

Paquete 95
No. 2431
26263



Fernández, Ana Sofía

~~Butler, Norma Evangelina~~

Investigación de métodos para

obtener antígenos hemaglutinantes "in vitro"

de Encefalitis de San Luis.

1985

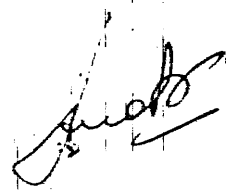
U-O
INDUSTRIA ARGENTINA

Paquete 95
No 2431

TESIS DOCTORAL

Presentada por la Médica Veterinaria ANA SOFIA FERNANDEZ Docente de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Tandil); para optar al GRADO ACADEMICO DE DR. EN CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.

Tandil, 1985

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ana Sofia Fernandez', located in the bottom right corner of the page.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

-RECTOR:

INGENIERO QCO. RAUL ADOLFO PESSACQ.

-SECRETARIO GENERAL:

INGENIERO QCO. PABLO CESAR LUCHESSI.

-SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

ABOGADO CARLOS ALBERTO RAIMUNDI.

-SECRETARIO DE ASUNTOS LEGALES:

DR. HUGO JORGE PACHECO.

-SECRETARIO DE ASUNTOS ECONOMICO-FINANCIEROS:

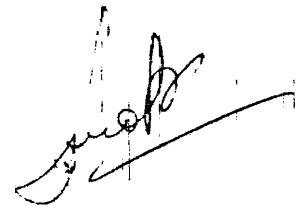
CONTADOR. ALDO HUGO ROSSI.

-SECRETARIO DE EXTENSION CULTURAL Y DIFUSION:

PROFESORA MARIA CONCEPCION ORRUMA.

-GUARDA - SELLOS:

INGENIERO ANDRES RINGVELET.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Raimundi', written over a horizontal line.

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

-DECANO NORMALIZADOR:

MED.VET. ALBERTO R. DIBBERN.

-SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

MED. VET. ESTEBAN URANGA.

-SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA:

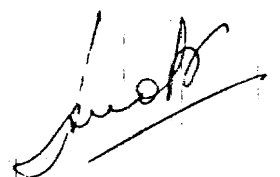
SR. OMAR HUGO RAMIREZ.

-DIRECTORA DE ENSEÑANZA:

SRA. HAYDE C.R. DE PERETTO.

-DIRECTOR ECONOMICO FINANCIERO:

SR. HECTOR S. MOREIRA.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Hector S. Moreira', written over a horizontal line.

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS

PROFESOR TITULAR "DEDICACION EXCLUSIVA"

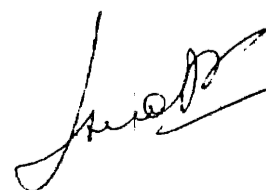
ANGULO Eusebia	Investigadora	Titular
CARROZZA Jesús S.W.	Int. a la Biofísica	Titular
GALLO Guillermo G.	Clín. Grand. Animales	Titular
MARTIN Alcides A.	Anat. y Fisiol. Patológ.	Titular
MENENDEZ Néstor A.	Patol. Aves y Pilíf.	Interino
PRACCA Lydia C.	Clín. Pequeños Animales	Titular
QUINTEROS Indalecio R.	Genética y Biometría	Titular
ZACCARDI Eduardo M.	Fisiología	Titular

PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

AGUIRRE Walter G.	Microbiol. Especial	Titular
ALBERDI Cecilio	Tecnol. y Sanid. Alim.	Titular
ANDREATA Jorge N.	Semiología y Proped.	Titular
BERTOLINI José M.	Anatomía Comparada	Interino
DELPRATO Ismael O.	Anat. Descrip. y Top.	EMERITO-c/1
GIMENO Emilio J.	Higiene E. y S. Pública	Titular
JENSEN Alicia D.	Bioestadística	Titular
LED Jorge E.	Parasit. y Enferm. Par.	Interino-c/1
MAROTTA Eduardo G.	Zootec. Espec. I Pte. (QSC)	Titular
MAROTTA Eduardo G.	Director Inst. S. Catalina	Interino
OTTINO Julio F.	Histología y Embriolog.	Interino
PENNIMPEDE Enrique F.F.	Inmunolog. Gral. y Aplic.	Titular
PIOVANO Nicolás M.	Int. a la Bioquímica	Titular
RODRIGUEZ Benjamin R.	Zootec. Espec. II Pte. (bye)	Titular
SCIAMMARELLA Alfredo M.	Medicina Operatoria	Interino

PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE"

AGUIRRE Walter G.	Microbiolog. Aplicada	Titular
ARGERI Nelson J.	Análisis Clínicos I	Interino
ARGERI Nelson J.	Análisis Clínicos II	Titular
BOCCIA Francisco O.	Patolog. Quirúrg. y Pod.	Interino
CARROZZA Jesús S. W.	Física y Quím. Aplic.	Interino
de ANTONI Graciela L.	Genética Microbiana	Titular
ISEAS Fortunato B.	Patología Médica	Interino



////

MARTIN Alcides A.	Patología General	Titular
MARTINO Olindo A.L.	Salud Pública	Titular
OSTROWSKI Jorge E.B.	Reproducción Animal	Titular
PANZONI Erico E.	Economía Agraria	Titular
PENNIMPEDE Enrique F.F.	Inmunología I P.	Interino
PEROTTI Rodolfo M.	Zootec.Espec.III Pte.(ayp)	EMERITO
RODRIGUEZ Benjamín R.	Zootec.Espec.IIPte.(bye)	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION EXCLUSIVA"

BRANDETTI Eugenio	Patol.Aves y Pilíferos	Reemplaz.
ERRECALDE Jorge O.	Farmacolog.Farm.y Terap.	Reemplaz.a.c/c.
ETCHEVERRIGARAY María E.	Virología	Titular-a.c/c.
IDIART Julio R.	Anatom.y Fisiol.Patolog.	Titular
LAGRECA Liliana A.	Zootec.Gral.y Agrostol.	Titular-a.c/c.
MONINA Marta I.	Clín.Grandes Animales	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

BOCCIA Francisco O.	Clínica Pequeños Anim.	Interino
DIBBERN Alberto R.	Zootec.Espec.IIPte(bye)	Interino-c/l.
DURANTE Eduardo J.	Servicio C.de Cirugía	Interino
FELDMAN Raquel E.	Parasitolog.Comparada	Titular-a/c.c
FERNANDEZ Enrique J.	Enfermed.Infecciosas	Interino-a/c.c
GARCIA VALENTI Horacio	Zootec.Espec.IIPte(bye)	Interino
GOMEZ Carlos M.	Inmunología II	Interino-a.a/c.
GRILLO Virginia E.	Zootec.Espec.IIIPte(ayp)	Interino
MAGGI Nilda B.	Medicina Operatoria	Reemplaz.
MARTINO Juan J.	Microbiología	Titular-a.c/c.
MURO Alicia M.	Servicio C.de Cirugía	Interino
NOIA Miguel A.	Introd.a la Biofísica	Titular
NOVARINI Miguel A.	Farmacol.Farm. y Terap.	Interino
ORTEGA César F.	Semiología y Propedeút.	Titular
PENNIMPEDE María T.del A.	Tecnolog.y S.Alimentos	Titular
REINOSO Enso H.	Micología Méd.e Indust.	Interino-a.c/c.
RENNER Juan F.	Clínica Grand.Animales	Interino
RUAGER Jorge	Anatomía y Fisiol.Pat.	Titular

////



////

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE"

BRANDETTI Eugenio	Parasit.y Enferm.Parasit.	Interino
BRAVO BARDALES Tomás	Economía Agraria	Reemplaz.
FINOCHIETTO Héctor D.	Patología Médica	Interino
GIMENO Eduardo J.	Patología General	Titular
MAGGI Nilda B.	Patología Quir.y Podol.	Interino
MALIANI Florestán S. (h)	Higiene Epid.y S, Pública	Titular
MOISO Alejandro C.	Microbiología	Titular
OLIVA Graciela A.	Virología	Interino
PRILO LOFEUDO Graciela E.	Zotec.Espec.IIIPte(ayp)	Interino
ROJAS Edmundo R.	Fisiología	Titular
SARA Raúl C.	Reproducción Animal	Interino
TARSIA Elba	Introd.a la Biofísica	Titular
TESORIERO Catalina	Microbiología Especial	Interino
VENTURINI Lucila M.	Parasit.y Enferm.Parasit.	Interino-a.c/c.
VILLAR Martha E.	Análisis Clínicos I Pte.	Interino
VILLAR Martha E.	Análisis Clínicos II Pte.	Interino

JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION EXCLUSIVA"

BASCHAR Héctor O.	Clínica Grand.Animales	Interino
FERRER Daniel E.	Asesor Pedagógico	Interino
FONROUGE Reinaldo D.	Higiene Epid.y S.Pública	Interino
RONCINO Roberto	Sección Radioisótopos	Interino
TEJEDOR Eugenio D.	Genética y Biometría	Interino

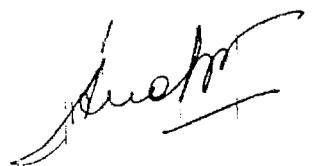
JEFE DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

ALIVERTI Héctor M.	Zotec.Espec.IIPte.(bye)	Interino
ALLENDE Miriam G.	Servicio C.de Cirugía	Interino;
ALLEVATO Hugo L.	Higiene Epid.y S. Pública	Interino
AMASINO Carlos F.	Enfermed.Infecciosas	Interino
AULICINO Oscar O.	Tecnología y S.Aliment.	Interino
BABUSCI Máximo	Fisiología	Interino
BAMBILL Emilia C.	Zotec.Espec.IPte.(OSC)	Interino
BERNAGOZZI Jorge A.	Inmunolog.Gral.y Aplic.	Interino
BISCHOFF Jorge R.	Genética y Biometría	Interino
BUGALLO Antonio	Farmacología Far.y Terap.	Interino

////

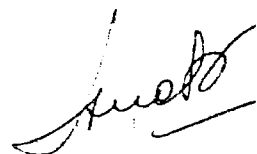


////		
BUTLER Eduardo A.	Patología Quirúrg. y Pod.	Reemplaz.
CARBONE Cecilia	Animales de Laboratorio	Interino
CASTAÑEDA César A.	Clínica Pequeños Animales	Reemplaz.
CASTUMA María E.	Introduc. a la Bioquímica	Interino
COSTA Enrique F.	Anatomía Descrip. y Topog.	Interino
CREDARO Cristina	Análisis Clínicos I P.	Interino
CHAMPREDONDE Hugo N.	Patología General	Interino
del CASTILLO Federico C.	Histología y Embriolog.	Interino
DRAGONETTI Ana M.	Clínica Pequeños Anim.	Interino
FORNER Jesús J.A.	Tecnología y S. Alimentos	Interino
FREGOSI Mario O.	Anatomía Descrip. y Topog	Interino
FRIGOLI Alicia E.	Introd. a la Biofísica	Interino
FRIGOLI Alicia E.	Introd. a la Biofísica	Interino
FUENTES Leticia S.	Introd. a la Biofísica	Interino
GIANOTTI Ricardo S.	Tecnología y S. Aliment.	Interino
GONZALEZ Ester T.	Virología	Interino
GUAJARDO Margarita H.	Introd. a la Bioquímica	Interino
GUGLIELMETTI Elda M.C.	Introd. a la Biofísica	Interino
GUGLIELMETTI Elda M.C.	Física y Quím. Aplicada	Interino
IBARGOYEN Guillermo S.	Patología General	Interino
LACCHINI Raúl A.	Zootecnia Gral. y Agrost.	Interino
LINZITTO Oscar R.	Histología y Embriolog.	Interino
LOJO María E.	Genética Microbiana	Interino
MARCANTONI Hugo	Histología y Embriolog.	Interino
MARTINS Stella M.	Zotec. Espec. IIPte. (bye)	Interino
MILLAN Margarita D.	Anatomía Descript. y Top.	Interino
MONTESINOS RAMOS Ignacio	Clínica Grand. Animales	Interino
MURO Alicia M.	Clín. Pequeños Anim.	Inter. (c.L.s/s)
ORELLANA Jorge	Histología y Embriolog.	Interino
PELLON Horacio S.	Tecnología y S. Aliment.	Interino
PIACENTINI Enrique	Tecnología y S. Aliment.	Interino
PIAZZA Delia	Microbiología Especial	Interino-L/s/s.
POLI Mario A.	Genética y Biometría	Interino
PONS Eduardo E.	Clínica Grand. Animales	Interino
RADMAN Nilda E.	Parasitolog. y Enfer. Par.	Interino



////

RAMIREZ Luis E.	Anatomía Descrip. y Top.	Interino
RECALDE Ricardo J.	Patología Quir.y Podol.	Reemplaz.
RIVADAVIA Carlos A.	Introd.a la Bioquímica	Interino
RUSSO Angel F.	Reproducción animal	Interino
SALESSI Enrique	Fisiología	Interino
SILVA Elisabeth A.	Genética y Biometría	Reemplaz.
SCAVIA Ricardo C.	Anatomía Comparada	Interino
TABORCIA Juan A.	Patología General	Interino
TARABUSO Ricardo	Semiología y Propedeút.	Interino
TREBUCQ Ruben A.	Inmunolog.Gral.Aplic.	Interino
VARELA Juan A.H.	Microbiología	Interino
VOCOS GIMENEZ Sara T.	Zotec.Espec.IIPte (bye)	Interino



TITULO:

- INVESTIGACION DE METODOS PARA OBTENER ANTICENOS HEMOAGLUTINANTES
"IN VITRO" DE ENCEFALITIS DE SAN LUIS -

MED.VET. Ana Sofía FERNANDEZ (1)

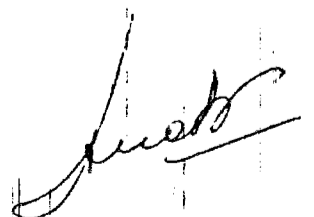
Dra. NORMA EVANGELINA METTLER (2)

- (1) Ana Sofía FERNANDEZ = Tesista - Médico Veterinario. Ayudante de Primera con Dedicación Exclusiva de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (TANDIL)
- (2) Norma E. METTLER =
-Directora-
DRA. en Medicina (UBA) Argentina.
DRA. en Salud Pública (YALE) USA.
Miembro de la Carrera de Investigador de la Comisión de INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CIC) de la Prov. Bs. As.
Prof. Titular Cát. de INMUNOLOGIA Fac. Cs. Vet. (UBA).



CONTENIDOS

CARATULA	PAG.	1
AUTORIDADES DE LA UNLP.	PAG.	2
TITULO	PAG.	9
CONTENIDOS	PAG.	10
INTRODUCCION	PAG.	11
MATERIAL Y METODO	PAG.	16
RESULTADOS ,,,,,,	PAG.	31
DISCUSION	PAG.	39
CONCLUSIONES	PAG.	42
ABREVIATURAS	PAG.	43
SOLUCIONES	PAG.	44
RESUMEN	PAG.	48
SUMMARY	PAG.	49
BIBLIOGRAFIA	PAG.	50
ART. 11	PAG.	57



INTRODUCCION

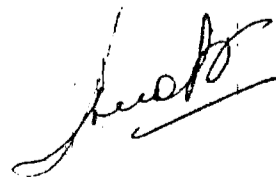
El virus Encefalitis de San Luis (SLE), fue aislado por primera vez en San Luis, pueblo de Missouri en los Estados Unidos de Norteamérica en 1933 como agente causal de una epidemia de ENCEFALITIS en humanos. Desde entonces, hasta ahora, se lo ha aislado en múltiples ocasiones como causal de diferentes EPIDEMIAS en humanos, que siempre se restringen al continente americano, especialmente a Estados Unidos en donde, el virus, está ocupando el vacío dejado por una enfermedad ya controlada (1), la POLIOMIELITIS O PARALISIS INFANTIL.

Es un virus que tiene mucha importancia desde el punto de vista de la Salud Pública, porque cuando altera el Sistema Nervioso Central, puede provocar la muerte o dejar secuelas psíquicas o motoras. No hay vacunas adquiribles comercialmente para uso humano y sabemos que el virus de San Luis (SLE), también afecta a nuestro país como lo demuestran ENCUESTAS SEROLOGICAS realizadas en humanos (2) y animales (3), comprometiendo a nuestro territorio en toda su extensión (4).

En el Partido de TANDIL, Provincia de Bs.As. (Buenos Aires), se ha demostrado a través de RASTREO SEROEPIDEMIOLOGICO, de que este virus es activo, también ahora, como lo revelan las encuestas serológicas realizadas en humanos (5) y (6), bovinos (7) (8) y (9) y en equinos (10) (11) y (12).

El virus, si bien afecta al hombre, la mayor parte de las veces produce infecciones asintomáticas o simplemente cuadros gripales (13), aunque en Estados Unidos aparecen anualmente brotes de encefalitis epidémicas, de carácter rural, semiurbano o urbano; en nuestro país se lo ha aislado de pacientes, correspondientes a EPIDEMIAS de FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA (FHA) que no han tenido CONVERSION SEROLOGICA para VIRUS JUNIN (14) (15) y (16) y que han cursado con FIEBRES LEUCOPENICAS, similares a las que produce el virus Junín. Otras veces han aparecido anticuerpos (AC) en niños que cursaron su enfermedad como DIARREAS ESTIVALES, muchas de las cuales dejaron SECUELAS SICOMOTORAS (17) (18) (19), o siguiendo a síndromes de encefalitis asépticas en adultos (20). De cualquier forma los estudios hasta ahora mencionados, más otros correspondientes a las Provincias de Córdoba (21) en poblaciones humanas y en Tucumán en animales (22), no dejan lugar a duda, sobre la amplia difusión en infecciones humanas y de animales domésticos practicadas en nuestro país, desde 1963 (2), hasta la fecha.

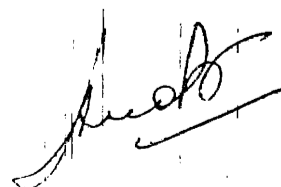
Aunque no sepamos si en nuestro caso los animales domésticos solo representan una herramienta para detectar la presencia del virus en la naturaleza o si eventualmente podrían producir enfermedad o EPIZOOTIAS, ya que si bien no



se han descrito en nuestro medio, animales cuyas patologías infecciosas respondan a esta etiología, se sabe que las cepas aisladas en el Hemisferio Norte son capaces de infectar equinos experimental y naturalmente (23) y que — desde el punto de vista EPIDEMIOLOGICO (24) (25) (26) tienen un ciclo natural donde intervienen pájaros y mosquitos. Mientras que en nuestro Hemisferio Sur, los pájaros no parecen estar comprometidos en la cadena epidemiológica, sino que intervienen pequeños roedores silvestres, lo que hace a diferencias genéticas y patológicas del virus, y dan las bases para una clasificación (27) (28) (29) . Estas variaciones pueden medirse con marcadores biológicos, siendo el más usado, los ratones de 21 días de edad, para los estudios comparativos de VIRULENCIA, en donde la infección es letal para las cepas de SLE aisladas del Hemisferio Norte, mientras que para algunas cepas — del Hemisferio Sur no son tan patógenas para los huéspedes de esta edad, inoculados por VIA INTRAPERITONEAL (IP). Además de estas variaciones REGIONALES las cepas tienen distintos comportamientos según se trate de un huésped definitivo u ocasional (caballo u hombre) o si se trata de un reservorio (pájaro o ratón) (1) (30). En el primer caso (10), hay viremias de alta magnitud luego de la infección seguida de la invasión al Sistema Nervioso Central pudiéndose observar SIGNOS y SINTOMAS de la infección. En el segundo caso (20) hay viremia, sin correlación entre signos y síntomas que generalmente no existen. Los signos y síntomas producidos por este virus son los correspondientes a — una MENINGO-ENCEFALITIS ASEPTICA, con dolor de cabeza, náuseas, vómitos y fotofobia, leucositosis en líquido Céfalorraquídeo (LCR) hay un lento período de exaltación nerviosa y convulsiones cuando se compromete el cerebro y posteriormente llega un período llamado LETARGICO, en el cual sobreviene la — muerte o bien la curación cuando desciende la fiebre; dejando secuelas del tipo nervioso (neurológicas) y deterioro de la personalidad en sobrevivientes, sobre todo en individuos de edad avanzada.

En niños se han descrito lesiones oftálmicas como secuelas post-infección — (30). La prognosis, depende, de la edad del paciente, estado nutricional, — precocidad con que se haya hecho el diagnóstico, etc. El tratamiento es siempre sintomático.

El virus SLE está relacionado al virus Fiebre Amarilla, Dengue, entre otros. — Conocidos como ARBOVIRUS GRUPO-B de la clasificación ANTIGENICA de CASALS(1) (31). Esta clasificación es sumamente útil desde el punto de vista INMUNOLOGICO, se hizo en base a pruebas SEROLOGICAS CLASICAS DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IH); FIJACIONES DE COMPLEMENTO NEUTRALIZACION VIRAL — (NT).



En la actualidad hay registrados más de 60 de estos virus antigénicamente - relacionados, pertenecientes a los ARBOVIRUS GRUPO-B; que al ser estudiados en BASES FISICO-QUIMICAS fueron TAXONOMICAMENTE registrados como el GÉNERO-FLAVI-VIRUS (Flavi = amarillo, pues Fiebre Amarilla encabeza el género), de la familia TOGAVIRIDAE. Hoy el género se ha hecho tan grande y difiere tanto de los otros géneros que integran la familia especialmente de las ALFA-VIRUS Y RUBIVIRUS, que han sido postulados como integrantes de una nueva familia que llevará el nombre de FLAVIVIRIDAE.

Los FLAVIVIRUS Y ALFAVIRUS, se caracterizan desde el punto de vista BIOLÓGICO, por ser transmitidos por artrópodos, en su mayoría mosquitos y garrapatas (32) y en general todos aquellos virus transmitidos por mosquitos como el virus SLE, tienen la propiedad de reproducir experimentalmente no solo en mosquitos inoculados en el laboratorio sino también en líneas celulares primarias y continuas, de mosquitos mantenidos "in vitro" (33) y (34).

Este virus desde el punto de vista bioquímico se caracteriza por tener un núcleo de RNA de cadena simple (35), tener simetría cúbica y ser sensible a los SOLVENTES LIPIDICOS, como éter o dexosicolato de sodio, etc. (36), además de tener una cubierta o manto lipídico, de allí el nombre de la familia (manto = toga) TOGAVIRIDAE.

El hombre, generalmente se infecta al ser picado por mosquitos de diferentes especies, de acuerdo al molde urbano o rural de la epidemia, en nuestro país ha sido recuperado de mosquitos del género CULEX, que a su vez han demostrado ser buenos transmisores del virus experimentalmente (37). En síntesis el virus SLE ha sido aislado de numerosas especies de animales superiores e inferiores como los artrópodos, y han demostrado tener anticuerpos (AC) contra el mismo: aves domésticas y silvestres equinos (caballos y asnos), osos, arces, bovinos, ovinos, cabras, mulas; se ha detectado la transmisión TRANSOVARICA de los AC inhibidores de la hemoaglutinación AC IH) en pollos (38). Los primeros aislamientos de SLE en nuestro país se hicieron en la Provincia de Buenos Aires, Partido de Chacabuco, en 1963, ellos fueron: virus SLE cepa BEL y virus SLE cepa VII; de pacientes supuestamente afectados de fiebre hemorrágica argentina (15).

Más tarde SLE, fue aislado en varias ocasiones en las Provincias de Santa Fe y Córdoba.

Es sabido que los miembros de la familia TOGAVIRIDAE replican bien en cultivo de tejidos (CT) y SLE, también lo hace (39), produce acción CITOPATOGENICA (CP) en riñón de criceto y pollo, da claras placas en células de riñón de pato bajo agar y en células BHK bajo metil celulosa (40) (41). También -



desarrolla en células de riñón de porcino, epiteloma humano (42), en líneas continuas de mosquitos (33), en células BHK-21, en células VERO. Pero en general, tanto para aislamiento como para estudio antigénico del virus, se ha usado un animal experimental, el RATON RECIEN NACIDO (44) y (45). En este huésped se reproduce el virus en cantidad suficiente para poder poner en evidencia una de las características más sobresalientes de este agente patógeno que es el de ser AGLUTINANTE frente a glóbulos rojos (GR) de ganso y de pollito recién nacido, dicha reacción es totalmente dependiente de PH y temperatura (T°). La hemoaglutinación (HA) es de incuestionable valor para la serología (44). Siendo la INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IH) una técnica sensible y fácil de realizar en cualquier laboratorio diagnóstico, y considerando que los AC IH aparecen rápido y se mantienen por un tiempo prudencial tanto en el hombre como en los animales domésticos, ésta es la técnica de predilección para detectar infecciones.

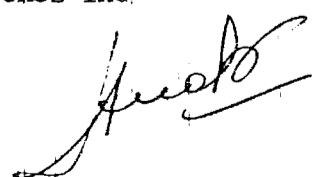
Es necesario, entonces tratándose de un virus ENDEMICO de nuestro país que dispongamos de ANTIGENOS (Ag) HA, que sean producidos a bajo costo, sin riesgo de infección pues los AG HA para serología, que se usan en la actualidad, se obtienen a partir de cerebro de ratón lactante (0-3 días de edad), que ha sido inoculado por vía intracerebral (IC), los cuales son tratados con SUCROSA-ACETONA (AG clásico) (44).

También pueden obtenerse buenos Ag HA usando ratones adultos SARCOMATOSOS (46) ó CARCINOMATOSOS (47) que reciben inoculación por vía IP.

Hay antecedentes que indican que se puede obtener Ag HA, del virus SLE, a partir de suero de criceto infectado (48), en líneas celulares primarias (49) o continuas (50). Hasta ahora todos los Ag HA que se han elaborado son inoculando animales que producen altos riesgos de infección para los trabajadores de laboratorio y altos costos de producción, derivados del mantenimiento o compra de líneas celulares y medios de cultivos especiales, o bien de animales para inocular. Además los Ag habitualmente usados contienen virus vivo infectante, lo que constituye un riesgo incluso, para el que realiza las reacciones serológicas.

ES EL OBJETIVO de este trabajo, realizar un Ag HA del virus SLE, a bajo costo sin manipular animales infectados, con técnicas simples al alcance de nuestros laboratorios, que pueda ser usado sin riesgo de infección en pruebas serológicas. El mismo tendrá que reunir las condiciones requeridas para aprobar un CONTROL DE CALIDAD es decir: ser INOCUO, ESPECIFICO, SENSIBLE y ESTABLE por lo menos a T° de refrigeración (4°C) por un tiempo prudencial.

LA INOCUIDAD: Será medida por la falta de capacidad de infectar ratones ino-



culados por vía IC e IP.

LA ESPECIFICIDAD: por la IH de 4-8 unidades hemoaglutinantes (UHA) de este Ag por sueros experimentales de referencia (SEC) para grupo B y/o encefalitis de SLE y no INHIBICION por controles de sueros provenientes de igual especie animal obtenidos con virus no relacionados, o sueros de animales sanos (SCN).

LA SENSIBILIDAD: por la comparación de títulos IH (INHIBIDORES DE HEMOAGLUTINACION) en sueros homólogos del Ag obtenido con el usado clásicamente (Ag SA-en c.r.i.)

LA ESTABILIDAD: por la conservación del título HA a lo largo de un tiempo prudencial y frente a los diferentes tipos de manipulación como por ejemplo la - INACTIVACION. Para abaratar costos, se usaron suspensiones celulares de fácil obtención, como medio de cultivo, suero puro diluido de la especie a la cual procedían las células y amortiguadores de fosfatos.



MATERIAL Y METODOS

Nómina de materiales usados en esta Tesis

a) . Semilla

1. Antígeno sucrosa-acetona control en ratón.
2. Inóculo para cada tubo de cultivo.
3. Sueros controles de SLE (sueros experimentales -SE-).

b) . Células a usar según origen:

1. equinas (plaquetas, glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB))
2. bovinas (plaquetas, GR, GB, glándulas salivales de feto, glándulas mamarias)
3. murinas (normales= de ratón recién nacido (rrn), cerebro de ratón 0-3 días y macerado de embriones a término; patológicas= sarcoma 180#TG)

Medios para suspensión de células

1. Solución de fosfato pH 6, 7, 8 y 9.
2. Suero puro de la especie celular correspondiente inactivado a 56°C por 30 minutos
3. Suero diluido 10% pH 6, 7, 8 y 9.
4. Fluido ascético puro y diluido 5%, Leche pura y diluida.

Indicador= Rojo fenol

Amortiguador= Tris y solución tampón de acetato

Antibióticos= Penicilina, estreptomycin, micostatina o anfotericina

Condiciones de cultivo

- . pH empleados: 6, 7, 8 y 9.
- . temperatura (T°) de incubación: 4, 24, y 37 °C
- . Tiempo de duración de cada experimento: 10 días.

Pruebas a someter a las diferentes muestras

Cada muestra fue tratada como un antígeno. Los procedimientos obligados fueron:

- . centrifugación a 1000 rpm para hacer límpida la muestra.
- . doble lavado con acetona y posterior secado en bomba de vacío.

En caso de obtener resultados positivos por los dos métodos anteriores, pero con antígenos difíciles de inhibir (duros) se aplicará:

- . sonicación.
- . cromatografía de absorción en tandas de diferentes molaridades de fosfatos.

Esto se efectuará con intenciones de parcelar el virus y luego purificar las partículas hemoaglutinantes.

En caso de no ser necesaria la sonicación y cromatografía, el Ag HA de SLE obtenido será sometido a las siguientes pruebas de inactivación viral:

- . con Beta propiolactona.
- . con formol.
- . con calor, autoclavado.
- . hipoclorito de sodio,

A cada uno de los antígenos (Ag) así obtenidos se les probará si son HA o no por medio de HA directa en microtécnica, en policubetas de poliestireno frente a 8 diferentes pH, frente a GR de ganso lavados y suspendidos al 10% en DGV (Medio de Dextrosa-Gelatina-Veronal).

Cuando algunos de los antígenos resulte HA se lo enfrentará a los sueros experimentales del mismo virus.

En las pruebas se incluirá un control del sistema que será el Ag de SLE cepa Bel que tiene probada hemoaglutinación.

-A los antígenos (Ag) que resultaran HA y no perdieran su título por inactivación se los inoculará por vía IP e IC a ratones blancos (pruebas de infectividad)

-A todos los animales que fuesen usados como donantes de células se les hicieron pruebas serológicas (IH, FC) contra el antígeno HA SLE cepa BEL, — realizado por el método SA del pasaje n° 11-12 con el fin de determinar que fueran sero-negativos para este virus.

Prueba a someter a todos los antígenos obtenidos:

Hemoaglutinación por microtécnica (Clarke y Casals) y modificada (Shope) (44)

Soluciones necesarias:

- . Solución tamponada de fosfatos más solución tamponada borato-salina (BAG'S) = para diluir el Ag
- . Soluciones de fosfatos de diferentes pH: desde 5,8 a 7,2 (5,8-6; 6,2-6,4; 6,6-6,8; 7-7,2) (VAD'S)
- . GR de ganso diluido a la concentración requerida.

Hemoaglutinación en microtécnica

Materiales usados: microplacas comerciales plásticas con 96 pocillos fondo — en U, microdiluidores de 0,05 c.c. y pipetas de vidrio también de 0,05 c.c.— de goteo continuo.

Glóbulos rojos de ganso: se obtuvieron por sangría parcial de un ganso, de la vena marginal del ala, con alcohol y algodón se desinfectó la zona usando jeringa y aguja estéril. Se usó 1,5 c.c. ACD por cada 8,5 c.c. de sangre (anticoagulante ACD -Acido cítrico-Dextrosa)

- . Se colocó la sangre con anticoagulante en el homogeneizador durante 4 horas
- . Las células se lavaron por centrifugación a 1500 rpm. durante 15 minutos.
- . Se descartó plasma más ACD y luego se le hicieron 4 lavados con sol. de DGV-

centrifugando 15 minutos a 1500 rpm.

Para el primer lavado se usó 2,5 volúmenes de DGV por cada volúmen de sangre. El sobrenadante fue descartado. El último lavado se hizo en tubos de centrifuga graduados durante 15 minutos a 1500 rpm. Basados en este precipitado se suspendieron las células al 10% en DGV.

.Se impidió la multiplicación de gérmenes, posible de ocurrir, por causa de contaminaciones durante el manipuleo, añadiendo a esta suspensión de glóbulos, mertiolato, para obtener una concentración final de 1:10000. Para esto se pesó polvo de merthiolate y se hizo una suspensión 1:100 en solución fisiológica (SF) estéril. De esta solución se añadió la proporción de 1 cc. — por cada 100 cc. de suspensión de GR al 10% (Mertiolato: timerosal, mercurial orgánico).

.Los glóbulos listos para emplear se guardaron a 4 °C. Para usar las células se diluyó en la proporción 1:40 en las soluciones tamponadas de fosfatos de tal manera que la concentración celular es al final 0,25% (en el pocillo de la microplaca). Las diluciones se hicieron en el momento de usar, pues las células podrían lisarse.

Realización de esta Tesis: Se ajustará al diseño experimental inicial: Ver Tabla I.

Tabla I

DISEÑO EXPERIMENTAL INICIAL

Suspensión de células al 10%		Medios de Mantenim.	pH c/u	Tempe- rat. T° c/u	TOTAL	
Especie	Clase				T.de C.	m
Equina	G. Blancos	3 medios	4 pH	3 T°	36 T de C	360
	G. Rojos	id.	6-7-8-9	4° 24°	36 T de C	360
	Plaquetas	id.		37°	36 T de C	360
Bovina	G. Blancos	id.	id.	id.	36 T de C	360
	G. Rojos	id.	id.	id.	36 T de C	360
	Plaquetas	id.	id.	id.	36 T de C	360
	Gl. salival	id.	id.	id.	36 T de C	360
	Gl. mamaria	id.	5 med.	id.	60 T de C	600
Murina	Cél. fetales	id.	id.	id.	36 T de C	360
	S.N.C. (rrn)	id.	id.	id.	36 T de C	360
	Sarcoma 180 TG	id.	id.	id.	36 T de C	360
3 especies	11 clases	Varios	4 pH's	3 T°	420	4200

Cada tubo examinado diariamente por diez días consecutivos lo que hacen a —

//////

4200 muestras examinadas crudas y después de tratadas con acetona (8400 examinadas en total) frente a 8 pH's y 3 diluciones a temperatura ambiente, en pruebas panorámicas más las que pudieran corresponder a titulaciones de — muestras positivas.

SEMILLA: Se usó SLE cepa Bel con 11-12 pasajes en cerebro de ratón lactante de 0-3 días (15) (c.r.i.) cerebro de ratón infectado.

La inoculación se hizo con 0,02 c.c. por vía IC de una dilución 10^{-2} del virus en bpa que es amortiguador (amortiguadores de fosfatos pH 7,2 más el agregado de 0,75% de albúmina bovina) (45).

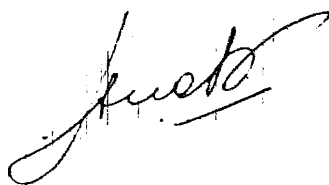
Entre el tercer y cuarto día post inoculación se cosecharon los cerebros de los animales enfermos, se hizo un macerado al 20% siempre en el mismo amortiguador, se centrifugó a 1500-2000 rpm durante 5-10 minutos y al sobrenadante (es lo que podemos decir nuestro elemento de trabajo) se lo fraccionó en ampollas de 1cc. y se lo congeló a -70°C .

1 -ANTIGENO CONTROL HA: sucrosa-acetona con parte de los cerebros (c.r.i.) del pasaje 11 y 12 se hizo Ag sucrosa-acetona siguiendo las técnicas clásicas de arbovirología de Clarke y Cassals (44) que consisten en:

- . descerebrar los ratones,
- . suspender en 4 volúmenes de sacarosa al 8,5%,
- . homogeneizarlos en licuadora pequeña,
- . lavar el homogeneizado con 20 volúmenes de acetona fría: en el primer lavado el homogeneizado fue goteado sobre la acetona fría (4°C) y reducido a polvillo. Se descartó esa acetona fría y se repusieron los 20 volúmenes dejándolos actuar durante una hora.
- . descartar la acetona,
- . dejar secar en bomba de vacío,
- . hidratar con 0,4 volúmenes de solución fisiológica (ClNa 9‰ en agua destilada estéril) por cada volumen de homogeneizado, inicial.
- . dejar una noche,
- . centrifugar a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C . El sobrenadante es el — Ag HA.

Se obtuvo así del pasaje Nro. 11 de SLE cepa Bel un antígeno cuyo título — fue de 1/1280 con un óptimo de PH 6,5. Del pasaje Nro. 12 el título del Ag — fue de 1/640 con un óptimo en pH 6,6.

2 -INOCULO: con parte de los c.r.i. se hizo una suspensión de virus 10^{-2} en bpa y de esta, se sembró, por cada tubo, 1 cc. en todas las experiencias.

111-


////

SUEROS CONTROLES INMUNES: Con la semilla inicial y luego de inactivarla, se inoculan ratones adultos vía IP, a razón de 0,3 cc. por cada animal. El inóculo fue de virus inactivado con Beta propiolactona preparado de la siguiente manera:

- . se mezclaron partes iguales de Beta propiolactona al 0,1% y suspensión de semilla al 20%
- . se colocó en baño maría a 37°C por 60 minutos y se inoculó.
- . Se hicieron dos inoculaciones de 0,3 cc. de virus inactivado, con espacio de 21 días entre una y otra.

A los 30 días se sangraron a blanco todos los animales y se obtuvo un suero experimental con título IH de 1/1280 frente a 4-8 UH de los Ag.

Control de suero negativo = suero de ratón normal (lavado por dos veces con acetona).

Medios de mantenimiento: ellos son:

- . Solución tamponada de fosfatos con pH's 6, 7, 8 y 9 que se logró combinando solución de fosfatos monosódico y disódico y cloruro de sodio con el agregado por cada tubo de cultivo de 1 cc. de solución de sacarosa al 8,5% en agua destilada estéril.

Indicador de pH: se usó una solución de rojo fenol al 0,5% en hidróxido de sodio 1/60M agregado en la misma cantidad y concentración en todos los tubos.

Previamente se construyó una escala de color de rojo fenol desde pH 6 hasta pH 9 con las distintas combinaciones de las soluciones tamponadas de fosfatos disódico y monosódico más cloruro de sodio, que va desde el color amarillo (pH 5,8) al color fucsia (solferino pH 9).

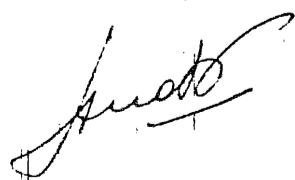
Por comparación con esta escala de color es que se midieron los distintos pH.

- . Solución amortiguadora de TRIS, que se agregó a las soluciones para ajustar a pH 9 y Solución tampón de acetato para pH 6.

Antimicrobiano: Solución de Penicilina 100 UI. Estreptomina 250 microgramos y Micostatina 250 microgramos por cc. Agregadas en la misma cantidad y concentración en todos los tubos.

. Suero de animales: Se obtuvo una extracción de sangre sin anticoagulante, se dejó coagular a T° ambiente y por centrifugación a 1500-2000 rpm. durante 15 min. Fue llevado a pH 8 y 9 con TRIS y a pH 6 con solución tampón de acetato. En todos los casos el suero a usar fue inactivado a 56°C durante 30 min. Se usaron sueros equinos y bovinos para células de las respectivas especies.

Suero diluido al 10% en los amortiguadores de fosfatos (una parte de suero y 9

1111


////

partes de amortiguadores). También para equino y bovino.

Leche pura: Se usó leche en polvo, que en vez de ser diluída en agua destilada fue disuelta en las soluciones tampones a pH 6, 7, 8 y 9 a razón de 30 gr. de leche en 250 cc. de líquido correspondiente para la leche pura (leche entera La Serenísimas).

Leche diluída: al 10%: se diluyó la leche pura en solución tamponada pH 6, 7, 8 y 9 a razón de 1 parte de leche pura más 9 partes de solución tamponada.

2) Fluido ascítico (F.A.) de ratón sarcomatoso Puro (edad del tumor: 10 días) que se extrajo sin anticoagulante del animal sarcomatoso a fin de que coagule y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. llevándose a pH 6, 7, 8 y 9 con solución tamponada y TRIS.

3) Fluido ascítico de ratón sarcomatoso diluído: se obtuvo de igual forma que en el caso anterior y se lo diluyó en solución tamponada de fosfatos al 10% en los consabidos pH 6, 7, 8 y 9 (1:10).

Las células usadas cuando se trata de glándulas mamarias o salivar fueron sometidas a pruebas de viabilidad con coloraciones vitales (azul tripán), ya que se habían traído del Matadero local.

Las demás células (GR, blancos y plaquetas) fueron usadas a continuación de su extracción por lo cual solo recibieron centrifugación y tratamiento descrito. Pero a todas las células puestas en experiencia, se les hizo prueba de viabilidad diaria en azul tripán. (cel. morinas)

Suspensión de células sanguíneas equinas y bovinas: fueron obtenidas de un equino o bovino adulto por punción aséptica de vena yugular, con material estéril y de plástico. La primera extracción se hizo usando anticoagulante Heparina 10 microlitros por cc., siempre trabajando en baño de hielo. La segunda extracción sin anticoagulante para suero.

Procesamiento de la sangre para obtención de GR, GB y plaquetas tanto equinas como bovinas.

.Se la centrifugó suavemente a 1000-1500 rpm en centrífuga refrigerada durante 10-15 min.

.En el sobrenadante quedaron el plasma y las plaquetas. En el sedimento los GR y GB. Se llevaron las tres fracciones en distintos tubos para su lavado ya que las bandas blancas y rojas del sedimento son perfectamente discernibles.

.Al sobrenadante o sedimento se lo centrifugó a 3000-5000 rpm durante 20 min

[Handwritten signature]
112

././././

luego de los cuales se tuvieron las plaquetas en el fondo de los tubos de vidrio esmerilado (formando como una nube).

.Se resuspendió el precipitado en solución fisiológica (SF) estéril al 10% y se centrifugó a 3500-5000 rpm por dos veces, la última en tubos de centrifuga graduados.

.Se descartó la solución fisiológica y se suspendieron las plaquetas GR, GB en las soluciones tamponadas correspondientes para su cultivo, al 10% (una parte de células y nueve partes de medio).

.Se agregó rojo fenol como indicador.

.Se adicionaron las células en la proporción indicada.

.Se agregó antimicrobiano.

.Se ajustó el pH (con TRIS o solución tampón de acetato de sodio).

.Por último se sembró el virus SLE cepa Bel, 1 cc en una dilución 10^{-2} en bpa 0,75% de albúmina bovina y se colocó a t° de cultivo: 4°, 24° y 37°C. - por cada tipo de célula sanguínea se usaron 36 tubos.

Los glóbulos blancos, rojos y plaquetas fueron suspendidos en 3 medios diferentes.

1) Solución amortiguadora de fosfatos más 10% de sacarosa al 8,5%.

2) Suero puro inactivado.

3) Suero inactivado diluido al 10% en soluciones tamponadas.

En todos los casos los pH fueron 6, 7, 8 y 9 y las temperaturas de cultivo- 4°, 24°(ta) y 37°C.

La única diferencia entre las células equinas y bovinas estuvo en el origen del suero, en donde a cada una se le puso el suero de origen correspondiente

SUSPENSION DE CELULAS PROVENIENTES DE GLANDULA MAMARIA BOVINA

Se usó glándula mamaria obtenida del frigorífico local, extraída inmediatamente después de la faena del animal. El trozo de glándula mamaria fue sumergido en solución fisiológica aséptica, todo en baño de hielo, hasta llegar al laboratorio donde fue introducida en horno ultravioleta durante 15 min, luego fue trozada en pequeñas porciones con tijera y cuchilla estéril- lavando con SF estéril y colocando los trozos en máquina trituradora durante 1 min a la primera velocidad, se lavó este tejido con SF dos veces, los fragmentos (ahora de 2-3 mm de espesor) se colocaron en un matraz y se agregó tripsina calentada a 37°C. Se incubó a esta temperatura durante 10 min, se descartó la tripsina y se agregó igual volumen de la misma solución (50 cc), de acuerdo a la cantidad de tejido, se dejó esta tripsina durante una hora a 37°C agitando. Se frenó la acción de la tripsina con suero homó-

logo (2 cc). Se centrifugó el sobrenadante que contenía las células dispersas en centrífuga refrigerada a 4 °C, durante 10 min a 800-1000 rpm y en el fondo quedaron las células, se las lavó con SF por 3 veces para eliminar toda la tripsina por 3 centrifugaciones de 800-1000 rpm durante 10 min, el último lavado se hizo en tubos de centrífuga graduados y se suspendieron las células al 10% en solución tamponada más 1 cc de sacarosa al 8,5%.

- 2) suero bovino inactivado (a 56 °C durante 30 min)
- 3) suero bovino diluido al 10%, inactivado, a 5 0 min.
- 4) leche pura
- 5) leche diluida al 10%

SUSPENSION DE CELULAS PROVENIENTES DE GLANDULA SALIVAR DE FETO BOVINO (51)-(52).

Se obtuvo un feto bovino de 6-7 meses de edad en el frigorífico local, al feto se le seccionó la cabeza y se la sumergió en solución desinfectante — muy diluida. Se renovó en el laboratorio esta solución 2 ó 3 veces por SF.— Se puso en horno ultravioleta 14 min. Con cuchillas estériles y bisturí se seccionaron las dos parótidas, se cortaron en trozos pequeños y se lavaron 2 ó 3 veces con SF. Estos trocitos fueron colocados en trituradora de tejido (tipo Moulinex) 1 min a 400-500 rpm. Los fragmentos quedaron de 2-3 mm — de espesor. Se calentó tripsina a 37 °C y se continuaron los lavados con SF. Se colocó en un matraz 50 cc de tripsina a 37 °C y con agitación constante — se le agregaron los trocitos de tejido. Se dejaron 10 min, se desechó esta tripsina y se la removió por igual volumen de la misma enzima, se dejó 1 hora a 37 °C. Se agregó a esta solución 2 cc de suero perteneciente al mismo animal y se centrifugó el sobrenadante a 800-1000 rpm durante 10 min en centrífuga refrigerada. Se descartó la tripsina y a estas células se las lavó 3 ó 4 veces con SF para eliminar la enzima, la última vez en tubos de centrífuga graduados para calcular la cantidad de células que se tenían y hacer una suspensión al 10% en soluciones tamponadas más 1 cc de sacarosa al 8,5% en suero puro y suero diluido, en estos casos suero fetal.

El suero usado, es del mismo feto bovino obtenido por punción aséptica vía intracardíaca sin anticoagulante. Se dejó coagular y ya en el laboratorio — se centrifugó a 1500 rpm durante 20 min. Se inactivó 30 min. a 56 °C. Se usó puro y diluido al 10%. Se siguió el mismo procedimiento que para los anteriores.

SUSPENSION DE LAS CELULAS MURINAS (53) (54) (55)

Cultivo de células provenientes de cerebro de ratón recién nacido

. Se tomaron dos camadas de entre 8 y 12 rrrn (0-3 días de edad), se los sa-



crificó con éter, se los desinfectó pasándoles un algodón con alcohol por toda la superficie del cuerpo. Luego con tijera y pinza estéril se les extrajo el cerebro.

. Se colocó el material en una caja de Petri y se lavó para eliminar restos de tejido con SF estéril.

.Se lavó 2 ó 3 veces y se colocó en un homogeneizador a 400 rpm ó 500 rpm durante 1 min, de manera de desmenuzar el tejido en pequeñas fracciones de 2-3 mm de espesor.

.Se colocaron estos fragmentos en un matraz de tripsinización lavando con SF.

.Se agregó 50 cc de tripsina previamente entibiada a 37°C, se incubó a 37°C por 10 min con agitación.

.Se dejó sedimentar el material y se descartó la tripsina, remplazándola por igual volumen de tripsina precalentada.

.Se incubó a 37°C durante 30 min con agitación.

.Se dejó sedimentar el material y se recogió el sobrenadante en tubos de centrifuga.

.Se agregó 2 cc de suero de ratón inactivado para anular la acción de la enzima (puesto a 4°C.)

.Se añadió tripsina a los fragmentos de tejidos remanentes e incubó a 37°C durante 20 min con agitación.

.Las células dispersas se recogieron de igual modo que las anteriores en el mismo recipiente.

.Se repitió este procedimiento hasta que los fragmentos se convirtieron en masas blanquecinas de tejido conectivo y células.

.Toda la cosecha se centrifugó 10 min a 1000 rpm en tubos de centrifuga graduados y se resuspendieron las células al 10% en las soluciones correspondientes:

- 1) Solución tampón de fosfatos más el agregado de 1 cc de sacarosa al 8,5% en pH 6, 7, 8 y 9.
- 2) Fluido ascítico puro inactivado (FA inactivado)
- 3) Fluido ascítico inactivado diluido (FA dil.10%)

SUSPENSION DE CELULAS PROVENIENTES DE FETO DE RATON DE 15 DIAS (52) (55) — (45)

.Se sacrificaron dos hembras con éter, que tenían una preñez de 15 días. Se limpió el área de la piel del animal con alcohol 70°. Se operó y extrajeron los fetos con material quirúrgico estéril. Se colocó el material extraído en una caja de Petri y se lavó con SF. Se cortó y separó el material que no

se utilizó (tejido adiposo, hígado, membranas, cabeza de los fetos y patas) —
Se puso el material útil en una nueva caja de Petri y se volvió a lavar con SF.

.Se colocó el material en un recipiente adecuado para realizar la disección de los tejidos. Se agregó una pequeña cantidad de SF para mantenerlos blancos. Se cortó el tejido en pequeños trozos con tijeras y pinzas estériles, — los fragmentos se colocaron con nueva SF en homogeneizador durante 1 min a primera velocidad, el material así desmenuzado se colocó con 50 cc de tripsina a 37°C. Se decantó esta tripsina y se colocó nueva, precalentada a 37°C. Se dejó actuar 1 hora a esa misma temperatura con agitación.

.Se dejó sedimentar el material y se recogió el sobrenadante en un tubo de centrifuga filtrando con gasa estéril. Se agregó 2 cc de suero de ratón inactivado y así se frenó la actividad de la enzima, se mantuvo a 40°C.

.Se añadió tripsina a los fragmentos de tejidos remanentes e incubó a 37°C — durante 20 min con agitación. Las células dispersas se recogieron de igual modo que las anteriores en el mismo recipiente. Se repitió este procedimiento hasta que los fragmentos se convirtieron en masas blanquecinas, frenando siempre la acción de la enzima con suero de ratón. Toda la cosecha se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm y se resuspendieron las células en los medios correspondientes. Se lavaron con los medios por dos veces por centrifugación y se suspendieron en los siguientes medios:

- 1) Solución tamponada de fosfatos pH 6, 7, 8 y 9 más 1 cc de sacarosa al 8,5 %.
- 2) Fluido ascítico de ratón sarcomatoso de 10 días de inoculado, puro, inactivado a 60°C durante 20 min.
- 3) Fluido ascítico de ratón sarcomatoso al 10%.

CULTIVO DE CELULAS DEL SARCOMA #180/TG (46)

El sarcoma #180 TG es un tumor fluido mesenquimatoso que crece en la cavidad peritoneal de ratones blancos, se obtiene por transferencia de células de un animal enfermo a otro por vía IP (0,2 cc). Cuando este tumor crece lo suficiente para extraerlo (aproximadamente entre los 10-14 días) se punza al ratón desinfectando con alcohol 90° la zona a tratar y con material estéril se obtiene la suspensión celular del tumor: 1) con anticoagulante Heparina (10-microlitros por cada cc de suspensión) 2) luego otro tubo sin este producto para que coagule, a temperatura ambiente. En el sobrenadante se encuentra — el FA a usar.

.Las células obtenidas con anticoagulante fueron procesadas por centrifugación a 800-1000 rpm en centrifuga refrigerada a 4°C, 15 min.



Se descartó el sobrenadante, se lavaron tres veces con SF estéril, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min y el último centrifugado se hizo en tubos de centrífuga graduados. Se suspendieron, al 10% en las soluciones correspondientes y se realizó idéntico procedimiento que en los casos anteriores, usando las mismas soluciones, cantidad de rojo fenol, antimicrobiano, TRIS y se inoculó virus SLE cepa Bel, etc colocándose a 4° 24° y 37°C.

Las células se suspendieron en 3 medios distintos:

- 1) Amortiguadores de fosfatos.
- 2) Fluído ascítico (FA) puro inactivado 30 min. a 56°C.
- 3) Buffer de fosfato con el agregado del 10% de fluído ascítico inactivado (FA 10% inact.).

Una vez que se colocaron las células en los medios correspondientes, se extrajo 1 cc de c/tubo c/ 24 horas. Dado que el tipo de células tenía, 3 medios diferentes, a excepción de las células de glándulas mamaria bovina, que tenían 5 medios diferentes, 4 pH's diferentes por cada medio y tipo celular y cada uno de ellos 3 temperaturas, el volúmen de los experimentos eran tales, que se trabajaba con una especie de células animales por vez. El total de muestras era de 36 por cada tipo celular por día.

Este muestreo fue hecho para cada Ag por 10 días consecutivos, lo que significaron 360 Ag potenciales para cada tipo de célula empleado, independientemente de su origen animal.

Para tener una idea: ver tabla I.

Procedimientos a los que se sometió a la muestra diaria

. Centrifugación simple: la mitad de la muestra fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue probado por HA.

. Doble lavado de acetona: la otra mitad de la muestra diaria (0,50 cc) se goteó sobre 20 veces un volúmen en acetona fría, agitando siempre.

. Se dejó sedimentar, se removió la acetona, se agitó, se esperó 10 min y se dejó sedimentar o se centrifugó 10 min a 1500 rpm.

Se volcó la acetona y se repuso igual volúmen, se volvió a dejar sedimentar y se descartó la acetona, y se secó 1-1½ h en bomba de vacío, ya seco, se hidrató con solución tamponada pH 9 a razón de un volúmen 10 veces superior al inicial. Se probó por HA.

HEMOAGLUTINACION EN MICROTECNICA (44)

Técnica: Se colocaron 2 gotas del BAB'S en cada pocillo, el antígeno ya sea puro o tratado con acetona en los pocillos de la primer hilera y se hicieron - 3 diluciones del mismo en las pruebas panorámicas.

En las pruebas finales las diluciones fueron a título final 12 en total.

.En la última policubeta plástica se tituló en Ag HA de SLE control, como se hace clásicamente, con control de glóbulos para los diferentes pH 5, 8 a 7,2 con los GR de ganso al 10% (2,3 cc.de solución tamponada de fosfatos más 0,1 cc.de GR de ganso al 10%).

.Se esperó a que caigan los GR en el control de glóbulos y se leyó la reacción luego de 40-45 min. a temperatura ambiente.

Tabla 2 - EXPERIMENTO EN CELULAS DEL SARCOMA MURINO #180 TG.

	Sol. Amortiguadora	Tubo	pH	T°	días de duración	Muestra
					1-2-3-4-5-6-7-8-9-10	
C E L U L A S S A R C O M A	Solución de fosfatos	1	6	4	una muestra diaria	10
		2	7	4	" " "	10
		3	8	4	" " "	10
		4	9	4	" " "	10
		5	6	24	" " "	10
		6	7	24	" " "	10
		7	8	24	" " "	10
		8	9	24	" " "	10
		9	6	37	" " "	10
		10	7	37	" " "	10
		11	8	37	" " "	10
		12	9	37	" " "	10
M U R I N O # 1 8 0 T G	Fluido ascítico de ratón, puro inactivado 30 min. a 56°C.	13	6	4	una muestra diaria	10
		14	7	4	" " "	10
		15	8	4	" " "	10
		16	9	4	" " "	10
		17	6	24	" " "	10
		18	7	24	" " "	10
		19	8	24	" " "	10
		20	9	24	" " "	10
		21	6	37	" " "	10
		22	7	37	" " "	10
		23	8	37	" " "	10
		24	9	37	" " "	10
	Fluido ascítico de ratón, diluido al 10% inactivado 30 min. a 56°C.	25	6	4	una muestra diaria	10
		26	7	4	" " "	10
		27	8	4	" " "	10
		28	9	4	" " "	10
		29	6	24	" " "	10
		30	7	24	" " "	10
		31	8	24	" " "	10
		32	9	24	" " "	10
		33	6	37	" " "	10
		34	7	37	" " "	10
		35	8	37	" " "	10
		36	9	37	" " "	10

A los antígenos que dieron resultados positivos para hemoaglutinación, ya sean obtenidos por simple centrifugación o los tratados con acetona, fueron enfrentados por inhibición de hemoaglutinación a los sueros experimentales - controles de Bel SLE) y al suero control (SC) grupo B del Centro Mundial de

Referencia, además de usar un suero negativo para SLE (SCN).

INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IH)

TRATAMIENTO DE SUEROS: Los sueros experimentales controles (SEC) y el suero-grupo B de referencia además del suero negativo control (SCN) fueron tratados por doble lavado con 20 volúmenes de acetona fría y secado en bomba de vacío durante 1 hora.

. El polvo fue rehidratado a volúmen 10 veces mayor al inicial con solución tamponada borato-salina a pH 9. Se dejaron hidratar a 4°C durante la noche y al día siguiente fueron absorbidos con el estroma de GR de ganso. Todo este proceso es para:

1°) el tratamiento con acetona los libera de inhibidores inespecíficos de tipo lipídico, lipidoproteico.

2°) la absorción con GR ganso elimina hemoaglutininas inespecíficas (44) (56) - (45)

ANTIGENOS: Fueron probados todos los que mostraron hemoaglutinantes, tanto los tratados como los crudos. Se los probó puros y en caso de tener alto título, se los diluyó 1/10 en BAB'S, dejándolos estabilizar 1 hora antes de cada prueba.

Todo esto se hace para ajustar a un pH óptimo y poder usar de 4 a 8 unidades-HA en las pruebas de IH (44). La última fila de la policubeta se usó de control de glóbulos. Se usaron 3 pH₂ para la titulación, el óptimo y uno por encima y otro por debajo en una diferencia de 0,2 más o menos de pH (Ej.: 6,6; - 6,4 y 6,8)

DETALLE DE LA PRUEBA REALIZADA: Se usaron policubetas plásticas con 96 pocillos con fondo en U, se las dividió en 3 secciones de 4 pocillos por 8 en forma vertical. Se colocó en cada pocillo una gota de BAB'S (0,025 cc.), se colocó el SE experimental correspondiente (suero control + y -) y se hicieron 3 diluciones con microdiluidores (57) de izquierda a derecha, siendo estos 1/20 1/40 y 1/80. En el último pocillo se colocó el suero tratado diluido 1/10 de tal manera que se pudo usar como control de suero.

Se agregó el antígeno en todos los pocillos, en una gota diluida convenientemente. Se incubó la mezcla durante 14 horas a 4°C. Se volvió a titular el antígeno pero ahora no sólo al pH óptimo sino uno por encima y otro por debajo (ej.: óptimo 6,6; se tituló en 6,5; 6,6 y 6,7), al último se agregaron los GR diluidos en las soluciones tamponadas de fosfatos correspondientes para cada pH.

Se leyó la reacción cuando cayeron los controles de los glóbulos en la segunda titulación del Ag, alrededor de 45 min.



PRUEBAS FACULTATIVAS O ALTERNATIVAS: SONICACION Y CROMATOGRAFIA

En caso de haber obtenido antígenos HA que no inhibieran los sueros contra los (antígenos duros), las muestras podrían someterse a sonicación (58) (59) y cromatografía de absorción (60) (61) (62) (63) DEAE G25 en tandas de diferentes molaridades de fosfatos más 0,5% de albúmina bovina en solución boratada de 0,001 a 0,2M de tal manera de purificar la partícula HA.

Si bien podría usarse también cromatografía de afinidad como la descrita por Wofsy y Burr en 1969 (60), en nuestro caso usaremos cromatografía de absorción en Sephadex DEAE en diferentes molaridades de fosfatos de 0,001 a 0,24M más 0,5% de albúmina bovina boratada siguiendo las técnicas clásicas (64)

PRUEBAS QUE SE LLEVARON A CABO CUANDO SE LOGRO UN BUEN ANTIGENO HA

De acuerdo al tipo de células se las volvería a poner en cultivo teniendo en cuenta pH, T° y tiempo.

Ajuste de pH: si la producción de Ag estuviere entre dos pH, por ejemplo 7 y 8, se pondrían los siguientes pH de cultivo: 6,8; 7; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8; 8 y 8,2

Ajuste de tiempo: se haría recolección cada 12 horas y se procesarían inmediatamente las muestras, en total 10 días también.

Temperatura: se usaría la indicada, por ejemplo 37°

TRATAMIENTOS INACTIVANTES:

Cuando se obtuvieron Ag HA se practicaron los siguientes métodos de inactivación:

- 1) Calor: autoclavado 20 min. a 60°C ó 30 min. a 56°C.
- 2) Formol al 40%
- 3) Betapropiolactona
- 4) Hipoclorito de sodio.

"Se usaron estos métodos porque la mayoría de los integrantes de la familia TOGA VIRIDAE no pierden su poder inmunogénico o su reactividad inmunológica cuando son inactivados por estos procedimientos clásicos" (36). Todos los antígenos que permanecieron con igual título o con una dilución menos fueron inoculados por vía IC o IP en ratones de 21 días de edad. Esto se hizo para comprobar si eran infectivos (PRUEBAS DE INFECTIVIDAD).

- 1) Calor: autoclavado (45). Se tomó 1 cc. del Ag que resultó HA, tanto el Ag crudo como el tratado, y se lo autoclavó a 60°C y a 56°C.
- 2) Formol (45) Se usó formol al 40% en solución de agua destilada estéril y una suspensión de virus al 10% también en bpa sin el agregado de albúmina de tal manera de llevar a una concentración final de formalina de 0,2%. Se dejó en heladera a 4°C durante 7 días. Se probó HA.
- 3) Betapropiolactona (45) (65) (66) (67) (68) Existen varios métodos de inac-

tivación con Betapropiolactona, por ejemplo este que sirve para inactivar SLE cuando se inocula a ratones para obtener sueros experimentales.

a) Se colocó en un tubo 4,5 cc. de agua destilada estéril más 0,5cc de Beta—propiolactona al 10%.

b) Se colocó en otro tubo 4,5 cc. de agua destilada estéril más 0,5% de Beta propiolactona al 10% del paso anterior, aquí la dilución fue del 10%.

c) Se colocó en un Erlenmeyer 4,5 cc. de agua destilada estéril más 5 cc. de Betapropiolactona al 1% y aquí la dilución fue del 0,1%.

d) Se tomó el Ag HA y se mezcló partes iguales de este y Betapropiolactona — que quedó al 0,05%.

e) Se colocó esta suspensión a baño maría a 37°C durante 60 min. para inactivación.

f) se dejó enfriar, se probó por HA y si era inocuo.

4) Hipoclorito de sodio: Se tomó hipoclorito de sodio de uso común marca comercial NYC, que viene en bidones de 5 litros declarando en su etiqueta que posee 80 g. de hipoclorito de sodio por dm^3 (80 g/dm^3 de cloro activo) para su uso se debió diluir 1 litro del producto en 39 litros de agua.

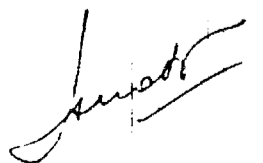
Se tomó del bidón 1cc. y se lo diluyó en 39 cc de agua bidestilada.

Se tomó 1 cc del Ag HA, tanto bruto como tratado y se agregó 1 cc. del hipoclorito de sodio 1/40.

Se centrifugó 10 min a 1500 rpm, se tomó el sobrenadante, se probó por HA, — si bajó el título y si era inocuo.

PRUEBAS DE INFECTIVIDAD

Todos los antígenos que resultaron HA y el título permaneció aún después de la inactivación, fueron inoculados por IC e IP en 5 cajas de 4 ratones cada una (adultos de más de 21 días) puro y en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-9} . Las diluciones se hicieron en solución fisiológica estéril; si la vía fue IP se inocularon 0,3 cc por animal. Si la vía fue IC se inocularon 0,02 cc por animal. Si luego de 21 días el animal sobrevivió se llamo inocuo al-Ag y al virus se lo consideró inactivado.



R E S U L T A D O S

De todos los tipos celulares estudiados, sólo 3 resultaron adecuados para obtener Ag HA para SLE.

- 1) Plaquetas bovinas en suero puro y diluido al 10% a 56°C durante 30 min.
- 2) Cerebro de ratón.
- 3) Células provenientes del Sarcoma #180 TG

1 - Plaquetas bovinas

En suero puro

Se obtuvieron vestigios de HA del primer al tercer día en los tubos cuyos pH era 6,7,8 y 9, y habían sido colocados a 37°C y en suero puro bovino-inactivado. El pH de los HA fue 6,4; 6,6; 6,8, esto ocurrió tanto en los Ag-tratados como en los no tratados.

Al cuarto día hubo HA en tubos a pH 7 a 37°C. Los títulos fueron 1/2 sin-tratar y 1/20 en los tratados y vestigios en los demás tubos a 37°C cuyos pH fueron 6,8 y 9 (Ver Tabla 3)

Al quinto día hubo HA en los Ag provenientes del tubo a pH 7,8 con título 1/4 en los sin tratar y 1/40 en los tratados. La HA ocurrió en los pH 6,4;— 6,6 y 6,8. Seguía habiendo vestigios en los tubos a pH 6 y 9.

Al sexto día hubo HA en los Ag provenientes del tubo a pH 7 y su T° 37°C, con título 1/2 para los no tratados y 1/20 para tratados en los pH 6,4;— 6,6 y 6,8, posteriormente se negativizaron en la producción de Ag.

En suero diluido

Hubo vestigios de HA en todos los tubos mantenidos a 37°C cuyo pH era 6,— 7,8 y 9, desde el primero al sexto día en los pH 6,4;6,6 y 6,8 (Ver Tabla 3)

En todos los casos que la HA se produjo francamente, se probaron estos Ag con los sueros controles de Bel y el suero grupo B de referencia, tanto los-tratados como los no tratados, y se encontró que éstos inhibieron los Ag obtenidos, por lo tanto estábamos en presencia de Bel (SLE).

2 - Cerebro de ratón

Se obtuvieron antígenos HA a partir de células de cerebro suspendidas al 10% en FA puro en pH 7 y 8 a 37°C y a partir del tercer día en que hubo vestigios, tanto en los Ag brutos como en los tratados. Al cuarto día observamos en pH 7 un Ag HA de título 1/2 en bruto y 1/40 en tratado; y en el pH 8 a 37°C hubo Ag HA con título 1/2 en sin tratar y 1/20 en tratados. Ambos Ag-HA en los pH 6,4; 6,6 y 6,8 (Ver Tabla 4)

También se notó que en el pH 8 a 37°C hubo Ag HA con títulos de 1/2 sin-tratar y 1/20 en tratados. Su rango HA es pH 6,4;6,6 y 6,8 (Ver Tabla 4).

Al quinto día en pH 7 y 8 se obtuvieron Ag HA con títulos 1/4 en sin tratar y 1/80 en tratados en pH 7; y 1/2 y 1/20 en pH 8 para sin tratar y tratados respectivamente.

Todos hemoaglutinaron en los pH 6,4; 6,6 y 6,8.

Para el sexto día solamente tuvimos vestigios en el mismo rango de pH. Todos estos antígenos fueron probados contra los sueros controles de SLE cepa-BEL y suero control de referencia, y este lo inhibió.

3 - Células provenientes de Sarcoma #180 TG

Se obtuvieron vestigios desde el segundo día post inoculación en los tubos cuyos pH fueron 7 y 8 a 37°C.

Al tercer día en pH 7 y 8 hubo Ag HA con títulos 1/2 sin tratar y 1/40 — tratados en ambos pH. Al cuarto día en pH 7 y 8 hubo Ag HA 1/4 sin tratar y 1/80 tratados. Al quinto día en pH 7 hubo Ag HA con títulos 1/16 sin tratar y 1/320 tratados, y en pH 8 1/4 sin tratar y 1/80 tratados. Al sexto día en ambos pH (7 y 8) se obtuvieron vestigios.

Estos antígenos fueron HA en el rango de pH 6,4; 6,6 y 6,8 a T° ambiente. Además fueron inhibidos por los sueros controles Bel (SLE) y el suero control grupo B de referencia usando siempre la microtécnica. (Ver Tabla 5).

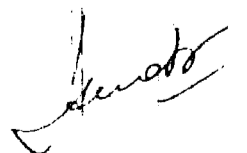


Tabla 3 - RESULTADOS OBTENIDOS EN PLAQUETAS BOVINAS

Plaquetas al 10% en:	Tubo	pH	t°	días										O B S		
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	
Solución tamponada de fosfatos, más - 1 cc. de sacarosa al 8,5%	1	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	2	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	3	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	4	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	5	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	6	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	7	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	8	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	9	6	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	10	7	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	11	8	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	12	9	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
Suero puro inacti- vado	13	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	14	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	15	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	16	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	17	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	18	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	19	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	20	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	21	6	37	v	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/	/	+
	22	7	37	v	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/	/	*
	23	8	37	v	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/	/	*
	24	9	37	v	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/	/	±
Suero inactivado diluido al 10%	25	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	26	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	27	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	28	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	29	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	30	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	31	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	32	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	33	6	37	v	v			v	v	v	/	/	/	/	/	±
	34	7	37	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/	/	/	±
	35	8	37	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/	/	/	±
	36	9	37	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/	/	/	±

* 1/20; 1/40; 1/20 títulos en antígenos tratados
1/4; 1/2 títulos en antígenos no tratados

Tabla 4 - RESULTADOS OBTENIDOS EN CELULAS DE CEREBRO DE RATON LACTANTE.

Cerebro ratón 10%	Tubo	pH	T°	0	1	2	3	días		6	7	8	9	10	Obs
								4	5						
Solución tamponada de fosfatos más lcc. de Sacarosa al 8.5%	1	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	2	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	3	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	4	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	5	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	6	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	7	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	8	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	9	6	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	10	7	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	11	8	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	12	9	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
Fluido ascítico puro inactivado de Sarcoma 180 TG	13	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	14	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	15	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	16	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	17	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	18	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	19	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	20	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	21	6	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	22	7	37	/	/	/	v	40	80	v	/	/	/	/	*
	23	8	37	/	/	/	v	20	20	v	/	/	/	/	*
	24	9	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
Fluido ascítico diluido al 10% de Sarcoma 180 TG	25	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	26	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	27	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	28	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	29	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	30	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	31	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	32	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	33	6	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	34	7	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	35	8	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	36	9	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-

* 1/40 y 1/80; 1/20 y 1/20 títulos en Ag tratados.

* 1/2 y 1/4; 1/2 y 1/2 títulos en Ag no tratados (crudo)

sueto

Tabla 5 RESULTADOS OBTENIDOS EN CELULAS DEL SARCOMA MURINO # 180 TG.

Células Sarcoma 180 en:	Tubo	pH	T°	días											O B S			
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
Solución tamponada de fosfatos más — 1 cc. de sacarosa al 8,5%	1	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	2	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	3	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	4	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	5	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	6	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	7	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	8	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	9	6	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	10	7	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	11	8	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	12	9	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
Fluido ascítico puro inactivado	13	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	14	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	15	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	16	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	17	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	18	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	19	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	20	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	21	6	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	22	7	37	/	/	v	40 2	80 4	320 16	v	/	/	/	/	/	/	/	*
	23	8	37	/	/	v	40 2	80 4	80 4	v	/	/	/	/	/	/	/	*
	24	9	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
Fluido ascítico inactivado diluido al 10%	25	6	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	26	7	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	27	8	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	28	9	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	29	6	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	30	7	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	31	8	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	32	9	24	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	33	6	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	34	7	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	35	8	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	36	9	37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-

(*) 1/40, 1/80, 1/320, etc. títulos en Ag tratados

(*) 1/2, 1/4, 1/16, etc. títulos en Ag no tratados (bruto)

EXPERIMENTO FINAL PARA OBTENCION DE ANTIGENO HEMOAGLUTINANTE

De los tres experimentos se eligió al Sarcoma 180 como fuente productora de Ag HA porque es el que mayor título presentó. Para ello se repitió el experimento pero como los mayores títulos del Ag fueron entre pH 7 y 8, se hizo ajuste de pH y de tiempo. Se cultivó todo a 37°C y en las mismas condiciones, los pH usados fueron 6,8; 7; 7,2* 7,4; 7,6; 7,8; 8 y 8,2.

Tabla 6

Células del Sarcoma 180 TG más Bel (SLE) en fluido ascítico de ratón sarcomatoso

Tubo	pH	T°	observaciones cada 12 horas															
			0	1	$\frac{1}{2}$	2	$\frac{1}{2}$	3	$\frac{1}{2}$	4	$\frac{1}{2}$	5	$\frac{1}{2}$	6	$\frac{1}{2}$	7	$\frac{1}{2}$	8
1	6,8	37	/	/	/	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/
2	7,0	37	/	/	/	v	v	40 2	v	80 4	v	320 16	v	v	v	/	/	/
3	7,2	37	/	/	/	v	40 2	80 4	160 8	320 16	640 32	1280 64	2560 64	5120 128	v	v	v	v
4	7,4	37	/	/	/	v	20 2	v	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/
5	7,6	37	/	/	/	v	20 2	v	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/
6	7,8	37	/	/	/	v	20 2	v	v	v	v	v	v	v	v	/	/	/
7	8,0	37	/	/	/	v	40 2	40 2	40 2	80 4	80 4	80 4	20 2	v	v	/	/	/
8	8,2	37	/	/	/	v	40 2	80 4	80 4	80 4	v	v	v	v	v	/	/	/

Las observaciones cada doce horas se hicieron hasta el día 10, pero como a partir del día 8 no hubo ningún dato positivo no se tuvieron en cuenta en este esquema.

Observándolo, vemos que el mejor antígeno HA se obtuvo en el día 6 a partir del tubo en pH 7,2 a 37°C cuyo título fue 128 en Ag no tratado y 5120 en tratado, que fue inhibido fácilmente por los sueros experimentales de referencia con resultados esperados en controles.

Pruebas alternativas

Dado que se obtuvieron antígenos fáciles de inhibir no fue necesario realizar sonicación ni cromatografía, pero sí fue necesario someter este Ag a pruebas de inactivación e infectividad.

1. Resultados de las pruebas de inactivación

Se usaron las pruebas que se detallan a continuación con el Ag en título de 1:5120 obtenido en Sarcoma 180 a pH 7,2, 37°C en el sexto día.

Tabla 7

ANALISIS DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INACTIVACION

Pruebas de inactivación	Antígeno HA sin tratar	Ag HA tratado
Autoclavado 20 min. 60°C	pierde título HA	pierde título HA
" 30 min. 56°C	" " "	" " "
Formol 40%	" " "	reduce título 1/64
Hipoclorito de sodio	" " "	pierde título HA
Betapropiolactona	" " "	conserva título 5120

De acuerdo a este cuadró podemos decir que los antígenos crudos se desactivaron hasta perder su título con cualquiera de las pruebas usadas.

Respecto a los Ag HA que han sido tratados con doble lavado de acetona y — posteriormente sometidos a inactivación, el Ag resultante luego de la inactivación con formol al 40% redujo el título de 5120 a 64. El único inactivante que mantuvo el título fue la solución de Betapropiolactona.

2. Resultados de los ensayos de infectividad

Se practicaron sólo con los Ag que conservaron su poder HA.

Para el antígeno HA tratado con acetona, inactivado con formol al 40% título 1/64: se inocularon 5 cajas de ratones adultos con las diluciones en SF:puro 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , 0,3 cc. por vía IP. Se esperaron 21 días entre cada experimento, se añadió una caja con 4 ratones como control de colonia y se salvaron todos los animales. Cuando la vía fue 10^{-4} dosis de 0,02 cc.

Para el Ag HA de Sarcoma 180 TG Bel (SLE) tratado con acetona e inactivado con solución de betapropiolactona, al igual que en el ensayo anterior se inocularon 5 cajas de 4 ratones adultos cada una, con las siguientes diluciones en SF estéril: puro, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , y la dosis fue 0,02 cc. por vía IC. Las otras 5 cajas fueron inoculadas por vía IP, la dosis fue 0,3 cc. en las mismas diluciones. Se esperó 21 días, se añadió una caja de 4 ratones — sin inóculo como control de colonia y se salvaron todos los animales.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE VIABILIDAD CELULAR

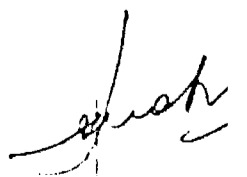
Todas las células usadas de diferente origen, fueron probadas por método del Azul Tripán. Se partió con un 100% de viabilidad en el día 1° del experimento y cuando las células dejaron de producir antígeno se tuvo 0% de viabilidad.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS REALIZADAS A LOS ANIMALES DONANTES DE CELULAS

Todos los animales donantes de células fueron serológicamente negativos para

Handwritten signature

el virus SLE cepa Bel. Las técnicas usadas fueron IH, FC y NT.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. H. S.', located in the bottom right corner of the page.

DISCUSION

El método que aquí se presenta, sencillo y de aplicación práctica abre la posibilidad de permitir el estudio de la importancia de este virus en patología humana y animal. A través de encuestas serológicas ya ha sido demostrado que SLE infecta tanto al hombre como a animales domésticos (2) (22) (12)(21) y que la respuesta inmune del huésped es a base de la inmuno globulina IgM γ 6 en este y otros arbovirus (69) (70) (71) (72), sobre morbilidad y mortalidad producida en las distintas especies y en los diferentes grupos etarios los mismos estudios no nos dicen nada.

Sabemos que SLE es el virus que está ocupando el vacío dejado por poliomielitis en lo que a enfermedades con secuelas neurológicas se refiere, en la parte norte de nuestro continente; pensamos que en América muchos de los síndromes de etiología desconocida como diarreas estivales y fiebre sistémica - (17) (16) (19) (18) (20), pueden ser producidas por este virus que ahora podría contar con A_p 's de pruebas fáciles de uso diagnóstico.

El uso del Sarcoma #180 para producir antígeno ya había sido descrito, pero en ratones sarcomatosos que debían ser observados por varios días después de inoculados (46). Este trabajo evita el manipuleo de ratones sarcomatosos ya infectados con SLE y además describe la forma simple de inactivar el virus vivo residual de los antígenos.

La gran variedad de tipos de células usadas y las diferentes temperaturas y pH permitieron además encontrar cuales son las células susceptibles para reproducir el virus de SLE, pues a pesar de que no fueron hechas titulaciones del virus para demostrar su reproducción en cantidad suficiente, se pueden obtener hemoaglutininas.

En las condiciones usadas este virus parece no reproducir en glóbulos rojos, sabemos que en animales algunos arbovirus como Fiebre de Garrapatas del Colorado, perteneciente a la familia Reoviridae reproduce en ellos (73) y también sabemos que otros arbovirus como Encefalitis Venezolana son capaces de reproducir en cultivos de monocitos (74) (75) y el virus Dengue, no solo reproduce en monocitos sino que también lo hace en macrófagos peritoneales (76) (77) (78) (79). El hecho de que algunos Flavivirus como los productores de encefalitis centroeuropeas se localizan en glándulas mamarias de cabras, vacas y ovejas infectadas y se eliminan por leche (1), hizo que se incluyeran células de glándula mamaria en la investigación, aunque evidentemente con este virus y en estas condiciones experimentales no se obtuvieron hemoaglutininas lo que no excluye la posibilidad de reproducción viral.

La reproducción del virus en plaquetas bovinas nos indica que este virus es capaz de reproducir en esa población celular lo que si pasara también en — plaquetas humanas explicaría la plaquetopenia de los pacientes de Chacabuco de los cuales se aisló el virus en Argentina (15) (14).

El virus tampoco produjo hemoaglutininas en células salivares, glóbulos rojos y glóbulos blancos bovinos y no lo hizo en células de fetos murinos privados de cerebros, patas y manos.

El período medio de obtención de antígenos hemoaglutinantes en células sarcomatosas es el mismo que se observó en un estudio anterior (46), en donde se inoculaban los ratones sarcomatosos directamente en el tumor ascítico, lo — que hizo suponer que se trataba del virus, antes de realizar la IH, prueba — que nos dio la certificación final de la identidad del antígeno buscado.

El tratamiento del fluido de la suspensión de células sarcomatosas infectadas con SLE realizado con acetona, no solo aumentó el título HA en 20 a 40 — veces, sino que a la vez lo hizo estable a la inactivación del virus con Beta propiolactona en las condiciones del experimento, estabilidad que no tuvo el mismo antígeno crudo antes de su tratamiento con acetona. Quizás variando — las combinaciones del experimento, para realizar la inactivación, sea en — frío o a otros pH's, se hubiera podido conservar la HA del antígeno crudo pero esto escaparía a este plan que poseía un objetivo determinado y no deseaba — ramificarse en una serie infinita de experimentos.

Creemos que la información positiva de todo este trabajo no está solo en el procedimiento para obtener el antígeno que se presenta como final, de Sarcoma # 180 TG, infectado cosechado al sexto día y tratado con el método de la — Sucrosa-Acetona, inactivado con betapropiolactona, sino también en mostrar — las otras fuentes de producción de Ags hemoaglutinantes: suspensión de células de cerebro de ratón y de plaquetas bovinas, elementos que en determinadas circunstancias y lugares podrían ser más fáciles de conseguir, que los tumores ascíticos del Sarcoma # 180.

Pero con este Ag HA obtenido de este tumor es con el que mejor se cumplen — nuestros objetivos de tener un antígeno ESPECIFICO, ESTABLE, SENSIBLE Y DE POCO RIESGO para el trabajador de laboratorio.

Se le adiciona a esto, su BAJO COSTO DE PRODUCCION.

En trabajos posteriores, tendría que estudiarse, cual es el límite de viabilidad y concentración de células necesarias para sintetizar Ags HA de virus de San Luis, además cuales son los factores condicionantes de los medios usados para suspender las células ya que estas consideraciones no estuvieron —

dentro de nuestros objetivos de proyecto.

Con toda esta información creemos colaborar en estos tiempos de crisis económicas en nuestro país, con un procedimiento simple para obtener antígenos que nos permitan estudiar nuestras enfermedades endémicas a nivel nacional.

A handwritten signature in dark ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to be a name, possibly "J. Pérez" or similar, though it is difficult to decipher precisely.

C O N C L U S I O N E S

De los once tipos de células usadas en suspensión en diferentes pH y temperaturas hubieron, tres que resultaron positivas para la producción de antígeno hemoaglutinante de virus SLE, células de Sarcoma 180 TC, plaquetas bovinas y células nerviosas murinas. La única temperatura que dio positiva de las tres consideradas fue de 37°C y el pH óptimo fue cercano a 7.

El mejor en título y además sensible en función de ser inhibido por sueros específicos resultó ser el obtenido con células de Sarcoma 180 suspendidas en su propio fluido. Este antígeno logró un título hemoaglutinante de 1:5120, cuando se cultivaron las células a pH 7,2 y los mejores títulos fueron observados entre el 4° y el 6° día.

Otras dos clases de células: plaquetas bovinas y células de cerebro de ratón recién nacido fueron también positivas en los mismos pH , pero con menor título y estabilidad.

Todos los antígenos crudos que resultaron negativos por hemoaglutinación también lo fueron cuando se los trató con acetona, mientras que todos los antígenos crudos que resultaron positivos por hemoaglutinación mejoraron notablemente su título cuando se los trató con acetona.

Otras 8 clases de células: glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas equinas, glóbulos rojos y blancos bovinos, células de glándulas mamaria de bovino adulto y salivares de feto bovino, células murinas fetales (sin cerebro), fueron todas negativas.

El antígeno obtenido de Sarcoma 180 TC fue inactivado con betapropiolactona sin cambios en su título hemoaglutinante y con pérdida de su infectividad, resultando de esto un buen antígeno inactivado que puede ser usado para el diagnóstico clínico, en laboratorios comunes sin riesgo de infección para los trabajadores o el ambiente.

Debemos adicionar otra cualidad más a este antígeno hemoaglutinante del virus SLE, que es sumamente barato a comparación de los Ag posibles de obtener a partir de los cultivos primarios y de líneas establecidas de células de artrópodos (80)

ABREVIATURAS USADAS EN ESTA TESIS

IC: vía intracerebral
IP: vía intraperitoneal
UFP: unidades formadores de placas
SLE: virus encefalitis de San Luis
CT: cultivo de tejido
BHK: línea celular continua de riñón de criceto lactante
HeLa: línea celular continua tumoral
Ag: antígeno
HA: hemoaglutinación/ hemoaglutinante
GR: glóbulo rojo
GB: glóbulo blanco
LCR: líquido céfaloraquídeo
rrn: ratón recién nacido
cri: cerebro de ratón infectado
ACP: acción citopatógena
IH: inhibición de la hemoaglutinación
FC: fijación de complemento
NT: neutralización
SEC: suero experimental control
SCN: suero control negativo
: número
SF: solución fisiológica
M: molar
rpm: revoluciones por minuto;
min: minutos
BAB'S: solución boratada a pH 9 con el agregado de albúmina bovina al 0,4%
UI: unidades internacionales
 μ g: microgramos
 μ l: microlitro
T°: temperatura
cc: centímetro cúbico
FA: fluido ascítico
d: días
%: tanto por ciento
bpa: amortiguador de fosfatos más el agregado de albúmina bovina al 0,75%

SOLUCIONES EMPLEADAS EN ESTA TESIS

1) Solución fisiológica para el lavado de las células a suspender:

ClNa anhidro 9 g.
 Agua destilada 1000 cc.

2) Soluciones de fosfatos pH 6, 7, 8 y 9 (VAD= soluciones tamponadas)

2.0M de fosfatos de sodio dibásico

Na_2HPO_4 283,96 g.
 Agua destilada csp. 1000 cc.

2.0M de fosfatos de sodio monobásico

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 276,02 g.
 Agua destilada csp. 1000 cc.

1.5M de Cloruro de Sodio

ClNa 87,67 g.
 Agua destilada csp. 1000 cc.

0.15M NaCl - 0.2M Na_2HPO_4

1.5M NaCl 100 cc.
 2M Na_2HPO_4 100 cc.
 Agua destilada 800 cc.

0.15M NaCl - 0.2M NaH_2PO_4

1.5M NaCl 100 cc.
 2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 cc.
 Agua destilada 800 cc.

Soluciones tamponadas de fosfatos para llevar a pH deseado (VAD 5)

Solución tamponadas Fosfatos para pH	0.15M NaCl 0.2M Na_2HPO_4	0.15M NaCl - 0.2M NaH_2PO_4
5,75	en cc. 3.	en cc. 97.
6,0	12,5	87,5
6,2	22.	78.
6,4	32.	68.
6,6	45.	55.
6,8	55.	45.
7,0	64.	36.
7,2	72.	28.
7,4	79.	21.

3) Solución de Rojo fenol 0,15%

Rojo fenol 0,5 g.
 NaOH 1/60M 100 cc.

La solución se filtra (con papel de filtro). Se fracciona en tubos de tapa a rosca: 10 cc. por tubo.
 Se autoclava para esterilizar.

4) Solución de Penicilina-Streptomicina-Micostatina

Penicilina 1000000 UI Micostatina 5000 UI 0,5cc.
 Streptomicina 1 g. Agua bidestilada 100 cc.

Genet

Agua bisdestilada 100 cc.

Esta solución contiene 10000 UI de Penicilina y 10000 g de Streptomina — por cc. Para agregar a las soluciones lcc. de cada 100 cc.

5) Solución de TRIS

1.0M pH 9 Hidroximetil-aminometano (SIGMA.PM= 121,136) pH 7 a 9.

TRISMA ClH 1,52 g.

TRIS Base 10,94 g.

Agua destilada esp. 100 cc.

(Puede haber otras combinaciones)

6) Soluciones de anticoagulante Alsever y Heparina, que se usaron para obtener la sangre a emplear

Solución Alsever

Dextrosa 20,5 g.

ClNa 4,2 g.

Acido cítrico 0,55 g.

Citrato de Na 8 g.

Agua destilada 1000 cc.

Esterilizar en autoclave y guardar a 4 °C.

Solución Heparina

Liquemine de uso comercial

7) Solución de anticoagulante ACD donde se recogen los GR de ganso

ACD

Citrato de Na 11,25 g.

Acido Cítrico 4 g.

Dextrosa 11 g.

Agua destilada 500 cc.

8) Solución de DGV donde se suspenden los GR de ganso al 10% para usar. Solución de Merthiolate que se agrega a los GR de ganso

Veronal (Barbital) 0,58g.

Gelatina 0,60g.

Veronal sódico 0,38g.

CLNa anhidro 0,02g.

MgSO₄·7H₂O 0,12g.

NACl 8,5 g.

Dextrosa 10 g.

Agua destilada 1000 cc.

Merthiolate

Merthiolato 100 mg.

Solución Fisio-

lógica 10 mg.

9) Soluciones tampones de fosfatos donde se suspenden los GR de ganso para la HA, ph 5,8 a 7,2

Agua bisdestilada 100 cc.

Esta solución contiene 10000 UI de Penicilina y 10000 g de Streptomina — por cc. Para agregar a las soluciones lcc. de cada 100 cc.

5) Solución de TRIS

1.0M pH 9 Hidroximetil-aminometano (SIGMA.PM= 121,136) pH 7 a 9.

TRISMA ClH 1,52 g.

TRIS Base 10,94 g.

Agua destilada csp. 100 cc.

(Puede haber otras combinaciones)

6) Soluciones de anticoagulante Alsever y Heparina, que se usaron para obtener la sangre a emplear

Solución Alsever

Dextrosa 20,5 g.

ClNa 4,2 g.

Acido cítrico 0,55 g.

Citrato de Na 8 g.

Agua destilada 1000 cc.

Esterilizar en autoclave y guardar a 4 °C.

Solución Heparina

Liquemine de uso comercial

7) Solución de anticoagulante ACD donde se recogen los GR de ganso

ACD

Citrato de Na 11,25 g.

Acido Cítrico 4 g.

Dextrosa 11 g.

Agua destilada 500 cc.

8) Solución de DGV donde se suspenden los GR de ganso al 10% para usar. Solución de Merthiolate que se agrega a los GR de ganso

Veronal (Barbital) 0,58g.

Gelatina 0,60g.

Veronal sódico 0,38g.

CLNa anhidro 0,02g.

MgSO₄ 7H₂O 0,12g.

NACl 8,5 g.

Dextrosa 10 g.

Agua destilada 1000 cc.

Merthiolate

Merthiolato 100 mg.

Solución Fisio-

lógica 10 mg.

9) Soluciones tampones de fosfatos donde se suspenden los GR de ganso para la HA, ph 5,8 a 7,2

13) Solución 0,4% albúmina bovina boratada pH 9 (= RAB'S)

4% albúmina bovina pH 9 en solución 100 cc.
 Solución boratada salina pH 9 900 cc.

14) Solución bpa 0,75% albúmina bovina para inocular el virus (pH 7,2)

Albúmina bovina fracción V 7,5 g. Solución albúmina bovina
 Solución salina de fosfatos 100 cc. 7,5% pH 7,2

Se filtra por Millipore y para llevarla a 0,75% se diluyen:

1 parte de la descripta en
 9 partes de solución salina de fosfatos

15) Solución amortiguadora (tamponada) de acetato/acético pH 3,6-5,6

- a) Acido acético 0,2M: disolver Acido acético Glacial 11,5 cc.
 en agua destilada, y llevar: agua destilada 1000 cc.
- b) Acetato de sodio 0,2M: disolver Acetato de Na $3H_2O$ 27,2 g.
 en agua destilada y llevar a: agua destilada 1000 cc.

En el siguiente cuadro se muestran las combinaciones de ambas soluciones:

<u>Solución a)</u>	<u>Solución b)</u>	<u>Agua destilada</u>	<u>pH</u>
en cc. 463	en cc. 37	en cc. 500	3,6
440	60	500	3,8
410	90	500	4,0
368	132	500	4,2
305	195	500	4,4
255	245	500	4,6
200	300	500	4,8
148	352	500	5,0
105	395	500	5,2
88	412	500	5,4
48	452	500	5,6

Se usa para llevar a pH 6, al suero puro de cualquier especie y el FA puro: 1 gota.

Todas las soluciones luego de preparadas, y antes de usarse, fueron filtradas: a través de 200nm. el suero inactivado, y la tripsina y demás soluciones en 100 nm.

Solución de Azul Tripán: Azul Tripán 1/1000, en solución salina fisiológica.

RESUMEN

Título: Investigación de métodos para la obtención de Antígeno hemoaglutinante "in vitro" del virus Encefalitis de San Luis

Un Ag HA para el virus SLE, se obtuvo en células suspendidas "in vitro", incubadas a 37°C a pH 7 a 8 con un óptimo de 7,2. La fuente celular fue células provenientes del Sarcoma 180 TG, cosechado de ratones y resuspendidas en el mismo fluido ascítico inactivado a 56°C durante 30 minutos.

El HA se obtuvo del 3° al 6° día de inoculadas las células con un óptimo entre el 5° y 6° día.

Otras fuentes de células, plaquetas bovinas y células de cerebro de ratón — fueron también positivas a estos pHs y T° pero dieron títulos más bajos.

Las restantes fuentes de células resultaron negativas.

S U M M A R Y

Title: "Search for "in vitro" hemoagglutinating antigens for Saint Louis -
Encephalitis virus"

A hemagglutinating antigen for SLE virus was obtained in cells suspended -
"in vitro" incubated at 37°C at pH 7,0 to 8,0 with the optimal of 7,2. The
source of cells was Sarcoma 180 TG harvested from mice, and resuspended in
the same ascitic fluid after inactivation at 56°C during 30 minutes.

HA was recorded from the third to sixth day after seeding with the optimal
between fifth and sixth day.

Other two sources of cells: bovine platelets and mouse brain cells were --
also positive at these pH's and temperature but lower titlers were observed
Other eight sources of cells were all negatives.

Handwritten signature

BIBLIOGRAFIA

- (1) - METTLER N.E. "Familia Togaviridae". Cuaderno de Virología Nro.5. Publicación de la UNCPBA, Libro 65 Páginas. Tandil 1980
- (2) - METTLER N.E., PARODI, A., CASSALS J. "Survey for antibodies against arthropod borne viruses in man in Argentina". Amer. J. Trop. Med. Hyg. Vol.12 Nro. 4, págs.653-656, 1963.
- (3) - SABATTINI M.S., SHOPE R.E. and VANELLA J.M. "Serological survey for arboviruses in Córdoba Province, Argentina" Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol.14 Nro.6 págs. 1073-1078, 1965.
- (4) - EVANS, A.S., CASSALS J., OPTON E.M., BORMAN E.K., LEVENE L. and CUADRADO R. A nationwide survey of Argentine military recruit 1965-1966. I Description of sample and antibody patterns with arboviruses, polioviruses respiratory viruses, tetanus and trepanematosis. Am. J. Epidemiol. 93: 111-121 1971.
- (5) - METTLER N.E., FERNANDEZ A.S., SCHETTINO A.M., DI SANTO M., PARDO D. "Flavivirus responsables de infecciones en humanos en Tandil, Pcia. Buenos Aires" - Actas del I Congreso Argentino de Virología pág.172 - Bs.As. Agosto 1983.
- (6) - METTLER N.E., FERNANDEZ, A.S., SCHETTINO A., DI SANTO M., PARDO D. "Infecciones humanas por Flavivirus en Tandil" Rev. de la Asoc. Méd. Arg. Vol.96 - Nro.4 págs. 105-107 1983.
- (7) - SCHETTINO A.M., METTLER N.E. "Encefalitis de San Luis. Presencia de anticuerpos inhibidores en bovinos de la Pcia. de Buenos Aires". Resúmenes del III Congreso Argentino de Cs. Veterinarias, 1981.
- (8) - METTLER N.E., FERNANDEZ A.S., DISANTO M., PARDO D. "Métodos de identificación de flavivirus endémicos que afectan poblaciones humanas: uso de bovinos" Actas del IV Congreso de Inmunología Bs.As. Junio 1984.
- (9) - SCHETTINO, A.M., METTLER N.E. "Investigación de bovinos como animales centinelas para la detección de SLE" Actas del IV Congreso Argentino de Cs. Veterinarias, pág. 283, La Plata Noviembre 1982.
- (10) - METTLER N.E., SCHETTINO A.M. "Virus SLE: presencia de anticuerpos en equinos del sudeste de la Pcia. de Bs.As." Gaceta Veterinaria Tomo XLIV pág.531-539, Julio 1982
- (11) - SCHETTINO, A.M. "Virus SLE: búsqueda de anticuerpos en equinos de Tandil y sus alrededores" Tesis doctoral UNLP, Sept. 1981
- (12) - METTLER N.E., FERNANDEZ A.S., DISANTO M., PARDO D. "Flavivirus que interesan a equinos de Tandil y alrededores" Actas del I Congreso Internacional de Cs Veterinarias, La Plata 1983.
- (13) - HOSFALL and TAMM "Viral and Rickettsial Infection of man" CLARKE D.H. and

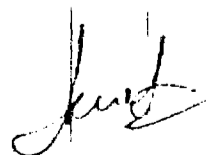
- CASALS J. "Arbovirus group B" Chapter 27, págs. 606-658, 4th Edition, 1967.
- (14) - METTLER N.E. "Fiebre Hemorrágica Argentina: conocimientos actuales Publicación Científica Nro.183 de la OPS, 51 págs. 1970.
- (15) METTLER N.E. and CASALS J. "Isolation of St.Louis Encephalitis virus from man in Argentina" Acta Viroológica vol.156 págs. 148-154, 1971
- (16) METTLER N.E. "Estudios realizados con los sueros de la Epidemia de Fiebre Hemorrágica Argentina del año 1963 que no presentaron conversión serológica — para virus Junín" Actas II Jornadas Entoepidemiológicas Salta 2-9 Octubre 1965 pág. 10. Revista Medicina Vol. 26 Nro.3 págs. 161-169, Mayo-Junio 1966.
- (17) METTLER N.E. "Dosaje de anticuerpos contra arbovirus grupos A y B en niños diarreicos de la ciudad de Buenos Aires y alrededores" Actas II Jornadas Entoepidemiológicas Salta 2-9 Octubre 1965. Revista Medicina 26 Nro.2, págs. 98-102 Abril Mayo 1966.
- (18) METTLER N.E., ESCARDO F. "Encefalitis. Investigación serológica. Replanteo clínico". Actas I Congreso Nacional de Pediatría de Uruguay, 28 al 31 de Mayo de 1965. Actas II Jornadas Entoepidemiológicas, Salta, Vol.3 págs. 257-260 — 2-9 Octubre 1965.
- (19) METTLER N.E., ESCARDO F. "Encefalitis: Investigación serológica. Replanteo clínico y correlación etiológica de la diarrea infantil". Boletín de la Cátedra de Pediatría del Hospital de Niños Nro.5, págs.34-38, 1966
- (20) CHAROSKY L., BALDAZARI E., KOREN F., METTLER N., LOIZAGA C. "Síndrome encefalítico a posible etiología por virus SLE" Revista de la Asoc. Médica Argentina Vol.52 Nro.7, págs. 267-269, Julio 1968.
- (21) BETINOTTI, C.M. "Incidencia de anticuerpos fijadores de complemento para virus de encefalitis, cuatro especies diferentes, en las poblaciones en general, de Córdoba" La Semana Médica Nro.110, (2) págs. 393-399, 1957
- (22) RUIZ HOLGADO A.P., RAYA J.M., SABATTINI M.S., NADER O.R.M., CASTAGNARO N. R.de "Encuesta sobre arbovirus realizada en animales de la Pcia.de Tucumán, Argentina" Bol.OPS Nro.63, págs. 303-309, 1967.
- (23) MC.HAMMON W.D., CARLE H.N. and IZUMI E.M. "Infection of horses with St. Louis Encephalitis virus. Experimental and Natural" Proc.Soc.Biol.Méd.Nro.49- págs.335-340, 1942
- (24) U.S.Department of Health and Human Services.CDC "Arbovirus surveillance reference and research. Ann Report. Center of Infectious Diseases Division of Vector Borne Viral Diseases and World Health Organization Center for arbovirus Reference and Research Fort Collins, Colorado 80522, 1982
- (25) U.S.Department of Health and Human Services CDC "Arbovirus surveillance-reference and research. Ann Report. Center of Infectious Diseases Division of

Vector Borne Viral Diseases and World Health Organization Center for Arbovirus Reference and Research Fort Collins, Colorado 80522, 1983.

- (26) THE COMMITTEE ON PROGRAMS FOR THE PREVENTION OF MOSQUITO-BORNE ENCEPHALITIS Arboviral encephalitides in Ontario with special reference to Saint Louis Encephalitis. Canadá -Ontario Ministry of Health. Ms.MAHDI; L.Spence; J.M.JOSHUA - (Ed.) 1979-1982.
- (27) TRENT D.W., GRANT J.A., VORNDAM A.V., and MONATH T.P. "Biochemical heterogeneity among St. Louis Encephalitis virus isolated of different geographic — origen" Virology 114, págs. 319-332, 1981
- (28) TRENT D.W., MONATH T.P., BROWN G., VORNDAM A.V., CROPP B., KEMP G. "Variedades entre cepas del virus de San Luis: bases para una clasificación genética, patogenética y epidemiológica" en Variación Genética de los Virus. Annals of — the New York Academy of Sciences. Vol.354 págs. 219-321, Noviembre 1980
- (29) BROWN G.S., MONATH T.P., KEMP G.E., KIRSCHNER J.H., and KIRCH L.J. "Geographic variation among Sr.Louis Encephalitis virus strains in the viremic-responses of avian host" Am.J.Trop.Méd. & Hyg. Vol.29 págs. 1411-1419, 1980.
- (30) KAPLAN and KOVELESKY "Saint Louis Encephalitis with particular involve— ment of brain sistem".Arch.zNeurol. 35 (1), págs. 45-46. Dep.Pediat.Neurol.Good Samaritan Hosp. 1033 EM Mc.DowellRd.Phoenix, Arizona 85006 USA 1978
- (31)CASALS J. "The arthropod-borne group of animal viruses" Trans.of the New — York Academy of Sciences. Ser. II. Vol.19 Nro.3 págs. 219-235. Enero 1954.
- (32) BERGE T.O. "International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 2nd.edition. Publication sponsoned by the National Institute of Alergy and Infections Diseases National of Health. Bethesda, Maryland and the Center for Diseases Control (CDC) Atlanta, Georgia. Pág.619, 1970
- (33) BUCKLEY S. "Susceptibility of the Aedes albopictus and Aedes aegypti cell-lines to infection with arbovirus" Proc.of the Soc.Experimental Biology and Medicine Vol.131, págs. 625-630, 1969
- (34) METTLER N.E., BUCKLEY S. "Attempts to cultivate Junín and Portillo viruses- in Sin g's cell lines" Proc.III International Colloquium on invertebrate tissue-culture in Smolonice, Checoslovaquia, 22-25 Junio de 1963.
- (35) NAEME C.W., and TRENT D.W. "Identificación del virus de San Luis como RNA" Amer.Journal Trop.Med.& Hyg. Vol. 7 Nro.5, págs.535-545, 1978
- (36) DAVIES-DULBECO EISEN GINSBERGWOOD -Trat.de Microbiol.TOGAVIRUS Y OTROS VI RUS TRANSMITIDOS POR ARTROPODOS 2° ED. Cáp.60, págs. 1402-1416,1980
- (37) MITCHELL, MONATH and SABATTINI "Transmission of St.Louis Encephalitis vi-rus from Argentina by mosquitoes of the Culex pipiens complex (Diptera Culici dae)"J.Med.Entomol.Vol.17 Nro.3 págs. 282-285, 1975

- (38) BOND J., FLORENCE O., LEWIS J., JENNINGS V. and MC LEOD I.
 "Transovarian transmission of hemagglutination inhibition antibody to St. Louis Encephalitis virus in chickens" *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 14 (6) págs. 1085-1089 - 1975
- (39) KISSLING R.E. "Growth of several arthropod borne viruses in tissue culture" *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 96, págs. 290-294, 1957
- (40) HENDERSON J.R. "Applications of 1st. cell cultures in the study of animal viruses. I Variation in horses responses to infections by certain arthropod borne viruses" *Yale J. Biol. Med.* Nro. 33, págs. 310-358, 1961
- (41) SCHULZE and SXHLEISENGER R.W. "Assay of Dengue and other group B arthropod borne viruses under methyl-cellulose overlay media" *Virology* 19, págs. 40-48, 1963
- (42) BUCKLEY S. "Applicatibility of HeLa (Gary) strain of human malignant epithelial cells to the propagation of arboviruses" *Proceeding of the Society for Exp. Biol. and Med.* Vol. 116, págs. 354-358, 1964
- (43) WRIGHT et al. "Cultivo del virus Encefalitis de San Luis en células BHK-21" *Journal of Viriology* Vol. 24, págs. 651-661, 1977.
- (44) CLARKE D.H., and CASALS J. "Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod borne viruses" *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 7 - Nro 5, págs. 561-573, 1958
- (45) LENETTE E. "Diagnostic and Procedures for diagnosis for viral and rickettsial infections" 4th. edition, 1979
- (46) METTLER N.E., CASALS J., CLARKE D.H., DOWNS and SHOPE R. "Use of Sarcoma 180 TG to prepare hemagglutinating and complement fixing antigens from viruses in adult mice" *Applied Microb.* Vol. 22 págs. 377, 1971
- (47) METTLER N.E., CLARKE D.H., CASALS J. "Results of virus inoculation in mice bearing Erlich ascitic tumor. Antigen production and tumor regression". *Infection and Immunity* Vol. 37 Nro. 1, págs. 23-37, 1982
- (48) SRIHONGSE S. and JOHNSON K. "Hemagglutinating production and infectivity - patterns inoculated with group C and other new world arbovirus" *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 15, págs. 273-279, 1969
- (49) BUCKLEY S. and SRIHONGSE S. "Production of hemagglutinin by Dengue virus in HeLa cell" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol. 113 págs. 284-288, 1963.
- (50) SCHMIDT N. and LEBETE E. "Viral and Rickettsial Diseases* Comparison of various methods for preparation of viral serological antigens from infected cell cultures". *Appl. Microbiol.* 22 (2) Págs. 217-226, 1971

- (51) POLLACK Robert (Ed.) "Reading in mammalian cell culture" Annals Cold Spring Harbor Lab. págs. 25-45, 1973
- (52) HAYFLICK L., MOORTHEAD P.S. "The serial cultivation of human di- ploid cells strain" Exp.Cell.Res. Nro. 25, págs. 585, 1961
- (53) STAMFORD K., EARLE W.R., LIKELY G.D. "The growth in vitre of -- single iselated tissue cells" J.Nat.Cancer Inst.V.9, págs. 229, 1948
- (54) HARRISON R.G. "Observation on the living developing nerve feber Proc.Soc.Exp.Biol. and Med. 4, págs. 140, 1967
- (55) MID. R.L., BOYMAN P.D., DANIEL C.W. "Establishment of mouse --- embryo cell in vitro" EXP.Cell.Res.V.107 Nro. 2, July, 1977.
- (56) SHOPE, R.E. "The use of a micro-hemagglutination inhibition test follow antibody responses after arthropod borne viruses infection in a community of forest" Annals Am.Microbiol. Rio de Janeiro. Nro. 11- parte A pág. 160-171, 1973.
- (57) TAKATSY G. and JAMMON M. "The use of spiral loops in serologi-- cal and virological micromethod" Acta virológica Nro.4, págs. 365- - 369, 1966.
- (58) ARDOINE P., CLARKE D.H., and HAMMON C. "The preparation of arbo virus hamagglutinin by sonication and tripsin treatment".The Amer. - J.Trop.Med.Hyg. Vol.18 Nro.4, 1969.
- (59) ARDOINE P., CLARKE D.H. "The use of sonication and of Calcium- phosphate cromatography for preparation of Group C Arbovirus hema--- gglutinins" The Amer.J.Trop.Med.Hyg. Vol.18 Nro.3, 1967
- (60) WOFSY L., BURR B. "The use of affinity cromatography of the --- specific purification of antibodies and antigens" The Journal of Im- munology Vol.10 Nro.2, Aug.1969
- (61) PETERSON E.A., and SABER H.A. "Cromatography of Proteins I Cellu lose ion-exchange adsorvants" J.Amer.Chem.Soc.Vol.18, págs. 751-755, - 1956.
- (62) SABER H.A., GRITTER F.J., WICHOFF M.N. and PETERSON E.A. "Croma tography of proteins II+ Fraccionation of serum proteins on anion- - exchange cellulose" J.Amer.Chem.Soc.Vol.18, págs. 756, 1956.
- (63) TOUMBS M.P., COOKE K.B., BURSTON D., and MC LAGEN N.F. "The cro matography of normal serum proteins" Bioch. anal Vol.284, págs.126

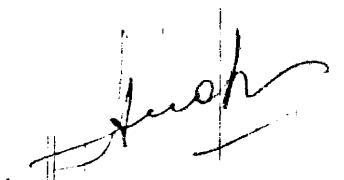


1961

- (64) MARGNI R.A. "Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. Ed. Pan 3ra. Edición, Buenos Aires Arg., 1982
- (65) WILLIAMS C., CHASE M. "Methods in immunology and immunochemistry. Preparation of Antigens and Antibodies" Chapter 1, Vol. 21 Nro. 2 págs. 90-92, 1967
- (66) YALEROW A.H., ARSOB and SPENCE (Dep. Med. Microb. Virus - Toronto "A simple method for the inactivation of SLE virus preparation for immunofluorescent microscopy" Can. J. Microbiol. 26 (1) págs. 72-74, --- 1978
- (67) FINKELSTEIN R. and SULKIN E. "Effects of Betapropiolactone on complement fixing antigens of St. Louis Encephalitis virus" Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 95 (1), págs. 112-115, 1975.
- (68) LOGRIPPO G.A. "Investigations of the use Betapropiolactone in virus inactivations" Ann. New York Ac. of. Sci. Vol. 83 págs. 578-594, -- 1960.
- (69) BURKE D.S., and NISALAK A. "Detection of Japanese Encephalitis virus Immunoglobulina M antibodies in serum by antibodies capture -- R.I.E. J. Clin. Microbiol. 15, págs. 353-361, 1982
- (70) MEURMAN O. "Detection of antiviral Ig M antibodies and its problems. A review In New Developments in Diagnostic virology págs. 111 113, 1984.
- (71) ROGGENDORF M., HEENZ F., DEFNHARDT F., and KUNZ Ch. "Serological diagnosis of acute tick-borne encephalitis by demonstration of -- antibodies of Ig M. Journal of Medical Virology, págs. 41-50, 1981
- (72) SCHMITZ and EMMERICH P. "Detection of specific Immunoglobuline-M antibody to different Flaviviruses by use of E.L.I.Z.A. Labeled Antigens. Journal of Clinical Microb. págs. 664-667 Vol. 9 Nro. 5, 1985.
- (73) METTLER N.E. Familia Reoviridae. Cuaderno de Virología Nro. 11. Publicación de la UNCPBA. Tandil 1983 (76 págs.)
- (74) LEVITT, WEILCH, ZULLER H. and EIDELMAN R. (USA Army Med. Res. Inst Infect. Dis., Detrick Federick, Md 2170 USA) "Interaction of alphaviruses with human peripheral leucocytes, in vitro replication of Venezuela equine encephalomyelitis virus in monocytes cultures" Infec---

- tion and Immunity 24 (3), págs. 642-646, 1979.
- (75) GUMLEY P.M. "Arbovirus encephalitis via a road traveled by ma--
kes of the differences LB Invest. (USA) United States (48) 4, págs. -
369-371, 1984.
- (76) HOTTA H., WIHARTA A., SUSUMU H. and HOMMA M. Dengue tipo 2 Vi--
rus infection in human periferal blood monocyte cultures. Microbiol.-
Immunol. Vol. 28(10) págs. 1099-1109, 1985
- (77) AGUS S.W., HOTTA H., SUJUDE and HOTTA "Multiplication of Den--
gue viruses in peritoneal macrofage cultures from athymic nude mice
ICMR Annals (Kobe university School of Medicine) 2 págs. 65-76 Japan -
1984.
- (78) BRANDT W.E., M.C. COWN J.M., GENTRY M.K., and RUSELL P.K.
"Infection enhancement of Dengue Type 2 virus in the U-937 human mo--
nocyte cell line by antibodies to flavivirus cross-reactive determi--
nants. Infect. Immun. 36 págs. 1036-1041. USA 1982
- (79) HOTTA and HOTTA Dengue virus multiplication in culture of mouse
peritoneal macrophage. Effects of macrophage activators. Microb. Immu--
log. 26 págs. 665-676, 1985
- (80) STOLLAR V. "Togaviruses in cultured arthropod cells. In the Toga
viruses (SCHLESINGER R.W. Ed.) págs. 584-622, 1985.

ARTICULO 11 LA FACULTAD NO SE HACE SOLIDARIA DE LAS OPINIONES
VERTIDAS EN UNA TESIS.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. J. ...', located in the bottom right corner of the page.