

Se emplearon en este estudio 80 sueros obtenidos de bovinos infectados, por vía intranasal, con virus atenuado de la fiebre aftosa. Como control de positividad fueron usados sueros de cobayos hiperinmunizados y sueros de bovinos de conocida positividad. Como control de negatividad, 40 sueros provenientes de la República de El Salvador, es decir, de una zona libre de fiebre aftosa.

#### Control de antígeno

Con el fin de descartar la presencia de anticuerpos contra componentes de células BHK en animales inmunizados con vacunas preparadas con virus desarrollados en este medio celular y que pudieran producir falsos positivos, se procesó un cultivo de células BHK, sin virus, con el mismo procedimiento empleado en la obtención del antígeno VIA. El efecto citopático fue simulado por medio de ultrasonido. El producto final, llamado falso VIA, fue

<sup>7</sup>LKB Tank No. 3948, LKB Produkter AB, Stockholm, Suecia.

<sup>8</sup>Solución Ponceau, Gelman Instruments.

<sup>9</sup>LEO Agarose, Miles Laboratories, Inc.

diluido consecuentemente para que tuviera la misma concentración proteica del patrón VIA. La determinación fue hecha por medio de la reacción del biuret. Todos los sueros fueron simultáneamente corridos contra VIA y falso VIA.

#### Reacción del biuret

Esta fue efectuada de acuerdo con el método de Gornall, Bardawill y David (7) tomándose como coeficiente de extinción un valor de 2,8, el cual fuera obtenido para proteínas séricas.

#### Inmunodifusión doble (IDD) en agar

El método es esencialmente el mismo descrito por McVicar y Suttmöller (12). Cada sistema estaba constituido por siete cavidades, una central y seis periféricas, mediando una distancia de 6 mm entre los bordes de la cavidad central y las periféricas. Cada una de ellas tenía un diámetro de 4 mm y una profundidad de 3 mm con un volumen de 38  $\mu$ l. Las lecturas fueron efectuadas a las 24, 72, 86 y 120 horas.

Se llevó a cabo un estudio comparativo entre la CIEF y la IDD para establecer las correlaciones entre las positivities detectadas por ambas técnicas. Los resultados son mostrados en los Cuadros 1, 2 y 3, los cuales indican la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y correlación de ambas técnicas.

#### Estudio estadístico

Para el estudio estadístico se ha tomado una expresión que de acuerdo con Thorner y Remein (15) permite trabajar directamente con las frecuencias celulares de una tabla 2 x 2:

	Prueba N° 1		
	(+)	(-)	
Prueba N° 2			
(+)	a	b	
(-)	c	d	
			n

en donde la diferencia entre las proporciones de sensibilidad se distribuye de acuerdo con la dis-

tribución de probabilidades de "t" de Student con n-1 grados de libertad:

$$t = \frac{(b - c) : n}{\sqrt{(b + c) : n^2}}$$

#### RESULTADOS

El estudio comparativo de los buffers barbital-barbital sódico y barbital-acetato de sodio demostró que ambos poseían un rendimiento semejante no observándose ninguna diferencia en lo que respecta a la posición, intensidad, tiempo de formación, visibilidad de las bandas de precipitación, etc. Como tampoco se advirtiera alguna ventaja para ninguno de ellos con referencia a la diferenciación de las bandas o a la sensibilidad del método, se decidió utilizar el buffer barbital-acetato de sodio por cuanto resultaba menos oneroso.

Una distancia de 3 mm entre los bordes de las cavidades de los antígenos y las de los antisueros resultó ser la óptima.

En lo que concierne a las concentraciones de VIA empleadas se observó que la presencia e intensidad de las bandas de precipitación dependían de la relación título del antígeno-concentración del antígeno y aparecían en la zona de equivalencia. El análisis de los resultados obtenidos indicó que la mayoría de los sueros podría ser encuadrada dentro de tres diluciones de la solución patrón de VIA, e.g. 1/30, 1/50 y 1/75, las cuales reaccionaban con sueros fuertes, medianamente débiles y muy débiles respectivamente.

De las diversas fuerzas iónicas experimentadas, el buffer que poseía un valor igual a 0,05  $\mu$  demostró un comportamiento más eficiente observándose un desplazamiento razonable de las inmunoglobulinas sin presentar distorsiones, aunque ocasionalmente se formaban bandas discretas en la agarosa como consecuencia de la baja solubilidad de estas proteínas de suero bovino en esa concentración de sales. Esta particularidad no ofreció ningún inconveniente por cuanto, como se explicara en Materiales y Métodos, las bandas inespecíficas se disuelven fácilmente cuando se aumenta la fuerza iónica del medio después de terminada la electroforesis.

Para el buffer de la cuba un valor de 0,11  $\mu$  se estableció como óptimo por cuanto provocaba un buen efecto electroforético.

El sistema fue corrido durante distintos períodos de tiempo, encontrándose que el más eficiente para la agarosa HEEO era de dos horas empleando una diferencia de potencial de 160 voltios. Con agarosas de menor  $-m_r$ , como la Seakem por ejemplo, fue necesario correr primero los sueros durante 30 minutos a 260 voltios, agregar entonces el antígeno y correr nuevamente las placas a 160 voltios por un período adicional de 90 minutos.

Los sueros controles de negatividad no dieron ninguna reacción mientras que los sueros problema proporcionaron todas las alternativas posibles desde negativos hasta positivos fuertes.

En lo que se refiere al control preparado con las células BHK, o sea el llamado falso VIA, no dio ninguna reacción aun cuando fue corrido a diferentes concentraciones en los diversos estudios efectuados.

En el estudio comparativo entre las técnicas CIEF e IDD, el análisis estadístico demostró que, aunque ambas técnicas poseen la misma especificidad, la primera de ellas es mucho más sensible llegando a demostrar casi dos veces más positivos, como puede observarse en los Cuadros 1, 2 y 3.

CUADRO 1. Sensibilidad y especificidad de CIEF e IDD en la detección de anticuerpos anti-VIA

Técnicas	Infección		Total	
	Si	No		
CIEF	Posit.	63	0	63
	Neg.	17	40	57
	Total	80	40	120
	Sensibilidad = 78,8 $\pm$ 9,0%			
Especificidad = 100%				
IDD	Posit.	34	0	34
	Neg.	46	40	86
	Total	80	40	120
	Sensibilidad = 42,5 $\pm$ 10,8%			
Especificidad = 100%				

CUADRO 2. Sensibilidad ( $\xi$ ) y correlación ( $\phi$ ) de IDD y CIEF en la detección de anticuerpos anti-VIA

CIEF	Técnicas		Total
	IDD		
	+	-	
+	32	31	63
-	2	15	17
Total	34	46	80

$\xi$  (CIEF) = 78,8%  
 $\xi$  (IDD) = 42,5%  
 Diferencia = 36,3 (t = 5,048)  
 $\phi$  = 0,32  $\chi^2$  = 8,345

CUADRO 3. Reproducibilidad de los resultados por las técnicas de CIEF e IDD<sup>a</sup>

Técnicas	Determinaciones			Total	
	Primera				
	+	-			
CIEF	Segunda	+	57	5	62
		-	1	17	18
	Total		58	22	80
	$(\phi) = 0,81$ $\chi^2 = 52,207$ (p < 0,01)				
IDD	Segunda	+	32	2	34
		-	3	43	46
	Total		35	45	80
	$(\phi) = 0,87$ $\chi^2 = 60,956$ (p < 0,01)				

<sup>a</sup>En este cuadro se comparan los resultados obtenidos en dos determinaciones efectuadas con los mismos componentes y en iguales condiciones.

DISCUSION

El objetivo principal de este trabajo fue adaptar la técnica de la CIEF como un procedimiento sensible, rápido y relativamente simple para investigar anticuerpos anti-VIA en sueros de bovinos.

Actualmente, la detección de anticuerpos anti-VIA se efectúa por medio de la IDD en agar como técnica de rutina, la cual, si bien posee una alta reproducibilidad, carece de la sensibilidad suficiente como para detectar anticuerpos en sueros con títulos bajos, proporcionando, consecuentemente, falsos negativos. En cambio la CIEF es una técnica altamente sensible que ha sido ampliamente usada para la detección del antígeno de Australia, anticuerpos contra ADN y muchos otros sistemas los cuales son frecuentemente encontrados en la literatura especializada.

Sin embargo, la técnica tiene que ser adaptada para cada sistema en particular dado que las condiciones del antígeno, en lo que respecta a su movilidad en el campo electroforético varían de una sustancia a otra. Por otra parte, es de fundamental importancia que se establezca dentro de lo posible la relación óptima entre las concentraciones de los anticuerpos y la de los antígenos para evitar fenómenos de zona que puedan proporcionar falsos negativos, disminuyendo la sensibilidad de la técnica.

Con el propósito expresado se eligió una batería de sueros procedentes de un grupo de animales infectados por vía intranasal con virus vivo atenuado de la fiebre aftosa y cuyos títulos variaban desde los positivos fuertes a los débiles, e incluso negativos de acuerdo con los estudios previos efectuados por medio de la IDD. Estos sueros fueron investigados con la CIEF empleándose una serie de diluciones del antígeno VIA con el objetivo de establecer un margen de reacción más o menos estrecho el cual impidiera los fenómenos de zona. Finalmente se encontró que la mayor parte de los sueros reaccionaban con una o más de las siguientes diluciones del antígeno VIA: 1/30, 1/50 y 1/75 de una solución patrón. Consecuentemente, los sueros fueron estudiados frente a estas diluciones antigénicas lo cual permitió aumentar la sensibilidad del método por cuanto sueros fuertes no reaccionaban con diluciones altas del antígeno y vice-versa, sueros débiles no lo hacían con las concentraciones altas del antígeno.

Ha sido estudiado (16) que debe existir una relación apropiada entre la movilidad del antígeno y los valores de la  $-m_r$  del medio de soporte; este valor varía entre las diferentes marcas comerciales de agar y de agarosa y depende de la composición

química de los mismos (9). En este trabajo se investigaron dos preparaciones comerciales de agarosa, una de bajo  $-m_r$ , Seakem y la otra fue HEEO de elevadas propiedades endosmóticas.

Cuando la primera de ellas fue utilizada pudo observarse que la banda de precipitación antígeno-anticuerpos se formaba muy cerca de la cavidad del suero, indicando una baja actividad endosmótica y un rápido movimiento del antígeno. Para subsanar este inconveniente, se corrió primero el suero a 260 voltios durante 30 minutos; ésto permitió a las gamma-globulinas desplazarse razonablemente hacia el cátodo; el antígeno fue introducido posteriormente y se continuó la corrida a un voltaje menor lo cual permitió que las bandas de precipitación se formaran aproximadamente a una distancia igual entre la cavidad del suero y la del antígeno superándose de manera simple el bajo cociente de movilidad catódica.

Con la HEEO no hubo tal problema por cuanto los valores  $-m_r$  fueron suficientemente altos y en las condiciones de la corrida, e.g. pH, fuerza iónica, temperatura, etc., las bandas de precipitación se formaron a distancias equidistantes de las cavidades del antígeno y del antisuero. De esta manera se presentan dos alternativas del método cuyo empleo dependerá de la disponibilidad de agar o de agarosa de alta o de baja electroendosmosis.

Aparentemente en este sistema los componentes del buffer empleado no tienen mayor importancia, dentro de ciertos límites, ya que los dos que fueron estudiados proporcionaron prácticamente los mismos resultados.

Con este método se pueden obtener resultados en un lapso relativamente breve, generalmente después de dos o tres horas a partir del momento cuando se conectó el circuito. Sin embargo, para sueros muy débiles es más conveniente permitir una incubación de 20 horas con una coloración posterior de las bandas de precipitación; ello permite que aquellas que no son perceptibles directamente lo sean después de teñidas, aumentando de esta manera la sensibilidad de la prueba. El proceso completo desde la preparación del medio de soporte hasta la coloración dura aproximadamente 30 horas en contraposición de las 120 horas necesarias para la IDD. Esto, agregado al pequeño volumen de los porta-objetos, proporciona una

economía no sólo de tiempo sino también de espacio, incluso las láminas teñidas pueden ser archivadas si la conveniencia así lo indicara.

La sensibilidad, especificidad, consistencia y correlación entre la CIEF y la IDD han sido también estudiadas estadísticamente (Cuadros 1, 2 y 3). Al plantear la prueba de significación estadística para la diferencia entre dos proporciones de sensibilidades se debe tener en cuenta la frecuencia con la cual los resultados estén correlacionados. En el presente estudio, la aplicación de los dos procedimientos a cada suero bovino tiende a producir respuestas semejantes. Por lo tanto, el error estándar de la diferencia entre dos proporciones debe ser calculado de manera tal que se elimine el efecto de la correlación entre dichas proporciones. Consecuentemente, se ha empleado una expresión que permitió operar directamente con las frecuencias celulares de una tabla 2 x 2 (15). El valor de  $t = 5,048$  (79 d.f.) encontrado fue altamente significativo e indicó que los porcentajes de sensibilidad (78,8% para la CIEF y 42,5% para la IDD) demostrados por ambos métodos es sustancialmente favorable para el primero de ellos.

Consecuentemente, la técnica de la CIEF ofrece grandes ventajas prácticas para las encuestas serológicas dirigidas a la investigación de anticuerpos anti-VIA por cuanto: a) permite detectar anticuerpos contra el antígeno VIA en un tiempo relativamente breve y siempre mucho menor que la IDD; b) la sensibilidad es bastante más elevada que la de la IDD y se pueden detectar sueros con títulos muy bajos y c) gran número de muestras pueden ser investigadas simultáneamente, debiéndose tener también en cuenta el pequeño volumen empleado en cada cavidad (14  $\mu$ l) y las altas diluciones del antígeno VIA empleado lo cual proporciona una significativa economía.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Albino Alonso Fernández por los reactivos gentilmente cedidos, a los Drs. Vicente Astudillo y Hernán Málaga por sus críticas oportunas en la redacción de este trabajo y finalmente a la Sra. Maria das Graças Alexim por su encomiable cooperación técnica.

#### REFERENCIAS

1. ARQUEMBOURG, P.C.; LOPEZ, M.; BIUNDO, J.; SALVAGGIO, J. Detection of anti-DNA antibodies by counterimmunoelectrophoresis. *J. Immunol. Methods* 5: 199-207, 1974.
2. ARROYAVE, C.M.; TAN, E.M. Detection of complement activation by counterimmunoelectrophoresis (CIEP). *J. Immunol. Methods* 13: 101-112, 1976.
3. BUSSARD, A. Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel: l'électrosynérèse. *Biochim. Biophys. Acta* 34: 258, 1959.
4. COWAN, K.M.; GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* 30: 528-540, 1966.
5. GASPAR, A.; EDLINGER, E. Diagnostic rapide des Entérovirus par électrosynérèse. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 129 A: 545-552, 1978.
6. GOCKE, D.J.; HOWE, C. Rapid detection of Australia antigen by counterimmunoelectrophoresis. *J. Immunol.* 104: 1031, 1970.
7. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751, 1949.
8. GRAHAM, H.A.; ALDENDERFER, P.H. A counterimmunoelectrophoresis inhibition test for the detection of hepatitis-associated antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139: 414, 1972.
9. HIERHOLZER, J.C. Effects of sulfate concentrations, electroendosmotic flow, and electrical resistance of agar and agaroses on counterimmunoelectrophoresis with adenovirus antigens and antisera. *J. Immunol. Methods* 11: 63-76, 1976.
10. LAURELL, C.B. Quantitative estimation of protein by electrophoresis in agarose gel containing antibody. *Anal. Biochem.* 15: 45, 1966.
11. MacWILLIAM, K.M.; COOK, K.M. Counter-electrophoresis as a possible method for typing ECHO and Coxsackie viruses. *J. Hyg., Camb.* 74: 239, 1975.
12. McVICAR, J.W.; SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiological surveys. *Am. J. Epidem.* 92: 273-278, 1970.
13. PRINCE, A.M.; BURKE, K. Serum hepatitis antigen (SH): rapid detection by high voltage immunoelectro-osmophoresis. *Science* 169: 593, 1970.
14. SCHULLER, E.; FOURNIER, C.; REBOUL, J.; COSSON, A.; DRY, J.; BACH, J.F. Determination of DNA antibodies in normal and pathological sera by a new counterimmunoelectrophoresis method. *J. Immunol. Methods* 11: 355-385, 1976.
15. THORNER, R.M.; REMEIN, G.R. Principles and procedures in the evolution of screening for disease. *Public Health Monograph No. 67.*

16. TRIPODI, D.; KOCHESKY, L.S.; DAVIS, O. Immunochemistry of counterimmunoelectrophoresis and the effect of electroendosmotic flow on reactivity. *J. Immunol. Methods* 4: 1-10, 1974.
17. VIA Manual. Plum Island Animal Disease Center, P.O. Box 848, Greenport, Long Island, N.Y. 11944, USA.
18. VIA. CPFA. Alonso Fernández, A.; Söndahl, M.S.; Ferreira, M.E. (en preparación).