

‘Virus Aftosos Colombianos’

POR EL DR. JUAN HEINSOHN DE BRIGARD

“Tesis Laureada”, según Acta N° 112
DEL CONSEJO DE JUECES DE TESIS,
el 2 de Junio, del año de 1952.

INTRODUCCION

Con el título de “Virus Aftosos Colombianos”, se inicia un estudio, sobre el agente causal de la Fiebre Aftosa, en cuanto a su naturaleza, características y comportamiento, no aspirando a sacar nuevas conclusiones científicas, si no a dar una información general, de un punto de primera importancia para el país y sobre el cual nada se ha escrito hasta el presente. Los datos que figuran en este trabajo, han sido recopilados, durante un año de estudio y experimentación, con virus aftosos colombianos durante el cual se ha llegado a cierto grado de conocimiento científico de nuestras cepas nativas. Se contó para la investigación, con el Laboratorio de Tipificación y Diagnóstico de Fiebre Aftosa, que funciona en el Instituto Nacional de Higiene Samper Martínez de Bogotá y con la valiosísima cooperación e instrucción del Profesor Erich Traub, Virólogo mundialmente conocido, quien se encargó de instruir el personal que más tarde tra-

bajaria en la parte científica de la lucha contra la Fiebre Aftosa en Colombia.

Creo importante anotar, que en este trabajo, sólo se dará importancia al Virus Aftoso como tal, sin tratar lo que respecta a su patogenia, sus consecuencias, pérdidas que ha ocasionado etc. Como ya dije, no es mi intención sentar nuevas bases, en cuanto a trabajo científico se refiere, pero quiero si, aclarar varios puntos, aún desconocidos para la mayoría de los colegas ya que prácticamente, solo se sabe que hay Fiebre Aftosa en Colombia. Se dará una importancia especial, a lo que respecta a la Tipificación del Virus, su clasificación previa, su comportamiento de Laboratorio a través de las diferentes experimentaciones, sus estudios cruzados entre los distintos tipos colombianos, y entre estos y otros virus extranjeros. Se harán breves comparaciones en cuanto a las diferencias de comportamiento del virus en el campo, su distribución en las diferentes regiones del país, basándonos en el control diario del Laboratorio de Tipificación. Para el efecto, se incluye un mapa epizoológico, en el que aparece la localización de los diferentes Virus causantes de Enfermedades vesiculosa, y que son cuidadosa-

mente controladas, por medio de diagnósticos diferenciales.

No quiero seguir adelante, sin dar antes mi más profundo agradecimiento al Profesor Traub, gracias a quien adquirí los conocimientos necesarios para la elaboración de este trabajo. Es por él, que hemos logrado conocer y estudiar la enfermedad, ya que siempre ha estado listo a prestar su colaboración en todo lo que se refiera a la lucha contra la Fiebre Aftosa.

PRIMERA PARTE

METODOS USADOS

- a) Fijación de Complemento
- b) Inoculación de animales susceptibles.

Fijación de Complemento

La Prueba de Fijación de Complemento, ha sido el medio de diagnóstico diario, para muestras sospechosas llegadas del campo, para clasificación de virus, para pruebas de pureza de material pasado por establos y en general para las distintas pruebas serológicas. Desde un principio, se adoptó la variación al método, usado por el Dr. Traub, con lectura al ojo de 100% de hemólisis, habiéndose demostrado perfectamente suficiente, y exacta, siempre que se haya adquirido la práctica necesaria. Además la rapidez del método, la hace de suprema utilidad, ya que por él se logra un diagnóstico preciso de la enfermedad, a las pocas horas de llegado el material sospechoso al Laboratorio.

El método de Fijación de Complemento, en el diagnóstico y determinación de diferentes tipos de Virus Aftosos, fue enunciado en 1929 por Ciuta (1), quien demostró tres tipos diferentes, (O, A y C) según Vallé, inmunológicamente diferentes, después de que varios investigadores habían obtenido resultados negativos. Usó para el efecto, epitelios vesiculares de curies infectados, como antígeno y antisuero ho-

mólogo inmune, obtenido de curies hiperinmunizados, con virus pasados por cerdo. Los ensayos encaminados a extender los resultados a material bovino, con el fin de aplicar el método a un diagnóstico rápido y seguro, sólo tuvieron éxito hasta el año de 1943, en el que Traub y Mohiman (2), anunciaron la fijación de Complemento específica, con sueros de curies inmunitados, y extractos de epitelios de bovinos infectados, como antígeno. Con este método, se reemplazó rápidamente, el antiguo diagnóstico de inmunidad cruzada, especialmente en lo que se refiere a la determinación de tipos. La fijación de complemento se hizo entonces útil, no sólo para el diagnóstico de material de campo, sino que resolvió el problema de la prueba de pureza de los virus pasados por Laboratorio, con el objeto de producir Vacunas (2). Es de primera necesidad para determinar cualquier infección mixta que ocurra en los trabajos sobre virus, ya que en el campo éstas se encuentran solo ocasionalmente.

Aunque se han hecho algunas modificaciones al método inicial, todos los serólogos están de acuerdo en usar, antisueros de curies hiperinmunizados, y epitelios de animales infectados espontáneamente, como antígeno en el diagnóstico diario de Fiebre Aftosa. Se ha experimentado en la obtención de sueros hiperinmunes de animales grandes, pero hasta el momento, no se han obtenido resultados satisfactorios, hasta donde estamos informados.

Inoculación de animales susceptibles.

a). En los diferentes pases de Laboratorio, con las cepas de campo, con fines diagnósticos, para obtener material virulento, o para titular material, se han usado dos métodos de inoculación en los establos aislados, en cuanto a la práctica en bovinos susceptibles se refiere.

El primer método usado, ha sido el de escarificación lingual, usando para el efecto, escarificadores apropiados en

forma de lanceta de doble filo, con los cuales se hacen cortes transversales, sobre toda la superficie lingual, empeñando en la base de la lengua. Los cortes no deben interesar la submucosa, y deben hacerse con escasa separación con el objeto de dar una mayor superficie de penetración al Virus. Con una torunda de algodón estéril, empapada en el material virulento (suspensión de la muestra de campo o de epitelio ya pasado por Laboratorio), se frota el tejido escarificado, en varios sentidos, hasta que se considere que toda la superficie lingual esté debidamente contaminada; así se logra que el virus penetre adecuadamente, y se obtienen vesículas de buena formación. La fórmula de los buffers de suspensión para antígenos y de otros compuestos químicos usados en la experimentación diaria, serán dadas en el capítulo de materiales usados. El método de escarificación lingual, tiene el inconveniente, de producir a veces, infecciones bacteriales secundarias, sobre la superficie y submucosa linguales, dificultándose la obtención de material y la apreciación de las lesiones. Además, la formación de las vesículas no es considerable, y debido a la profundidad de los cortes, éstas se rompen prematuramente, trayendo como consecuencia la recolección de un material de poco contenido en antígeno.

El segundo método, de infección artificial en bovino es el intradermolingual, es decir, bajo la epidermis del epitelio lingual. Para el efecto se usan macerados y suspensiones de epitelios bacteriológicamente estériles, del 5, 10 o 20%, en buffer M/15 o en salinabuffer. Se inocula aproximadamente, 10 cc de la suspensión por animal, en toda la superficie lingual, y en puntos repartidos de atrás hacia adelante. De esta manera se puede recolectar la mayor cantidad posible de epitelio virulento. Para la inoculación se usan jeringas de 10 cc. y agujas calibre 22, dobladas en ángulo obtuso, para facilitar

la operación. En el caso de titulaciones de virus en bovinos, o inoculación de un virus con diferentes líquidos de suspensión en la misma lengua, es conveniente, hacer un esquema gráfico previo de ésta, dividiéndola en puntos exactos, en donde se inoculará cada dilución o cada material, con el objeto de no tener dificultades en el momento de la apreciación. Por este método de inoculación intradermolingual, se logra, que concentraciones aun muy bajas de virus, en materiales de campo, mal tomados, se multipliquen y produzcan lesiones. Si el material que se usa, es bacteriológicamente estéril, se previenen infecciones secundarias, a diferencia del método anterior, en donde las bacterias encontraban vía fácil de penetración por las escarificaciones. Además, la formación de vesículas es buena, y en veces éstas ocupan casi la totalidad de la superficie lingual; por lo tanto el material se recolecta en condiciones óptimas. Este es el método que se usa en las titulaciones, y en la recuperación de virus de materiales de campo, que no han dado resultado alguno, con la fijación de complemento.

b) Para las experimentaciones relativas a la transmisión y a los pases diarios de las diferentes cepas de virus aftosos a curies, ya sea para obtención de antisueros, titulaciones de virus o experimentos de inmunidad cruzada, se han usado también dos métodos de inoculación o infección artificial; son en principio los mismos usados en bovino, pero el sitio de infección es el epitelio plantar; para el efecto, se prefieren, curies adultos, sanos de un peso comprendido entre 500 y 700 gramos, y si posible de epitelio plantar no pigmentado, con el objeto de apreciar la formación de vesículas muy tenues. Parece que dicho pigmento, tiene algo que ver con la formación de vesículas, pero falta experimentación al respecto. Como regla general, cuando se trata de adaptar un virus a la especie, o de recuperarlo de un material poco vi-

sultados de la inoculación son bastante tracutánea, del material en suspensión concentrada y si posible, bacteriológicamente estéril. Se usa también para hiperinmunizar curies en la obtención de antisueros. Se emplean para el efecto, jeringuillas de tuberculina de 1 cc. y agujas calibre 26, inoculando 0,1 a 0,2 cc. de la suspensión virulenta en cada pata, repartida en dos o tres puntos diferentes. El método de escarificación es similar al usado en bovino, y se usan los mismos útiles; es aconsejable, cuando se trata de pasar material ya adaptado a la especie. Una vez hechas las escarificaciones se hace la infección con linfa fresca recientemente tomada de las lesiones del pase anterior. Si esta linfa es escasa como sucede con relativa frecuencia, especialmente en cepas difíciles de adaptar, se debe hacer un macerado en mortero con arena estéril, de las cubiertas epiteliales del pase anterior, y preparar una especie de pappilla espesa, con un buffer; esto es luego frotado sobre las superficies plantares escarificadas. Las infecciones intracutáneas son a veces necesarias cuando por motivos, como edad del animal demasiado tiempo transcurrido entre dos pases, o muerte de los curies, se pierde un pase. Hay que hacer entonces suspensiones concentradas con el macerado de las cubiertas vesiculares del último pase. Por la cantidad minúscula de este material, es prácticamente imposible someterlo a filtración, y muchas veces con la sola centrifugación a que se somete el extracto vesicular, es imposible descartar la presencia de bacterias, que a veces producen infecciones secundarias de importancia, dificultando o impidiendo del todo la recolección de linfa y vesículas. Por eso, dentro de lo posible, hay que evitar la inoculación intracutánea, que aparentemente, es mejor por lograrse una mayor y más segura formación de vesículas. Ahora, si el material virulento se puede someter a filtración, el método es ideal, y los re-

rrulentos, se debe usar la infección claros.

Por el método de escarificación, se logra una formación de vesículas bastante aceptable siempre que el virus esté ya adaptado a la especie y que las condiciones del animal lo hagan completamente susceptible. En estos casos, la formación de vesículas no difiere en nada en la obtenida por la infección intracutánea. En todo caso, cualquiera que sea el método usado para la inoculación en la experimentación con virus aftos en curies, se deben tomar animales adultos, y de buen tamaño, pues está demostrado que animales pequeños no son, o son muy poco susceptibles dificultando el trabajo de gran manera. En titulaciones o cualquier otra inoculación de importancia, sólo se pueden obtener resultados claros y concluyentes, tomando curies adultos y usando material bacteriológicamente estéril.

Puede también infectarse el epitelio palmar en los curies pero las lesiones son menores y la cantidad de linfa y de material vesicular que se obtienen es muy poco. Si el extracto virulento es escaso, basta inocular una sola pata, y si el animal tiene una de éstas pigmentada, debe preferirse la depigmentada.

MATERIALES USADOS

a) Para las diferentes pruebas de Fijación de Complemento, se han usado, los siguientes materiales:

- 1) Antígeno.
- 2) Antisuero.
- 3) Complemento.
- 4) Sistema Hemolítico (Glóbulos rojos y amboceptor hemolítico).
- 5) Solución salina.
- 6) Vidriería y demás materiales de laboratorio.

ANTIGENO

Antígenos apropiados para Fijación de Complemento, pueden ser preparados a partir de epitelios vesiculares de todos los animales susceptibles a una

infección espontánea. En recientes investigaciones llevadas a cabo por el profesor Traub, se ha demostrado que los embriones de pollo infectados, pueden también dar un antígeno específico (3). En cambio, extractos de cerebro de ratón blanco infectado con cepas neurotropas de virus aftoso, no han dado hasta el presente, resultados positivos. (4). Según experimentos de ultracentrifugación, el antígeno que fija Complemento en la Fiebre Aftosa, es diferente de la partícula de virus infectante (5). Se ha demostrado que sedimenta más lento que el virus y no aparece que este juegue un papel en la fijación de complemento, ya que muchas veces, por centrifugación fraccionada, materiales que dan buenos antígenos para fijación de complemento, no tienen aún pequeñísimas concentraciones de virus demostrable por inoculación en animales susceptibles. Es desconocida la relación que existe entre la partícula virus y la porción antigenica; hay autores que afirman que el antígeno es una proteína y no un carbohidrato o un lípoide (5). Igualmente se ha logrado separar por medio de la ultracentífuga, el antígeno inmunizante, del fijador de complemento.

El antígeno para pruebas de diagnóstico, es preparado como ya se dijo, de epitelio vesicular de animales infectados. Es importante que el material sea tomado en los primeros días de la enfermedad, pues después de abiertas las vesículas el antígeno es inactivado rápidamente. La prueba de fijación de complemento, depende en su mayor parte, de la cantidad y calidad del material recibido del campo. Para envío de esas muestras de Laboratorio, se usa una mezcla a partes iguales de glicerina y Buffer de Fosfato, con un pH de 7.6. Este preservativo, inhibe la producción de microorganismos, y conserva el antígeno en buenas condiciones por mucho tiempo, siempre que la temperatura se mantenga entre 2 y 4° C.

Del epitelio recibido, se hacen ex-

tractos al 10 o 20%, según la calidad y cantidad del material, triturándolo en mortero estéril, y suspendiéndolo en Salina Buffer. Es conveniente que el epitelio sea triturado minuciosamente, con el objeto de que el antígeno se ponga en libertad. Esta suspensión, es después centrifugada a 1500 o 2000 RP M durante 15 minutos. El sobrenadante, se pasa a un tubo de prueba estéril, y se calienta a 57°C por 30 minutos en el baño de María. El calentamiento tiene por objeto, quitar al antígeno sus propiedades anticomplementarias; este método puede ser reemplazado por la extracción con éter o cloroformo, pero es más lento, y los resultados son prácticamente los mismos. Cualquiera que sea el método, después de esto, el antígeno está listo, para la prueba serológica. Si el material que se ha recibido es demasiado viejo o mal tomado, y no ha dado resultados en la fijación de complemento, hay que proceder a la inoculación intralingual de bovinos o intraplantar de curies, cuyos métodos se explicaron anteriormente. En caso de que el material en cuestión, tenga aun trazas de virus activo, aparecerán vesículas dentro de los días siguientes a la inoculación, y las cubiertas epiteliales serán usadas para las pruebas de fijación de complemento.

ANTISUERO

Además de un antígeno de buena calidad, un suero altamente específico, es de gran importancia para las pruebas de diagnóstico. La preparación de los antisueros, es un procedimiento difícil, costoso y arriesgado. Es arriesgado porque las diferentes pruebas de estos sueros, requieren un suministro constante de antígenos provenientes de reses infectadas con los tres tipos de virus aftosos y los dos tipos de virus de estomatitis vesicular. Debido a que en Colombia, no tenemos hasta el momento, el tipo "C" (Vallé) de Fiebre Aftosa, y al peligro que para el país significaría importarlo, aun para fines expe-

rimentales, los sueros preparados en el laboratorio de Tipificación con cepas nacionales, no son usados para el diagnóstico diario sino que para el efecto se emplean antisueros importados que han sufrido todas las pruebas del caso. Los antisueros colombianos, no han podido pasar la prueba de pureza por la falta del virus "C", y únicamente son usados con fines experimentales.

En la producción del antisuero con fines de diagnóstico, hay que tener en cuenta la variabilidad serológica de los virus de la Fiebre Aftosa. Un antisuero preparado contra una variante serológica de uno de los virus de F. A. (Fiebre Aftosa), generalmente, da una reacción intensa con el antígeno correspondiente y en cambio, reacciones muy débiles con otras variantes del mismo tipo. Por lo tanto, es indispensable producir antisueros específicos muy potentes, ya que los sueros débiles no podrán dar resultados concluyentes, con material de campo que tenga solo una pequeña cantidad de antígeno, de una variante, contra la cual se ha preparado el antisuero. Según experiencias de algunos investigadores, entre ellos Traub de Alemania, (6), no se han encontrado cambios repentinos en la estructura antigénica del virus, en determinada área enzoótica, desde que se introdujo la Fijación de Complemento como medio de diagnóstico y determinación de variantes. No hay duda, de que ligeros cambios serológicos dentro de un tipo de virus de F.A. pueda ocurrir, sus causas no son conocidas y no son frecuentes en el campo. La presencia de estos cambios con la presentación de nuevos virus, es fácilmente evidenciable, siempre que se cuente con sueros altamente específicos.

Para la preparación de antisueros contra la F. A. y la E. V. (Estomatitis Vesiculosa) con fines diagnósticos para la Fijación de Complemento, es necesario seleccionar una cepa típica de campo, con la cual se infectan los cu-

ries productores de los antisueros. Los métodos de infección han sido ya explicados; los animales deben ser adultos, sanos y bien nutridos. Por lo general, se acostumbra a tomar lotes de cuatro a seis curies, haciendo pases sucesivos, en lotes iguales, con linfa del pase anterior. Para el primer pase, se toma material bovino de campo, que se haya escogido para el efecto de producción del antisuero. Después de tres o cuatro pases en que la enfermedad generalice en la totalidad de los animales usados, (la generalización, consiste especialmente en la formación de vesículas secundarias en la epidermis palmar y en la lengua), se recolecta el material de los pases que hayan presentado buenas vesículas primarias a medida que se hacen los pases y se conservan si es posible en hielo seco. (Los animales negativos de los diferentes pases se sacrifican). Si no se cuenta con esto, basta poner las vesículas en glicerina Buffer, y colocar los tubos en nevera. Los animales en que se haya obtenido generalización, deben ser reinfectados en el cutis plantar, una vez que hayan curado las primeras lesiones, con un extracto al 20% en Buffer M/15 de las cubiertas epiteliales conservadas en glicerina. La cantidad a inocular en cada pata, es de 025 cc. por vía intracutánea. Por lo general, los animales, no desarrollan vesículas después de esta inoculación. Dos o tres inoculaciones más, (hiperinmunizaciones), se hacen con 3 a 4 días de intervalo, en la misma forma antes escrita. Los animales se sangran en blanco, 2 o 3 días después de la última inyección intracutánea, y se prueba cada suero individualmente. La cantidad promedio de suero que se obtiene de cada curí es de 8 a 10 cc. El método de inmunización que se usa para producir antisueros de E. V. es el mismo que el usado con la F. A. solo que se usan tanto los animales que presentan vesículas primarias, como los que presentan ge-

neralización en consideración a que el número de animales que presentan generalización en E. V. es mucho más bajo que en F. A. Una vez que se han obtenido los sueros individualmente, se separa un centímetro de cada uno, conservando el resto en la nevera. Este cc. de suero es inactivado a 57°C por 30 minutos, con el fin de destruir el complemento, y se somete a las siguientes pruebas de rigor:

- a) Prueba de efecto Anticomplementario.
- b) Prueba de especificidad o Pureza.
- c) Prueba de Potencia.

a) Para esta prueba hay que tener el antisuero en dilución de 1:2.5, que es una cantidad doble o cuádruple a la usada en las pruebas de diagnóstico. El complemento debe tomarse en 1% más que el obtenido en su titulación preliminar (DMH), es decir que se tomarán dos Unidades de Complemento (Uc). Si esta prueba demuestra que el antisuero es aún anticomplementario, debe someterse a una segunda inactivación en el baño de María, después de lo cual se debe repetir la prueba de efecto anticomplementario. En general estos sueros no se muestran anticomplementarios.

b) La prueba de especificidad y pureza, se lleva a cabo en presencia de extractos al 10% de los diferentes antígenos de F. A. "O" "A" y "C" y de E. V. "N.J." e "Ind", y de epitelio normal de bovino. Esta prueba demostrará tal vez que no todos los sueros son de tipo específico; sin embargo, esas reacciones cruzadas no específicas no son muy débiles y se pueden eliminar diluyendo el suero respectivo con una cantidad apropiada de suero normal de curi. Los sueros que den reacciones fuertemente cruzadas (apreciables por el grado de hemólisis; ver adelante), si deben eliminarse. Si la reacción cruzada se debe a contaminación de los pases que se llevaron a cabo en la producción de antisueros, ésta es mucho más fuerte. Es obvio, que estos sueros deben elimi-

narse del todo de las siguientes pruebas. Sólo deben ser usados aquellos sueros que hayan dado en esta prueba una reacción de cuatro cruces (totalmente positivos), con el antígeno correspondiente, según se explicará al hablar de apreciación de hemólisis.

c) En la prueba de potencia de cada uno de los antisueros, se titulan estos, con diferentes diluciones con el antígeno homólogo. Aquellos sueros que den un título igual en la prueba de potencia, pueden ser reunidos y filtrados en una bujía de Berkefeld y se inactivan por 30 minutos a 56 o 57°C., en el baño de María. En seguida se les añade un preservativo que consiste en ácido fénico a razón de 0.5 cc. de la solución de fenol al 5%, por cada 4.5 cc. de antisuero, (título final en el suero, 0.5% de ácido fénico). Una vez hecha esta operación se almacenan, quedando listos para los trabajos de diagnóstico.

La tipificación con muestras de campo deficientes, que por lo general tienen un contenido bajo en antígeno fijador de complemento, requieren el empleo de los antisueros más fuertes, siempre que la importancia de ese diagnóstico compense el costo de suero potente; se hace esto especialmente, cuando se presenta un brote en un sitio hasta ahora indemne, o cuando se sospecha la presencia de una nueva variante o de un nuevo tipo de virus. Los sueros débiles, se usan para materiales frescos, recolectados durante la experimentación del Laboratorio, o en brotes en el campo, siempre que la operación se lleve a cabo en tiempo oportuno. En estos casos se espera un alto contenido en antígeno en el material sospechoso.

COMPLEMENTO

El Complemento se obtiene por punción cardiaca de curies, ojalá machos, y de un peso superior a 500 gramos. Deben ser animales sanos y bien nutridos, ya que se ha comprobado, que en estos casos se logra un complemento de gran poder. Si por cualquier circuns-

tancia no se desea sangrar en blanco los curies, debe entonces tomarse 10 a 12 cc. de sangre de cada uno, sangrando de 5 a 10 animales cuya sangre se conserva individualmente. Una vez que se ha coagulado se separan los coagulos según se hace usualmente, y el suero se somete a una centrifugación moderada con el fin de purificarlo de las células que aun hayan quedado en suspensión. Cada suero debe mezclarse con partes iguales de la Solución preservativa de Witte, cuya fórmula se dará más adelante. Los complementos así preservados conservan sus títulos por varios meses, si se almacenan (2 a 5° C); además la solución de Witte, actúa como bactericida y bacteriostático, permitiendo la manipulación del complemento sin muchas precauciones de esterilidad. Las muestras de cada uno de los sueros se titulan en presencia de salina que reemplaza el suero y el antígeno; por lo general, es suficiente hacer una titulación del 1 al 6% del complemento; los resultados deben leerse inmediatamente después de 15 minutos de incubación a 37 grados, con el fin de saber cual es la mínima cantidad de Complemento capaz de producir la hemólisis, (se denomina una Unidad de complemento,) que equivale a un 100%. Un buen complemento es aquel que produce hemólisis completa (sobre 0,5 cc de una suspensión al 2,5% de glóbulos rojos de cordero, en colaboración con la hemolisina homóloga), al 2 o 3%; se consideran aceptables los que den un 4% y se desechan los de un título superior, ya que se ha demostrado que se fijan mal, por el sistema antígeno anticuerpo. Además estos complementos de 5%, 6% o más, pierden el título rápidamente en contraste con los inferiores, que lo conservan por largo tiempo. Aquellos complementos que den un mismo título, se reunen y conservan en la nevera para el trabajo serológico diario. Es importante observar que la titulación del complemento, informa únicamente sobre sus propiedades

des hemolíticas, y es indispensable evaluar su fijabilidad, comparándola con la de otro complemento conocido.

SISTEMA HEMOLITICO

a) Amboceptor Hemolítico.

El amboceptor hemolítico, es suero de conejos que han sido inoculados repetidas veces con glóbulos rojos de cordero lavados. El suero así preparado, adquiere la propiedad de lizar los glóbulos de cordero en colaboración del complemento. Los animales empleados en la preparación de la hemolisina o amboceptor, deben ser sanos y de buen tamaño. A estos, se les inocula intravenosamente, la suspensión Stock (50%) de glóbulos rojos lavados de cordero; la primera dosis es de 2,5 cc. La segunda dosis es de 5 cc., al tercer día de la primera inyección y la tercera dosis de 10 cc. cuatro días después de la segunda inyección. Se hacen entonces sangrias de prueba de la vena de la oreja, en cantidad de 1 a 2 cc. de sangre, y a diario después del tercer día de la última inyección, se hacen titulaciones con el suero así obtenido, que debe ser antes sometido a la inactivación a 57°C por media hora, (no es indispensable inactivarlos). Esto con el objeto de destruir el complemento. Si las muestras dan títulos de 1:3200 o más, el conejo respectivo se sangra asepticamente en blanco, por punción cardiaca. Después de una segunda titulación con la cantidad total de cada suero, son preservados con 0,5% de fenol, y quedan listos para el uso. Algunos autores usan una mezcla a partes iguales del suero y de glicerina estéril, pero se ha demostrado que el título hemolítico baja considerablemente. A una temperatura de 2 a 4° C, en nevera, se pueden conservar por largo tiempo las hemolisinas con mínima alteración del título hemolítico. Después de tres a cuatro meses, es conveniente retitularlas, y descartar aquellas que por cualquier motivo hayan bajado su título de 1:2400, ya que no dan un margen amplio de seguridad.

b) Glóbulos rojos de Cordero.

Un cordero sano, y en buen estado de nutrición, se sangra en la vena yugular, tomando semanalmente de 200 a 300 cc. de sangre. Esta se desfibrina con perlas de vidrio, por agitación continua durante 15 minutos. Es luego filtrada por papel o una capa delgada de algodón, sobre tubos de centrífuga. Se centrifuga por 10 minutos a 1500 o 2000 RPM, y luego el sobrenadante se saca por medio de vacío, reemplazándolo con solución salina. Se repiten los lavados por cuatro o cinco veces, hasta que el sobrenadante se aprecia completamente incoloro. Despues de la última lavada, el sedimento se mezcla a partes iguales con solución salina obteniendo así la suspensión Stock, que para los trabajos serológicos se considera como 100% de glóbulos rojos. Esta suspensión puede conservarse en nevera hasta por una semana, si se ha manipulado con cierta esterilidad, pues de lo contrario se desarrollan gérmenes hemolíticos que alteran la suspensión rápidamente.

El sistema Hemolítico, es una mezcla a partes iguales de la dilución del Amboceptor y la suspensión de Glóbulos rojos. La dilución del amboceptor, contiene 4 veces la mínima cantidad hemolítica, es decir que si determinada hemolisina ha dado un título de 1:4800, se debe tomar en la preparación del sistema hemolítico, 1:1200. La suspensión de glóbulos rojos se toma generalmente de 4 a 5% partiendo de la suspensión Stock. La cantidad varia con la claridad que se quiera obtener en la hemólisis, apreciable al ojo. Por lo general para un trabajo diario de Fijación de Complemento, basta preparar en la mañana 200 cc. de Sistema hemolítico, es decir 100 cc. de la dilución, del amboceptor 100 c.c. de la suspensión globular. Antes de usarlo debe incubarse por 15 minutos a 37 grados al baño de María y agitarlo cada vez que se necesite. No es conve-

niente usar el mismo sistema hemolítico por dos días consecutivos.

SOLUCION SALINA

Cloruro de Sodio q. p. 8,5 gramos
Agua destilada c. s. p. 1000 cc.

La solución puede ser esterilizada o no, según las necesidades; debe probarse, mezclando 4 cc. de la solución, con 1 cc. de la suspensión Stock de glóbulos rojos. Se centrifuga por 10 minutos a 1500 RPM. Despues de la centrifugación, el sobrenadante debe quedar completamente incoloro. La solución debe agitarse cada vez que vaya a hacerse uso de ella.

VIDRIERIA Y OTROS MATERIALES DE LABORATORIO

Tubos de prueba, tubos de Kahn, tubos graduados de 10, 50 y 100 cc. de centrifuga, cilindros graduados, bujías de Mandler y de Berkefeld, pipetas graduadas, de 1, 2, 5 y 10 cc., morteros, arena estéril, etc.

Una vez enumerados y discutidos los materiales usados, creo conveniente, hacer una corta explicación de los distintos métodos de Fijación de Complemento, y las variaciones que cada uno de los componentes tiene en estos métodos. Esta prueba de Fijación de Complemento, se puede llevar a cabo de acuerdo con dos variaciones: 1) Usando cantidades constantes de suero y antígeno. 2) Dejando constantes el antígeno y el complemento, y usando cantidades variables de suero.

El primer sistema es usado en muchos Laboratorios encargados de la Tipificación de Virus. Por este método se logra contrarrestar el efecto anticomplementario de muchos antígenos, por la variación del complemento. Es indispensable que el contenido en antígeno fijador de la muestra en cuestión sea alto, con el objeto de obtener un resultado claro en los tubos de mayor cantidad de complemento. Antes de hacer la prueba, es necesario, hacer una titulación preliminar de éste en presen-

cia de Suero Normal de curí y el antígeno sospechoso. Si en esta prueba, la mínima cantidad de complemento que produce hemólisis total, (Dosis Mínima Hemolítica), fuera de 4%, (Una Unidad complemento), las proporciones usadas en la prueba, serán de 5, 6, y 7%, es decir, 2, 3 y 4 Unidades de complemento. Los antisueros, diluidos al 1:5 o más según la potencia, y la suspensión del antígeno al 10 al 20%, así como el complemento, entran en la prueba a razón de 0.25 cc. por tubo. La prueba debe hacerse como ya se explicó anteriormente, en presencia de los antisueros de F. A., "O" "A" y "C" y de E. V. "N. J." e "Ind.". Se somete a un tiempo llamado de Fijación en el baño serológico, por 30 minutos a 37 grados C, y se añade el sistema Hemolítico, a razón de 0,5 cc. por tubo; entra de nuevo al baño de María por media hora a 37 grados C. (periodo de Lisis) y los resultados se leen inmediatamente, centrifugando los tubos que no tengan una hemólisis completa, con el fin de facilitar la apreciación de grado de dicha hemólisis.

Buffers diluyentes y preservativos, empleados durante la experimentación.

1) Solución de Witte, para preservar Complemento.

Ácido Bórico 2 gramos
Sulfato de Potasio q. p. 5 gramos
Agua destilada 50 cc.

Es de suma importancia, usar sustancias químicas puras para la elaboración de este preservativo.

2) Solución Buffer de Fosfato M/15, base para preservativos y diluyentes de sueros y antígenos, con un pH de 7.6.

Fosfato de Sodio Bisódico 10.7 gramos
Fosfato monopotásico .. 0.98 gramos
Agua destilada 1 litro.

3) Glicerina Buffer, para envío y conservación de material de campo y de estable, ya sea de curí o de bovino.

Glicerina bidestilada 50 cc.
Buffer de Fosfato M/15, pH 7.6 50 cc.

Se preparan frascos estériles, se colocan 15 cc. aproximadamente de esta solución y se esteriliza por 30 minutos en el autoclave a 15 libras.

4) Salina Buffer, para suspensiones de antígenos para fijación de Complemento, o extractos de material virulento para inoculaciones.

Solución salina 3 partes
Buffer de Fosfato M/15 pH.
7.6 1 parte.

Se coloca en fiolas o frascos a razón de 50 a 100 cc. y se esteriliza en el autoclave a 15 libras por 20 o 30 minutos.

5) Solución de fenol al 5% para preservar antisueros, o hemolisinas.

10 cc. de dicha solución por 100 cc. de suero (0.5% fenol).

El segundo método, consiste en el empleo de cantidades variables de suero, dejando constantes el antígeno y el complemento, da buenos resultados, en el caso de que alguno de los sueros no sea estrictamente puro. Es además más económico que el anterior ya que el suero por usarse en diluciones progresivas, se usa en pequeña cantidad, cosa de por demás ventajosa debido a su alto costo. Los resultados se leen exactamente lo mismo que en el método anterior. Un tercer método, consiste en la variación de la cantidad del antígeno; puede ser útil, cuando la cantidad con que se cuenta es poca, y también cuando es fuertemente anticomplementario. Si el contenido en antígeno fijador es bajo, el método es deficiente; la experimentación que se ha hecho, es poca y no tenemos conclusiones al respecto.

Lectura de Resultados, por apreciación de hemólisis.

La Fijación de Complemento por el sistema Antígeno-Anticuerpo, trae como consecuencia una reacción positiva, con hemólisis completamente negativa, a la vez que resultados negativos, sin

fijación, dan una hemólisis completa. Estos son los dos extremos de la reacción serológica, que son fácilmente apreciables a simple vista. El resultado positivo, debe observarse después de haber centrifugado el tubo a 1500 RPM por 10 minutos, ya que el sedimento globular que es inversamente proporcional a la hemólisis, es definitivo para una estimación exacta, dentro de las posibilidades del método de lectura al ojo. En el Laboratorio de Tipificación hemos usado las siguientes convenciones:

Hemólisis nula, reacción positiva
xxxx cruces.

Hemólisis completa, reacción negativa — (negativo)

Entre estos dos límites, la hemólisis se estima de media, una, dos, tres cruces, según el grado de fijación, y por consiguiente el grado de hemólisis. En titulaciones de Complemento o ambo-ceptor hemolítico, se considera como Dosis Mínima Hemolítica, la concentración mínima que produce 100% de hemólisis. La lectura al ojo, ha dado hasta el momento buenos resultados; claro está que si se necesitan resultados exactos, en experimentaciones de precisión, se debe usar el método de lectura al 50% en el espectrofotómetro. Una ventaja del método usado en el Laboratorio de Tipificación, es la rapidez con que se dan los diagnósticos, y en los cuales, la variación de la apreciación de hemólisis, es tan poca, que no tiene prácticamente ninguna consecuencia, en los resultados. Las reacciones positivas son generalmente tan claras, que no dejan lugar a duda.

SEGUNDA PARTE EXPERIMENTACION

1) Tipificación de Virus.

El método de fijación de Complemento, como medio de diagnóstico para muestras e campo, y para pruebas de pureza de material tomado de labora-

torio, ha sido empleado con magníficos resultados, en varios países, desde que se extendió el uso del procedimiento a material de animales infectados espontáneamente durante una epizootia. Un valioso informe de los técnicos virólogos encargados de la lucha contra la F. A. en México, (7), demuestra una vez más la efectividad del método en la práctica diaria de manejo de virus de Enfermedades vesiculares. En uno de los capítulos dice lo siguiente: "Además, la fijación de Complemento, es el medio posible para controlar los cambios antigenicos de las cepas de Virus usados para producir vacuna, y para averiguar cualquier aparición de una nueva variante en los virus de campo. Se ha iniciado el trabajo, para aplicar el método de la Fijación de Complemento en la Standarización de la vacuna. Sobre una base de 200 análisis de material de campo remitido al Laboratorio Serológico, se ha concluido que la técnica en cuestión llena las necesidades de una prueba in vitro, rápida, económica y segura".

Entre nosotros, no ha tenido el empleo de la Fijación de Complemento, el menor tropiezo, hasta el momento. Se ha demostrado de utilidad enorme, en lo que se refiere a la inmediata diferenciación de brotes de F. A. y de E. V. Desde que se tuvo noticia de la presentación de la F. A. en Colombia, el Laboratorio de Tipificación empezó a trabajar en el diagnóstico de las muestras de campo, ayudado en un principio por el Instituto Behring, cuyos expertos, fueron los primeros que hicieron los diagnósticos en el país, por medio de la Fijación de Complemento. En ese entonces, fue usado el método del 50% con lectura en el espectofómetro, método preciso, pero que tiene la falla de demorar el diagnóstico varias horas. Actualmente, el resultado de la investigación sobre muestras sospechosas, se da a las dos y media horas de recibir el material.

Hasta la elaboración de este trabajo,

el Laboratorio, ha recibido y tipificado, material sospechoso de los siguientes departamentos e intendencias: Cundinamarca, Caldas, Antioquia, Boyacá, Valle, Santander, Norte de Santander, Huila, Tolima e Intendencia del Meta.

Se han Tipificado, desde el mes de Marzo del año de 1951, hasta el presente mes de Mayo de 1952, 113 muestras sos-

pechosas de todos los departamentos ya enumerados. A continuación, aparecen los resultados de esas Tipificaciones, teniendo en cuenta el número de muestras llegadas de cada departamento, y el porcentaje de cada una de las enfermedades vesiculares y de cada uno de sus diferentes tipos que se han presentado.

NUMERO DE MUESTRAS Y PORCENTAJES

Departamento	Aftosa "O" %	Aftosa "A" %	E.V. "N.J." %	Negativ. %	E.V. "Ind." %
Cundinamarca	22.70.9		1.2 85		9.29.1
Valle	14.40	8.22.85	1.5		12.3285
Antioquia	11.55		3.30		8.40
Caldas	4.40		1.20		3.30
Tolima			1.33.5		4.80
Boyacá	2.66.6		1.33.3		2.66.6
Huila				1.50	1.50
N. Santander					
Santander	2.100				
Meta	1.100				

Las muestras que han dado resultado negativo se deben casi en su totalidad, a material mal tomado, ya sea en un periodo demasiado avanzado de la enfermedad, en que tanto el virus activo, como el antígeno fijador de Complemento se han destruido, o es tan pequeña cantidad que ha sido imposible llevar a cabo la reacción o recuperar virus por inoculación. Los datos epizoológicos, que han llegado con el material sospechoso, hacen suponer, que en realidad el brote se debe ya sea a la E. V. o a F. A. Esto se ha confirmado, por recolección de material fresco en las mismas zonas, con lo cual se ha aclarado el diagnóstico. Hasta el momento, no se ha presentado el caso poco común pero que ha sido observado en el Instituto Behring de Bogotá y en los Laboratorios Mejicanos, y que consiste en que un material en condiciones óptimas, no da ninguna reacción

de Fijación de Complemento, portándose como antígeno normal. Después de pases por Laboratorio, el material pierde esa propiedad. Las causas no son conocidas, pero hay autores que opinan que dichos materiales, tienen un contenido en antígeno fijador demasiado bajo, o que la capacidad de combinación de dichos antígenos con el complemento, en presencia de antisero homólogo, es nula. (8).

Hay que tener en cuenta, que los datos que aparecen en el cuadro anterior, están hechos de acuerdo con el material que se ha recibido en el Laboratorio, y que solo dan una noción del estado de infección de las diferentes regiones del país. Muchos de los brotes, que periódicamente vienen apareciendo no se han tipificado, por falta de material de diagnóstico. Durante los últimos meses, se ha intensificado la Campaña, hasta el punto de permitir que depar-

tamentos declarados como aftosos, se hayan encontrado libres, confirmando plenamente, que los brotes se debían a E. V. Esto solo se hace posible con un suministro constante de material de investigación, con el cual se aclaran las dudas y se controla la aparición de un nuevo virus o un nuevo tipo de virus. El caso anterior es el del departamento del Huila, considerado como aftoso hasta hace algunos meses, y en el que se comprobó plenamente, el virus de la E. V. de la misma manera, el Tolima, se ha encontrado hasta ahora limpia de F. A. hasta donde se puede saber con el material que se recibe en el Laboratorio. Claro está, que resultados concluyentes sobre la situación actual del país en cuanto a F. A. se refiere, solo se podrían obtener de una tipificación continua en cuanto brote se presente. Esto es indispensable, no solamente en lo que se refiere a datos estadísticos, sino que es de importancia capital, para enfocar las campañas de erradicación y de vacunación.

A igual que en el resto de los laboratorios serológicos, se han escogido aquí, unas cuantas cepas de experimentación, con las cuales se ha hecho el estudio de los virus colombianos, se han comparado entre sí, y con materiales extraños. Estas cepas, llamadas cepas típicas, se han escogido entre todas las recibidas, por haber mostrado en el campo, marenda infecciosidad y contagiosidad y un alto valor antigenético en los trabajos de laboratorio. Con ellas se han obtenido los antisueros específicos contra nuestras cepas nacionales, y se han hecho los estudios referentes a la adaptación de los virus, tanto a embriones de pollo, como a cultivos de tejidos, con fines de producción de vacuna. Son estas, las cepas O23 y A10 (La numeración, corresponde al número de llegada de cada una de las cepas al Laboratorio). Con el objeto de comprender mejor, el manejo a que se somete cada muestra sospechosa en el

laboratorio, creo conveniente incluir los procedimientos de diagnóstico de las dos cepas típicas que son idénticas a los llevados para todo material llegado al Instituto. Como dijo anteriormente, las muestras que por su calidad no permiten un citomóstico inmediato por fijación se complementan con serotípicas a inculcaciones, como método de respuesta. El método más común es el de variación del antisero, con antigeno y complemento constantes, pero si se presenta el caso, se requiere una tipificación, como se explicó en el capítulo correspondiente.

PROTOCOLO N° 23

Material de campo recolectado el 26 de Mayo de 1951, en una hacienda del Municipio de Usaquén, Cundinamarca, por el personal del laboratorio de Tipificación. El brote fue cuidadosamente estudiado tan pronto como se tuvo noticias de él. Los animales afectados no habían sido vacunados, y fueron atacados en un 100%. La mortalidad fue del 20%, en una Hacienda de 200 animales. Se recolectaron aproximadamente 20 gramos de epitelio virulento, en condiciones óptimas, se conservó en glicerina dulce, y se llevó al Laboratorio, para someterlo a las pruebas de diagnóstico.

1) Se tomó un gramo de material, se lavó con Salina-Lufier, se trituro con mortero con arena estéril, haciendo una suspensión al 10% se centrifugó a 1500 R.F.M durante 15 minutos, y el sobrante, fue inactivado a 57°C por media hora en el baño de María.

2) Se hizo una titulación preliminar del complemento, en presencia de suero normal de cerdo, y del antigeno respectivo. Los resultados de la titulación, fueron los siguientes:

1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%
xxxx	xxx	xx	x	--	--	--

La DMH de complemento, es de 5%, es decir en equivalente de una unidad de complemento. En la prueba de Fija-

ción con fines diagnósticos se debe usar el 6% o sea 2 U.c.

Diagnóstico Director de Fijación de Complemento, con el Material N° 23.

Antígeno: Extracto al 10% del material N° 23.

Antisueros: "O", "A" y "C" (Según Vallé), de los Laboratorios de Pirbright Inglaterra.

"N.J." Orden N° 1 EE. UU.
"Ind." Pirbright Inglaterra.

Los antisueros, se tomaron en diluciones de 1:10, 1:20 y 1:40.

Complemento, 6%. 2 U.c.

Los resultados, después de los períodos de fijación y de lisis una vez añadido el Sistema Hemolítico, fueron los siguientes:

CUADRO N° 2

Sueros	Diluciones	1:10	1:20	1:40	Controles 1:10 Suero
O	1:10-1:40	xxxx	xxx	xx	—
A	"	—	—	—	—
C	"	x	—	—	—
N.J.	"	—	—	—	—
Ind.	"	—	—	—	—
Control Ant. con Compl.	—	—	—	—	—
Control Ant. sin Compl.	xxxx	—	—	—	—

Resultados de la Prueba de Fijación de Complemento con el material sospechoso, N° 23: FIEBRE AFTOSA TIPO "O" (VALLE).

Se incluye un control para cada uno de los sueros, (sin antígeno), con el objeto de observar, si por cualquier motivo, uno de los antisueros se ha vuelto anticomplementario, alterando entonces considerablemente la reacción.

El Control de Antígeno N° 1, sin suero, con complemento, se incluye con el mismo objeto.

El control de Antígeno sin Suero y sin complemento indica si este antígeno es hemolítico. Además estos dos controles de antígeno, sirven como bases de comparación de hemólisis en los resultados finales, ya que en el primero, debe haber una hemólisis completa, y en el segundo, la hemólisis debe ser nula. Es necesario centrifugar este segundo tubo, para poder hacer las comparaciones exactas en el resto de los tubos positivos o sospechosos de la reacción.

PROTOCOLO N° 40

Material de campo, recolectado el 30 de julio de 1951 en una Hacienda del Corregimiento de Guanabanal, Valle del Cauca, por el personal del Laboratorio. Contagiosidad aproximada de 50% en animales convalecientes de F. A. Tipo "O". Se recolectaron, más o menos 15 gramos de 2 animales. El epitelio vesicular se recogió en condiciones óptimas. Entendemos por esto, que las vesículas estén en pleno desarrollo, pero que aún no se hayan abierto. En este período de la enfermedad, se constata siempre una Fiebre alta. El material se conservó en Glicerina Bifera, y se despachó al Laboratorio, con el fin de someterlo a las pruebas de diagnóstico.

1) Se tomó un gramo y medio del material, se lavó, se trituró con arena estéril, y se hizo una suspensión al 20%. Se centrifugó, lo mismo que el material anterior y el sobrenadante fue inactivado en el baño serológico.

2) La titulación preliminar de complemento en presencia de suero normal de curi (este suero debe ser inactivado antes de la prueba, para destruir el complemento) y el antígeno correspondiente, dio los siguientes resultados:

1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%
XXXX	XXX	XX	X	—	—	—

El título del complemento, fue del 5% (DMH), 1 U.c., debiéndose usar en la prueba diagnóstica, 6% (2U.c.).

Diagnóstico Directo de Fijación de Complemento con el material N° 40.

CUADRO N° 3

Sueros	Dilución.	1:10	1:20	Controles Suero
O	1:10 - 1:20	X	—	—
A	"	XXXX	XXXX	—
C	"	—	—	—
N. J.	"	—	—	—
Ind.	"	—	—	—
Cont. Ant. con Compl.	—	—	—	—
Cont. Ant. sin Compl.	XXXX	—	—	—

El resultado de diagnóstico, con la muestra sospechosa N° 40 fue de F. A. Tipo "A" (Vallé).

Pruebas similares, con ligeras variaciones del método en algunos casos, se hacen con todos los materiales llegados al laboratorio. Como se puede apreciar es un medio de diagnóstico muy sencillo y más aún, rápido y seguro. Se han escogido los sueros inofensos, para el trabajo diario, en consideración a su alto título, aunque no son estrictamente específicos. (Ver capítulo Fijación Cruzada). Gracias a su título, admiten diluciones con suero normal de curi, mejorando así su especificidad. En otro capítulo, trataré sobre estos sueros, no específicos, y la significación de dicha propiedad.

Las tipificaciones, se iniciaron el 29 de Marzo de 1951, con material sospechoso proveniente de un bovino de propiedad del Instituto Samper Martínez. El resultado de ese diagnóstico, fué, F.

Antígeno: Extracto al 20% de la muestra 40.

Antisueros: "O", "A" y "C", de F. A. de los Laboratorios de Pirbright, Inglaterra.

"N.J." de Beltsville EE. UU.

"Ind." Fort Lupton N° 1A EE. UU.

Los antisueros se usaron en diluciones de 1:10 y 1:20.

Complemento: 6% (2U.c.)

RESULTADOS:

A, tipo "O", presentando esa cepa la particularidad de no ser contagiosa. El animal, estando en contacto con 40 bovinos susceptibles, fue el único afectado en la finca; una vez transladado al Laboratorio, fue puesto en contacto con 4 terneros y un cerdo, los cuales, también se infectaron. Esta cepa, va a ser sometida a experimentación con el objeto de ver la posibilidad de su adaptación para la preparación de vacuna. Indudablemente, daría un margen grande de seguridad, añadiendo al hecho, que tiene un alto poder antigenico. Se ha transmitido por inoculación intralingual, en los establos aislados, y se han logrado vesículas primarias pero no generalización de la enfermedad. Se descartó la posibilidad de que fuera una nueva variante serológica, por reacciones de fijación de complemento, del suero preparado contra esta cepa, y otras cepas colombianas, especialmente la O23.

En cuanto al virus "A", se diagnosticó por primera vez a mediados del mes de Julio del año pasado, en una hacienda del Valle del Cauca. No se ha diagnosticado fuera de este departamento en el cual solo se ha encontrado aire-dedor de Cali. Tampoco se ha comprobado cambio alguno de caracteres antígenicos, en las muestras de tipo "A", recibidas hasta el momento. Como se ve claramente en los Cuadros 2 y 3, los resultados de las cepas típicas, son completamente limpios; las pequeñas reacciones cruzadas, con los Anticuerpos "O" y "C", se deben al fenómeno antes explicado, cuya interpretación es por demás complicada. Se ha demostrado en general, que cuando un antisuero tiene un título demasiado alto, se hace inespecífico, suponiéndose que existe un componente serológico común en diferentes tipos de virus Aftosos, responsable de las reacciones cruzadas. (Ver, Fijación de Complemento cruzada entre los diferentes tipos de Virus Aftosos colombianos).

Las dos cepas típicas, A40 y O23, se han adaptado a curí, antes que todo con el objeto de producir antisueros específicos; aunque estos no se han usado para pruebas de diagnóstico, se emplean en los demás trabajos serológicos, para probar materiales de curí, y para pruebas cruzadas de fijación de complemento, en las cuales no son completamente indispensables las pruebas de pureza.

Desde un principio, la cepa típica "O" se adaptó fácilmente a curios, habiéndose presentado más tarde ligeras dificultades, especialmente cuando para no interrumpir los pases diarios, nos hemos visto obligados a emplear animales jóvenes. La cepa A40, ha mostrado desde los primeros pases, gran infecciosidad para los curios; en la actualidad, lleva el pase 75, y se considera completamente adaptada, ya que presenta vesículas primarias de buena formación a las 24 horas, y generaliza-

ción a las 48 horas. Es importante anotar que la generalización en la lengua, se observó con regularidad hasta el pase 40 más o menos y que en adelante, ésta se localiza visiblemente, solo en las palmas de las manos. Con esta cepa, hay un 10 a 15% de mortalidad en los pases, generalmente, por lesiones cardíacas; se ha observado una miocarditis, pero no se ha estudiado con detenimiento. A medida que aumentan los pases, la mortalidad va creciendo paralela a la virulencia que adquieren las cepas.

Se considera, que actualmente, las dos cepas son aptas para la transmisión a embriones de pollo, con destino a una futura producción de vacuna, y los experimentos se han iniciado, bajo la dirección del Dr. Traub. Indudablemente, la producción de vacuna antiaftosa de embriones de pollo, será la vacuna del futuro. En el Occidente Alemán, se están haciendo ya vacunaciones experimentales con éxito, con virus adaptados a huevos. En Colombia se ha tomado como base para las experimentaciones, una cepa de virus "O", importada de la isla de Riems, que actualmente lleva 290 pases por huevo. Esta ha perdido totalmente la ectoparásitidad para canario, cerdos y ovejas, y hasta se espera debido a su alto poder inmunológico adaptarle para su uso. Hasta es, mientras estamos en capacidad de producir la vacuna con las cepas nacionales.

Como dije anteriormente, no se han presentado hasta el momento, cambios antígenicos en las cepas colombianas, siendo esto una gran ventaja para las campañas de cría, vacunación y vacunación que se hayan de adoptar. Considerando a gran escala la situación del país en lo que respecta a F. A., hemos llegado a las siguientes conclusiones, hasta donde estamos capacitados para juzgar de acuerdo con las tipificaciones que se han llevado a cabo, incluidas en el cuadro número 4:

CUADRO N° 4

Enfermedad	Porcentaje
	%
F.A. Tipo "O"	50.92
F.A. Tipo "A"	7.33
E.V. Tipo "N.J."	5.55
E.V. Tipo "Ind."	0.92
Negativas	35.10
Total Aproximado	99.82

Observando detenidamente, los cuadros 1 y 4, se observa, que el Virus "O", ha sido el de mayor difusión hasta el momento, ocupando mas de un 50% de las tipificaciones hechas en el Laboratorio. Las muestras negativas, llegadas de departamentos, en los cuales prevalece la infección por este virus, son sospechosas de F. A. tipo "O", calculando, que el porcentaje de éste en el país, se acerca indudablemente al 65 o 70%.

En seguida, se observa, que el Virus "A", ocupa el segundo puesto, sin haberse diagnosticado fuera de una pequeña área, alrededor del Municipio de Cali. Del Departamento del Valle del Cauca, se han recibido constantemente muestras sospechosas, y sin embargo, no ha sido posible tipificar el virus "A" fuera de la zona nombrada. En regla general, del Municipio de Palmira hacia el Norte, la epizootia ha sido causada por el virus "O", y pequeños brotes de E. V. "NJ". En un principio se temió que una fuerte epizootia aparecida en el departamento del Huila, pudiera ser debida al virus "A" introducido del Valle del Cauca, pero como se puede ver en el cuadro numero 1 solo se tipificó E. V. "NJ".

En cuanto a la E. V. "NJ" se refiere, parece que está bastante difundida, por sobre todo el país. Indudablemente, ha sido el tipo que se ha presentado con mayor virulencia, y puede ser el causante de los brotes que se vienen sucediendo hace tantos años. Muchas veces se ha temido, al tener noticias de un nuevo brote, que se deba a F. A. debido a la singular virulen-

cia que presenta la E. V. en el país. Por lo común, la enfermedad generaliza en el campo, con características similares a las de F. A. ayudada por la circunstancia de que últimamente no se han podido encontrar equinos afectados. De esto se destaca la importancia que tiene la Fijación de Complemento, en el diagnóstico diferencial de las dos enfermedades, pudiéndose dar los resultados, con el fin de tomar las medidas del caso, a las dos y media horas de recibido el material.

El Virus de la E. V. "Ind", solo se ha tipificado en Santander del Norte, y no se tiene noticia de su virulencia y comportamiento. Tampoco se ha podido someter a experimentación, debido a que el material recibido no permitió aislar Virus. Entre los dos tipos de E. V., no se ha hallado hasta el momento reacciones serológicas cruzadas.

2) — Determinación de Variantes.

Desde el año de 1943, en que se está usando en Alemania el método de Fijación de Complemento, en la determinación de diferentes tipos de virus afeatos, se inició también el trabajo encaminado a la determinación de variantes serológicas, a las cuales se les achacaban los llamados quiebres o roturas de inmunidad, que tantos trabajos implicaban en las campañas de vacunación y para lo cual no se había encontrado una explicación satisfactoria. (9). Estos trabajos, fueron iniciados y llevados a cabo por Traub y sus colaboradores, quienes en el año de 1947, encontraron la primera cepa de virus "O", que difería marcadamente de la que hasta entonces se usaba como base para la preparación de antisueros para diagnóstico, y para producción de vacuna. Esta cepa original se llamó entonces O1 dando la denominación de O2, para la nueva variante encontrada. Con el objeto de dar una información gráfica de la manera tan diferente como reaccionan cada una de estas variantes del virus "O",

en lo que respecta a la Fijación de complemento, reproduczo un cuadro, publicado en 1949, por su autor Dr. E. Traub, quien llevó a término las experimentaciones correspondientes:

CUADRO N° 5

Suecos Diluciones		Antígeno	
		01	02
01	1:05	xxxx	x
	1:10	xxx	—
	1:20	—	—
02	1:5	x	xxxx
	1:10	—	x
	1:20	—	—

Aunque la intensidad de la diferencia en la reacción serológica, no es tan marcada como la que se observa con suero y antígeno de diferente Tipo, su significado tiene una gran importancia en lo que se refiere a la producción de vacunas, contra cada una de las variantes. Está plenamente establecido, que el poder inmunitante de una variante contra otra, es inferior al conferido por la misma variante. Este fenómeno se ha observado con relativa frecuencia entre nosotros, en las vacunaciones que se han hecho con vacunas importadas, ya que se ha presentado el caso de brotes, con virus "O", en animales vacunados contra ese tipo. En algunos casos, esto se ha debido a deficiente manipulación de vacuna y demás, pero en otros, los más de ellos, se ha comprobado que la inmunidad conferida, por la vacuna fabricada con una variante diferente a la nuestra, no es de un 100%, como sería de desear. Indudablemente, este punto es demasiado amplio, y habría de entrar a estudiar el comportamiento individual de cada animal, y la relación que hay entre éste y los diferentes medios en que se encuentra, con el desarrollo de inmunidad. Como hasta el momento, no tenemos datos al respecto, me refiero a la literatura que

se ha escrito sobre variantes, y que es el fruto de una investigación detenida, por parte de científicos de primer orden.

La cepa de virus "A", tomada como base para la producción de antisueros para diagnósticos, se denominó, cuando se encontraron cepas serológicamente diferentes, A1. En 1943, se encontró, que una cepa proveniente de España, daba reacciones de fijación muy pobres, con el antisero A1, a la vez, que el antígeno A1 las daba igualmente débiles con el antisero Español. Esta nueva cepa se llamó entonces A2. La cepa A3, se encontró en un brote que se presentó en un hato que había sido vacunado con vacuna bivalente O—A1 en la provincia de Thuringia. Es interesante, que un brote por el Virus A3, se controló perfectamente, con vacuna preparada con la misma cepa, en las Provincias de Pomerania, Mecklenburg y Sajonia.

En Diciembre de 1948, se logró demostrar en Marburg, la cepa A4, proveniente del oeste alemán, y se caracterizó por una extraordinaria malignidad, causando enormes pérdidas. Una quinta variante del virus A, que completa lo que hasta el momento se conocía respecto a clasificación, fue la cepa A5, aislada en Alemania en el año de 1949. Todas estas variantes, demostraban gran diferencia tanto desde el punto de vista serológico como inmunológico. Al igual que con las diferentes variantes hasta entonces conocidas del virus "O", también se llevaron a cabo reacciones de Fijación de Complemento, cruzadas, con las variantes del virus "A". El siguiente cuadro, muestra la manera de reaccionar cada una de ellas, con sus antisueros respectivos, y con los de las demás variantes. Este trabajo fue publicado también por el Dr. E. Traub y leído en la conferencia internacional de Berna, Suiza, en el año de 1949. Las experimentaciones, fueron hechas por él mismo.

CUADRO N° 6

Suero Dil.		Antígeno				
		A1	A2	A3	A4	A5
A1	1:5	XXXX	XXX	XXX	XXX	XXX
	1:10	XXXX	—	—	—	—
	1:20	XXX	—	—	—	—
	1:40	—	—	—	—	—
A2	1:5	X	XXXX	X	X	X
	1:10	—	XXXX	—	—	—
	1:20	—	XXX	—	—	—
	1:40	—	—	—	—	—
A3	1:5	X	X	XXXX	X	X
	1:10	—	—	XXXX	—	—
	1:20	—	—	X	—	—
	1:40	—	—	—	—	—
A4	1:5	XX	X	XX	XXXX	X
	1:10	X	X	X	XXXX	—
	1:20	—	—	—	XX	—
	1:40	—	—	—	—	—
A5	1:5	XXX	X	X	X	XXXX
	1:10	X	—	—	—	XXXX
	1:20	—	—	—	—	X
	1:40	—	—	—	—	—

Hasta el momento, no se sabe nada respecto a la variabilidad serológica del virus "C".

Es importante anotar, que las variantes serológicas, se han manteni-

do sin variación alguna a través de los diferentes pases de Laboratorio, en ganado, cerdos y curies. En el curso de la Tipificación rutinaria en Alemania, con las diferentes variantes de virus aíticos, provenientes del campo, se ha demostrado una estabilidad bastante grande de dichas variantes, contra la opinión de autores, que están a favor de los cambios de dichas variantes en el campo (9).

De los experimentos realizados sobre la significación de la variante en la inmunización activa, se desprendió, que la infección, con una variante, inmuniza curies y ganado, contra la infección con otra variante del mismo tipo, producida 2 a 3 semanas más tarde. Los resultados en ensayos realizados con ganado vacunado fueron diferentes; las vacunas producidas con diferentes variantes, inmunizaban contra el virus homólogo, pero no todos los animales eran inmunes a las otras variantes. Este hecho se confirmó hasta la saciedad con ejemplos de vacunaciones hechas en diferentes países de Europa, antes de conocerse la variabilidad serológica de los diferentes tipos de virus aíticos. (9). En Colombia, la experiencia ha mostrado algo parecido, pero faltan datos estadísticos al respecto. En los protocolos del Laboratorio, tenemos confirmados los siguientes brotes en hales vacunados:

CUADRO N° 7

Procedencia Mat. Sospech.	Fecha Vacunación 1951	Vacuna	Fecha Infección 1951	Intervalo Vac. e Infec.	Resultados Tipificación
Palmira	Febrero	02	Abril	2 meses	F.A. "O"
Bogotá	Febrero	"	Abril	2 meses	F.A. "O"
Facatativá	Marzo	"	Mayo	2 meses	F.A. "O"
Cerrito	Marzo	"	Mayo	2 meses	F.A. "O"
Buga	Marzo	"	Junio	3 meses	F.A. "O"
Jamundi	Marzo	"	Junio	3 meses	F.A. "O"
Usaquén	Febrero	"	Junio	4 meses	F.A. "O"

Todos estos brotes, se debieron al Virus "O", según tipificaciones, en hales vacunados con vacuna "O" importada,

y dentro del periodo de inmunidad.

Tanto los resultados obtenidos en Europa, como lo poco que en Colombia he-

micos podido observar, justifican la conclusión de que se deben tener en cuenta las variantes serológicas, en lo que se refiere a la producción de vacuna alta efectividad. Los resultados obtenidos con curies, fueron similares, comprobándose que eran necesarias dosis considerablemente mayores, para inmunizar los animales contra las cepas heterólogas, que contra las homólogas.

Esta clasificación, (O1, O2, y A1 A5), es aceptada en Europa únicamente (hasta 1951) de manera definida. En otros países afectados por la F. A., las cepas reciben el nombre del lugar en donde este virus se presentó por primera vez; para la preparación de vacuna, tienen entonces en cuenta cepas altamente inmunizantes, pero sin observar las variantes como tales. En México, existieron tres variantes serológicas, en el brote que acaban de controlar. Fueron todas del virus "A", y se denominaron, MP (Méjico Puebla), Ameca y Jesús María. En la Argentina, en donde existen al parecer gran número de variantes de todos los tipos, estas no son consideradas. El uso de la clasificación Europea, es de suma utilidad, ya que de este modo, se tiene una pauta para el control de los virus en el país, se facilita la producción de vacuna y se pueden realizar estudios comparativos con antisueros y cepas extranjeras, cosa de tanta utilidad en la investigación de virus aftosos. Claro está que en lo que se refiere a producción de vacuna, se debe escoger dentro de la variante o variantes predominantes, las cepas que presenten caracteres inmunológicos más marcados. La clasificación de un virus nuevo dentro del grupo-variantes, es un asunto delicado, y es importante tener antisueros contra todas las variantes conocidas, además del antisuero contra la cepa en cuestión.

En vista de la gran importancia que tiene el conocimiento exacto de las variantes serológicas de virus aftosos que predominan en el país, y teniendo en cuenta la necesidad, primero de la im-

portación de una vacuna aceptable por lo menos y segundo de la próxima preparación de vacuna nacional, se hizo una prueba, de determinación de variantes, con nuestras dos cepas típicas O23 y A40. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

Prueba de Fijación de complemento, con el fin de Determinar la Variante serológica del virus "O" Colombiano.

Antígeno: 6º pase de la muestra 23, en los establos aislados de Laboratorio, por bovino susceptible. Epitelio vesicular recolectado a las 24 horas de la infección intra-lingual. Extracto al 15% en salina Buffer, después de maceración en mortero y con arena estéril. Centrifugación a 1800 RPM por 15 minutos, en tubos graduados estériles de 50 cc. Sobrenadante transpasado a tubos de prueba estériles, e inactivado a 57°C por 30 minutos.

Antisueros: Los antisueros que se usaron en la prueba, se recibieron de diferentes Laboratorios serológicos europeos y americanos. Estos han sufrido todas las pruebas del caso, y han sido titulados en presencia de sus antígenos homólogos. Con el objeto de obtener resultados uniformes, se ajustaron todos los sueros a un mismo título, de acuerdo con la titulación preliminar con que llegaron al Laboratorio. Debido a que algunos de los antisueros solo tenían un título de 1:10, todos se ajustaron a las mismas condiciones; fueron estos los sueros usados:

1)— Sueros de Variante de los Laboratorios de Marburg Alemania, O1, O2 y O3.

2)— Suero "O" tipo, de Marburg. Este suero es una mezcla a partes iguales de los tres sueros de Variante.

3)— Suero "O", preparado con una cepa colombiana, denominada cepa "Pepino". (Cepa denominada así por el nombre del animal del que se tomó). Fue la primera cepa de virus "O", tipificada en el laboratorio de tipificación.

4)— Suero "O" de los laboratorios Pirbright, Inglaterra.

5)— Suero "O" de Brescia, Italia.

6)— Suero "O" de España, preparado con la cepa "O" de Venezuela.

Como controles se usaron los siguientes antisueros heterólogos:

1)— Suero "A" Pirbright, Inglaterra.

2)— Suero "A" preparado con la cepa A40, en Colombia.

3)— Suero "C" de Pirbright, Inglaterra.

4)— Suero "C" de Brescia, Italia.

5)— Suero E. V. "NJ", Pirbright England.

6)— Suero E. V. "NJ" Colombiano número 5.

7)— Suero E. V. "Ind." Pirbright Inglaterra.

8)— Suero E. V. "Ind." Colombiano número 9.

Complemento: La titulación preliminar de Complemento en presencia de antígeno O23, dió una D. M. H. de 4%. En la prueba se usó 5% o sea 2 U. C. Esta prueba se hace en presencia de suero normal inactivado. Los antisueros han sido ya sometidos a pruebas de efecto anticomplementario, y se comportan como suero normal en los controles, en cuanto a la acción del complemento se refiere.

Se incubó por 30 minutos en el baño serológico a 37°C, para el período de Fijación. Luego se añadió el sistema hemolítico fresco, preparado así: Glóbulos rojos de cordero lavados al 5%, 100 cc. Hemolisina, título 1:48000, se tomó 1: 1200, 100 cc. Se llevó de nuevo al baño de María por 30 minutos, para el período de Lisis. Los resultados, leídos inmediatamente después de este período, fueron los siguientes:

CUADRO N° 8

Antígeno 023 SUERO:	Diluciones de Suero				Controles de Suero
	1:5	1:10	1:20	1:40	
01 Variante Marburg	xxxx	xxx	xx	—	—
02 Variante Marburg	xxx	xx	x	—	—
03 Variante Marburg	xxxx	xxxx	xxx	xx	—
0 Type Marburg	xxxx	xxxx	xxx	xxx	—
O "Pepino" N° 10					
IFA Colombia	xxxx	xxxx	xxx	xxx	—
041 Pirbright England	xx	x	—	—	—
0 Italy	xxx	xx	x	—	—
0 Spain Cepa Venezuela	xxxx	xxxx	xxx	xx	—
A37 Pirbright England	—	—	—	—	—
C33 Pirbright England	—	—	—	—	—
C Italy	x	—	—	—	—
NJ. England Pirbright	—	—	—	—	—
NJ N° 5 IFA Colombia	—	—	—	—	—
Ind, Pirbright England	—	—	—	—	—
Ind, N° 9 IFA Colombia	—	—	—	—	—
AC1	—				
AC2	xxxx				

Resultados: El virus "O" colombiano reacciona al título, (1:10) con los antisueros, Variante O3, de Marburg O, tipo de Marburg, O, "pepino" colombiano, y O, Venezolano. La fijación con los antisueros O1 y O2, es débil, comparada con las anteriores. Se ve claramente, que nuestra cepa corresponde a la variante O3, y al virus venezolano. Queda así, confirmado el motivo por el cual hasta el momento las vacunas importadas no

han sido 100% efectivas, en consideración a que han sido fabricadas, en su generalidad con el virus O2. Desde que se hizo esta determinación de Variante, el virus colombiano se ha llamado O3, y se supone, que sea la cepa venezolana, en razón de su reacción con el antisero correspondiente, aunque no estamos enterados de la clasificación que allí se ha hecho.

Prueba de Fijación de Complemento, con el fin de determinar la Variante serológica del virus "A", Colombiano.

Antígeno: Material de campo original número 49, Tipificado como F. A. Tipo "A". Recolectado en el Valle del Cauca el 30 de Julio de 1951. Extracto al 15%, hecho en salina Buffer después de maceración con arena estéril. Centrifugación a 1800 RPM, por 15 minutos, e inactivación del sobrenadante en el baño serológico a 57°C. por media hora.

Antisueros: Al igual que en la prueba anterior, se usaron antisueros importados y nacionales. Todos se ajustaron a un mismo título (1:10). Los antisueros usados fueron los siguientes:

1)— Sueros de Variante del Instituto Marburg, Alemania de A1 — A5.

2)— Suero "A" tipo, de Marburg, Alemania.

3)— Suero A. de Brescia, Italia.

4)— Suero "A", de Pirbright, Inglaterra.

5)— Suero "A", preparado contra la cepa A40, Colombia.

6)— Suero "A", México, Puebla.

Como controles, se usaron en la prueba, los siguientes antisueros heterólogos:

1)— Suero "O", de Pirbright, Inglaterra.

2)— Suero "O", Pepino Colombiano.

3)— Suero "C", de Pirbright, Inglaterra.

4)— Suero "C" de Brescia, Italia.

5)— Suero E.V. "NJ" de Pirbright, Inglaterra.

6)— Suero E. V. "NJ" número 5, Colombiano.

Suero E. V. Ind. de Pirbright, Inglaterra.

8)— Suero E. V. "Ind." número 9, Colombiano.

Complemento: La titulación preliminar de Complemento, en presencia del antígeno A40, y suero normal de curi, dio una D. M. H. de 4%, en la prueba de diagnóstico, debe usarse, un 5%, o sea 2 U. c.

Se incubó por 30 minutos en el baño serológico a 37 grados C, para el período de Fijación. Se añadió el Sistema Hemolítico, en las mismas condiciones que en la prueba anterior. Se llevó de nuevo al baño de María por 30 minutos a 37°C. para el período de lisis. Leídos los resultados inmediatamente después de este período y centrifugando los tubos positivos, con el objeto de hacer la lectura precisa, se observó lo siguiente:

CUADRO N° 9

Antígeno O40	Diluciones				
	1:5	1:10	1:20	1:40	de Suero
SUEROS:					
O41 Pirbright England	x	—	—	—	—
O "Pepino" N° 10 IFA	x	—	—	—	—
Colombia	—	—	—	—	—
A1 Variant. Marburg	x	—	—	—	—
A2 "	"				
A3 "	x	—	—	—	—
A4 "	x	—	—	—	—
A5 "	x	x	—	—	—
A Type Marburg	XXX	XX	x	—	—
A Italy	XXX	XX	XX	x	—
A37 Pirbright England	XXXX	XXX	XXX	XX	—
A40 N° 1-A IFA. Colombia	XXXX	XXXX	XXXX	XXX	—
A MP-VJ, "PaloAho"					
Méjico	XXX	XX	XX	XX	—
C Italy	x	—	—	—	—
C33 Pirbright England	x	—	—	—	—
NJ. Pirbright England	—	—	—	—	—
NJ N° 5 IFA Colombia	—	—	—	—	—
Ind. Pirbright England	—	—	—	—	—
AC 1	—				
AC 2	XXXX				

RESULTADOS:

El virus A, colombiano solo reacciona al título del antisuero, con el homólogo, preparado en el Laboratorio de Tipificación de Bogotá. Las reacciones con los antisueros de Variante de A1 a A5, son tan débiles, que no dejan lugar a duda, de que nuestro virus es diferente a los conocidos y tipificados hasta ahora en Europa. Habría que aclarar, si el antisuero inglés de Pirbright, ha sido preparado con alguna cepa sudamericana, tal vez idéntica a la nuestra, pues la reacción es bastante intensa, aunque no llega al título del antisuero. En consideración a que la cepa A colombiana, no corresponde a ninguna de las cepas hasta hoy clasificadas, se ha denominado, A6 (por Traub y colaboradores). Sería conveniente hacer estudios comparativos, entre nuestro virus A y otros virus americanos del mismo tipo, con el fin de establecer un posible punto de contacto e incluir en encontrar una cepa serológicamente idéntica. De esta manera, se aclararía el camino que siguió este virus, hasta penetrar al país. Desgraciadamente, el resto de los países sudamericanos afectados por la F. A. no usan la presente clasificación, y si la usan nada sabemos al respecto, pues no hay literatura, complicándose de gran manera estos estudios comparativos, de tanta utilidad.

Las pequeñas reacciones cruzadas, observadas con los antisueros heterólogos serán discutidas en el capítulo siguiente, al hablar de Fijación de Complemento cruzada, con diferentes tipos de Virus aftesos colombianos.

Por el momento, es importante aclarar, que nuestras dos cepas de virus aftesos, O y A, son diferentes a las que hasta el momento se han clasificado en Europa. Que la cepa O, corresponde a la venezolana, y que la cepa A, no tiene ningún punto de contacto, con los antisueros con que se ha probado salvo el suero inglés, respecto al cual se necesita una investigación. Que nuestra

cepa A, reacciona al título del antisuero homólogo, contra el cual ha sido probada en condiciones idénticas a como se ha hecho con los sueros heterólogos y con el resto de antisueros A.

Cuando se terminó este trabajo de tesis, recibimos de Italia, de los Laboratorios Zooterapicos de Brescia, dos antisueros A, clasificados por el profesor Ubertini, como A6 y A7. Con el fin de establecer, si nuestra cepa de virus A, correspondía a cualquiera de estas dos variantes, se hizo de nuevo una prueba serológica, con nuestra cepa A40.

El antisuero A6 llamado por Ubertini cepa Lazzari, fue preparado de una cepa causante de una epizootia en Europa en 1950 y 51.

El antisuero A7 llamada cepa Pancera, se preparó de cepa de campo, en una grave epizootia que afectó todos los países del centro de Europa en 1951.

Material usado en la prueba:

Antígeno: A40, primer pase de bovino, extracto al 15% en Buffer M/15. Inactivado por 30 minutos a 57 ° C.

Antisueros: A6, A7, variantes italianas y A40, preparado con nuestra cepa. Títulos de los antisueros 1:10

Complemento: Titulación preliminar en presencia de suero normal, y antígeno: 5%. Se usó 6% (2 U.c).

Diluciones S.

	1:5	1:10	1:20	C.S.1
Antisueros				
A6 (Italia)	xx	x	—	—
A7 (Italia)	—	—	—	—
A40 Colombia	xxxx	xxx	x	—

Controles de Antígeno C.A.1 - C.A.2 xxxx

Como se ve claramente, la cepa colombiana de Virus A, no corresponde tampoco, a las variantes A6 y A7, clasificadas por Ubertini. La reacción nula, con el antisuero A7, puede deberse a un contenido antígenico, muy bajo de la muestra pasada por bovino, hace algunos meses. La reacción de fijación de la cepa A40, con el antisuero homólogo, es clara y concluyente.

3) **Pruebas serológicas cruzadas, con las dos cepas Típicas de Virus Aftos colombianos.**

Las pruebas serológicas cruzadas, entre las cepas colombianas, O y A, se han llevado a cabo, con el objeto de poner de manifiesto, una relación serológica estrecha entre diferentes tipos de virus aftosos, responsable de reacciones de fijación de complemento inespecíficas, y se pueden de cierta manera, explicar el hecho tan discutido, de que un tipo aftoso, es derivado del otro. En la mayoría de las reacciones, ya sea diagnósticas o experimentales se ha observado un fenómeno, consistente en la fijación de complemento, entre un antisuero y un antígeno heterólogo, dando lugar a resultados, si no confusos, por lo menos inespecíficos. Esto sucede especialmente, cuando el título del antisuero es muy alto, es decir, que este poder de fijación cruzada, está en relación directa con el antisuero. Por medio de diluciones, con suero normal de cerí, es posible atenuar y hasta hacer desaparecer esa propiedad, quitándole toda su importancia en una reacción de fijación según se vió en el capítulo "antisueros".

Desde el punto de vista práctico, el estudio del fenómeno encargado de dar estas reacciones cruzadas, puede no tener una gran importancia, pero en cambio, es interesante, relacionar este factor, con otras propiedades de los virus aftosos, y encontrar la relación que existe entre esto, y el comportamiento inmunológico cruzado entre diferentes tipos de virus aftosos. La relación serológica existente entre estos virus, podría ser debida a un componente serológico común a distintos tipos de virus, y que se presenta con mayor intensidad en algunos de ellos. Tal es el caso de virus O y el C, cuyos antisueros dan por lo general, reacciones de fijación cruzadas, con antígenos heterólogos. Durante la práctica de la tipificación diaria, se ha observado, con gran fre-

cuencia, que el antisuero C, cruza ligeramente, con el antígeno O, y con el A, el antisuero A, no cruza con antígeno O, y el antisuero O, cruza con el antígeno A. Claro está que estas fijaciones cruzadas, son tan débiles, que no alcanzan a tener importancia en los resultados, pero las reacciones que dan, no son limpias, y hasta cierto punto, podrían indicar una falla del proceso. Volviendo a ese componente serológico común fijador de complemento, es de suponer, que si existe, el tiempo de fijación que por lo general, se usa en las reacciones diagnósticas, no le da tiempo suficiente para ocasionar una fijación más acentuada. Este tiempo de fijación es suficiente, para que antígeno-anticuerpo homólogos, fijen el complemento necesario para obtener resultados claros, pero en cambio, antisuero, con antígeno heterólogo, necesitarían un tiempo mucho más largo, para fijar el complemento, por medio de ese componente serológico común. Con el fin de demostrar prácticamente este fenómeno, que se observa con tanta frecuencia, se ideó la siguiente experimentación al respecto:

1) Emplear antisueros colombianos, con el objeto de aclarar si el fenómeno se debía a defecto de preparación de algunos de los sueros importados (las reacciones cruzadas se observaron siempre con los antisueros usados para diagnóstico).

2) Demstrar la presencia de una fijación cruzada, usando un tiempo de fijación, y condiciones idénticas a las empleadas en las reacciones diagnósticas.

3) Repetir la fijación de complemento, usando un tiempo de fijación largo con el objeto de que si la existencia de ese componente era real, este se manifestara por este procedimiento.

4) Comparar los resultados de fijación obtenidos con los antisueros contra nuestras dos cepas típicas con los obtenidos en los diagnósticos diarios.

Los resultados de una experimenta-

ción de esta clase, solo son dicientes, si se observan sobre varios casos, con el fin de no achacarlos a condiciones individuales. Por lo tanto, empleamos antisueros, tomados individualmente, de diferentes lotes de curies infectados con las cepas típicas colombianas, en el curso de los pases que se llevan a diario en el Laboratorio. Solo se usaron los animales, que presentaron generalización de la enfermedad, con el objeto de lograr un título suficiente, para la fijación.

Obtención de los antisueros: 1) Se hizo sangría parcial, estérilmente, por separado, en los curies, preinfectados con las cepas típicas colombianas, O23 y A40, respectivamente. Los animales usados, se habían empleado, para los pases diarios de los dos virus, correspondiendo, dos o tres curies por cada pase. En cuanto a la fecha de infección, esta se hizo de enero 3 de 1952 a febrero 20 de 1952, siendo los más recientes, los últimos números de la lista de antisueros y viceversa. Los sueros fueron obtenidos individualmente, después de centrifugación de cada una de las sangres coaguladas. Fueron después sometidos a inactivación (2 cc. de cada uno) en el baño de María a 57°C por 30 minutos. Se colocaron en tubos estériles con tapón de caucho y se numeraron en orden, teniendo en cuenta, la antigüedad de los pases, de los cuales se habían obtenido.

2) Se hizo la prueba de efecto anticomplementario de cada uno de los antisueros, obteniendo resultados negativos. En seguida, los dos lotes de antisueros, contra las dos cepas típicas colombianas, están listos para someterlos a las pruebas de fijación cruzada.

I) Prueba de Fijación cruzada, con los antisueros O23, y los antígenos homólogo y heterólogo, en condiciones idénticas a aquellas en que se llevan a cabo las pruebas diagnósticas, con el objeto de demostrar la presencia de un componente serológico común entre diferentes tipos de virus aftosos.

ANTIGENOS: "O", de muestra reco-

lectada en el Municipio de Tausa, por el personal del Laboratorio (Material número 87), y que dio como resultado la Fijación de complemento, F. A. tipo "O".

Se tomaron 11 gramos de material, conservado en glicrina, se hizo una suspensión al 15%, y se inactivó por 30 min. a 57°C, después de centrifugación. La suspensión se hizo en Salina Buffer.

"A", se tomó el tercer pase por bovino de la muestra A40, en cantidad de 10 gramos. Se hizo suspensión al 15% en Salina Buffer, y preparó el antígeno como en el caso anterior.

Antígeno normal de bovino, se preparó a partir de epitelio normal de bovino, en cantidad de 10 gramos en suspensión al 15%, inactivado.

ANTISUEROS: Se tomaron 33 antisueros, obtenidos individualmente de curies infectados con virus O23 adaptado a la especie. Estos antisueros, se inactivaron a 57°C por 30 min. Se usaron en la prueba, en dilución al 1:5.

Como control, se incluyeron antisueros "O" y "A" de Pirbright, en dilución al 1:5 y Normal de curi al 1:5.

COMPLEMENTO: La titulación de complemento en presencia de cada uno de los antígenos y suero normal de curi, fue de 3% 1 U.C. Se usaron en la prueba, 2 U.C (4%).

Resultados de la prueba:

CUADRO N° 10

Sue- ros.	ANTIGENOS:			Control Suero	
	"O"	"A"	"X"	CS1	CS2
1	XXX	—	—	—	XXXX
2	XXXX	—	—	—	XXXX
3	XXXX	X	—	—	XXXX
4	XXXX	—	—	—	XXXX
5	XX	XX	—	—	XXXX
6	XXXX	—	—	—	XXXX
7	XXXX	—	—	—	XXXX
8	XXX	—	—	—	XXXX
9	XXXX	—	—	—	XXXX
10	XXXX	XXX	X	XX	XXXX
11	XXX	—	—	—	XXXX
12	XXXX	—	—	—	XXXX
13	XXXX	X	—	—	XXXX
14	XXXX	—	—	—	XXXX
15	XXXX	X	—	—	XXXX
16	XXXX	XXX	X	—	XXXX

17	xxxx	—	—	—	xxxx
18	xxxx	x	—	—	xxxx
19	xxx	x	—	—	xxxx
20	xxxx	—	—	—	xxxx
21	xxxx	—	—	—	xxxx
22	x	—	—	—	xxxx
23	xx	—	—	—	xxxx
24	xxx	—	—	—	xxxx
25	xxxx	x	—	—	xxxx
26	—	—	—	—	xxxx
27	xx	—	—	—	xxxx
28	xxx	—	—	—	xxxx
29	x	—	—	—	xxxx
30	x	—	—	—	xxxx
31	x	—	—	—	xxxx
32	x	—	—	—	xxxx
33	x	x	—	—	xxxx
O					
Pir	xxxx	x	—	—	xxxx
A					
Pir	—	xxxx	—	—	xxxx
N	—	—	—	—	xxxx

CONTROLES ANTIGENOS:

O	C.A. 1	—
	C.A. 2	xxxx
A	C.A. 1	—
	C.A. 2	xxxx
N	C.A. 1	—
	C.A. 2	xxxx

Se ve en este cuadro, que algunos de los antisueros "O", dan una ligera fijación con el antígeno "A", tal como se había observado en las pruebas diagnósticas diarias. Es necesario observar que en unos de los últimos antisueros de la lista, no alcanzan a dar una fijación apreciable con el antígeno homólogo, por escasez de anticuerpo (material obtenido de pases muy recientes), pero sin embargo, dan ya una fijación cruzada con el antígeno heterólogo. La intensidad de estas reacciones cruzadas, es idéntica a la que corrientemente hemos observado a diario, con otros antisueros "O". Por otra parte, le antisero "A", que se incluyó como control, dió un resultado completamente limpio, con el antígeno "O".

II) Prueba de fijación cruzada con los antisueros A40, y los antígenos homólogo y heterólogo, en condiciones idénticas a las observadas en el trabajo diagnóstico.

ANTIGENOS: Los mismos usados en la prueba anterior.

Antisueros: Se tomaron 52 antisueros obtenidos individualmente, de cuadres infectados con virus A40, adaptado a la especie. Sueros inactivados por 30 minutos a 57°C. Usados en dilución de 1:5.

Se incluyeron como controles, suero normal de curi y antisueros "O" y "A" de Pirbright, Inglaterra.

COMPLEMENTO: 3% en presencia de suero normal y cada uno de los antígenos. Usado 4%, (2 U.c.).

Después de 30 minutos de fijación en el baño serológico a 37°C. y de 30 minutos de lisis, una vez añadido el sistema hemolítico después de la fijación: Resultados:

CUADRO N° 11

Sue- ros.	ANTIGENOS:			Control Suero	
	"O" Bov	"A" Bov	"N" Bov	CS1	CS2
1	—	xxxx	—	—	xxxx
2	—	xxx	—	—	xxxx
3	—	x	—	—	xxxx
4	—	xx	—	—	xxxx
5	—	xx	—	—	xxxx
6	—	xxxx	—	—	xxxx
7	—	xxxx	—	—	xxxx
8	—	xxxx	—	—	xxxx
9	—	xxx	—	—	xxxx
10	—	—	—	—	xxxx
11	—	xxxx	—	—	xxxx
12	—	x	—	—	xxxx
13	—	xxxx	—	—	xxxx
14	—	xxxx	—	—	xxxx
15	—	xxxx	—	—	xxxx
16	—	xxxx	—	—	xxxx
17	—	xxxx	—	—	xxxx
18	—	xxxx	—	—	xxxx
19	—	xxxx	—	—	xxxx
20	—	xxxx	—	—	xxxx
21	—	—	—	—	xxxx
22	—	—	—	—	xxxx
23	—	xxxx	—	—	xxxx
24	—	xxx	—	—	xxxx
25	—	xxxx	—	—	xxxx
26	—	xx	—	—	xxxx
27	—	xx	—	—	xxxx
28	—	xxxx	—	—	xxxx
29	—	xx	—	—	xxxx
30	—	—	—	—	xxxx
31	—	xxxx	—	—	xxxx
32	—	xxxx	—	—	xxxx
33	—	—	—	—	xxxx
34	x	xx	x	—	xxxx

Sue- ros.	ANTIGENOS:			Control Suero	
	"O" Bov	"A" Bov	"N" Bov	CS1	CS2
35	—	—	—	—	xxxx
36	—	xxx	—	—	xxxx
37	—	—	—	—	xxxx
38	—	—	—	—	xxxx
39	—	xxxx	—	—	xxxx
40	—	—	—	—	xxxx
41	—	—	—	—	xxxx
42	—	—	—	—	xxxx
43	—	—	—	—	xxxx
44	—	—	—	—	xxxx
45	—	—	—	—	xxxx
46	—	—	—	—	xxxx
47	—	—	—	—	xxxx
48	—	—	—	—	xxxx
49	—	—	—	—	xxxx
50	—	—	—	—	xxxx
51	—	—	—	—	xxxx
52	—	—	—	—	xxxx
OP.	xxxx	xx	—	—	xxxx
AP.	x	xxxx	—	—	xxxx
N	—	—	—	—	xxxx

CONTROLES DE ANTIGENOS

O	CA 1	—
	CA 2	xxxx
A	CA 1	—
	CA 2	xxxx
N	CA 1	—
	CA 2	xxxx

Se ve claramente, que a diferencia de los antisueros "O", la fijación cruzada occasionada con los antisueros "A" y el antígeno heterólogo, es casi nula, y solo se manifiesta ocasionalmente, usando un tiempo de fijación corto. Esto corresponde a lo observado en la práctica diaria, en donde muy rara vez suceden fijaciones cruzadas, con los antisueros "A". A semejanza del caso anterior, los antisueros de los últimos párrafos, no alcanzan a fijar complemento, con el antígeno homólogo, por no tener una suficiente concentración de anticuerpos. Es interesante observar, que el antisuero "O" inglés que se puso como control, dio de nuevo fijación cruzada con el antígeno "A".

Con el objeto de hacer resaltar más ese componente serológico común, en

diferentes tipos de virus aftosos, responsable a reacciones cruzadas, se llevaron a cabo pruebas de fijación en las cuales las condiciones permitieron que ese Componente fijara tanto complemento, como para demostrarse claramente en la reacción para el efecto, la cantidad de complemento, se aumento considerablemente, dando 6 unidades hemolíticas, y un tiempo de fijación de cuatro horas. Se hizo la prueba de nuevo con dos lotes de antisueros y los resultados obtenidos, fueron los siguientes:

I) Prueba de Fijación de Complemento, con los antisueros O23, y los antígenos homólogo y heterólogo, con el fin de poner de manifiesto, un componente serológico común a diferentes tipos de virus aftosos, empleando un tiempo de fijación largo, y mayor cantidad de complemento.

ANTIGENOS: Los mismos usados en la prueba anterior.

Antisueros: Los mismos empleados en la prueba de Fijación cruzada anterior, con los antisueros O23.

Complemento: 3% en presencia de suero normal y cada uno de los antígenos (1U.c.). Usado en la prueba 8% (6 U.c.). Después de 4 horas de fijación en el baño serológico a 37°C, añadido el Sistema Hemolítico y sometido a 30 minutos de lisis. **Resultados:**

CUADRO N° 12

Sue- ros.	ANTIGENOS:			Control Suero	
	"O" Bov	"A" Bov	"N" Bov	CS1	CS2
1	xxx	xxx	—	—	xxxx
2	xxxx	xxx	—	—	xxxx
3	xxxx	xxx	—	—	xxxx
4	xxxx	xxx	—	—	xxxx
5	xxxx	xxxx	—	—	xxxx
6	xxx	xxx	—	—	xxxx
7	xxxx	xxx	—	—	xxxx
8	xxxx	xxx	—	—	xxxx
9	xxxx	xxxx	—	—	xxxx
10	xxxx	xxx	—	—	xxxx
11	xxx	xxx	—	—	xxxx
12	xxx	xxx	—	—	xxxx
13	xxxx	xxxx	—	—	xxxx

Sue- ros.	ANTIGENOS:			Suero	
	"O" Bov	"A" Bov	"N" Bov	CS1	CS2
14	xxxx	xxx	—	—	xxxx
15	xxxx	xxxx	—	—	xxxx
16	xxxx	xxxx	—	—	xxxx
17	xxxx	xxxx	—	—	xxxx
18	xxxx	xxxx	—	—	xxxx
19	xxxx	xxxx	—	—	xxxx
20	xxxx	xxxx	—	—	xxxx
21	xxxx	xx	—	—	xxxx
22	xx	xx	—	—	xxxx
23	xx	xx	—	—	xxxx
24	xxxx	xx	—	—	xxxx
25	xx	xx	—	—	xxxx
26	—	xx	—	—	xxxx
27	xx	xx	—	—	xxxx
28	xx	xx	—	—	xxxx
29	x	x	—	—	xxxx
30	x	xx	—	—	xxxx
31	xx	xxxx	—	—	xxxx
32	x	x	—	—	xxxx
33	x	xxxx	—	—	xxxx
OP.	xxxx	xxx	—	—	xxxx
AP.	—	xxxx	—	—	xxxx
N	—	—	—	—	xxxx

CONTROLES DE ANTIGENOS

O	CA 1	—
	CA 2	xxxx
A	CA 1	—
	CA 2	xxxx
N	CA 1	—
	CA 2	xxxx

El componente serológico común, se ha manifestado claramente, en este tiempo de fijación, cuando reacciones muchas veces más fuertes, con el antígeno heterólogo que con el homólogo. Es interesante ver, que aun los antisueiros de los últimos pases, poseen este componente antes que los anticuerpos tituladores específicos. En general, la diferencia de fijación con los antígenos homólogo y heterólogo son casi idénticas, en lo que se refiere a los antisueiros "O". Con el fin de hacer un estudio comparativo, sobre este punto, con los antisueiros "A", se llevó a cabo con ellos, una prueba cruzada, en las mismas condiciones, es decir, con un tiempo de fijación largo.

2) Prueba de fijación con los antisueiros "A" con los antígenos homólogo y

heterólogo, con un tiempo de fijación largo, y mayor cantidad de complemento, con el objeto de probar la presencia del mismo fenómeno anterior.

Antígenos: Los mismos usados en las pruebas anteriores.

Antisueiros: Antisueiros empleados en la prueba de fijación con los antisueiros "A". Cuadro número 11.

Complemento: 3% en presencia de suero normal y cada uno de los antígenos. Usado en la prueba 9% (7 U.c.)

Tiempo de fijación de 4 horas al baño de María a 37°C. Sistema hemolítico, y 30 minutos de lisis.

CUADRO N° 13

Sue- ros.	ANTIGENOS:			Control Suero	
	"O" Bov	"A" Bov	"N" Bov	CS1	CS2
1	—	xxxx	—	—	xxxx
2	—	xx	—	—	xxxx
3	—	x	—	—	xxxx
4	—	xxxx	—	—	xxxx
5	—	xx	—	—	xxxx
6	—	xxxx	—	—	xxxx
7	—	xxxx	—	—	xxxx
8	—	xxxx	—	—	xxxx
9	—	xx	—	—	xxxx
10	—	—	—	—	xxxx
11	—	xxxx	—	—	xxxx
12	—	x	—	—	xxxx
13	—	xxxx	—	—	xxxx
14	—	xxxx	—	—	xxxx
15	—	xxxx	—	—	xxxx
16	—	xxxx	—	—	xxxx
17	—	xxxx	—	—	xxxx
18	—	xxxx	—	—	xxxx
19	—	xxxx	—	—	xxxx
20	—	xxxx	—	—	xxxx
21	—	—	—	—	xxxx
22	—	—	—	—	xxxx
23	—	xxxx	—	—	xxxx
24	—	xx	—	—	xxxx
25	—	xxxx	—	—	xxxx
26	—	xxxx	—	—	xxxx
27	—	xxxx	—	—	xxxx
28	—	xxxx	—	—	xxxx
29	—	xx	—	—	xxxx
30	—	—	—	—	xxxx
31	—	xxxx	—	—	xxxx
32	—	xxxx	—	—	xxxx
33	—	—	—	—	xxxx
34	x	xxxx	x	—	xxxx
35	—	xxx	—	—	xxxx
36	—	xx	—	—	xxxx
37	—	—	—	—	xxxx
38	—	—	—	—	xxxx

39	—	xxxx	—	—	xxxx
40	—	—	—	—	xxxx
41	—	—	—	—	xxxx
42	—	—	—	—	xxxx
43	—	—	—	—	xxxx
44	—	—	—	—	xxxx
45	—	—	—	—	xxxx
46	—	—	—	—	xxxx
47	—	—	—	—	xxxx
48	—	—	—	—	xxxx
49	—	—	—	—	xxxx
50	—	—	—	—	xxxx
51	—	—	—	—	xxxx
52	—	—	—	—	xxxx
A.P.	x	xxxx	—	—	xxxx
O.P.	xxxx	xxx	—	—	xxxx
N.	—	—	—	—	xxxx

CONTROLES DE ANTIGENOS

O	CA	1	—
	CA	2	xxxx
A	CA	1	—
	CA	2	xxxx
N	CA	1	—
	CA	2	xxxx

Con los antisueros A, no es posible de mostrar un componente serológico común, como sucede con los antisueros O. Los primeros, mientras que dan reacciones de fijación en la mayoría de los casos de 100% con el antígeno homólogo, solo en raras ocasiones, presentan ligeras tendencias a cruzar. Se observa que el antisuero O, empleado como control, dio de nuevo una fuerte fijación cruzada. El antisuero A, inglés, dió una pequeña fijación cruzada, pero hay que tener en cuenta, que este suero tiene un título de 1:160, mientras que los antisueros usados en la reacción, solo reaccionan al límite de dilución 1:5 al igual que los antisueros O, empleado en la prueba anterior.

La presencia de este componente serológico común en los antisueros O, y su ausencia o exigua existencia en los antisueros A, podría de cierto modo explicar la relación que existe entre los diferentes tipos de virus aftosos, en lo que se refiere a su origen. En el capítulo siguiente, trataré de relacionar, la presencia de este fenómeno, con otro de inmunidad cruzada, que en conjunto, parecen dar una supremacía al virus O

sobre el A. Para completar este corto trabajo que dà solo una vaga idea, sería necesario, tener en cuenta el virus C, y establecer un estudio comparativo entre los tres tipos de virus aftosos. La interpretación de estos resultados, es asunto difícil, pero de cierto modo, muestra la relación que existe entre tres virus distintos de una misma enfermedad, y enfocan hacia la posibilidad de determinar cual de los tres virus aftosos ha sido el origen de los otros, que solo serían transformaciones del primero. Debido a lo extenso de este trabajo y a la cantidad de experimentación que requeriría establecer este punto solo me propuse a demostrar un componente común a dos virus, y que con frecuencia es objeto de interpretaciones dudosas en el trabajo serológico.

Experimentos sobre Inmunidad Cruzada, entre los dos Tipos de Virus Aftosos Colombianos.

Fueron llevados a cabo, con dos fines principales a saber:

1)— Establecer la existencia de una posible inmunidad cruzada, entre diferentes tipos de virus Aftosos.

2)— Determinar el grado de dicha inmunidad, dentro de las posibilidades de la corta experimentación.

Plan del Trabajo: Dicha experimentación, se llevó a cabo, sobre lotes de curies, que habían sido infectados periódicamente a través de los pases diarios con las dos cepas de Virus Aftosos Colombianos. Estos lotes fueron distribuidos así:

1) Un grupo de curies infectados con Virus O23 compuesto de 23 animales, inoculados entre el 15 de Enero de 1952 y el 9 de Febrero del mismo. Total de 13 pases.

2) Grupo de curies infectados con Virus A40, compuesto de 36 animales, inoculados entre el 9 de enero de 1952 y el 14 de Febrero del mismo, con un total de 19 pases.

3) Grupo de curies infectados con virus O23, compuesto de 42 animales, inoculados entre el 14 de febrero de

1952 y el 7 de Abril del mismo, con un total de 18 pases.

4) Grupo de curies infectados con el Virus A40, compuesto de 47 animales, inoculados entre el 6 de febrero de 1952 y el 5 de Abril del mismo, con un total de 29 pases.

Los grupos 1 y 2, fueron destinados para un primer experimento; es conveniente aclarar, que solo se usaron animales que presentaron generalización de la enfermedad, a través de los pases diarios. Una parte de los curies de cada grupo, fue reinfectada con el virus homólogo, al de la infección primaria, y la otra parte se infectó con el virus heterólogo.

Primer Experimento de Inmunidad Cruzada:

Se efectuó con los dos primeros lotes de curies el primero de los cuales, tenía una infección primaria de O23 (Cuadro número 14) y el segundo una infección primaria de A40, (Cuadro número 15). La reinfección se hizo simultáneamente, para los dos grupos y para todos los animales, el 20 de febrero de 1952. Se emplearon para el efecto, Virus aftosos pasados por curi, correspondientes al pase 27 del Virus O23, y al pase 30 del

Virus A40. El material vesicular de dichos pases, se maceró y se hizo una suspensión al 15% con Buffer de Fosfato M/15. Se inocularon 0,15 intracutáneamente, en cada superficie plantar derecha, de todos los animales. Se incluyeron 3 controles para cada virus en los cuales se empleó el mismo método de inoculación y la misma suspensión de Virus.

Los animales fueron observados cada 24 horas, a partir del día de la reinfección, durante una semana. La apreciación de la formación vesicular expresada en equis, es sencilla y facilita el control del desarrollo de la enfermedad. El signo — (negativo), indica formación vesicular nula. Cuatro equis (xxxx) indican una formación vesicular del tamaño de la superficie plantar. Una (x), dos (xx) y tres (xxx) equis corresponden a estado intermedio de formación vesicular. El término "gen" indica generalización de la enfermedad, apreciable por la formación de vesículas secundarias e inflamación en la superficie palmar y lengua. Es este el estado que tomamos como 100% positivo en la apreciación de los resultados finales.

Grupo N° 4

Infección Primaria "O"

CUADRO N° 14

Reinfección 2.20.52

gen

Pase	Fecha	N°	Cepa	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	144 h.
6	1.15.52	1	O						
7	1.16.52	2	O						
7	1.16.52	3	A	xx	xx	gen			
7	1.16.52	4	A	x	xx	gen			
8	1.17.52	5	O	x					
8	1.17.52	6	A	x	x	gen			
9	1.18.52	7	A	xxx	gen				
10	1.21.52	8	A	xxx	gen				
11	1.22.52	9	O						
11	1.22.52	10	A		gen				
12	1.24.52	11	O						
12	1.24.52	12	A	xx	gen				
13	1.25.52	13	O						
13	1.25.52	14	O		gen				
13	1.25.52	15	A	xx	gen				
15	1.29.52	16	A	x	x				
17	2.2.52	17	A	xx	gen				
18	2.4.52	18	O						
18	2.4.52	19	A		gen				
18	2.4.52	20	A	x	gen				
19	2.8.52	21	O						
19	2.8.52	22	A	x	x	gen			
20	2.9.52	23	A						

Grupo N° 2

CUADRO N° 15

Infección Primaria "A"				Reinfección 2.20.52					
Pase	Fecha	Nº	Cepa	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	144 h
3	1.7.52	1	A	—	—	—	—	—	—
3	1.7.52	2	A	—	—	—	—	—	—
3	1.7.52	3	O	—	xxx	xxx	—	—	—
3	1.7.52	4	O	—	—	—	—	—	—
3	1.7.52	5	O	—	—	—	gen	—	—
4	1.9.52	6	A	—	—	—	—	—	—
4	1.9.52	7	O	—	—	—	gen	—	—
4	1.9.52	8	O	—	—	—	gen	—	—
6	1.12.52	9	A	—	—	—	—	—	—
6	1.12.52	10	O	—	—	—	gen	—	—
7	1.15.52	11	O	x	gen	—	—	—	—
8	1.16.52	12	A	—	x	xx	—	—	—
9	1.17.52	13	O	—	—	—	—	gen	—
9	1.17.52	14	A	—	—	—	—	—	—
11	1.21.52	15	A	—	—	—	—	—	—
11	1.21.52	16	O	xx	xxx	gen	—	—	—
13	1.25.52	17	A	—	—	—	—	—	—
13	1.25.52	18	O	—	—	—	gen	—	—
14	1.26.52	19	O	—	—	—	—	—	—
15	1.27.52	20	A	—	—	—	—	—	—
15	1.27.52	21	O	—	xx	gen	—	—	—
16	1.28.52	22	A	—	—	—	—	—	—
16	1.28.52	23	O	—	—	gen	—	—	—
17	1.29.52	24	A	—	—	—	—	—	—
17	1.29.52	25	O	—	—	—	—	—	—
18	1.31.52	26	A	—	—	—	—	—	—
18	1.31.52	27	O	x	xx	—	—	gen	—
19	2.2.52	28	A	—	—	—	—	—	—
19	2.2.52	29	O	—	—	—	—	—	—
20	2.6.52	30	O	—	—	—	—	—	—
21	2.7.52	31	O	x	xx	xx	gen	—	—
22	2.8.52	32	A	—	—	—	—	—	—
22	2.8.52	33	O	—	—	—	—	—	—
24	2.11.52	34	O	—	—	—	gen	—	—
26	2.14.52	35	O	—	—	—	—	—	—
26	2.14.52	36	A	—	—	—	—	—	—

Controles:

1	A	xxx	gen
2	A	xxxx	gen
3	A	xx	xxxx
1	O	xxxx	gen
2	O	xxx	xxxx
3	O	xxxx	gen

El segundo experimento sobre Inmunidad Cruzada se hizo simultáneamente con los grupos 3 y 4. Corresponde el grupo 3 a curies infectados primariamente con virus O23, y el grupo 4, a curies infectados primariamente con virus A40. Todos los animales presentaron generalización en la infección primaria. De la misma manera que en el experimento anterior, parte de cada grupo se reinfectó con el virus homólogo y parte con

el heterólogo. Los virus para reinfección correspondieron a los pases número 47 de O23 y número 62 de A40. Se empleó un extracto de vesículas planas al 15% en Buffer de Fosfato M/15 y se inocularon 0.15 cc por superficie plantar derecha e intracutáneamente a cada animal. Se incluyeron 3 controles para cada virus. Los resultados aparecen en los cuadros número 16 (grupo 3) y cuadro 17 (grupo 4).

CUADRO N° 16

Grupo N° 3
Infección Primaria "O"

Reinfección 4.20.52

Pase	Fecha	Nº	Cepa	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	144 h.
23	2.14.52	1	O	—	—	—	—	—	—
23	2.14.52	2	A	xx	xx	x	gen	—	—
24	2.15.52	3	O	xx	xxx	—	—	—	—
24	2.15.52	4	A	x	x	gen	—	—	—
25	2.17.52	5	O	—	—	—	—	—	—
25	2.17.52	6	A	xxx	gen	—	—	—	—
27	2.19.52	7	A	xxxx	xxxx	gen	—	—	—
27	2.19.52	8	A	x	xxx	gen	—	—	—
27	2.19.52	9	O	—	—	—	—	—	—
28	2.22.52	10	A	xx	xx	gen	—	—	—
28	2.22.52	11	A	xx	x	—	gen	—	—
28	2.22.52	12	O	—	—	—	—	—	—
30	2.25.52	13	A	xx	xxx	—	—	—	—
30	2.25.52	14	O	—	—	—	—	—	—
31	2.27.52	15	A	xxx	gen	—	—	—	—
32	3.20.52	16	A	xx	gen	—	—	—	—
32	3.20.52	17	O	—	—	—	—	—	—
32	3.20.52	18	A	xxxx	gen	—	—	—	—
33	3.22.52	19	O	—	—	—	—	—	—
34	3.23.52	20	O	—	—	—	—	—	—
34	3.23.52	21	A	xx	xxx	—	—	—	—
35	3.24.52	22	O	—	—	—	—	—	—
35	3.24.52	23	A	xx	xxx	gen	—	—	—
36	3.26.52	24	A	x	x	—	—	—	—
36	3.26.52	25	O	—	—	—	—	—	—
36	3.26.52	26	A	—	—	—	gen	—	—
37	3.28.52	27	A	x	—	—	—	—	—
37	3.28.52	28	O	—	—	—	—	—	—
37	3.28.52	29	A	x	x	gen	—	—	—
38	3.30.52	30	A	x	gen	—	—	—	—
38	3.30.52	31	O	—	—	—	—	—	—
38	3.30.52	32	A	x	xx	gen	—	—	—
39	4.1.52	33	O	—	—	—	—	—	—
39	4.1.52	34	A	xx	gen	—	—	—	—
40	4.3.52	35	O	—	—	—	—	—	—
40	4.3.52	36	A	—	—	—	gen	—	—
40	4.3.52	37	A	—	—	—	—	—	—
41	4.5.52	38	O	—	—	—	—	—	—
41	4.5.52	39	A	—	—	—	—	—	—
42	4.7.52	40	A	—	—	—	—	—	—
42	4.7.52	41	O	—	—	—	—	—	—
42	4.7.52	42	A	—	—	—	—	—	—
Controles:				3A	A	xx	xxx	gen	—
				30	O	xxx	xxxx	gen	—

CUADRO N° 17

Grupo N° 4

Pase	Fecha	Nº	Cepa	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	144 h.
20	2.6.52	1	O	x	gen	—	—	—	—
20	2.6.52	2	A	—	—	—	—	—	—
25	2.13.52	3	O	—	—	gen	—	—	—
27	2.15.52	4	A	x	xx	gen	—	—	—
27	2.15.52	5	A	—	—	—	—	—	—
28	2.16.52	6	O	x	x	—	—	—	gen
28	2.16.52	7	A	—	—	—	—	—	—
30	2.19.52	8	O	x	x	gen	—	—	—

30	2.19.52	9	A	—	—	—	—	—	—
31	2.20.52	10	O	—	—	—	gen	—	—
32	2.21.52	11	O	—	—	—	—	—	gen
32	2.21.52	12	A	—	—	—	—	—	—
33	2.23.52	13	O	—	—	—	—	Murió	—
33	2.23.52	14	A	—	—	—	—	—	—
34	2.24.52	15	O	—	—	—	—	—	gen
35	2.26.52	16	O	—	—	—	gen	—	—
35	2.26.52	17	A	—	—	—	—	—	—
35	2.26.52	18	O	—	—	—	—	—	—
36	2.27.52	19	O	xx	gen	—	—	—	—
36	2.27.52	20	A	—	—	—	—	—	—
37	2.28.52	21	O	xx	xx	gen	—	—	—
37	2.28.52	22	A	—	—	—	—	—	—
38	2.29.52	23	O	—	—	—	—	gen	—
38	2.29.52	24	A	—	—	—	—	—	—
39	3. 2.52	25	O	xx	gen	—	—	—	—
39	3. 2.52	26	A	—	—	—	—	—	—
41	3. 4.52	27	O	x	x	gen	—	—	—
41	3. 4.52	28	A	—	—	—	—	—	—
41	3. 4.52	29	O	xx	gen	—	—	—	—
42	3. 6.52	30	O	x	gcn	—	—	—	—
43	3. 7.52	31	O	x	gen	—	—	—	—
43	3. 7.52	32	A	—	—	—	—	—	—
44	3.10.52	33	O	x	x	—	gen	—	—
44	3.10.52	34	A	—	—	—	—	—	—
46	3.13.52	35	O	x	gen	—	—	—	—
46	3.13.52	36	A	—	—	—	—	—	—
47	3.18.52	37	O	—	—	—	gen	—	—
49	3.21.52	38	O	—	—	—	gen	—	—
50	3.23.52	39	O	x	gen	—	—	—	—
50	3.23.52	40	A	—	—	—	—	—	gen
51	3.25.52	41	O	x	x	—	—	—	—
52	3.27.52	42	A	—	—	—	—	—	—
53	3.29.52	43	A	—	—	—	—	—	—
54	3.31.52	44	O	xx	xx	gen	—	—	—
55	4. 3.52	45	O	x	x	gen	—	—	—
56	4. 5.52	46	O	x	x	—	—	gen	—
57	4. 5.52	47	A	—	—	—	—	—	—

Una vez estudiados individualmente, cada uno de los cuadros anteriores, en lo que se refiere a protección y no pro-

tección de un virus hacia el homólogo y hacia el heterólogo, podemos resumir los resultados en el siguiente cuadro:

CUADRO N° 18

Infección Primaria	Reinfección	Protección		No Protección	
		1er. Exp.	2º Exp.	1er. Exp.	2º Exp.
O	O	90	94	10	6
	A	17	32	83	68
A	A	93	100	7	0
	O	38	3	62	94

DISCUSION DEL TRABAJO

De lo anteriormente expuesto en la parte experimental de este trabajo, es interesante, anotar algunos puntos de importancia:

1)— De acuerdo con los diagnósticos

serológicos es claro, que los Virus con que se ha experimentado, corresponden a Virus Aftosos, de los Tipos "O" y "A", según Vallé.

2)— Según la clasificación de variantes serológicas, llevadas a cabo en el Laboratorio de Tipificación, nuestros

virus aftosos, corresponden a las variantes O3 y a una variante del Virus "A", no clasificada hasta ahora en Europa. No hay duda de que estos dos virus, son de origen americano, habiéndose comprobado plenamente el origen del Virus "O" y sospechándose un origen similar del virus "A", ya que no corresponde a ninguna de las variantes clasificadas en Europa hasta el presente. Este punto es de suma importancia, en lo relacionado con la entrada del virus "A" a nuestro país, ya que al respecto todo es aún obscuro; contribuyen, el hecho de la aparición de este virus en una zona aislada del país, y la demostración de que ésta nueva variante era desconocida en Europa, descartando la posibilidad de la infección por vacunas provenientes de dicho continente.

3)— Se clasificaron los virus de Estomatitis Vesicular, como Tipos New Jersey e Indiana.

4)— Las reacciones de Fijación Cruzada, entre antisueros "A" y antígenos "A" y "O", dan una especificidad marcada del antisuero y antígeno homólogo.

5)— Las reacciones de Fijación cruzada, entre los antisueros "O", y antígenos "O" y "A", demuestran que no hay una especificidad completa de estos antisueros.

6)— De lo anterior se deduce, que existe un factor serológico común, para los antígenos homólogos y heterólogos en los antisueros "O" factor que no existe, o que no se pudo hacer manifiesto, por los métodos ya vistos en relación con los antisueros "A".

7)— El primer experimento sobre in-

munidad cruzada, en los curies inmunes al virus "O", dio una protección del 90%, hacia el homólogo, y del 17% hacia el heterólogo. En el segundo experimento, con curies inmunes al virus "O", se observó una protección del 94 por ciento hacia el homólogo, y del 32 por ciento hacia el heterólogo. Nota: La presentación de generalización sin la formación de vesículas primarias, puede atribuirse a una inmunidad local, y según el Prof. Traub, es la primera vez que observa este fenómeno, en su larga práctica, con virus aftosos en curies.

En los dos experimentos con curies inmunes al virus "O", no se observa una diferencia muy marcada entre el tiempo de la aparición de la generalización en estos animales y los controles normales.

8)— El primer experimento de Inmunidad cruzada con curies inmunes al virus "A", mostró una protección del 93% hacia el homólogo, y del 38% hacia el heterólogo. El segundo experimento con curies inmunes al virus "A", muestra un 100% de protección hacia el homólogo y un 3% hacia el heterólogo. A diferencia con los experimentos, llevados a cabo en curies inmunes al virus "O", observamos que la aparición de la generalización es considerablemente, mas retardada que en los controles normales. Esto podría interpretarse, como un grado de inmunidad muy tenue.

9)— Comparando los resultados obtenidos entre las pruebas de inmunidad cruzada y Fijación cruzada, podemos observar dichos resultados en el siguiente cuadro:

CUADRO N° 19

VIRUS	HOMO LOGO			HETEROLOGO		
	Inmunidad	Fijación	Inmunidad	Inmunidad	Fijación	Inmunidad
O	90	94	100	100	17	32
A	93	100	58	58	38	3

La protección conferida por el virus "O" hacia el heterólogo se mantiene constante en los dos experimentos de

inmunidad cruzada. En cierto modo corresponden los resultados obtenidos con el mismo virus en las pruebas seroló-

gicas cruzadas. En cambio los resultados de Inmunidad obtenidos con el virus "A" hacia el "O", no son constantes. Tampoco corresponden, en este virus, las pruebas con los homólogos, en fijación e inmunidad.

CONCLUSIONES

1) Existe en Colombia, Fiebre Aftosa, causada por los Virus, Tipos "O" y "A", según Vallé.

2) Dichos Virus Corresponden, el "O", a la Variante serológica O3, y el "A", a una Variante serológica, no clasificada y desconocida aun en Europa.

3) Se clasificaron los Virus de Esto-

matitis Vesicular existentes en Colombia como Tipos New Jersey e Indiana.

4) Se demostró Inmunidad cruzada (promedio 25%), producida en curies, por el Virus de Fiebre Aftosa Tipo "O", hacia el Tipo "A".

5) La Inmunidad conferida por el Virus "A", hacia el Virus "O", en curies, no es concluyente según estos experimentos y se necesita mas trabajo al respecto.

6) Se demuestra un Componente serológico común, presente en los antisueros de Tipo "O", hacia los antígenos homólogo y heterólogo.

BIBLIOGRAFIA :

- 1) —Ciuca, A. J. Hyg. (1929). 28, 325
- 2) —Traub E. y Möhlman H. Zbl. Bakt. 1 Crig. 1943. 1950, 300
- 3) —Traub, E. y Sohneider, B.Z. Naturforschung, 1948, 3b, 178
- 4) —Traub, E. Observaciones personales no publicadas.
- 5) —Traub, E. y Pyl, G. Z. Inmunitatsforschung, 1943, 104, 158.
- 6) —Traub, E. Reporte a la Oficina Internacional de Epizootias, en la Conferencia Internacional de F.A. Berna, Suiza, Mayo de 1949.
- 7) —Tellez Girón, A., Levine J. M. Eichhorn E. Camargo F. Técnica Fijación de Complemento. Informe no publicado. México D.F.
- 8 y 9) —Traub E. Demostración y Clasificación de Variantes de Virus de F. A., por Fijación de Complemento, 1949, 5, Cuadro 111.