

ANALECTA Veterinaria

Publicación de la
FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PLATA

VOLUMEN: 2 ENERO - DICIEMBRE 1970 Nros. 1, 2 y 3

SUMARIO

SECCION I

Trabajos de docentes de la Facultad

CAPITULO I

Temas de Investigación

El trasplante adenohipofisario a la cámara anterior del ojo en pollos, R. B. Redelonghi, S. J. Trumper, A. R. Bilbao, R. A. Bosch	7
Evolución de la potencia gonadotrófica hipofisaria en pollos desde los 15 a los 260 días de edad, R. B. Redelonghi, S. J. Trumper; A. R. Bilbao, R. A. Bosch	13
Estudio de los proteinogramas normales y contribución al diagnóstico clínico de la Anemia Infecciosa en los equinos por electroforesis en papel, F. de Vega, G. M. Bade	19
Estudio electroforético en papel sobre sueros de bovinos normales, F. de Vega, G. M. Bade	25
Identificación y caracterización del virus del grupo Leucosis Sarcoma. I) Aislamiento y mantenimiento de células L-R, A. Schudel, B. R. Burmester	33
Identificación y caracterización del virus del grupo Leucosis Sarcoma. II) Activación y ensayo de células L-R, A. Schudel, B. R. Burmester	49
Determinación del ciclo biológico de Capillaria bursata, E. Led E. Brandetti, G. H. Panettieri	57
Amidostomum anseris (Zeder, 1800) en gansos de zonas aledañas a La Plata, E. Brandetti, J. E. Led	61

CAPITULO II

Temas de recopilación y difusión

Complejo leucosico aviar: Revisión de conceptos, A. Schudel	67
Producción de toxina tetánica en dos medios de cultivo diferentes. R. Demarchi, M. Casagne, C. Gómez, E. Fischer, N. Martínez, D. Bernagozzi	93

SECCION II

Trabajos de docentes ajenos a la Facultad

CAPITULO I

Temas de Investigación

Tratamiento de lanares afectados de sarna psoróptica procedentes de Tres Arroyos y La Plata, con una misma droga acaricida, H. C. Lasta....	101
---	-----

SECCION I

Trabajos de Docentes de la Facultad

CAPITULO I

Temas de Investigación

EL TRASPLANTE ADENOHIPOFISARIO A LA CAMARA ANTERIOR DEL OJO EN POLLOS (*)

Por Remo B. Redelonghi (1), Samuel J. Trumper (2), Ana R. Bilbao (3)
y Ricardo A. Bosch (4)

R E S U M E N

En el presente trabajo se describe una técnica de homotrasplante adenohipofisario a la cámara anterior del ojo en pollos. La evolución del trasplante es seguida macroscópicamente mediante observaciones diarias y los cambios microestructurales sufridos por la glándula son descriptos a las 24 horas, 7 días y 15 días.

THE ADENOHYPHYSIS TRANSPLANTATION TO ANTERIOR CHAMBER OF THE EYE IN COCKERELS

S U M M A R Y

We described a method for adenohipophysis homotransplantation to the anterior chamber of the eye. The evolution of the transplanted tissue was carry on by macroscopical daily observations. We described the microstructural changes of the gland 24 hr, 7 and 15 days after transplantation.

A N T E C E D E N T E S

El trasplante adenohipofisario a zonas alejadas del hipotálamo ha demostrado ser una excelente preparación para numerosos estudios neuroendocrinológicos en mamíferos. En las aves, sin embargo, hay muy pocos antecedentes sobre la utilización de trasplantes. Assenmacher (1958) utiliza la cámara anterior del ojo

para trasplantes hipofisarios en pe-
tos, pero no refiere el método quirúr-
gico seguido. Ma y Nalbandov (1961),
utilizan para sus experiencias en po-
llos el autotrasplante adenohipofi-
sario bajo la cápsula renal. Este tipo
de preparación requiere la hipofisec-
tomía y el trasplante en un mismo
acto operatorio, ambos muy trauma-

(*) Este trabajo fue realizado parcialmente con fondos provenientes de un subsidio de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Universidad Nacional de La Plata.

(1) Doctor en Ciencias Veterinarias. Jefe de Trabajos Prácticos interino con dedicación exclusiva. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(2) Médico Veterinario. Jefe de Trabajos Prácticos interino con dedicación exclusiva. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(3) Médico Veterinario. Jefe de Trabajos Prácticos por contrato. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(4) Doctor en Ciencias Veterinarias. Investigador con categoría de Profesor adjunto. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

tizantes y consecuentemente comprometedores para la sobrevida del tejido trasplantado. En el transcurso de nuestras experiencias relacionadas con el eje hipotálamo-hipofisogonadal del pollo nos vimos precisados a realizar en esta especie un método que nos permitiera el trasplante adenohipofisario en animales intactos, para someterlos a la hipofisectomía 7 días después. Como único recurso en nuestras manos, decidimos realizar homotrasplantes y como órgano receptor utilizamos la cámara anterior del ojo modificando

técnicas utilizadas en mamíferos (Smith, 1939). Esta región tiene fácil acceso y los tejidos provenientes de animales de la misma especie pero no emparentados, pueden ser trasplantados aquí con poco riesgo de sufrir el fenómeno de "rechazo". (Medawar y Russel, 1958).

El resultado exitoso del método motivó esta publicación. En la misma se incluye la descripción de los cambios microestructurales sufridos por las glándulas trasplantadas 24 horas, 7 días y 15 días después de la operación.

MATERIAL Y METODO

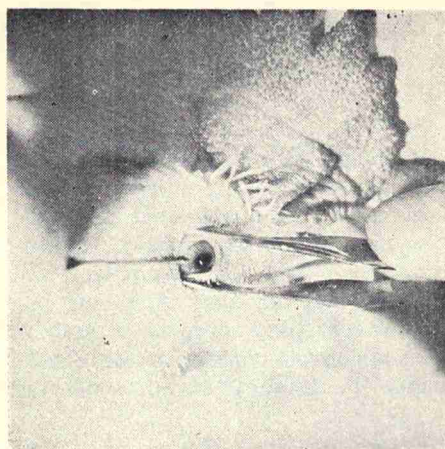
Como animales portadores se utilizaron 18 gallitos de raza Leghorn Blanca de aproximadamente 60 días de edad, anestesiados con pentotal sódico inyectado en la vena radial en dosis aproximada de 20 mg/kg. El grado de anestesia se consideraba óptimo cuando el estímulo por pinzamiento de la cresta sólo provocaba una débil respuesta del animal.

Inmediatamente los animales eran colocados en decúbito lateral izquierdo y sujetados firmemente. Las intervenciones en el ojo derecho fueron las más favorables en razón de la comodidad de acceso para el operador.

Los animales donantes fueron pollos de la misma raza y línea de 15 días de edad, los que fueron sacrificados por decapitación. Inmediatamente se les extrajo la adenohipófisis, la que fue sumergida en solución fisiológica para ser introducida por aspiración, con ayuda de una jeringa, en una aguja hipodérmica de bisel corto, de 1,5 mm de diámetro externo y 30 mm de longitud. El diámetro de la aguja deberá variar en razón directa al tamaño de la adenohipófisis, a los efectos de evitar el daño del tejido por compresión en el interior de la aguja.

Una vez el animal anestesiado y en la posición indicada, se procedió a la separación de los párpados con la ayuda de un pequeño separador, el

cual fue mantenido en posición correcta con la mano izquierda del operador y, sujetando firmemente la aguja por el cono con la mano derecha, se la dirigió con su extremo afilado hacia el ángulo posterior del ojo con el bisel hacia el operador (fotografía 1), para ser así introducida en el



Fotografía 1

globo ocular (cámara anterior) a través de la córnea, inmediatamente por dentro del borde esclero-corneal. La dirección que debe llevar la aguja a partir de ese momento debe ser paralela al iris con el objeto de evitar su daño. Para vencer la resistencia que ofrece la córnea al pasaje de la aguja debe hacerse considerable presión sobre la misma. Por esta razón,

la mano que la sostiene debe permanecer firmemente apoyada con el fin de evitar la introducción exagerada y descontrolada de la aguja en la cámara anterior, no debiendo sobrepasar su extremo afilado el centro de esta región. Una vez lograda esta situación, con la ayuda de una sonda metálica, de diámetro igual al diámetro interno de la aguja, se procedió a expulsar el tejido de la misma. De esta manera éste "caerá" en la cámara anterior, flotando libremente; la aguja, entonces, deberá ser retirada suavemente para evitar el arrastre hacia el exterior de la glándula trasplantada juntamente con el humor acuoso que escapa por la brecha abierta en la córnea.

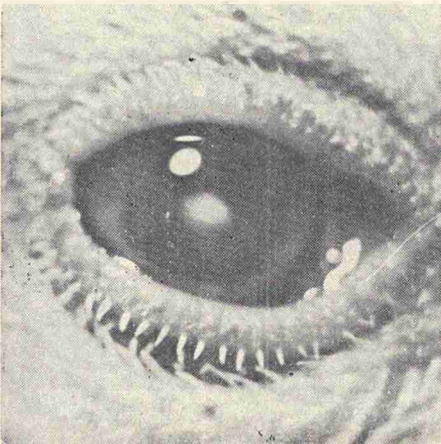
La preparación del animal receptor y la introducción de la glándula en la aguja hipodérmica deben hacerse de manera simultánea con el objeto de abreviar el tiempo que transcurre desde la extracción de la adenohipó-

fisis del donante hasta su trasplante. En ninguno de nuestros casos excedió los 3 minutos.

Con el objeto de evaluar la sobrevivencia del trasplante, la evolución del tejido glandular fue seguida macro y microscópicamente. Las observaciones macroscópicas consistieron en exámenes diarios de la glándula en el animal vivo, a través de la córnea, con la ayuda de un microscopio de Operación Zeiss y se extendieron desde las 24 horas hasta los 15 días posteriores al trasplante. De los 18 pollos operados, 6 animales se destinaron al estudio microscópico, sacrificándose 2 a las 24 horas, 2 a los 7 días y 2 a los 15 días después del trasplante. Las adenohipófisis fueron extraídas de la cámara anterior del ojo y fijadas en formol-sublimado, siendo procesadas posteriormente para su inclusión en parafina. Las secciones seriadas fueron teñidas con hematoxilina-eosina, P. A. S.-hematoxilina y P. A. S.-orange G-azul de metilo.

RESULTADOS

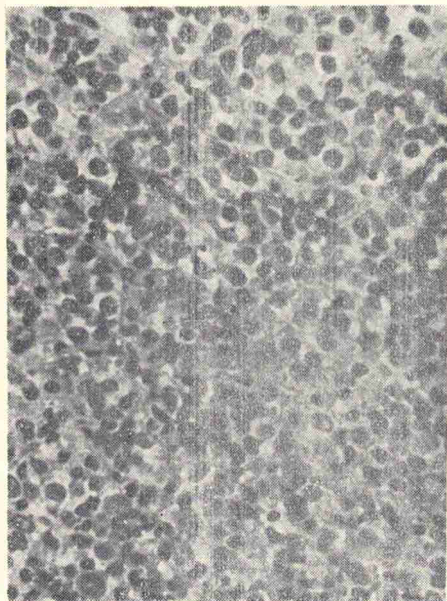
Las observaciones macroscópicas revelan en la totalidad del lote operado que, dentro de las 24 horas posteriores a la operación, el ojo intervenido readquiere sus características de normalidad: obturación de la solución de continuidad de la córnea y recuperación del humor acuoso. El



Fotografía 2

tejido adenohipofisario tiene color blanquecino y permanece "flotando" en el humor acuoso. Durante la primera semana el tejido trasplantado se fija al iris, adquiriendo una coloración rosada. Observando con pequeño aumento puede apreciarse que pende del iris por un delicado pedículo vascular (fotografía 2). No se observa variación en el tamaño del órgano con excepción de 3 animales, sobre un total de 16, en los que se observa una aparente disminución del tamaño de la glándula y ausencia de vascularización, por lo que fueron eliminados. Este aspecto es típico de los trasplantes de 7 días y a partir de este momento ya no se producen cambios macroscópicos destacables.

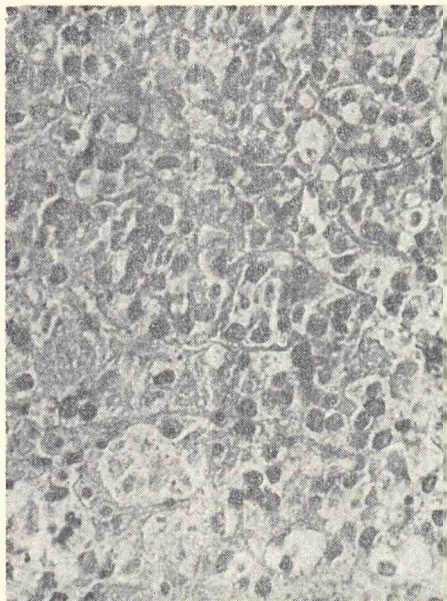
Microscópicamente, a las 24 horas posteriores al trasplante, la adenohipófisis muestra células turgentes y signos de infarto masivo de la zona central. Solamente una franja periférica más o menos estrecha es respe-



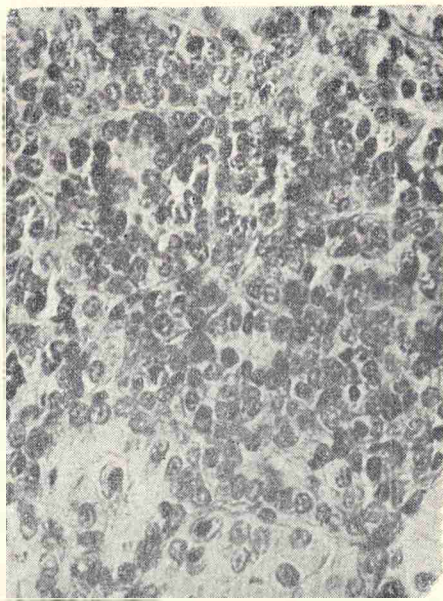
Fotografía 3



Fotografía 5



Fotografía 4



Fotografía 6

tada después de su extracción, aunque en la totalidad de la glándula las células no han perdido su típica granulación (fotografía 3). Los capilares sinusoides son difíciles de observar en el órgano.

Durante la primera semana el tejido trasplantado sufre importantes cambios, de acuerdo a lo observable microscópicamente a los 7 días. Aquí se puede apreciar que a partir de la zona periférica ha comenzado la proliferación celular hacia la zona central, infartada. Numerosos cordones radiales, con figuras de mitosis, siguen el trayecto de los sinusoides, que aparecen bien definidos y con células sanguíneas en su luz. Las cé-

lulas de la capa periférica no han perdido su granulación (fotografía 4).

Finalmente, a los 15 días el estudio microscópico parece indicar que el proceso reparativo está próximo a su término. La zona infartada central es mucho más pequeña o está reducida a pocos islotes de detritus celulares y ha sido reemplazada por células noviformadas a partir de la zona periférica. Es decir, que la diferenciación de dos zonas claramente demarcadas es muy difícil de realizar ahora. Aún pueden apreciarse algunas células con gránulos, especialmente en la periferia del órgano (fotografías 5 y 6).

D I S C U S I O N

El objeto fundamental de este trabajo fue realizar un método que permitiera efectuar trasplantes adenohipofisarios en animales intactos, de tal manera que los riesgos postoperatorios ocasionados por la subsecuente hipofisectomía estén minimizados, permitiendo contar con animales con ectopias adenohipofisarias experimentales.

De acuerdo a nuestros resultados, de los 14 animales restantes del lote, 11 mostraron trasplantes exitosos a los 15 días de operados.

El análisis microscópico nos señala que el tejido adenohipofisario sufre un severo daño, debido a la supresión abrupta de la circulación, apreciable

24 horas después de efectuado el trasplante por una zona de infarto que en este tiempo se manifiesta. Pero que, poco después, durante la primera semana, se inicia un proceso reparativo a partir de una zona periférica de tejido glandular bien conservado. Esta reparación se ve completada al cabo de los 15 días aproximadamente, momento en que sólo se aprecian pequeños islotes de tejido infartado, los que probablemente se resuelvan en una pequeña cicatriz conectiva.

La descripción detallada de los cambios citológicos escapa al objeto de este trabajo; éstos serán dados en una próxima publicación.

Agradecimiento: A Arbor Acres Argentina S. A. la provisión de los animales utilizados.

B I B L I O G R A F I A

- Assenmacher, I.* Recherches sur le controle hypothalamique de la fonction gonadotrope pré-hypophysaire chez le canard. Arch. Anat. microsc. et Morph. expér., 47, 448-557, 1958.
- Medawar, P. B. and Rucsell, P. S.* Adrenal homografts in mice, with special reference to "immunological adrenalectomy". Immunology, 1, 1-12, 1958.
- Ma, R. C. S. and Nalbandov, A. F.* En Advances in Neuroendocrinology. Ed. University of Illinois Press, Urbana. 1963.
- Smith, P. E.* En Sex and Internal Secretions. 2ª edición. Ed. Bailliere, Tindal and Cox London. 1939.

EVOLUCION DE LA POTENCIA GONADOTROFICA HIPOFISARIA EN POLLOS DESDE LOS 15 A LOS 260 DIAS DE EDAD

Por Remo B. Redelonghi (1), Samuel J. Trumper (2), Ana R. Bilbao (3)
y Ricardo A. Bosch (4)

R E S U M E N

En el presente trabajo se evaluó la potencia gonadotrófica hipofisaria y los pesos corporal, de la cresta, testicular e hipofisario de pollos de raza Leghorn Blanca desde los 15 a los 260 días de edad. Se observa un incremento de la potencia gonadotrófica relativa a partir de los 140 días de edad que se eleva notablemente entre los 110 y 260 días de edad. Este valor se compara con los correspondientes a los otros parámetros señalados.

EVOLUTION OF THE PITUITARY GONADOTROPHIC POTENCY IN COCKERELS FROM 15 TO 260 DAYS OF AGE

S U M M A R Y

In the present work is evaluate the pituitary gonadotrophic potency and the body, comb, testicular and hypophyseal weight of White Leghorn cockerels from 15 to 260 days of age. We observed an increase of the relative pituitary gonadotrophic potency from 140 days of age and between 110 to 260 days. This result is compared with the other refered parameters.

Agradecemos a Arbor Acres Argentina S. A., la provisión de los animales utilizados.

(1) Doctor en Ciencias Veterinarias. Jefe de Trabajos Prácticos interino con Dedicación Exclusiva. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. U. N. L. P.

(2) Médico Veterinario. Jefe de Trabajos Prácticos interino con Dedicación Exclusiva. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. U. N. L. P.

(3) Médico Veterinario. Jefe de Trabajos Prácticos por contrato. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. U. N. L. P.

(4) Doctor en Ciencias Veterinarias. Profesor Adjunto-Investigador con Dedicación exclusiva. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. U. N. L. P.

A N T E C E D E N T E S

La evolución de la potencia gonadotrófica de la hipófisis del pollo, desde los primeros días posteriores al nacimiento hasta la edad adulta, no ha recibido suficiente atención no obstante su importancia. Estos datos se hacen valiosos si se relacionan con otros parámetros, tal como el peso testicular.

Breneman (1945) determina la potencia gonadotrófica de pollos de raza

Leghorn Blanca, desde el nacimiento a los 90 días de edad encontrando una íntima interrelación entre la actividad secretoria adenohipofisaria y testicular en este período.

En este trabajo intentamos confirmar los resultados obtenidos por Breneman (op. cit.) y extender las investigaciones en ese mismo sentido hasta los 260 días de edad.

MATERIAL Y METODO

Fueron utilizados machos de raza Leghorn Blanca de 15, 80, 110, 140 y 260 días de edad, alojados en jaulas, sometidos a un régimen de iluminación de 14 horas L y 10 horas O. y alimentados "ad-libitum" con una dieta standard. Los animales de los distintos lotes fueron pesados, determinada el área de la cresta y luego sacrificados por decapitación.

Las hipófisis fueron pesadas e inmediatamente colocadas en acetona donde permanecieron por un lapso no menor de 60 horas. Dichas hipófisis

fueron luego llevadas a un desecador durante 7 días al cabo de los cuales se les trituró para obtener polvo seco el que fue suspendido en agua destilada e inyectado a pollitos de 1 día de edad a los efectos de determinar la potencia gonadotrófica hipofisaria según el método de aumento del peso testicular propuesto por Breneman (1945) y modificado por Nakajo e Imai (1956).

Simultáneamente se obtuvieron valores individuales del peso de la cresta y peso testicular.

R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos están volcados en las tablas 1 y 2. En ellas observamos un incremento ininterrumpido del peso corporal, desde 106 g. a los 15 días hasta 2.181 g. a los 260 días de edad. Un resultado similar fue encontrado en el peso de la cresta.

En lo que respecta a los pesos testiculares, es notable el incremento desde los 15 a los 80 días y desde los 110 a los 140 y 260 días de edad, y si bien el peso testicular registrado a los 110 días es menor que a los 80 días de edad, este descenso no es estadísticamente significativo ($p > 0,5$).

El peso hipofisario incrementa desde los 15 a los 110 días, permanece sin variante entre los 110 y 140 días y

aumenta nuevamente entre los 140 y 260 días de edad.

En cuanto a la potencia gonadotrófica, ésta arroja valores por unidad de peso (C.U./mg. glándula, peso seco) similares a los 15, 80 y 110 días de edad. Luego de esta edad hay un leve incremento a los 140 días el cual no es estadísticamente significativo ($p > 0,1$), pero a los 260 días de edad el aumento en la potencia gonadotrófica relativa (C.U./mg. seco, glándula) se eleva notablemente siendo altamente significativa la diferencia comparando su potencia con la de animales de 110 días de edad ($p < 0,001$).

TABLA 1

EVOLUCION DEL PESO CORPORAL Y DE LA CRESTA EN MACHOS
LEGHORN BLANCA DE 15 A 260 DIAS DE EDAD

Edad en días	Peso corporal (Kg.) \pm E. S.	Peso cresta (g.) \pm E. S.
15 (25)	0,106 \pm 0,003	—
80 (9)	1,030 \pm 0,014	6,88 \pm 1,48
110 (13)	1,430 \pm 0,050	13,1 \pm 1,85
140 (8)	1,627 \pm 0,141	25,4 \pm 3,29
260 (6)	2,181 \pm 0,050	115 \pm 10,6

— Los números entre paréntesis indican cantidad de animales.

Los resultados mencionados presentan algunas variaciones si se expresan en forma absoluta los valores de la potencia gonadotrófica (estimada) en unidades pollo por glándula (C.U.

/glándula). Es así que se tiene entonces un incremento desde los 15 a los 260 días de edad con valores de 0,84 C.U. a 10,1 C.U., respectivamente

DISCUSION

De acuerdo a los resultados la potencia gonadotrófica hipofisaria relativa sufre un notable incremento a partir de los 140 días de edad. Este es gradual desde los 15 a los 260 días cuando estos valores se estiman en forma absoluta. Esto último es coincidente con el aumento del peso testicular que incrementa paulatinamente entre los 15 y 260 días de edad. El peso de la cresta incrementa entre los 80 y 260 días.

No existe correlación entre el peso testicular y la potencia gonadotrófica hipofisaria, lo que está en concordancia con los resultados de Nelson, Norton y Nalbandov (1965), tanto para la concentración como para el contenido de LH hipofisaria. Estos datos son también coincidentes con los descritos por Breneman (1945) para

gonadotrofinas "totales" adenohipofisarias.

El análisis de la Tabla 2, señala un sostenido incremento del peso testicular a partir de los 110 días de edad. Este aumento de peso testicular no se acompaña de inmediato con un incremento de peso adenohipofisario, no obstante aumentar en la misma el contenido y la concentración de gonadotrofinas, lo que sería un signo de activa síntesis y/o bloqueo de la liberación de estas hormonas. Una posible explicación de este fenómeno podría ser dada por la influencia sobre la glándula de la elevación en el nivel de secreción de andrógenos testiculares, que explicarían a su vez el gran incremento en peso que sufre la cresta después de los 140 días de edad de los animales.

TABLA 2

EVOLUCION DEL PESO TESTICULAR, PESO HIPOFISARIO Y POTENCIA GONADOTROPICA EN MACHOS LEGHORN DE 15 A 260 DIAS DE EDAD

Edad en días	Peso testicular (g.) ± E. S.	Peso hipofisario (mg.) ± E. S.	B I O E N S A Y O		% de incremento	Potencia Gonadotrófica	
			Media del peso testicular control	(mg.) ± E. S. tratados		mg./seco	en C. U. ⁹ absoluta
15 (25)	0,037 ± 0,002	1,5 ± 0,07	5,49 ± 0,24 (14) (+)	11,51 ± 0,88 (5) £	109	3,1	0,84
80 (9)	1,09 ± 0,34 ^a	6,11 ± 0,29		11,72 ± 0,72 (9) &	113	3,2	3,97
110 (13)	0,88 ± 0,06 ^b	8,35 ± 0,3	5,54 ± 0,43 (14) (+)	11,71 ± 0,66 (14) ^{£c}	111	3,17	4,53
140 (8)	5,1 ± 0,5	8,27 ± 0,5		13,43 ± 1,1 (9) ^w	142	4,5	6,24
260 (6)	13,5 ± 2,7	10,49 ± 0,8		16,65 ± 0,43 (8) ^{zd}	200	5,71	10,1

Los números entre paréntesis indican cantidad de animales.

⁹ C. U. = Unidad pollo = 35 % de incremento.

(+) Pollitos BB inyectados con agua destilada.

£ Pollitos BB inyectados con polvo de hipofosis de animales de 15 días de edad.

& Pollitos BB inyectados con polvo de hipofosis de animales de 80 días de edad.

K Pollitos BB inyectados con polvo de hipofosis de animales de 110 días de edad.

W Pollitos BB inyectados con polvo de hipofosis de animales de 140 días de edad.

Z Pollitos BB inyectados con polvo de hipofosis de animales de 260 días de edad.

— valor de la diferencia entre a y b: $p > 0,5$ (no significativa).

— valor de la diferencia entre c y d: $p < 0,001$ (altamente significativa).

B I B L I O G R A F I A

Breneman, W. E. The gonadotropic activity of the anterior pituitary of cockerels. *Endocrinology* 36: 190-199; 1945.

Nakajo, S. y K. Imai. Investigation on chick assay method for avian gonadotropins. *Endocrinol Jap.* 3: 197-202; 1956.

Nelson, D. M., H. W. Norton y A. V. Nalbandov. Hypophysial and plasma LH levels in intact and castrate cockerels. *Endocrinology* 77: 731-734; 1965.

ESTUDIO DE LOS PROTEINOGRAMAS NORMALES
Y CONTRIBUCION AL DIAGNOSTICO CLINICO DE
LA ANEMIA INFECCIOSA EN LOS EQUINOS POR
ELECTROFORESIS EN PAPEL (*)

Por Fermín de Vega (1) y Graciela M. Bade (2)

R E S U M E N

- 1) *Fueron realizados los proteinogramas de 20 equinos normales y se calcularon los valores medios normales.*
- 2) *Posteriormente se efectuaron proteinogramas de 4 equinos con anemia infecciosa.*
- 3) *De la confrontación de los valores normales y patológicos surgieron diferencias de significativa importancia en el estudio evolutivo de esta enfermedad.*

PAPER ELECTROPHORETIC STUDIES OF NORMAL EQUINE SERUM
AND EQUINE INFECTIOUS ANEMIA SERUM AS CONTRIBUTION
FOR THE CLINIC DIAGNOSTIC.

S U M M A R Y

1. *Proteinogram of 20 normal equine serums and calculation of the normal average was performed.*
2. *Proteinogram of 4 animal serums with equine infectious anemia was realized subsequently.*
3. *Of the confrontation of normal and pathological values, differences of significative importance in the evolutive study of this disease were found.*

(*) Trabajo realizado en el Departamento de Ciencias Básicas, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

(1) Doctor en Ciencias Químicas. Jefe de Trabajos Prácticos del Departamento de Físico-Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Jefe de Trabajos Prácticos de Física Biológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

(2) Doctora en Ciencias Veterinarias.

A N T E C E D E N T E S

Vimos conveniente la aplicación de la electroforesis en los sueros de equinos con anemia infecciosa, dada la necesidad de complementar el diagnóstico clínico con resultados del laboratorio que puedan dar una visión más amplia de la enfermedad en estudio.

Para poder relacionar los electroferogramas obtenidos de animales enfermos con los normales que figuran

en la literatura, fue necesario que realizáramos nuestro patrón.

Los valores medios normales de las proteínas séricas de los equinos se obtuvieron de animales sanos concurrentes al Instituto de Hipología del Hipódromo de La Plata. Los casos de anemia infecciosa los suministró el Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

MATERIAL Y METODO

Las edades de los animales estudiados oscilaban entre los 3 y 5 años.

En los casos patológicos se destacaban en sus antecedentes inmediatos desmejoramiento del estado general con fiebre de tipo remitente y signos de anemia de 11 meses de evolución, síntomas que se intensificaban periódicamente. En algunos de ellos se habían realizado análisis de laboratorio que revelaban anemia intensa y signos de infección urinaria.

En el momento de su internación presentaban mal estado general, síndrome febril acompañado de anemia intensa y, en algunos, edema de patas y regiones bajas del cuerpo que en otros equinos se fue haciendo evidente durante su internación.

Las corridas electroforéticas se ejecutaron en el equipo Elphor, observándose las precauciones ya citadas en el trabajo (1).

La cantidad de muestra sembrada fue de 0,01 ml. El dosaje de proteínas totales se hizo por la reacción colorimétrica del biuret usando el micro-método de Gornall modificado por David (2).

Empleamos papel Schleicher-Schull 2043 B (120 g/cm².) de 34 x 4 cm.

El tiempo de cada experiencia osciló entre 16 y 17 horas, con un vol-

taje de 90 voltios y una intensidad total de 11 mA.

Se usó la solución buffer de Michelis cuya composición es la siguiente:

Veronal	8,712 g.
Na. OH	11,893 „
CH ₃ COONa	6,476 „
HCl 0,1 N	60 ml.
Agua destilada	1000 „
	pH = 8,6
	f. i. = 0,125

Para mantener aproximadamente uniforme la fuerza iónica del buffer, luego de cada corrida invertimos la polaridad de los electrodos y mantuvimos constante el volumen de la solución en la cuba, reintegrando con agua bidestilada el solvente evaporado.

Las proteínas antes de ser teñidas se fijaron por acción del calor en una estufa a 100°C durante 30'.

Coloreamos las corridas con una solución de azul de bromofenol al 1 mg. % (P/V) en solución saturada de CL₂Hg; el exceso de colorante se eliminó con una solución de ácido acético al 15 % (V/V), y con vapores de amoníaco se viraron totalmente a medio alcalino.

Los electroferogramas fueron obtenidos por densitometría en el equipo Analytrol con integrador automático.

R E S U L T A D O S

TABLA N° 1. PORCENTAJES RELATIVOS DE CADA UNA DE LAS
FRACCIONES DE PROTEINAS SERICAS REALIZADAS SOBRE
20 EQUINOS NORMALES

Suero N°	P. T. g. %	Albúmina	Globulinas				Relac. A/G
			alfa ₁	alfa ₂	beta	gamma	
1	7,80	49,0	3,3	12,7	12,0	23,0	0,940
2	8,40	50,0	4,6	11,4	11,0	23,0	1,000
3	8,40	44,0	3,5	12,4	13,1	27,0	0,960
4	7,80	34,5	4,9	13,8	16,6	30,2	0,530
5	7,00	34,4	5,0	13,6	16,8	30,2	0,530
6	6,00	44,0	3,9	12,0	13,0	27,1	0,960
7	7,00	49,0	4,0	12,0	12,0	24,0	0,940
8	7,80	42,6	4,5	13,8	16,2	22,9	0,740
9	8,20	42,4	5,4	13,4	14,8	24,0	0,735
10	7,40	49,0	3,3	12,7	12,0	23,0	0,960
11	7,80	50,0	4,6	11,6	11,0	23,0	1,000
12	6,00	44,0	3,5	12,4	13,1	27,0	0,960
13	7,20	34,5	4,9	13,8	16,6	30,2	0,530
14	7,50	42,6	4,4	13,9	16,1	23,0	0,740
15	7,40	42,4	5,6	13,2	14,0	24,8	0,735
16	6,80	49,0	4,0	12,8	11,0	24,0	0,940
17	7,00	50,0	5,0	11,8	10,0	24,0	1,000
18	7,10	49,0	5,0	11,0	11,0	24,0	0,960
19	7,80	42,4	5,8	13,0	14,0	24,8	0,735
20	7,00	50,0	4,6	11,4	11,0	23,0	1,000

(*) P. T., proteínas totales.

1) En la tabla N° 1, pueden observarse los porcentajes relativos normales de las distintas fracciones de proteínas; a partir de ellos se hizo el cálculo de los valores medios con su desviación standard.

2) El trazado electroforético de un animal normal con la corrida respectiva figura en el gráfico N° 1 y en

el N° 2 un caso con anemia infecciosa.

3) Los electroferogramas correspondientes a distintos casos de anemia infecciosa se representaron en la tabla N° 2, en ellas se compararon separadamente los valores patológicos con el normal.

GRAFICO Nº 1

TRAZADO Y CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE UN ANIMAL NORMAL

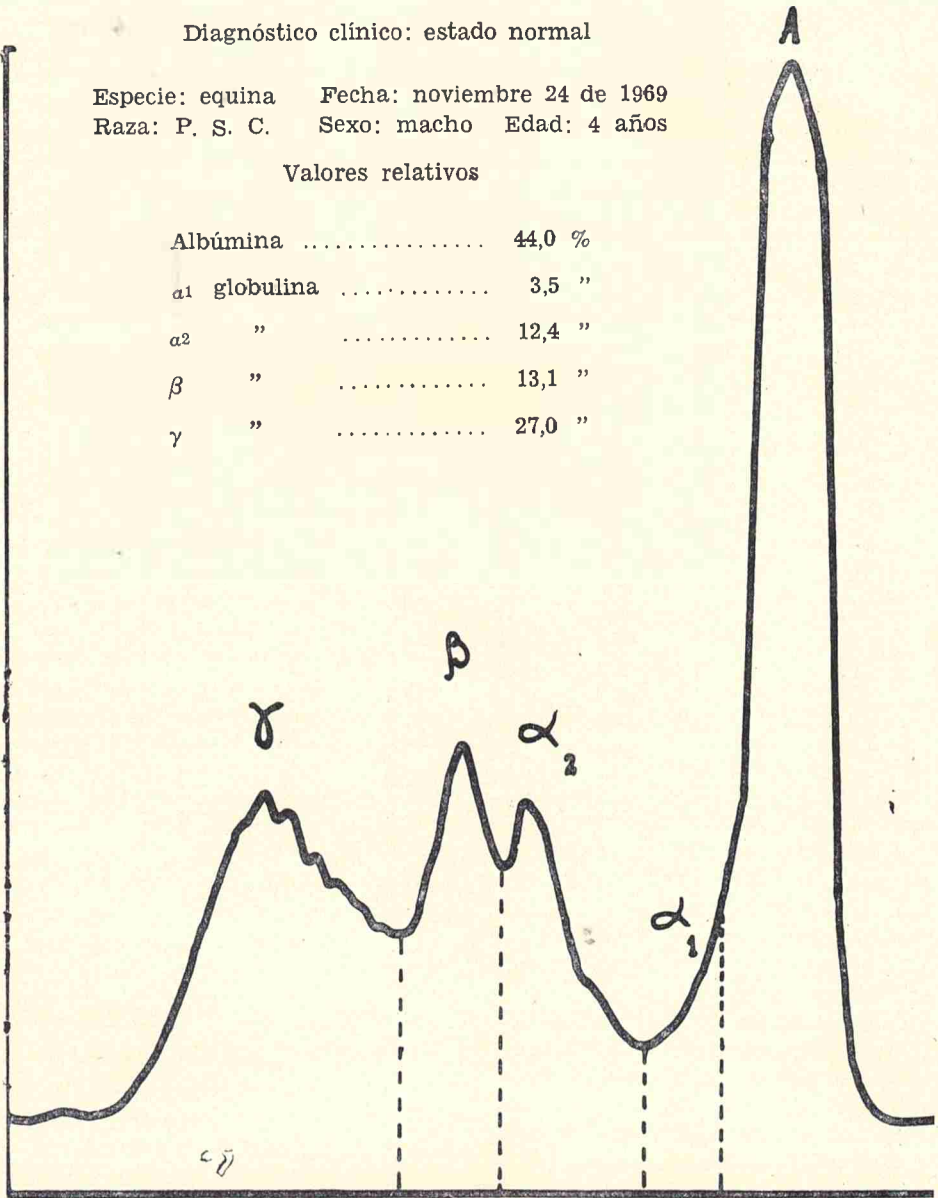
Diagnóstico clínico: estado normal

Especie: equina Fecha: noviembre 24 de 1969

Raza: P. S. C. Sexo: macho Edad: 4 años

Valores relativos

Albúmina	44,0 %
α_1 globulina	3,5 "
α_2 "	12,4 "
β "	13,1 "
γ "	27,0 "



Voltaje: 90; intensidad: 11 mA (0,45 mA/cm); Duración: 16 hs.

Proteínas totales: 6,00 g %

Relac. A/G 0,960

GRAFICO Nº 2

TRAZADO Y CORRIDA ELECTROFORETICA DE UN ANIMAL ENFERMO

Especie: equina.

Fecha: noviembre 25 de 1969.

Raza: P. S. C.

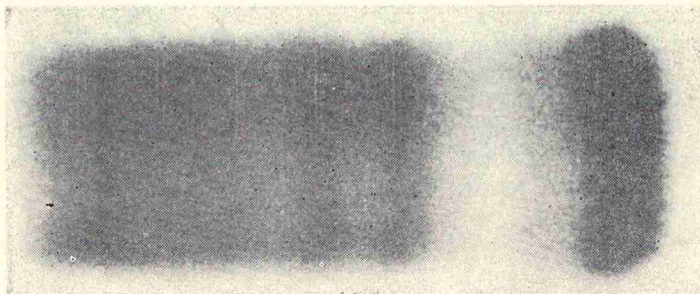
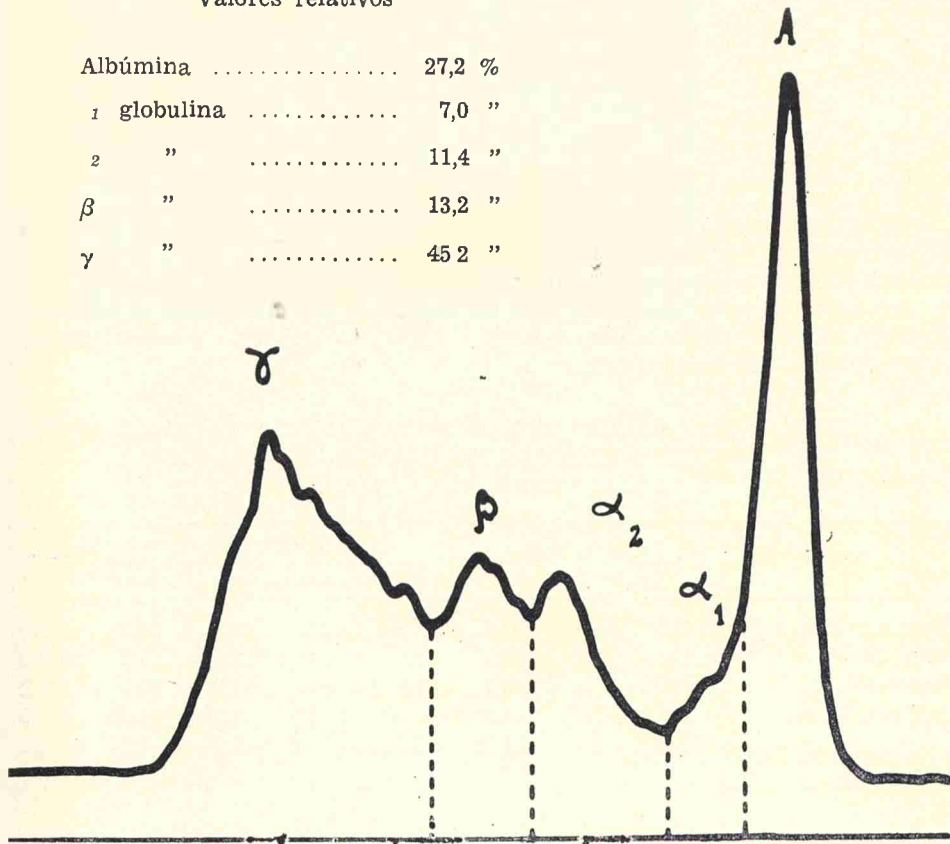
Sexo: hembra

Edad: 3 años

Diagnóstico clínico: anemia infecciosa

Valores relativos

Albúmina	27,2 %
γ globulina	7,0 "
δ "	11,4 "
β "	13,2 "
γ "	45,2 "



Voltaje: 90; Intensidad: 11 mA (0,45 mA/cm); Duración: 16 hs.

Proteínas totales: 7,80 g %

Relac. A/G 0,375

TABLA Nº 2. PORCENTAJES RELATIVOS DE LAS PROTEINAS SERICAS DE EQUINOS ENFERMOS DE ANEMIA INFECCIOSA COMPARADOS CON EL VALOR MEDIO NORMAL

Estado clínico	P. T. g. %	Albúmina	Globulinas				Relac. A/G
			alfa ₁	alfa ₂	beta	gamma	
Normal *	7,37	44,60	4,48	13,00	13,30	24,62	0,805
Desvio standard	± 0,65	± 5,50	± 0,74	± 1,10	± 2,30	± 2,22	± 0,213
Anemia infecciosa	7,80	27,2	7,0	11,4	13,2	45,2	0,375
" "	7,50	27,0	5,4	11,0	14,3	42,3	0,370
" "	7,25	27,8	4,3	11,5	13,5	42,8	0,385
" "	7,80	28,5	6,0	11,2	13,2	41,1	0,398

CONCLUSIONES

1) Obtuvimos en las corridas de los sueros normales 5 fracciones; sus porcentajes relativos coincidieron con los comunicados recientemente por otros autores. Los datos citados por Rullier (3), son los más próximos a

los nuestros y figuran en la tabla Nº 3. en cambio hubo divergencias con los hallados por Irfan (4), especialmente en el valor de la albúmina y gamma globulina y en la relación A/G.

TABLA Nº 3. VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES RELATIVOS DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE PROTEINAS EXPRESADAS SEGUN LOS AUTORES

Autores	Año	P. T. g. %	Albúmina	Globulinas				Relac. A/G
				alfa ₁	alfa ₂	beta	gamma	
Vesselinovitsh, S. D. (6)	1959		38,4	α =	16,6	21,7	23,3	0,623
Irfan, M. (4)	1967	7,3	33,5	15,0	16,0	15,5	20,0	0,503
Rullier, O. (3)	1968		45,1	5,2	13,0	13,8	22,9	0,821
de Vega, F. (*)		7,37	44,60	4,48	13,00	13,30	24,62	0,805
		± 0,65	± 5,50	± 0,74	± 1,10	± 2,30	± 2,22	± 0,213

(*) Valores obtenidos en este trabajo.

2) Establecimos como valores medios normales del electroferograma los siguientes: albúmina 44,60 % (± 5,50), globulinas alfa₁ 4,48 % (± 0,74), alfa₂ 13,00 % (± 1,10), beta 13,30 % (± 2,30) y gamma 24,62 % (± 2,22), con un cociente A/G de 0,805 (± 0,213) y proteínas totales de 7,37 g. % (± 0,65).

3) Comparando el patrón anterior con el obtenido en la anemia infecciosa se observó en esta hipalbuminemia acentuada, un marcado aumento de la gamma globulina y en las demás fracciones no se vieron diferencias significativas.

BIBLIOGRAFIA

1. de Vega, F. et al.: Estudio electroforético en papel sobre sueros de bovinos normales, (en prensa).
2. Gornall, A. G.; Bardawill, C. J. y David, M. M.: J. Biol. Chem., 177: 751 (1949).
3. Rullier, J. et al.: Laboratoire et Diagnostic en Médecine Vétérinaire. París, Vigot (1968).
4. Irfan, M.: The electrophoretic pattern of serum proteins in normal animals. Research in Veterinary Science, 8 (2): 137 (1967).
5. Vesselinovitsh, S. D.: The analysis of serum proteins of domestic animals by filter-paper electrophoresis. A. review. The Cornell Veterinarian, 49: 82 (1959).

ESTUDIO ELECTROFORETICO EN PAPEL SOBRE SUEROS DE BOVINOS NORMALES (*)

Por Fermín de Vega ⁽¹⁾ y Graciela M. Bade ⁽²⁾

R E S U M E N

- 1) Se realizó el estudio electroforético sobre papel de suero de 29 bovinos clínicamente normales de 2 y ½ a 3 años de edad, de raza Aberdeen Angus y de ambos sexos.
- 2) Se detallaron estadísticamente los valores de las proteínas totales y fraccionadas en albúmina y globulinas alfa, beta y gamma. Además se registró la relación albúmina globulina (coeficiente proteico).
- 3) Los valores obtenidos se compararon con los aportados por otros autores, llegándose a establecer resultados muy concordantes.

PAPER ELECTROPHORESIS STUDY IN NORMAL BOVINE SERUM

S U M M A R Y

1. *Electrophoretic paper study of 29 clinically normal bovine serums was realized. This work was performed in Aberdeen Angus bovine of 2½ - 3 years old and both sexes.*
2. *Statistical values of total proteins, alfa, beta and gamma globulins and their proteic coefficient was detailed.*
3. *Values concordant with other authors was obtained.*

(*) Trabajo realizado en el Departamento de Ciencias Básicas, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

(1) Doctor en Ciencias Químicas. Jefe de Trabajos Prácticos del Departamento de Físico-Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Jefe de Trabajos Prácticos de Física Biológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

(2) Doctora en Medicina Veterinaria.

A N T E C E D E N T E S

Luego de una exhaustiva consulta bibliográfica sobre los investigadores que estudiaron en nuestro país las proteínas séricas de los bovinos por vía electroforética, llegamos a la conclusión que debido al escaso número de trabajos realizados, existía la necesidad de confirmar los valores normales siguiendo una determinada técnica, en la cual se tuvieran en cuenta todas las posibles variables que pudiesen tener influencia, a fin de re-

ducir a un mínimo el número de errores cometidos.

Los sueros sobre los cuales se trabajó los obtuvimos personalmente en el frigorífico Swift de La Plata, durante el faenamiento y luego de una cuidadosa inspección del animal, para asegurarnos sobre su normal estado clínico.

La edad de los bovinos sacrificados oscilaba entre los 2 y $\frac{1}{2}$ y 3 años, siendo de raza Aberdeen Angus y de ambos sexos.

MATERIAL Y METODO

Para la ejecución de las corridas electroforéticas se empleó el equipo Elphor.

Previamente se aseguró el normal estado de cada una de las partes básicas del equipo. Comprobado el mismo y para mayor control durante cada experiencia se confirmó siempre la diferencia de potencial y la intensidad de la corriente comunicada por la fuente.

La cantidad de muestra osciló alrededor de los 0,01 ml., dependiendo la misma del dosaje previo de las proteínas totales. El papel usado fue el Schleicher-Schull 2043 B (120 g/cm.²) de 32 × 4 cm.

Las corridas se hicieron siempre en 6 tiras sembrando 3 muestras por duplicado.

El tiempo de cada experiencia estuvo comprendido entre las 16 y 17 horas, con un voltaje de 90 voltios y una intensidad de 11 mA. o sea de 0,45 mA/cm. Trabajando con este voltaje e intensidad el efecto Joule se redujo a un mínimo y con el tiempo empleado las separaciones de las distintas fracciones fueron definidas. La

solución buffer empleada fue la de Michaelis constituida por:

Veronal (ácido dietilbarbitúrico)	8,712 g.
NaOH	11,893 "
CH ₃ COONa	6,476 "
HCl 0,1 N	60 "
Agua destilada	1000 "
	pH = 8,6
	f. i. = 0,125

Las drogas tipo primario se pesaron directamente en balanza analítica, en cambio el hidróxido de sodio y el ácido clorhídrico fueron valorados y a partir de su título se calcularon exactamente las cantidades indicadas; el pH fue controlado con un peachímetro Knick.

Para mantener aproximadamente uniforme la fuerza iónica del buffer se invirtió luego de cada corrida la polaridad de los electrodos (esto es posible siempre que ambos sean de platino); además se controló el volumen constante de la solución en la cuba, reintegrándose con agua bidestilada el solvente evaporado.

Otra forma de controlar la fuerza iónica fue midiendo la conductancia de la solución en un puente Philips GM 4249.

Las proteínas luego de la corrida y antes de teñirlas se fijaron por acción del calor en una estufa a 100°C durante 30' y fueron coloreadas con una so-

lución de azul de bromofenol en concentración de 1 mg. % (P/V), en alcohol etílico de 96° saturado de Cl₂Hg. El tiempo de tinción fue de 15'. El exceso de colorante se eliminó con una solución de ácido acético al 15 % (V/V), en 6 baños consecutivos de 15' cada uno.

Las tiras teñidas y viradas totalmente a medio alcalino con vapores de amoníaco, fueron registradas por densitometría en el aparato Analytrol con integrador automático.

Para el dosaje de las proteínas totales se usó el micrométodo de Gornall modificado por David (1).

RESULTADOS

Sobre 29 electroferogramas obtenidos de bovinos normales se efectuó el cálculo del porcentaje relativo de

cada una de las fracciones de proteínas séricas. Los valores pueden observarse distribuidos en la tabla N° 1.

TABLA N° 1. PORCENTAJES RELATIVOS DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES DE PROTEINAS SERICAS REALIZADAS SOBRE 29 BOVINOS NORMALES

Suero N°	P. T. (*) g. %	Albúmina	Globulinas			Relac. A/G
			alfa	beta	gamma	
1	7,24	57,6	10,0	9,1	23,3	1,360
2	8,80	46,6	9,0	8,0	36,4	0,870
3	10,00	40,8	11,6	10,6	37,0	0,690
4	7,00	40,6	12,2	11,3	36,0	0,700
5	9,60	36,1	14,1	8,5	41,3	0,568
6	7,80	43,0	10,2	6,8	40,0	0,755
7	8,50	47,0	8,5	6,5	38,0	0,887
8	10,80	40,2	8,4	9,8	41,6	0,675
9	10,40	36,4	12,7	6,9	44,0	0,575
10	10,28	34,5	5,5	8,0	52,0	0,528
11	7,90	52,8	8,3	10,4	28,5	1,120
12	8,10	43,7	9,4	7,3	39,6	0,772
13	8,00	56,5	9,3	10,0	24,2	1,283
14	8,00	50,0	7,6	10,2	32,2	1,000
15	8,80	53,1	9,8	7,6	29,5	1,125
16	8,50	34,7	13,8	10,3	41,2	0,530
17	9,60	36,2	14,2	8,6	41,0	0,570
18	9,00	50,8	10,7	10,0	28,5	1,027
19	8,40	59,5	10,3	9,3	20,9	1,562
20	7,20	54,5	8,6	8,6	28,3	1,200
21	8,40	59,1	8,4	12,0	20,5	1,440
22	5,80	59,0	9,6	8,7	22,7	1,540
23	8,00	61,0	7,9	9,2	21,9	1,560
24	6,60	55,0	10,0	10,6	24,4	1,220
25	9,00	53,1	8,3	13,3	25,8	1,130
26	8,00	60,0	6,7	11,6	21,7	1,500
27	8,00	64,0	7,5	9,1	19,4	1,780
28	8,00	61,0	8,5	9,0	21,5	1,560
29	8,00	62,0	9,4	11,0	17,6	1,630

(*) P. T., proteínas totales.

A partir de las mismas se hizo el estudio estadístico, determinándose el valor medio de cada fracción y su

desviación standard. Los datos figuran en la tabla N° 2.

TABLA N° 2. VALORES MEDIOS DE LAS FRACCIONES DE PROTEINAS SERICAS DE BOVINOS CON SU DESVIACION STANDARD REALIZADAS SOBRE 29 CASOS

Fracciones	\bar{x} (*)	σ (**)
— Albúmina	50,4 %	$\pm 9,2$
Globulina alfa	9,4 „	$\pm 2,2$
„ beta	9,4 „	$\pm 1,6$
„ gamma	30,8 „	$\pm 8,3$
Proteínas totales	8,40	$\pm 1,05$
Coefficiente proteico	1,068	$\pm 0,446$

(*) \bar{x} , media.

(**) σ , desviación standard.

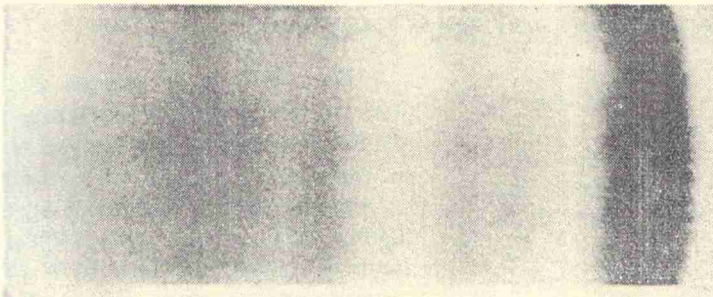
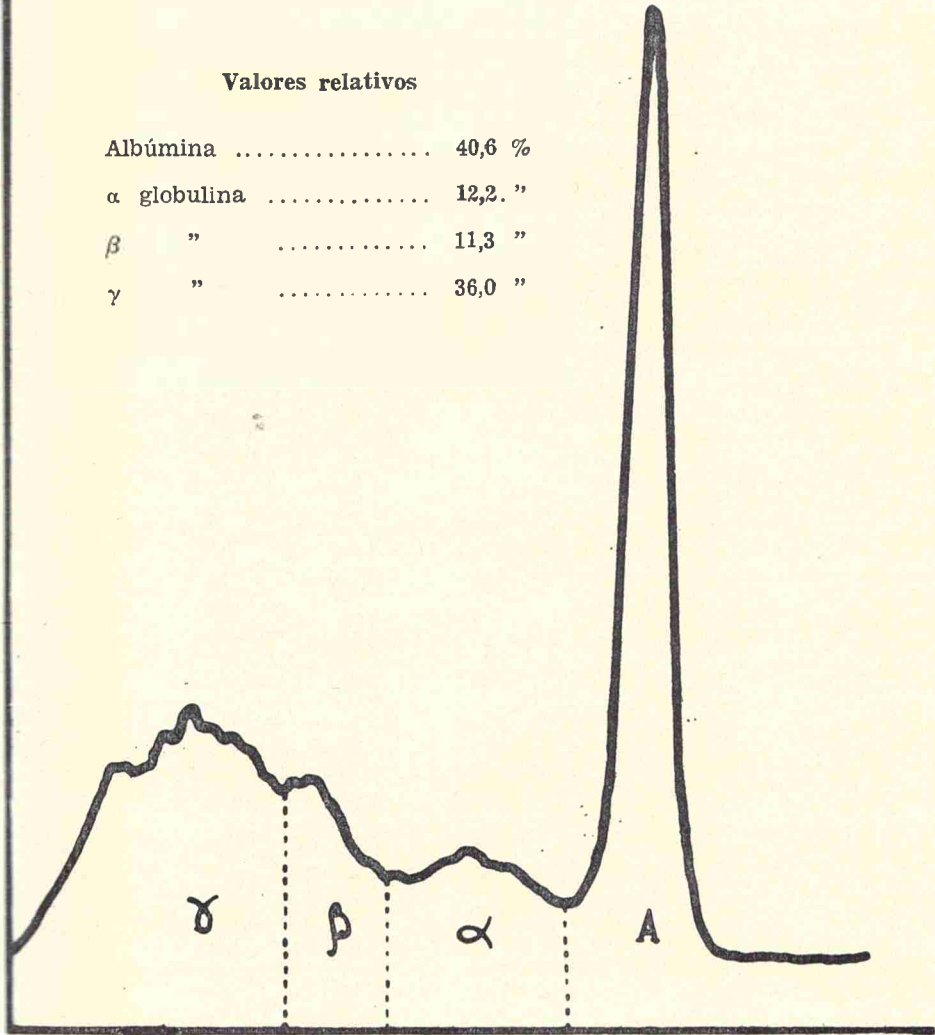
GRAFICO Nº 1

TRAZADO Y CORRIDA ELECTROFORETICA DE UN SUERO NORMAL

Suero de bovino normal Fecha: 20 de diciembre de 1969
Raza: Holando Argentino Edad: 3 años

Valores relativos

Albúmina	40,6 %
α globulina	12,2. "
β "	11,3 "
γ "	36,0 "



Voltaje 90 Intensidad 9,75 mA (0,75 mA/cm.) Duración 16 hs.
Proteínas totales 7,00 Relac. alb./glob. 0,700

TABLA Nº 3 VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES RELATIVOS
DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE PROTEINAS
EXPRESADAS SEGUN LOS AUTORES

Autores	Año	P. T.	Albú- mina	Globulinas			Relac. A/G
				alfa	beta	gamma	
Boguth, W. (2)	1953		43,8 ± 2,9	13,7 ± 2,5	11,4 ± 1,6	12,4 15,7 ± 1,5	0,779
Ebel, K. (3)	1953		37,5 ± 1,4	13,4 ± 1,3	9,9 ± 1,6	39,0 ± 2,4	0,640
Wehemeyer, P. (4)	1954	7,1	39,6	6,8	7,7	16,9	0,655
Bradish, et al. (5)	1954	7,0	46,6	22,9		30,5	0,872
Rooney, J. R. (6)	1957		52,0	13,0	11,0	9,0 15,0	1,083
Laborie, R. (7)	1958		52,2	13,5 **	12,6	21,6	1,094
Venturoli, M. (8)	1958		43,4 ± 2,1	14,5 ± 1,5	13,5 ± 0,6	27,0 ± 2,5	0,769
Urroz, G. (9)	1958		38,6	10,8 7,0 ± 1,1 ± 1,2	11,8 ± 1,9	31,8 ± 2,3	0,628
Boguth, W. et al. (10)	1959		45,3	11,6 **	10,6 **	31,5 **	0,862
Perk, K. et al. (11)	1959		46,3 ± 2,4	11,4 ± 0,8	14,0	29,3 ± 2,7	0,828
Sainz Sainz, et al. (12)	1959		43,5 ± 2,4	14,6 ***	13,5 **	12,7 15,7 ± 1,3 ± 1,5	0,769
Vesselinovitch, S. D. (13)	1959		42,5	11,5	12,6	33,4	0,739
Masselin, J. N. et al. (14)	1961	8,53	43,4	12,0	14,1	30,5	0,766
Mazzini, C A. et al (15)	1961		42,2 ± 6,9	12,6 ± 5,1	17,3 ± 4,4	14,7 13,2 ± 4,3 ± 4,8	0,760 ± 0,240
Garrido Contreras, A. (16)	1967	7,85 ± 0,10	41,8	11,7	15,5	30,7	0,720
Irfan, M. (17)	1967	7,16	43,1	11,0	12,0	33,9	0,756
Rullier, J. et al. (18)	1968	7,8	31,9	16,8	12,9	38,4	0,469
de Vega, F.	1969	8,40 ± 1,05	50,4 ± 9,2	9,4 ± 2,2	9,4 ± 1,6	30,8 ± 8,3	1,068 ± 0,446

** 2 fracciones.

*** 3 fracciones.

CONCLUSIONES

Se detallaron los valores obtenidos por otros autores y los hallados en este trabajo en la tabla Nº 3. De su confrontación se dedujo lo siguiente:

a) El porcentaje de albúmina hallado fue discretamente superior al referido por otros.

b) Los valores de las globulinas alfa y beta se encontraron ligeramente por debajo de los anotados en la bibliografía.

c) En cuanto a la gamma globulina, los resultados concordaron teniendo en cuenta el margen de error en cada caso. La gamma globulina se expresó como la suma de la que algunos autores llaman gamma₁ y gamma₂, dado que si bien en el electroferograma se observó un débil pico de separación, se consideró conveniente expresar la suma, debido a

que no existe una verdadera definición electroforética.

d) Dado que cada autor usó una técnica algo distinta fue necesario comparar nuestro trabajo con el que siguiera etapas básicas semejantes. Así encontramos con gran satisfacción el trabajo realizado por Rooney (6), cuyos resultados se asemejan a los de este estudio.

Finalmente se establecieron como porcentajes relativos normales de las distintas fracciones de proteínas, los siguientes: albúmina 50,4 % ($\pm 9,2$), alfa globulina 9,4 % ($\pm 2,2$), beta globulina 9,4 % ($\pm 1,6$) y gamma globulina 30,8 % ($\pm 8,3$). El coeficiente proteico fue de 1,068 ($\pm 0,446$) y las proteínas totales de 8,40 % ($\pm 1,05$).

BIBLIOGRAFIA

1. Gornall, A. G.; Bardawill, C. J. y David, M. M.: J. Biol. Chem., 177: 751 (1949).
2. Boguth, W.: Papierelektrophoretische serumuntersuchungen bei haussäugetieren. Zentralblatt für Veterinärmedizin I (mitteilung) band, 1 (2): 168 (1953).
3. Ebel, K. H.: Papierelektrophoretische untersuchungen der bluteiweiss verhältnisse bei hunden, rinden und kälbern. Zentralblatt für Veterinärmedizin, 1 (1): 70 (1953).
4. Wehmeyer, P.: Act Path. Microbiol. Scand., 32: 69 (1954).
5. Bradish, C. J.; Henderson, W. M., and Brooksby, J. B.: Biochem. J. 56: 329 (1954).
6. Rooney, J. R.: Paper electrophoresis of bovine serum. American Journal of Veterinary Research, 18: 67 (1957).
7. Laborie, R.: De la valeur des reactions hématologiques, sérologiques et bio-électriques, au point de vue du diagnostic de la tuberculose bovine. Revue du Corps Vétérinaire de L'armée, 13 (1): 17 (1958).
8. Venturoli, M.: Studio elettroforetico di alcune epatopatie bovine Zooprofilassi, 13: 601 (1958).
9. Urroz, I. G.: Contribución al estudio electroforético de los valores normales de las proteínas séricas de bovino. Rev. de Investigaciones Ganaderas I. N. T. A., 4: 149 (1958).
10. Boguth, W.; Habermatz, F. und Schnappauf, H. P.: Papierelektrophoretische bestimmung der proteingebundenen iohlenhydrate im serum von haus-und laboratoriumstierem. Sen- tralblatt für Veterinärmedizin, 4 (10), 901 (1959).
11. Perk, K. and Lobl, K.: A comparative study on the sera proteins and lipids in two breeds of cattle. The British Veterinary Journal, 115 (11): 411 (1959).
12. Sainz Sainz; Pardo, O. y Laglera, A.: Investigación de las proteínas del suero sanguíneo de los rumiantes por electroforesis en papel. XVI Congreso Mundial de Veterinaria, 2: 131 (1959).
13. Vesselinovich, S. D.: The analysis of serum proteins of domestic animals by filter-paper electrophoresis. A review. The Cornell Veterinarian, 49: 82 (1959).
14. Masselin, J. N.; Monesiglio, J. C.; Chiavalle, A. M. y Garcia, N. N.: Electroforesis sobre papel a alta presión y voltaje. Su aplicación al fraccionamiento de proteínas séricas de sueros bovinos normales. Rev. de Investigaciones Ganaderas, 12: 197 (1961).
15. Mazzini, C. A. y Frattini, J. F.: Estudio químico y electroforético en sueros sanguíneos de bovinos normales. IIº Congreso Nacional de Veterinaria, Buenos Aires, 185 (1961).
16. Garrido Contreras, A.: Investigaciones electroforéticas e inmunolectroforéticas del suero sanguíneo de las especies ruminantes domésticas. Archivos de Zootecnia, 16 (63): 257 (1967).
17. Irfan, M.: The electrophoretic pattern of serum proteins in normal animals. Research in Veterinary Science, 8 (2): 137 (1967).
18. Rollier, J. et al.: Laboratoire et Diagnostic en Médecine Vétérinaire. Paris, Vigot (1968).

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL GRUPO LEUCOSIS - SARCOMA

I. *Aislamiento y mantenimiento de células L-R (*)*

Por Alejandro A. Schudel (1) y B. R. Burmester (2)

R E S U M E N

Se describe el aislamiento y mantenimiento de células L-R.

Las células L-R resultan de la infección solitaria de una partícula viral de virus de Sarcoma de Rous, parcialmente defectiva, a una célula susceptible, en ausencia de infección simultáneamente por un virus ayudante o asociado.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LEUCOSIS/SARCOMA GROUP OF VIRUSES

I. *Isolation and maintenance of L-R cells*

S U M M A R Y

The isolation and maintenance of the L-R cells was described.

L-R cells are the result of a solitary infection of a single Rous Sarcoma partially defective particle, to a susceptible cell in the absence of a simultaneous infection by an helper virus.

(*) Trabajo realizado como Becario Externo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina; en el Regional Poultry Research Laboratory U. S. D. A. East Lansing Michigan U. S. A. Parte del trabajo de Tesis para optar al título de Magister Scientiae en Patología Animal. Presentado en las V Jornadas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata.

(1) Médico Veterinario, Magister Scientiae en Patología Animal. Jefe de Trabajos Prácticos Interino de la Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(2) Director del Regional Poultry Research Laboratory. Agricultural Research Service, U. S. D. A. East Lansing, Michigan U. S. A.

A N T E C E D E N T E S

Virus Tumorales Aviares Defectivos

H. Temin en 1963 (20) y Hanafusa en 1963 (5), demostraron las características defectivas de la cepa Bryan High Titer de Virus de Sarcoma de Rous. Entiéndase por defectividad la pérdida de alguna de las funciones vitales que impiden la producción de partículas virales completas.

Cuando un fibroblasto de embrión de pollo es infectado con una sola partícula viral defectiva de virus de Sarcoma de Rous, se transforma y comienza a dividirse, formando focos de células redondeadas y retráctiles. Sin embargo, no se registra producción de virus infeccioso similar al virus infectante. Por esta razón, en ausencia de producción de virus detectable, fueron llamadas *non producer cells*, células no productoras o simplemente NP.

La sobreinfección de estas células NP con cualquiera de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma, da lugar a la producción de partículas virales infecciosas, correspondientes a la multiplicación del virus de leucosis, llamado en este caso ayudante, por la síntesis de su envoltura externa.

La propiedad atribuida al virus ayudante, es la habilidad de proveer durante la infección a la célula NP, de la cubierta externa al virus de Sarcoma de Rous defectivo, produciéndose la salida de ambos; pero el virus de Sarcoma de Rous defectivo poseerá ahora las mismas características antigénicas que su virus ayudante, pues de él tomará su cubierta externa y, por lo tanto, sus características antigénicas de tipo.

La actividad del virus ayudante en la síntesis de virus completo de Sarcoma de Rous defectivo, es la base del test de células NP o L-R descriptas en este manuscrito.

La presencia de Virus de Rous Asociado (RAV) (Rous Associated Virus) en los stocks de Virus de Sarcoma de Rous, explica la necesidad de las par-

tículas defectivas de Virus de Sarcoma de Rous, de proveerse de la ayuda necesaria para la multiplicación completa de la partícula viral.

El virus ayudante es necesario en los periodos finales de la síntesis viral, Hanafusa 1964 (6) y Vogt 1964 (83). Las células no productoras (L-R) no contienen antígenos de tipo, pero sí se transforman. Cuando el virus ayudante es adicionado a la preparación, aparecen los antígenos de tipo, del virus ayudante a nivel de la membrana celular. Los virus de Sarcoma de Rous que adquieren sus antígenos específicos de tipo, de su virus ayudante, son conocidos como Pseudotipos. Este antígeno de tipo, es adquirido por el pseudotipo de RSV, no por la síntesis de su genome sino obedeciendo a la síntesis del genome del virus ayudante e integrado a su cubierta externa, por mezcla fenotípica.

La ausencia de producción de virus infeccioso por parte de las células NP, ha sido recientemente sujeta a una extensiva reevaluación.

Por estudios de microscopía electrónica, se observa la presencia de partículas virales semejantes a la del grupo Leucosis/Sarcoma (Duogherty y Di Stéfano, 1965 (3), Courington y Vogt, 1967 (1)).

Estas partículas son capaces de infectar activamente células susceptibles, Weiss 1967 (25), Vogt 1967 (24), y se las llama RSV (0) por su inusual susceptibilidad de hospedador.

Los virus RSV (0), tienen una muy limitada especificidad de hospedador y no poseen relación antigénica con ninguno de los cuatro subgrupos de virus del grupo Leucosis/Sarcoma. Los distintos clones de células denominadas ahora L-R pueden producir dos tipos de RSV (0) llamados alfa y beta. El primero no posee hospedador susceptible y el segundo es fácilmente identificable por su capacidad de producir efectos citopatológicos en fibroblastos de embrión de perdis y

producir interferencia con los miembros del subgrupo B.

El descubrimiento de RSV (0) demuestra por lo tanto que el Virus de Sarcoma de Rous, no es completamente defectivo.

Replicación de virus de Sarcoma de Rous no defectivo en células L-R

En una revisión extensiva de la ultraestructura de células (fibroblastos de embrión de pollo) infectadas con una partícula defectiva de Virus de Sarcoma de Rous, células conocidas como NP Dougherty y Di Stéfano en 1965 (3), demostraron la existencia de partículas virales similares a las partículas del tipo C de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma.

El número de partículas virales en células NP es significativamente menor en células infectadas con multiplicación activa de virus, Courrington y Vogt 1967 (1), confirmado luego por Hagueneau y Hanafusa en 1968 (4).

Empleando métodos químicos, Robinson 1965 (15), demuestra la presencia de partículas virales en cultivo de tejido. Células NP en su fase activa de desarrollo, crecían en un medio con Timidina tritiada (3H) y el virus eliminado, presentaba una constante de sedimentación, similar a la del virus de Sarcoma de Rous infeccioso.

El RNA extraído de esta preparación sedimentaba al mismo gradiente que el virus de Sarcoma de Rous infeccioso. La cuantificación confirmó los resultados de Dougherty 1965 (3) y Courrington y Vogt 1967 (1), ya que la síntesis viral correspondía al 50 % del que una célula normalmente infecciosa produciría.

Las partículas recogidas del fluido sobrenadante, concentradas, produjeron formación de focos característicos en cultivo de tejido, Weiss 1967 (25), demostración que finalmente confirmó que el virus de Sarcoma de Rous no es defectivo.

Vogt en 1967 (24) aclara la confusión creada entre las propiedades defectivas del virus de Sarcoma de Rous.

Las partículas virales producidas por las células NP son llamadas RSV (0) para demostrar su independencia de virus Helper y poseen además una especificidad de hospedador muy particular y, al contrario de los demás subgrupos virales, la producción de focos en células C/O es altamente ineficiente. No es infeccioso para C/B y C/AB. Sin embargo, es infeccioso en C/A y escasas C/O. El hospedador de elección es el cultivo de fibroblastos de embrión de perdiz (Japanese Quail).

Por todas estas características RSV (0) no pertenece a ninguno de los cuatro subgrupos anteriormente descritos, ya que es infeccioso en C/A y C/O (escaso), mientras que los demás subgrupos virales poseen una eficiencia considerablemente mayor en C/O. Esta última característica, la de infectar sólo una pequeña proporción de C/O en cultivo de embriones individuales sugeriría una cierta selectividad dentro de las células C/O, ya que es lógico deducir que todas las células de un mismo embrión poseerán el mismo fenotipo celular.

La cantidad de RSV (0) producido por las células NP, es muy pequeña, del orden de 10^4 a 10^5 por cada 10^6 células NP. Sin embargo, son permeables al tratamiento con policaciones (DEAE-dextran), Hanafusa y Hanafusa 1968 (7).

La descripción de Virus de Sarcoma de Rous como defectivo, fue elaborada en conocimiento de su incapacidad de formar su cubierta externa al infectar una célula susceptible, siendo entonces necesaria la presencia de un virus ayudante para su salida. Si el virus de Sarcoma de Rous produce un virus de características antigénicas diferentes, pero que es infeccioso para un tipo celular distinto al de su progenitor y se multiplica sin la ayuda de un virus ayudante, no ha perdido ninguna función vital y no es defectivo.

El rol del virus Helper sería el de extender la susceptibilidad de hospedador del virus de Sarcoma de Rous

agregándole algunos determinantes a la estructura externa del mismo.

Resulta pues incorrecto utilizar el término defectivo para el virus de Sarcoma de Rous. Es inapropiado además, calificar de No Productoras a células que evidentemente producen virus infeccioso.

Hanafusa y Hanafusa sugieren en 1968 (7), cambiar la nomenclatura para las células NP y utilizando como modelo la terminología de bacteriófago, las denominan L-R (Leucosis negative Rous Cell).

No hay mayores diferencias entre las distintas variantes de virus de Sarcoma de Rous, en cuanto a su defectividad y parecería recomendable considerar a este virus como representado por una serie de variantes con diferentes susceptibilidades de hospedador.

Variantes

La mayor parte de las L-R producen virus infeccioso para C/A o células de embrión de perdiz, el resto no produce efecto citopatológico visible, Hanafusa y Hanafusa 1968 (7) y 1969 (8); Weiss 1969 (26-27).

Entre un cierto número de clones aislados de C/O infectados con BH-RSV-RAV-1, el 90 % de los clones producidos elabora RSV (0), con una susceptibilidad de hospedador similar a la descrita anteriormente. Sin embargo, un 10 % de los clones restantes no produce RSV (0) detectable por infectividad en ningún medio de todos los testados (aves, células, membrana corioalantoidea) aun en presencia de agentes que facilitan la penetración celular (policaciones). Cuando estos clones crecen en presencia de Timidina tritiada (3H), las partículas virales eliminadas poseen

un coeficiente de sedimentación en sacarosa, similar al virus de Sarcoma de Rous infeccioso.

Estas características establecen una clara diferenciación entre estas dos variantes, a la primera de las cuales, infecciosa para perdiz y C/A, se la denomina RSV (0) beta, y L-R beta las células L-R de donde provienen. En el segundo caso, al RSV (0) producido por clones que no manifiestan efecto citopatológico, se lo denomina RSV (0) alfa y los clones L-R de donde proviene L-R alfa.

Cada uno de los clones de L-R produce virus con las mismas características durante todo el período en que son testados, aun con la superinfección de estos clones con RAV-1, el pseudotipo viral producido será BH-RSV-RAV-1, si este virus es inoculado en C/O, y reaislado en clones de L-R, éstos serán 100 % productores de RSV (0) beta si el clon original era L-R beta; pero si el clon de L-R activado poseía características de L-R alfa, los clones reaislados luego de la activación con RAV 1 y clonado serán 80 % L-R alfa y 20 % beta.

El primer ejemplo es una clara indicación de la dependencia viral de la célula, como determinante del tipo viral producido, no así en el segundo caso, en el que RAV 1 interaccionaría con el genome celular, favoreciendo la aparición de una nueva variante viral.

Recientemente Hanafusa 1970 (8), demuestra la influencia celular en producción de variantes virales, considerándose nuevamente al hospedador como elemento importante en los mecanismos de multiplicación viral y no sólo el medio en el cual el virus puede replicarse y expresarse.

MATERIAL Y METODO

Origen del stock de virus

BH-RSV-RAV-1, obtenido por clonación de material tumoral inoculado en monocapa de fibroblastos de embrión de pollo de características fenotípicas C/O, propagado en mono-

capa de fibroblastos de embrión de pollo C/B, reclonado y propagado por pasaje de células en C/O, colectando el fluido sobrenadante a los 3-5-7 días postinfección.

La purificación del material viral se realizó de acuerdo a la técnica Moloney 1960 (11).

Titulado por la formación de focos de monocapas de fibroblastos de embrión de pollo C/O, el título del material viral es de 1×10^6 FFU (Unidad Formadora de Foco) por ml., Purchase y Okazaki 1964 (13). En el caso de aislamiento de NP se utilizaron diluciones logarítmicas de base 2 a partir de una concentración de 100 FFU por placa.

Las aves utilizadas para la producción de tumores, en el material original, provenían del programa SPF (grupo de aves mantenidas en condiciones de aislamiento), a fin de evitar contaminación con otros subgrupos de virus durante el período experimental (6 semanas).

Suero Hiperinmune

Obtenido por inoculación de BH-RSV-RAV-1, (400-4000 FFU) en el tejido subcutáneo del ala, en aves de 16 semanas de edad de línea 15 I.

Reinoculadas 3 semanas después con BH-RSV-RAV-1 (4000-40000 FFU) por vía endovenosa. Sangrados 7 días más tarde y titulados por el método de neutralización en placa.

Las aves utilizadas provienen del grupo SPF y se mantienen durante el término de la experiencia en estrictas condiciones de aislamiento, para evitar contaminaciones con otros virus y contar así con un suero monovalente altamente específico.

Inoculación en membrana corioalantoidea

En embriones de 7 días de edad, se practicó inoculación en membrana corioalantoidea (CAM), según la técnica descrita por Keogh 1938 (10).

La cantidad y calidad del inóculo, fue variable, de acuerdo al diseño experimental.

Se utilizaron embriones de 4 días de desarrollo de Línea 6, C/O, Línea 7 C/AB, Línea 1900, C/O, Línea 100, C/A, C/B y C/AB y embriones de perdiz (Japanese Quail).

Luego de inoculados, se mantienen en incubación por 13 días y se efectúa

la lectura de los pocks en membrana corioalantoidea, a los 18-20 días.

Inoculación en Perdiz (Japanese Quail)

Perdices (Japanese Quail) obtenidas, por gentileza del Poultry Department, Michigan State University, provenientes de una población heterogénea pero de buenas condiciones sanitarias.

Se inoculan en el ala con suspensiones virales a los dos días de edad.

Durante todo el período experimental (4 semanas) se mantienen en aisladores de tipo Horsfall.

Los embriones que se utilizan en cultivo de tejidos, son procesados entre 7-9 días de vida embrionaria.

Cultivo de células

Embriones de 10 días de edad, provenientes de las líneas del programa SPF, (RIF-COFAL-NP), de las distintas líneas de pollos mantenidas en este laboratorio y de acuerdo al fenotipo utilizado.

Para el aislamiento de células NP se utilizaron cultivos de fibroblastos de embrión de pollo de fenotipo C/O.

Los cultivos de fibroblastos de embrión de pato, fueron procesados a los 11 días de vida embrionaria y provienen de parvadas comerciales.

Todas las células primarias, se plantean en placas de 150 x 25 mm, de donde se originan las secundarias que se utilizaron a lo largo de todos los modelos experimentales.

Medios de Cultivo

Solución Stock

Medio 199; Morgan 10x, con 1-glutamina, sin NaHCO_3 .

Mezcla Nutriente F10, 10x (Hanks) con 1-glutamina, sin NaHCO_3 .

Caldo Triptosa Fosfato, (TPB) 29.5 gm de TPB deshidratada (Difco) en c.s.p. 1.000 cc de agua destilada, esterilizada en autoclave.

Penicilina/Estreptomocina; 1.000.000 unidades por mililitro.

Micostatin; 50 unidades por mililitro.

Aislamiento, Propagación y Preservación de las células L-R

Aislamiento:

Co-cultivos de fibroblastos de embrión de pollo secundarios y fibroblastos de embrión de pato secundarios, en una proporción de 1/100 a 1/300, se siembran en placa de petri de 60 x 15 mm, en una concentración de 1.2×10^6 células por placa; son infectadas con 0.2 ml de BH-RSV-RAV-1 en diluciones logarítmicas de base 2 a fin de obtener de 1-50 focos por placa.

Se mantienen en incubación en cámara húmeda a 37°C o 40°C con 5 por ciento de CO₂. Luego de 16 horas el medio de crecimiento es reemplazado por una monocapa de agar con antisuero específico. A los 4 días post-inoculación se cubren con una nueva monocapa de agar.

En el periodo transcurrido entre el primer día post-infección y la segunda monocapa de agar, puede adicionarse 1cc de una dilución 1/10 de suero específico anti-BH-RSV-RAV-1.

Selección

A los 6 días post-infección, los focos aparecen característicos al microscopio y comienzan a ser macroscópicamente visibles a los 9 días.

La primera selección se realiza en base a la cantidad de focos por placa, de preferencia las que poseen de 1-10 focos por placa, seleccionando los que muestran mejor desarrollo, con centros no degenerados, bordes netos y sin focos satélites.

Clonado

Empleando un sacabocado estéril (uno por cada clon) se corta el agar y se circunscribe el foco a clonar. Con una pipeta Pasteur y vacío se elimina el agar por succión. Si el foco es firme, permanecerá adherido a la placa; en caso que quede adherido al agar se pone directamente este agar con las células del foco en un tubo con 0.5 de suero de ternero.

Para remover el foco de la placa, se deja caer una gota de tripsina 1 % diluida 1/20 o 1/50, cuidadosamente y usando una pipeta por cada orificio. Este procedimiento puede obviarse y remover las células directamente por raspado con una pipeta y la ayuda de PBS. En caso de utilizar tripsina, las placas se mantienen en incubador a 37° hasta observar que las células comienzan a redondearse. Entonces, con una pipeta Pasteur y con la ayuda de una pipeta de goma, se succiona y expelle cuidadosamente tratando de levantar la mayor cantidad de células posibles y el contenido de la pipeta se vierte en tubos conteniendo suero de ternero (0.5 cc) refrigerados en baño de hielo.

Propagación

Las células clonadas en la forma anterior se co-cultivan con fibroblastos de embrión de pato secundarios en placas de 60 x 15 mm, una placa para cada uno de los focos clonados. Se emplea medio de crecimiento. A las 24 horas se cambia el medio de crecimiento por medio de mantenimiento.

Los cultivos se mantienen bajo control constante, cambiando el medio de mantenimiento cada 48 horas, y controlando el crecimiento de las células clonadas.

Los clones que manifiestan un crecimiento rápido, son replatedos en co-cultivos con fibroblastos de embrión de pato secundario a una placa de 20 x 100 mm (3×10^6 fibroblastos frescos secundarios de pato), si el crecimiento es bueno; en caso contrario el cultivo mixto se hace en una placa de 60 x 15 mm con 1×10^6 fibroblastos de embrión de pato secundarios.

Las placas que no muestran buen crecimiento, que demuestran crecimientos aberrantes, se descartan inmediatamente. En cada pasaje se toma muestra del cultivo de tejido sobrenadante, para testar por producción de virus infeccioso. El test puede realizarse en CAM o en fibroblastos de embrión de pollo secundarios C/O.

Los pasajes se realizan cada tres o cuatro días, adicionando una porción de fibroblastos de pato secundarios en cada pasaje, e incrementando el número de placas sembradas.

Luego de 4 pasajes, los que muestran mejores características de crecimiento, pureza, velocidad de multiplicación y no son productores de RSV infeccioso y detectable por CAM o fibroblastos de embrión de pollo, se seleccionan definitivamente como L-R stock.

Preservación

Los clones así seleccionados, pueden usarse inmediatamente o bien preservarse, por congelación en Nitrógeno líquido.

Se tripsinizan con Tripsina 0.025 %, se centrifugan y resuspenden en me-

dio de crecimiento, se cuentan y se diluyen con medio de congelamiento a una concentración del doble de la final, bajo agitación permanente y en baño de hielo. La concentración final se mantiene en 5×10^6 a 1×10^7 .

Como el DMSO es muy tóxico para las células, las ampollas deben ser cerradas inmediatamente para no perder viabilidad celular, y se congelan a 1°C por minuto, hasta alcanzar -70°C; luego se transfiere a Nitrógeno líquido. En el proceso de congelamiento, se utilizó el Linde BF-4 Biological Freezing Equipment que produce un descenso controlado electrónicamente de 1°C por minuto, o recipientes metálicos con interior de asbesto en refrigeradoras de -70°C y luego de 16 horas se efectúa la transferencia a Nitrógeno líquido.

RESULTADOS

Aislamiento de Células L-R:

Fibroblastos de embrión de pollo de características fenotípicas C/O y fibroblastos de embrión de pato, en proporción de 1/100, procesados como células secundarias, tal como se detalla en Material y Método, fueron plateados en placas de Petri de 60 x 15 mm (Falcon) en número de 1.2×10^6 células por placa, se mantuvieron por 24 horas con 4 cc de medio de crecimiento para CEF en incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ controlada. Pasadas 24 horas, al obtenerse un buen cultivo en monocapa, se seleccionaron las mejores placas y se inocularon con BH-RSV-RAV-1, en diluciones de base 2, a fin de obtener aproximadamente 50, o menos Unidades Formadoras de Focos por placa. El inoculum se mantiene por 45', se lavan las células de la monocapa con PBS y se adiciona una capa de agar con antisuero. La segunda capa de agar se aplicó a los 4 días post-inoculación. Se controlaron las placas diariamente a fin de observar el desarrollo de los focos y su selección. A diez días se procedió al clonado de las células transformadas, y se cocultivaron con fibro-

blastos de embrión de pato en placas de 60 x 15 mm (1×10^6 por placas). Se mantuvieron en este primer pasaje hasta tanto las células L-R representaron un 10 % del cultivo total. Luego de lo cual se pasaron en un segundo pasaje a un cultivo mixto de fibroblastos de embrión de pollo C/O y fibroblastos de embrión de pato en placas medianas, con una cantidad total de 5×10^6 células por placas. El sobrenadante obtenido del primer pasaje se testó por inoculación en membrana corioalantoidea de embrión de pollo C/O y por inoculación en fibroblastos de embrión de pollo C/O.

Los sucesivos pasajes se realizaron en la forma descripta para el segundo, analizando luego de cada pasaje el líquido sobrenadante de los clones en forma individual en CAM y en fibroblastos de embrión de pollo C/O. Los resultados se tabulan en Tabla Nº 1.

El análisis del fluido sobrenadante resultó positivo desde el primer pasaje, en ambos sistemas de test.

Resultó ligeramente más susceptible membrana corioalantoidea que Fibroblastos de embrión de pollo, esto ya

ha sido publicado anteriormente, Crittenden, Reamer y Okazaki 1967 (2), pero en el segundo pasaje ya no hubo distinción en la susceptibilidad entre los dos sistemas debido a un incremento en la producción de RSV-RAV-1.

El paso siguiente consistió en determinar el origen de la contaminación con Virus Asociado de Rous, que produjo la activación del virus defectivo. Dos hipótesis se testaron: la primera, la posibilidad de que las células empleadas para el clonado estuvieran contaminadas con RAV (o LL) que como se sabe se transmite en forma congénita a través del embrión, y la segunda, una falla en la actividad del suero neutralizante.

Para testar la primera de las hipótesis se tomó una muestra de fibroblastos de embrión de pollo del mismo origen (preparado a partir del mismo cultivo original y congelado en Nitrógeno como control y se propagó por tres pasajes sucesivos; se congeló con CO₂ y acetona y descongeló tres veces, para romper las membranas celulares y dejar en libertad las posibles partículas virales; se centrifugó a 2.000 g por 18 minutos para eliminar restos celulares y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a

4°C por 45 minutos a 45.000 g; se resuspendió el pellet en citrato de potasio 0.05 M, y se inocularon células L-R (línea 25) de características de activación específica y ya controlada. El resultado fue negativo, como era de presumir, pues los embriones provienen del grupo SPF son testados dos veces al año, por la existencia de anticuerpos o virus de LL, a los que resultaron negativos. Por lo tanto, no es posible la transmisión vertical de la enfermedad.

La segunda hipótesis parecía más factible, pues es muy raro que una contaminación con Virus Asociado de Rous durante la propagación pudiera ocurrir en todas las placas al mismo tiempo cuando, como en estos casos se extreman las medidas para evitar contaminación con virus del grupo Leucosis Sarcoma. Retestadas las propiedades neutralizantes, lo que se supone como causa del efecto anteriormente mencionado) se observó una pérdida de título. Además el pseudotipo BH-RSV producido por todos los clones correspondió al subgrupo A, por inoculación en fibroblastos de pollo de distintas características fenotípicas, tal como se detalla en tabla 1 (última columna, RSV pseudotipo).

TABLA Nº 1

PRIMER AISLAMIENTO DE L-R

Scores de 1-20 % de acuerdo al crecimiento de L-R)

Nº de Clon	Dilución de virus	Primer pasaje			Segundo pasaje			Tercer pasaje			RSV Pseudotipo
		L-R	CAM	CEF	L-R	CAM	CEF	L-R	CAM	CEF	
1	1/2×10 ⁻⁵	10	+	+	20	+	+	20	+	+	A
2	1/2×10 ⁻⁵	10	+	+	20	+	+	20	+	+	A
3	1/2×10 ⁻⁵	10	+	+	20	+	+	20	+	+	A
4	1/2×10 ⁻⁴	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
5	1/8×10 ⁻⁵	10	+	+	20	+	--	20	+	+	A
6	1/8×10 ⁻⁵	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
7	1/8×10 ⁻⁵	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
8	10 ⁻⁶	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
9	10 ⁻⁶	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
10	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
11	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
12	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
13	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
14	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
15	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
16	10 ⁻⁶	0	+	--	20	+	+	20	+	+	A
17	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
18	10 ⁻⁶	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
19	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
20	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
21	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
22	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	--	20	+	+	A
23	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
24	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
25	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A

L-R — Células de Rous Leucosis negativa.

CAM — Membrana Corioalantoidea.

CEF — Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo.

Un segundo intento de clonado fue realizado en forma periódica, partiendo de placas inoculadas en la misma forma que en el experimento anterior, pero colectando los focos a distintos tiempos a razón de 5 clonados semanales.

En este segundo intento se utilizó un suero de probada efectividad neutralizante (10³ unidades neutralizantes contra 4x10² FFU). En total se aislaron 25 clones a partir de distintas placas, de los cuales, luego de cuatro pasajes, se seleccionaron dos

por su capacidad de propagación y multiplicación en cocultivo. Los resultados se detallan en Tabla Nº 2. Fotografía Nº 1.

Tal como se observa en Tabla Nº 2, la mayoría de los focos resultó no productor de virus identificable en el sistema testado, 20/25, tres resultaron contaminados en el transcurso de los pasajes y se seleccionó finalmente a los clones Nº 14 y Nº 23 para proseguir la fase de activación. Los demás fueron congelados y posteriormente descartados pues el grado de

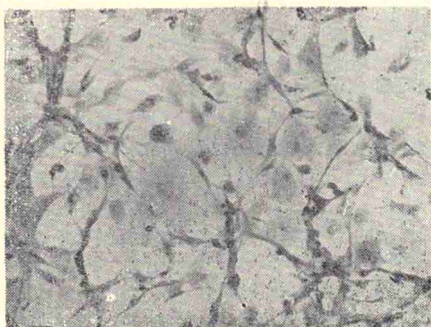


Foto N° 1

propagación disminuyó luego de cuatro pasajes, presumiblemente por la pérdida de la capacidad de reproducción luego del congelamiento. Fotografía N° 2.

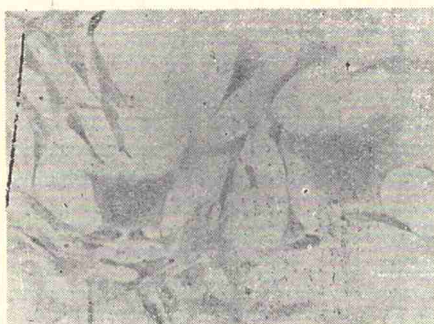


Foto N° 2

Los cuatro clones que resultaron productores, fueron testados para identificar el pseudotipo al que res-

pondían luego de la producción de virus completo e infeccioso: todos, sin excepción, correspondían al subgrupo A.

En este caso, es muy difícil identificar si se debió a un contaminante o a una infección simultánea a las células susceptibles por parte del virus ayudante y el virus defectivo de Sarcoma de Rous. Los sucesivos pasajes de los clones N° 14 y N° 23 a fin de incrementar su cantidad, se realizaron en placas de 150 x 25 mm. sembradas en cultivos mixtos con fibroblastos de embrión de pato frescos en cada pasaje. El 7° pasaje del clon 23 resultó infeccioso en condiciones de cultivo, ya que producía focos en fibroblastos de embrión de pollo C/O, no se llevó a cabo ninguna prueba de identificación de pseudotipo viral involucrado, aunque parece deducible la producción de RSV (0) beta por estas células, ya que no activaba células L-R de características Standar (L-25) y no infectaba fibroblastos C/B, aunque todas estas pruebas resultan inconclusivas, ya que no puede excluirse la presencia de un contaminante del subgrupo B. Los resultados que se reportan en este manuscrito con el clon N° 23, corresponden a los obtenidos previo al comienzo de su actividad productora, o presumiblemente productora, es decir entre el cuarto y sexto pasaje.

TABLA N° 2

SEGUNDO INTENTO DE AISLAMIENTO DE L-R

Clon N°	Primer pasaje			Segundo pasaje			Tercer pasaje			Cuarto pasaje		
	%	L-R	CAM CEF	%	L-R	CAM CEF	%	L-R	CAM CEF	%	L-R	CAM CEF
1	0	—	No test	10	—	—	Contaminado					
2	0	No test	No test	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
3	0	No test	No test	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
4	10	—	—	10	—	—	10	—	—	Confl. — —		
5	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
6	0	—	—	0	—	—	20	—	—	Confl. — —		
7	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Confl. — —		
8	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
9	20	—	—	10	—	—	10	—	—	20 — —		
10	20	—	—	10	—	—	20	—	—	20 — —		
11	0	—	—	10	—	—	20	—	—	20 — —		
12	10	—	—	20	+	±	Descartado por prod. de RSV-RAV-A					
13	10	—	—	10	—	—	Confl.	—	—	20 — —		
14	10	—	—	10	—	—	Confl.	—	—	Confl. — —		
15	10	—	—	10	—	—	Contaminado con E. coli					
16	10	—	—	10	—	—	Contaminado con E. coli					
17	10	—	—	10	—	—	Confl.	—	—	Confl. — —		
18	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
19	10	+	—	10	+	+	Confl. Desc. por prod. de RSV-A					
20	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
21	0	+	+	10	+	+	Desc. por productor de RSV-A					
22	10	—	—	10	—	—	Confl.	—	—	Confl. — —		
23	10	—	—	10	—	—	Lento — —					
24	10	—	—	10	+	—	20	+	+	Desc. por p. RSV-A		
25	0	—	—	Confl.	+	—	Confl.	+	+	Desc. por p. RSV-A		

No test: No testado.

Confl.: Confluente.

L-R: Célula de Rous, Leucosis negativa.

CAM: Membrana Corioalantoidea.

CEF: Cultivo de Fibroblastos de embrión de pollo.

Antes de someter los clones aislados a pruebas experimentales se los sometió a una última experiencia en la que se trató de determinar las características celulares, con respecto a la producción de virus no infeccioso, RSV (0). Para ello se utilizaron fibroblastos de embrión de pollo de características fenotípicas conocidas, C/AB, C/A y C/B y fibroblastos de embrión de perdiz (Japanese). Todos

se procesaron en la forma standard y se platearon en placas de 60 x 15 mm. en forma individual. A las 24 horas luego de la siembra, fueron infectadas por 45', con fluido sobrenadante del cultivo de clon N° 14 y N° 23, previamente centrifugado a 40.000 g. por 1 hs. y resuspendido el pellet en citrato de potasio 0.05 M. Los resultados se tabulan en la Tabla N° 3 (A).

Simultáneamente se inocularon con el mismo material que en el experimento anterior, embriones de pollo y embriones de perdiz de 7 días, en membrana coriolantoidea. Tabla número 3 (B).

La inoculación se repitió en perdiz de 2 días de edad mantenida en estricto aislamiento. Tabla número 3 (C).

Ninguno de los clones testados demostró bajos condiciones experimentales empleadas, la producción de focos o tumores, luego de inocu-

lados en fibroblastos, embriones de perdiz, esto significa que si bien estas células pueden producir virus, no es infeccioso en las condiciones rutinarias de test. Además, el RVS (0) testado, recibido por cortesía del doctor Vogt, probablemente corresponda al variante Beta del virus Sarcoma de Rous, aunque sería necesario hacer más pruebas experimentales a fin de comprobar las características antigénicas, relacionadas con su envoltura externa.

TABLA Nº 3

CARACTERIZACION DEL VIRUS NO DEFECTIVO DE SARCOMA DE ROUS

A—

Cultivo de tejidos celulares (formación de focos)

Muestra	Fonotipo celular				
	C/O	C/AB	C/A	C/B	Quail
Nº 14	—	--	--	--	--
Nº 23	—	--	--	--	--
BH-RSV-RAV-1	X	--	--	X	X
RSV (0)	—	--	X	—	X

B

Inoculación en membrana corioalantoidea (cuenta de pocks)

Muestra	C/O	C/AB	C/A	C/B
Nº 14	0/5	0/5	0/5	0/5
Nº 23	0/5	0/5	0/5	0/5
RSV (0)	0/5	0/3	1/4	NT
BH-RSV-RAV-1	5/5	0/3	0/1	4/5
BH-RSV-RAV-2	3/3	0/2	3/3	NT

C—

Inoculación de perdiz (respuesta tumoral)

Muestra	Tumor/Inoculados
BH-RSV-RAV-1	2/2
RSV (0)	2/2
Nº 14	0/2
Nº 23	0/2

DISCUSION

Por los resultados obtenidos es fácil observar que no existen dificultades en el aislamiento de clones de células L-R (llamadas formalmente NP, non producers) resultado de la inoculación de un virus defectivo de Sarcoma de Rous, con diluciones cercanas al punto final (cuando la eficiencia del planteo casi es mínima). En el segundo experimento de aislamiento se observa que resultaron productores 5/25 clones aislados. La selección posterior se efectuó en base a la capacidad de propagación de las células L-R.

El significado funcional de las células L-R, es motivo del más intensivo estudio, no sólo en el sistema de virus del grupo Leucosis/Sarcoma, sino en los tumores a partículas virales de tipo C, en laucha y gato, donde la defectividad de las capas virales y la producción de células no productoras del tipo L-R ha sido recientemente reportado, O'Connor (sin publicar). En este sistema, el virus de leucemia felina (FLV) actúa como ayudante del virus de Sarcoma de laucha (MSV). Este fenómeno es tan interesante como el de formación de agregados virales físicos entre el virus de Sarcoma de laucha MSV y FLV, luego de ultracentrifugación, es decir en forma de agregados físicos, probablemente obedeciendo a las leyes generales de coloides.

La necesidad de una intensa síntesis de DNA celular inmediatamente después de la infección por parte de estos virus, y su mantenimiento por lo menos por las primeras 8 horas luego de la infección y los resultados de Payne en 1968 (12) de la existencia de un antígeno que reacciona en el test de COFAL, en una línea de pollos susceptible y su ausencia en una línea resistente y su segregación en forma de alelo mendeliano autosómico dominante complican la interpretación de los mecanismos de multiplicación viral y el significado de la presencia de un antígeno viral específico de grupo.

Si sumamos a ello la determinación de la importancia del material celular en la síntesis viral, determinada por Hanafusa 1969 (8), en el cual la célula juega un papel importante en la interrelación virus-célula, no sólo el lugar donde el virus utiliza la maquinaria necesaria para su síntesis. Recientemente una nueva hipótesis sobre carcinogénesis viral, ha sido propuesta por Huebner 1970 (9) en la cual una parte del material genético viral, el oncogene, actuaría reprimiendo la célula en su transformación oncogénica, la infección viral activaría la desrepresión del oncogene y la transformación celular. Si relacionamos todos estos conocimientos con la teoría propuesta por Temin en 1966

(21) sobre la existencia de provirus de Sarcoma de Rous, que podría ser una forma replicativa intermedia, una proteína, una enzima o material existente, faltando sólo determinar, cuál es la forma replicativa, si existe, dónde y cómo actúa, y las interrelaciones virus-células al nivel molecular.

¿Cómo se relacionan estos conocimientos con las células LR, y qué tienen que ver estas células con el mecanismo de carcinogénesis?

Dijimos en la revisión de literatura, que una característica importante de estas células es que producen virus de características diferentes al virus infectante. ¿Cómo se produce esta transformación viral? Indudablemente la única posibilidad factible es la influencia del genotipo celular, ya que el virus infectante no puede ser pues es defectivo y pese a multiplicarse no es eliminado y no hay cambios antigénicos a nivel de la membrana celular. Además, el RSV (0) producido no es detectado previo a la infección. Es indudable que las células, con su material genético aporten mucho más a la naturaleza del nuevo virus, que la maquinaria de síntesis.

Es posible pues, que la existencia o la ausencia de esta forma replicativa (si existe), juegue un papel im-

portante en la síntesis del fenotipo no defectivo del virus de Sarcoma de Rous.

El segundo interrogante depara aún más preguntas que las que admite responder. El mecanismo de carcinogénesis es prácticamente desconocido, pero hay una serie de características celulares que indican la aparición de cambios relacionados con carcinogénesis, luego de la infección viral, ya sea cambios enzimáticos, síntesis de nuevas proteínas o enzimas y, transformación. La síntesis de antígeno Gs. luego de la infección y su presencia en líneas de pollos normales, en las células L-R y en el genome de los virus defectivos y no defectivos de Sarcoma de Rous, es otra indicación de interrelación entre el genome celular y el mecanismo de carcinogénesis. Qué papel podría asignarse a la presencia de antígeno Gs. en células normales Payne 1968 (12) sino el de desrepressor del genome viral integrado (oncogene), por supuesto que esta suposición es de tipo hipotético. Es posible que en un futuro no muy lejano, el desrepressor la forma replicativa, o el provirus enunciado por Temin en 1966 (21) será hallado y tendremos entonces más argumentos para analizar el mecanismo de carcinogénesis y sus implicancias.

B I B L I O G R A F I A

1. *Courrington, C. and Vogt, P. K.* Electron microscopy of chick fibroblast infected by defective RSV and its Helper. *J. Virology* Nº 1, 400-414. 1967.
2. *Crittenden, L.; Reamer, R. and Okazaki, W.* Two loci controlling Cellular resistance to Avian Leucosis/Sarcoma Viruses. *Virology* 5, 898-904. 1967.
3. *Dougherty, R. M. and Di Stefano, H. S.* Virus particles associated with nonproducers Rous Sarcoma cells. *Virology*, 27-451. 1965.
4. *Hagueneau, F. and Hanafusa, H. A.* Quantitative Electron Microscope study of the virus released from a cells infected with RSV. *Virology*, 34-275. 1969.
5. *Hanafusa, H.; Hanafusa, T. and Rubin, H.* The defectiveness of RSV *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 49, 572-580. 1963.
6. *Hanafusa, H.* Analisis of the defectiveness of RSV 1-Characterization of the helper virus. *Virology* 22, 591-601. 1964.
7. *Hanafusa, H. and Hanafusa, T.* Further studies of RSV production from transformed cells. *Virology* 34. 1968.
8. *Hanafusa, T.; Miyamoto T. and Hanafusa, H.* Type of chick embryo cell that fails to support formation of infections RSV. *Virology* 40, 55-64. 1969.
9. *Huebner, R. J. and Todaro, G.* Tumor Viruses as Determinants of cancer. *P. N. Acad. Science US* 64, Nº 3. 1969.
10. *Keogh, E. V.* Ectodermal Lesions Produced by the virus of Sarcoma de Rous. *Brith. J. Exptl. Path.* 19, 1-8. 1938.
11. *Moloney, J. B.* Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from sarcoma 32. 1-Rigen and introductory investigations *J. Nat. Cam. Inst. Vol.* 24, Nº 4, 933-951. 1960.
12. *Payne, L. N. and Chubb, R. C.* Studies on the nature and genetic control of an antigen

- in normal chick embryos with results in the COFAL test, *J. Gen Virol* 3, 379-389. 1963.
13. *Purchase, G., Okazaki, W.* Morphology of foci produced by Standard preparations of RSV *J. nat. Can. Inst. Vol. 32, N° 2, 579-591. 1964.*
 14. *Rispens, B.; Long, P. L. and Okazaki, W. and Burmester B. R.* The NP activation test for assay of Avian Leukosis/Sarcoma viruses *Avian Diseases Vol. XIV N° 4, 1970.*
 15. *Robinson, W. S.; Pitkanen, A. and Rubin, N.* The nucleic acid of the Bryan strain of Rous Sarcoma Virus Purification of the virus and isolation of the nucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Science U. S., 54, 137-144. 1965.*
 16. *Rubin, H.* A virus in chick embryo wich induces resistance in vitro to infection with RSV *Proc. Natl. Acad. Sci. US 46, 1105-1119. 1960.*
 17. *Rubin, H. Vogt, P. K.* An Avian Leucosis Virus Associated with Stocks of RSV. *Virology* 17, 184-194. 1962.
 18. *Sarma, P.; Tuerner, H. and Huebner, R. J.* An Avian Leucosis group specific complement fixation reaction. Application for the detection and Assay of non-cytopathogenic Leucosis virus. *Virology* 23, 313-321. 1964.
 19. *Sarma, P.; Vess, W.; Huebner, R. J.* Evidence for the invitro transfer of defective RSV fenome from Hamster tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Science U. S. Vol. 55, N° 6, pp. 1435-1442. 1966.*
 20. *Temin, H.* Further evidence for a converted, non virus producing state of RSV infected cells. *Virology* 20, 235-245. 1963.
 21. *Temin, H.* Nature of the provirus of Rous Sarcoma Virus. 1966.
 22. *Vogt, P. K.; Rubin, H.* Localization of infections virus and viral antigens in chick fibroblasts during successive Stages of infection with RSV. *Virology* 13, 528-544. 1961.
 23. *Vogt, P. K.* Flourescent microscopic observations on the defectiveness of RSV *J. N. Cancer Inst. Monograph* 17, 527-541. 1964.
 24. *Vogt, P. K.* A virus released by non producing RS cells. *Proc. Nat. A a. S. i. U. S. A. 58, 101. 1967.*
 25. *Weiss, R. A.* Spontaneous virus production from non-virus producing RS cell. *Virology* 32, 719. 1967.
 26. *Weiss, R. A.* The host range of Bryan Strain RSV synthetized in absence of helper virus. *J. Gen. Virology* 5, 511-528. 1969.
 27. *Weiss, R. A.* Interference and Neutralization Studies with Bryan Strain Rous Sarcoma Virus in the absence of helper virus. *J. Gen. Vir. 5, 529-539. 1969.*

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL GRUPO LEUCOSIS - SARCOMA

II — Activación y ensayo de células L - R (*)

Por Alejandro A. Schudel (1) y B. R. Burmester (2)

R E S U M E N

Las células L-R descritas en este trabajo, se obtuvieron por la inoculación de RSV parcialmente defectivo en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo C/O. Bajo las condiciones empleadas en este sistema de test no se obtuvo la misma respuesta a los tres diferentes subgrupos virales del grupo Leucosis/Sarcoma que fueron testados. Queda por determinar si esta diferencia, es debida a las características de las cepas virales empleadas, a las células en que se realizó el ensayo o es una característica de los clones empleados en esta experiencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos no hay ningún tipo de interferencia a falla en la sensibilidad en el test empleado, por la producción de RSV (0) si es que se produce.

La reproductibilidad de los resultados, la facilidad con que se realiza el test, el corto periodo de tiempo empleado, comparado con otros métodos y la simpleza del test, hacen de esta metodología un instrumento con grandes posibilidades de aplicación en la práctica del laboratorio de diagnóstico.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LEUCOSIS/SARCOMA GROUP OF VIRUSES

II. Activation and essay of L-R cells

The L-R cells described here were originated from C/O chick embryo fibroblast and the virus produced after their activation was assayed in C/O fibroblasts. The fibroblast came from RIF free SPF flock.

Under the conditions described here, the clones of L-R cells isolated did not show similar susceptibility to the different virus subgroup tested. Where this phenomenon was due to the susceptibility of the clones, the assay cells system used, or the strain of virus tested, was not determined.

The results obtained with samples from field conditions and experimentally inoculated birds, showed that in this procedure the system of testing the RSV (0) production by the L-R cells (if any), did not interfere in the system, nor with the sensitivity of the test.

(*) Trabajo realizado como Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, en el Regional Poultry Research Laboratory - East Lansing Michigan U. S. A.
Presentado en las Segundas Jornadas Argentinas de Microbiología.

(1) Jefe de Trabajos Prácticos - Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

(2) Director del Regional Poultry Research Laboratory. Agricultural Research Service. U. S. D. A. East Lansing. Michigan U. S. A.

A N T E C E D E N T E S

Con la descripción del test de RIF (Resistance Inducing Factor) por Rubin en 1960 (5) y el test de COFAL (Complement Fixation Avian Leucosis) por Sarma en 1964 (8) conocemos que los virus del grupo Leucosis/Sarcoma del Complejo Leucósico Aviar son RIF positivos, poseen un antígeno fijador de complemento común y están estructuralmente relacionados al grupo myxovirus (RNA), específicamente al grupo Leukovirus según la última clasificación tentativa de Melnik en 1969.

Los test anteriormente mencionados son complicados e incompatibles con la aplicación con fines prácticos. El test de RIF no es sensitivo en forma diferencial a los distintos subgrupos virales y exige técnicas altamente especializadas. El test de COFAL, por otra parte, pese a detectar todos los miembros de los distintos subgrupos virales, exige el uso de sueros altamente específicos, no siempre fáciles de obtener, dificultades con falsos positivos (efectos anticomplementarios) y un largo periodo de cultivo previo al test.

Algunos investigadores presentan la posibilidad de un test de Fluorescencia específica de subgrupo; pero en condiciones prácticas experimenta-

rias dificultades, que hacen difícil su aplicación, Rubin y Vogt 1962 (6), Vogt y Rubin 1961 (9).

Las células No Productoras (NP) (Non Producers) llamadas correctamente Células de Rous, Leucosis negativas (L-R) (Leucosis negative Rous Cell) que ya han sido descritas, Rispens (4), Schudel (7), son activadas por la superinfección de un virus ayudante (L. Linfoidea). La detección del RSV ahora producido, se realiza por la inoculación y formación de pocks en membrana corioalantoidea de embriones susceptibles, inoculación y formación de tumores en pollos susceptibles o finalmente por inoculación y formación de focos citopatogénicos en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo. (Rispens, Long, Okazaki, en prensa (4)).

Estas células L-R producen RSV (0) no defectivo, y no detectable en los medios comunes de ensayo. Por lo tanto, no entorpece el sistema de test.

El presente trabajo tratará de explicar el mecanismo de activación y ensayo de células L-R para su utilización como sistema práctico y aplicable en la detección de virus del grupo Leucosis/Sarcoma.

MATERIAL Y METODO

Origen de las células L-R: su aislamiento y propagación han sido ya descritos, Schudel (7).

Origen de las capas virales: RAV-1, RAV-2 y RAV-50 corresponden a material aislado a partir de BH-RSV-RAV-1, BH-RSV-RAV-2 y BH-RSV-RAV-50 por la técnica de Moloney (3). Propagados luego en fibroblastos C/O.

Cultivos de células: Se utilizaron cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, provenientes del programa SPF, RIF—, COFAL— y NP—.

ACTIVACION Y ENSAYO DE CELULAS L-R

Activación: Se extrajeron las ampollas del Nitrógeno se propagan en cocultivo con fibroblastos secundarios de embrión de pollo y de pato en un radio de 1/1, en placas de 50 x 125 mm., una ampolla con 5 x 16⁶ células por cada placa.

Si el crecimiento es rápido, se realizan tantos pasajes como sea necesario para propagarlas en gran cantidad y realizar el test de activación.

La activación de las L-R, puede ser realizada con material proveniente de

suelo, extracto de embrión, biopsia, etcétera, en condiciones de esterilidad que no comprometan al crecimiento celular. Se siembran 5 x 10⁶ células en placas de 60 x 15 mm. con medio de crecimiento y se incuban por 24 horas. Luego de este tiempo, se obtiene una buena monocapa celular que es infectada con la muestra a testar por 45', luego de los cuales se adiciona medio de mantenimiento y se dejan en incubación por un período de 9 días, tomando muestras del sobrenadante en el período entre los 3 y 9 días.

Ensayo: El material sobrenadante colectado en la fase de activación a los 3, 5, 6 y 7 días, se centrifugó a 2.000 g. por 20', o se congela y descongela tres veces sucesivas, luego se centrifuga a 2.000 g. por 20'. El objeto es liberar la mayor cantidad de virus posible y tener un sobrenadante libre de elementos celulares. Un centímetro cúbico de este material es inoculado en una monocapa de fibro-

blastos de embrión de pollo C/O. ó 0,1 cc en membrana corioalantoidea de embrión de pollo.

Luego de sembrado el inoculum, se deja contacto con monocapa por 45', y se cubre el cultivo con una monocapa de agar 3 %, adicionando medio de mantenimiento a los tres días post-inoculación. En caso de efectuar lectura macroscópica, se necesitan monocapas de agar a los 3 y 7 días.

La lectura de los focos se realiza en forma microscópica a los 7 días luego de inoculación, y a los 11 días en forma macroscópica.

Material problema: Los macerados de embriones de 11 días, se trituraron, congelaron y descongelaron dos veces, resuspendiendo con medio de cultivo de crecimiento y se centrifugó a 4.000 g., 20' tomando el sobrenadante como inoculum.

El suero provenía de aves inoculadas experimentalmente con la capa RPL₁₂ y se procesó a las 24 horas luego de la sangría.

RESULTADOS

A fin de testar la susceptibilidad a los distintos subgrupos virales se tomó una ampolla del clon N° 23 de células L-R y se repicó en cocultivo con fibroblastos de embrión de pollo y fibroblastos de embrión de pato. Los resultados se detallan en Tabla N° 1.

Se activaron a las 24 horas de platedas con RAV-1 perteneciente al subgrupo A; RAV-2 perteneciente al subgrupo B; RAV-50 perteneciente al subgrupo D; todos obtenidos en forma purificada e inoculados a las placas en diluciones logarítmicas de base 10. Los fibroblastos de pollo utilizados en los cocultivos, correspondían al fenotipo C/O. El medio de cultivo sobrenadante se cambió a los 3, 6 y 9 días. Con el sobrenadante extraído se testó por presencia de virus de Sarcoma de Rous completo en monocapas de fibroblastos de embrión de pollo C/O para testar por formación de focos,

se leyó por técnica de Adams o lectura macroscópica de los focos, luego de dos monocapas de agar.

Tal como se observa, hay una diferencia de susceptibilidad entre subgrupos A, B y D, probablemente debida a la disminución del título de RAV-50, refutado por el hecho de que aun a los 9 días hay diferencias en el título de ambos grupos virales, una real diferencia en susceptibilidad al subgrupo D, no atribuible a los fibroblastos C/O en los cuales se realiza en ensayo ya que éstos son susceptibles aun a subgrupos C y D sin dificultad.

Por la misma tabla podemos obtener datos con respecto al tiempo mínimo de activación en el cual, al recoger el sobrenadante el test fue sensible y por nuestros datos es entre los días 6 y 9 postinoculación. Lo que concuerda con Rispens, Long y Okazaki 1970 (4) que postulan 7 días.

TABLA N° 1

Activación y ensayo de Clon N° 23 de L-R

Dilución	RAV 1 Sub. Grup. A Días			RAV 2 Sub. Grup. B Días			RAV 3 Sub. Grup. D Días		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
10 ⁻¹	* CONF.	CONF.	CONF.	200	CONF.	CONF.	70	410	CONF.
10 ⁻²	1120	CONF.	CONF.	50	CONF.	CONF.	—	330	315
10 ⁻³	200	CONF.	CONF.	—	215	CONF.	—	90	315
10 ⁻⁴	30	CONF.	CONF.	—	95	CONF.	—	2	68
10 ⁻⁴	30	CONF.	CONF.	—	65	CONF.	—	—	—
10 ⁻⁵	3	CONF.	CONF.	—	3	295	—	—	—
10 ⁻⁶	—	410	CONF.	—	—	37	—	—	—
Control	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* CONF: Confluente.

Los resultados reportados se expresan en promedio por cada tres placas. Se llevaron a cabo pruebas de test de sensibilidad entre los dos clones seleccionados, pero en este caso sólo frente a un subgrupo viral, subgrupo A, por activación con RAV-1 purificado.

Los clones, luego del cuarto pasaje, se propagaron nuevamente en cocultivo con fibroblastos de embrión de pato y pollo, 1/1 luego de dos subcultivos con intervalo de tres días en cada uno, las L-R de ambos clones parecían estacionarias, por lo que se procedió a su activación. Para ello se plataron en placas pequeñas de 60 x 15 mm., se incubaron por 24 horas y se inocularon al día siguiente con las

diluciones de base 10 como se detalla en tabla N° 2, la muestra se tomó a los 3 - 5 - 7 días luego de la inoculación en la misma forma detallada anteriormente. El ensayo se llevó a cabo en fibroblastos de embrión de pollo C/O. Ver Tabla N° 2.

La inoculación de diluciones de log. de base 10 a cocultivos de fibroblastos de embrión de pollo y pato, y células L-R de los dos clones seleccionados, demuestra que no hay diferencias apreciables en la sensibilidad a la activación con RAV-1 perteneciente al subgrupo A de los virus de Leucosis/Sarcoma. Queda aún por determinar la sensibilidad selectiva de estos dos clones frente a miembros de otros subgrupos C o D.

TABLA Nº 2

Cuadro demostrativo de sensibilidad entre clon Nº 14 y Nº 23

Dil. de RAV - 1	Ensayo a los 8 días		Ensayo a los 5 días		Ensayo a los 7 días	
	Nº 14	Nº 23	Nº 14	Nº 23	Nº 14	Nº 23
10 ⁻¹	X	X	X	X	X	X
10 ⁻²	X	X	X	X	X	X
10 ⁻³	X	X	X	X	X	X
10 ⁻⁴	X	—	X	N.T.	X	X
10 ⁻⁵	—	—	X	X	X	X
10 ⁻⁶	—	—	X	X	X	X
10 ⁻⁷	—	—	X	—	X	X
Control	—	—	—	—	—	—

Para una mayor seguridad en la susceptibilidad a la activación, se comparó el clon Nº 23 con uno de los clones aislados en el laboratorio, por Rispens y Long, cuya denominación es L-25, en la misma forma que el experimento anterior, se inocularon con diluciones logarítmicas de RAV-1, tal como se detalla en Tabla Nº 3.

Como se observa, no hay una diferencia apreciable en la sensibilidad de ambas líneas, sobre todo considerando que el período de activación en condiciones de test Standard, es de 5 y 6 días, en este período, ambas líneas celulares responden en la misma forma.

TABLA Nº 3

Cuadro demostrativo de sensibilidad entre clon Nº 23 y L-25

Dil. de Virus	Ensayos a los 3 días		Ensayos a los 5 días		Ensayos a los 7 días	
	Nº 23	L-25	Nº 23	L-25	Nº 23	L-25
10 ⁻¹	X	X	X	X	X	X
10 ⁻²	X	X	X	X	X	X
10 ⁻³	X	X	X	X	X	X
10 ⁻⁴	—	X	X	X	X	X
10 ⁻⁵	—	—	X	X	X	X
10 ⁻⁶	—	—	X	X	X	X
10 ⁻⁷	—	—	—	X	X	X
L-R Control	—	—	—	—	—	—

Para probar la sensibilidad de estos clones en condiciones de test-standard se utilizó un inoculum de distinta naturaleza, a) macerado de embriones provenientes de aves de línea 6 de la población exterior mantenida en condiciones de campo, y por lo tanto con alto porcentaje de infección endémica, y b) muestras de suero de las mismas aves. Por a), podemos determinar el momento en que

el ave pasa el virus a través del huevo en forma vertical, estado denominado sembradora (sheeder) periódico y no constante, y por b) determinamos el estado virémico del ave.

Los resultados se detallan en Tabla Nº 4.

Es dable observar la correspondencia entre clon Nº 14 y L-25, utilizada como control.

TABLA Nº 4

A —

Test con macerados de embriones

L-25	2/30
Nº 14	2/30
Nº 23	2/30

B —

Muestras de Suero experimento 45-3-3-5

L-25	43/90
Nº 14	43/90

DISCUSION

En el presente trabajo no se determinó si la falta de susceptibilidad al subgrupo D (RAV-50) de virus del grupo de virus Leucosis/Sarcoma fue inherente a los clones aislados o respondía al virus utilizado. Resultados obtenidos por Rispens, Long y Okazaki (comunicación personal), demuestran que no existe diferencia en susceptibilidad a la activación de células L-R con los distintos subgrupos virales, siempre que se utilicen fibroblastos del tipo C/O.

La producción y mantenimiento de las células L-R es fácil y viable, con resultados altamente reproducibles en los sistemas de test para la identificación de virus del grupo Leucosis/Sarcoma.

Las células de clones, descongeladas contiene L-R además de fibroblastos de embrión de pollo y pato; al platearse es conveniente el agregado de nuevos fibroblastos de pato y pollo C/O, estos últimos no representan ningún problema en el sistema de test, dado que no son susceptibles a la infección con RSV (0) y los fibroblastos de embrión de pato tampoco son susceptibles.

En el test de activación siempre se utilizaron fibroblastos de embrión de pollo que permiten la multiplicación del virus a testar antes de infectar L-R. En síntesis, permiten incrementar el título de la muestra inoculada.

Es importante contar con fibroblastos de embrión de pollo libres de infección con virus RIF, en todos los pasos de este trabajo; la existencia de virus de tipo RIF en fibroblastos

de embrión de pollo en la fase de aislamiento o activación, resultaría desastrosa a los fines del test. En el primer caso, resulta imposible obtener un clon que no resulte productor y, en el segundo, todas las muestras resultarían positivas, incluso los controles.

El test de células L-R tiene ventajas sobre los otros métodos de detección, identificación y caracterización de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma.

1. El test de L-R es sensitivo a todos los subgrupos virales, siempre que se empleen células de fibroblastos de embrión de pollo C/O.
2. El test de L-R, es ligeramente más sensitivo que COFAL y mucho más sensitivo que el test de RIF.
3. El período de test es menor que el empleado en los test de RIF y COFAL ya que los resultados se obtienen en 10-12 días.
4. Obtenidas las células L-R, el test de activación y ensayo es simple y puede ser operado por personal técnico competente.
5. Permite testar gran cantidad de muestras en forma simultánea.
6. Por el grado de susceptibilidad, reproductibilidad de los resultados y exactitud, con apropiados controles, es muy raro encontrar resultados errados y por lo tanto es válido para estudios cuantitativos.

7. El virus de Sarcoma de Rous, producido luego de la activación, puede ser testado en distintos grupos fenotípicos de células, a fin de caracterizar el subgrupo al que pertenece.

Desde el punto de vista de la aplicación práctica, el test de células L-R ofrece nuevas y mayores posibilidades para estudios virológicos y epidemiológicos. La aplicabilidad de este sistema de test, depende en forma casi exclusiva de su costo. Si pensamos con criterio de erradicación o control, en realidad todavía es caro, aunque es mucho más económico que COFAL y RIF sobre todo teniendo en cuenta el hecho de que permite testar muchas muestras en forma simultánea.

Considerando la erradicación con fines prácticos en poblaciones comerciales, debemos considerar tres factores:

- a) Costo del programa de test.
- b) Grado de infección del plantel.
- c) Posibilidad de reinfección.

Considerando estos tres factores, es evidente que el costo de programa de test no pesa mucho, comparándolo con las pérdidas que en un plantel altamente infectado esta enfermedad puede causar, máxime si pueden aplicarse medidas para evitar la reinfección que, como ha sido demostrado, una vez eliminada del plantel con medidas de precaución, sólo limitadas, se elimina la reinfección (Burmester 1955 (1), Burmester 1964 (2).

CONCLUSION

Se determinó la utilidad de la activación y ensayo de las células L-R como test de identificación de virus del grupo Leucosis/Sarcoma.

La susceptibilidad de los clones empleados a la activación por virus pertenecientes a los distintos subgrupos, no ofrece deferencias cualitativas

siempre que se utilicen fibroblastos susceptibles para el ensayo.

Dada la simplicidad del test, la exactitud de sus resultados y el corto período de tiempo empleado en su ejecución, permite procesar una gran cantidad de muestras en forma simultánea.

BIBLIOGRAFIA

1. *Burmester, B.; Gentry y Watters, N.* Poultry Science. Vol. XXXIV, 609-617. 1955.
2. *Burmester, B.* USDA repportt. 1964.
3. *Moloney, J. B. J.* Nat. Cancer Inst. Vol. 24. Nº 4, 933-951. 1960.
4. *Rispens, B.; Long, P.; Okazaki, W. and Burmester B. R.*, "The N. P. activation test for assay of Avian Leukosis-Sarcoma viruses Avian Diseases Vol. XIV Nº 4, 1970.
5. *Rubin, H.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. Vol. 46, 1105-1119. 1960.
6. *Rubin, H.; Vogt, P.* Virology 17, 184-194. 1962.
7. *Schudel, A. A.* Analecta Veterinaria (en prensa). 1970.
8. *Sarma, P.; Tuerner, H. and Huebner, R.* Virology 23, 313-321. 1964.
9. *Vogt, P. K.; Rubin, H.* Virology 13, 528-544. 1961.

DETERMINACION DEL CICLO BIOLÓGICO DE CAPILLARIA BURSATA

Por Jorge Eugenio Led ⁽¹⁾, Eugenio Brandetti ⁽²⁾, Guillermo Horacio Panettieri ⁽³⁾.

R E S U M E N

Comprobada la parasitosis por Capillaria bursata, los autores logran reproducir la enfermedad en pollos mantenidos libres de toda infestación, dándoles a ingerir lombrices recogidas en el gallinero del que procedían las aves originalmente necropsiadas, demostrando así el ciclo indirecto de este nematode y el papel de Eisenia sp. como hospedador intermediario.

BIOLOGICAL CYCLE DETERMINATION IN CAPILLARIA BURSATA

S U M M A R Y

After the verification of the parasitic infection caused by Capillaria bursata the authors reproduced the disease in parasites free chicken, feeding the birds with earth worm collected from the poultry yard, where were the birds come from and necropsied. The workers demonstrated by this way the roll of Eisenia sp. as intermediary host of this nematode and its indirect biological cycle.

(1) Profesor Adjunto (Interino). Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(2) Auxiliar Docente Diplomado. Servicio de Patología de Aves y Pilíferos. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(3) Auxiliar Docente Diplomado "ad-honorem". Servicio de Patología de Aves y Pilíferos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

A N T E C E D E N T E S

Frente al hallazgo de *C. bursata* (1) y ante la falta de datos bibliográficos

sobre el ciclo biológico de este nematode decidimos investigar al respecto.

MATERIAL Y METODO

Aves utilizadas: Se emplearon veinticuatro pollos mantenidos libres de infestación, alojados en jaulas en grupos de seis. Con ellos se integraron dos lotes, de doce animales cada uno, procediéndose de la siguiente manera:

Lote 1: Fueron infestados en el curso de la 2ª semana de vida (13 días), dándoles a ingerir a cada pollo cinco lombrices procedentes de un gallinero con regular infestación.

Lote 2: Testigos.

Lombrices de tierra: En un gallinero cuya población estaba parasitada por *C. bursata*, de acuerdo con lo comprobado en el Servicio de Patología de Aves y Pilíferos, se recogieron lombrices de tierra que fueron clasificadas en la Cátedra de Invertebrados I Parte, del Museo de Ciencias Naturales de la Universidad de La Plata, como estados juveniles de *Eisenia sp.*

Con el fin de evitar la vehiculización externa de huevos de parásitos se procedió a un prolijo lavado de las lombrices asegurándonos haber logrado este propósito mediante la observación microscópica del líquido utilizado en la operación.

Examen de materia fecal: A los veinte días de suministradas las lombrices se iniciaron los exámenes coproparasitológicos por los métodos clásicos.

Establecida de este modo la existencia de infestación se procedió a aislar de a uno a los animales para la realización de exámenes coproparasitológicos individuales diarios.

Necropsias: Comprobada la presencia de huevos de *Capillaria* en materia fecal de las aves, individualmente aisladas, se procedió a su sacrificio y necropsia, lo que luego se generalizó a la totalidad de los animales utilizados y sus respectivos testigos.

R E S U L T A D O S

Lote 1 (Infestados) Se encontró *C. bursata* en ocho pollos.

Lote 2 (Testigos): Todos resultaron negativos.

Resumen de las Necropsias

Pollos infestados	Resultados		Testigos	Resultados	
	♂	♀		♂	♀
1	2	10	—	—	
2	4	10	—	—	
3	3	8	—	—	
4	5	11	—	—	
5	15	22	—	—	
6	—	—		(M)	
7	1	4	—	—	
8	—	—	—	—	
9	—	—	—	—	
10	10	17	—	—	
11	3	3	—	—	
12		(M)	—	—	

Referencias: (M) Animales que murieron en los primeros días de la experiencia.

DISCUSION

De la experiencia se desprende la importancia de la lombriz de tierra en el ciclo evolutivo de *C. bursata* en los pollos, lo que resulta de sumo interés, si consideramos que hasta el presente, según la bibliografía consultada, no se han descripto datos al respecto.

Si bien el examen de materia fecal se comenzó a efectuar a los veinte

días de la infestación, cabe consignar como dato de interés el primer hallazgo de huevos de *Capillaria bursata* a los veintisiete días de la misma. *C. bursata* se transmite mediante un hospedador intermediario, actuando como tal la lombriz de tierra *Eisenia sp.*, no descartando por el momento su posible transmisión directa.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Arbor Acres Argentina que facilitó los pollos

utilizados en la experiencia.

BIBLIOGRAFIA

1. Led, J. E. y Brandetti, E. Presencia de *Capillaria bursata* (Freitas y Almeida, 1934) en *Gallus-gallus*. (En prensa).
2. Biester, H. E. y Schwarte, L. H. (1964). Enfermedades de las aves. 1ª edición española U. T. E. H. A.
3. Berghen, P. (1966). Serum Protein changes in *Capillaria obsignata* infections. *Experimental Parasitology*, 19, 34-41.
4. Kelley, G. W. Jr. (1967). Las lombrices pueden afectar a las ponedoras en jaula o sobre camada, Industria Avícola. México.
5. Morgan, B. B. y Hawkins, R. (1949). *Veterinary Helminthology*. Burgess Publisher Company.
6. Fritzsche, K. y Gerriets, E. (1964). Enfermedades de las aves. 1ª edición española. Editorial Acribia.
7. Wakelin, D. (1965). On species of the genus *Capillaria* Zeder, 1800 (Nematoda) from British domestic fowl. *Parasitology* vol. 55. Part. 2.

AMIDOSTOMUM ANSERIS (ZEDER, 1800) EN GANSOS
DE ZONAS ALEDAÑAS A LA PLATA

Engenio Brandetti (1) y Jorge Eugenio Led (2)

R E S U M E N

Se comunica el hallazgo de Amidostomum anseris (Zeder, 1800) en gansos de zonas aledañas a la ciudad de La Plata.

AMIDOSTOMUM ANSERIS (ZEDER, 1800) IN GOOSE
IN THE ENVIRONS OF LA PLATA CITY

S U M M A R Y

It is communicated the find of Amidostomum anseris (Zeder, 1800) in goose, in the environs of La Plata City.

(1) Auxiliar Diplomado del Servicio de Patología de Aves y Pílferos. Instituto de Patología. Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata.

(2) Profesor Adjunto de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata.

A N T E C E D E N T E S

En Europa y EE. UU., donde la explotación de los anseriformes ocupa un lugar destacado dentro de la avicultura, *Amidostomum anseris* (Trichostrongylidae), agente de la gastritis verminosa de los gansos, ocasiona serios problemas por tratarse de una enfermedad considerada de suma gravedad, especialmente para los gansarones de 4 a 8 semanas de edad, en los que la mortandad puede alcanzar cifras elevadas.

En el Servicio de Patología de Aves y Pilíferos de nuestra Facultad hemos tenido oportunidad de necropsiar dos gansos de 6 a 8 meses de edad, exponentes enfermos de un pequeño lote en el que hubo cierta mortandad. Procedían los mismos de una granja rudimentaria ubicada en los alrededores de La Plata.

Además de la salmonelosis diagnosticada obtuvimos del estómago muscular de una de las aves, varios

ejemplares machos y hembras de *Amidostomum anseris*, parásito que de acuerdo a la bibliografía consultada no se ha relatado en nuestro país.

Morfología: Verme fino y rojizo con cavidad bucal amplia y con tres dientes puntiagudos en su base (foto 1).

Machos: 10 a 17 mm. de longitud, bolsa copulatrix caracterizada por dos lóbulos laterales y uno mediano pequeño con rayo dorsal bifurcado hacia atrás (Foto Nº 2). Espículas iguales de aproximadamente 200 micras de largo (Foto Nº 3).

Hembras: 15 a 24 mm. de longitud. Vulva en la parte posterior del cuerpo. Cola digitiforme (Foto Nº 4). Huevos morulados, tamaño medio 118,9 micras de longitud por 59,45 micras de ancho, que en condiciones favorables se hacen larvados en 48 horas (fotos 5 y 6).

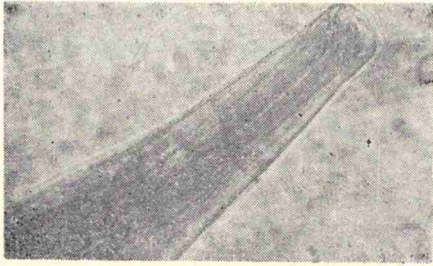


FOTO Nº 1

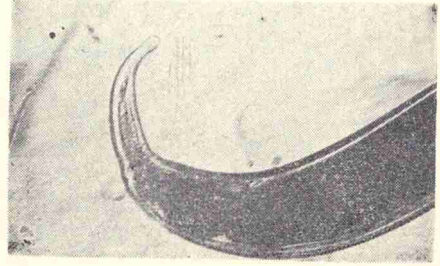


FOTO Nº 4

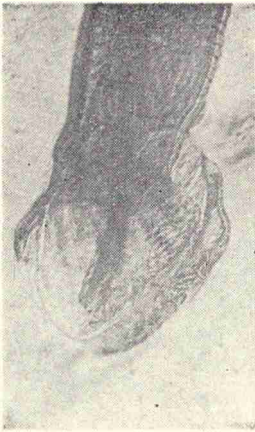


FOTO Nº 2

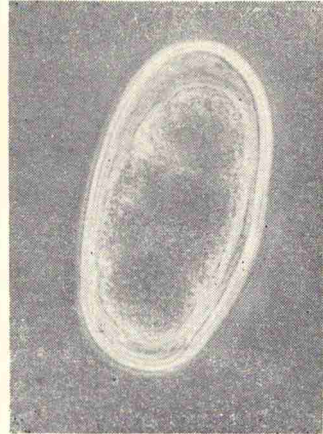


FOTO Nº 5

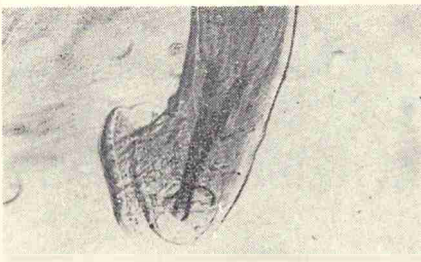


FOTO Nº 3

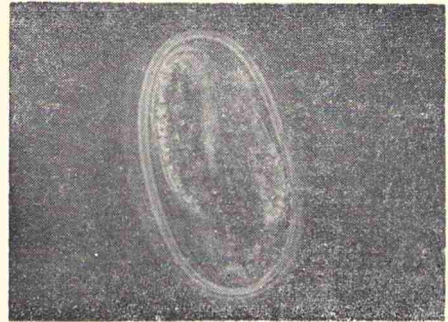


FOTO Nº 6

BIBLIOGRAFIA

- Biester, H. E. y Schwarte, L. H.* (1964). Enfermedades de las aves, 4ª Edición Española. Ed. Uteha.
- Fritzsche, K. y Gerriets, E.* (1964). Enfermedades de las Aves. 1ª Edición Española. Ed. Acribia.

- Yamaguti, S.* (1961). *Systema Helminthum*. Interscience Publishers. New York-London.

COMPLEJO LEUCOSICO AVIAR: Revisión de conceptos (*)

Alejandro A. Schudel (1)

R E S U M E N

El Complejo Leucósico Aviar comprende por lo menos dos enfermedades con características etiológicas y patológicas propias. En los últimos años se han realizado importantes avances en la investigación de las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar. Esta publicación pretende reunir los datos antiguos, trabajos actuales y nuevos conceptos, como así también señalar problemas importantes a criterio del autor, aún no solucionados.

AVIAN LEUCOSIS COMPLEX: REVIEW OF CONCEPTS

S U M M A R Y

The avian Lecousis Complex is by definition a group of et least two well defined aetiological and pathological entities.

In the last few years there has been an important increase of research with remarkable findings in this area of work, and this paper sumarize the old and current developments, new advances an unsolved problems in the view of the author.

(*) Trabajo realizado en el Regional Poultry Research Lab. East Lansing Michigan, U. S. A., con una Beca Externa del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina.

(1) Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

A N T E C E D E N T E S

El alto grado de desarrollo y perfeccionamiento avícola logrado en los últimos años, no sólo en nuestro país sino en todas las áreas desarrolladas del mundo con alta tasa de consumo proteico, ha llevado a que el manejo avícola se realice en forma industrial.

Las fallas de manejo en una explotación de este tipo producen pérdidas de gran importancia, de las que probablemente, aquellas debidas a problemas sanitarios de los plantales sean mucho más serias, ocasionando a menudo, trastornos irreparables. En ese sentido las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar ocupan un lugar de prioridad entre todas las entidades patológicas que afectan la industria avícola.

Enfermedad de Marek (una de las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar) puede causar hasta el 80 % de mortalidad en parrilleros en brotes agudos, las pérdidas se manifiestan entonces en mortalidad. Leucosis Linfoidea con un cuadro epidemiológico diferente causa pérdidas por baja conversión, baja producción y una tasa de mortalidad moderada, pero constante, que en definitiva causa tanto o más pérdidas que la primera de las nombradas.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica estima en más de 200.000.000 de dólares anuales, las pérdidas, por mortalidad y decomiso, en casos de Enfermedad de Marek, y en 100.000.000 de dólares anuales las causadas por Leucosis Linfoidea, sin considerar en esta última las pérdidas por fallas en la conversión, que son incalculables y posiblemente lleven la cuenta a valores superiores a los de Enfermedad de Marek. (Datos estimados en el año 1969.)

Datos similares a los anteriores han sido publicados por el Ministerio de Agricultura de Gran Bretaña y es posible que las pérdidas adquieran tamaño magnitud en todos los países del mundo, en los que como en el nuestro se practica la cría de pollos en forma intensiva.

La literatura en el tema es abundante, con muy buenas revisiones (Furth 1946, *Physiol. Rev.* 26-47-1946 - G. Panima 1947, *Vet. Ital.* 8-33 - P. Biggs 1963, *Poultry Rev.*) pero carente de publicaciones en español.

En una rápida revisión del tema se tratará de actualizar los detalles más importantes de las Enfermedades del Complejo Leucósico Aviar, en sus aspectos etiológicos, características anatomopatológicas, epidemiología y posibilidades de control.

H I S T O R I A

La existencia de las enfermedades del Complejo se remonta a la antigüedad, pero las primeras evidencias concretas de su presencia en las poblaciones avícolas se tiene merced a una descripción incompleta de Roloff en 1868 (79) de un caso de linfosarcoma en pollo. En 1896 Caparini (25) describe una entidad leucémica en pollos.

Ellerman y Bang en 1908 (38) introducen el término leucosis, en la descripción de una entidad leucémica en pollos, transmisible por filtrados libres de células agregando datos epidemiológicos de interés.

Peyton Rous en 1911, en el Rokefeller Institute, realiza los trabajos pioneros sobre *virus oncogénicos* con un tumor transmisible (fibrosarcoma) aislado de una gallina Plymouth Rock transplantable sólo a su descendencia.

J. Marek describe en 1907 (62) una entidad linfoproliferativa de los nervios periféricos, denominándola *poli-neuritis*.

Pappenheimer y col. 1929, (72) subraya haber encontrado una incidencia del 10 % de tumores viscerales (muy frecuentes en ovario) asociados a lesiones linfoproliferativas neura-

les, denominando a este cuadro patológico *neurolinfomatosis gallinarum*.

En 1949, Burmester y col. estable-

cen la transmisión vertical de Leucosis Linfoidea.

ETIOLOGIA

Por muchos años los conocimientos sobre los agentes etiológicos de las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar, fueron confusos y basados principalmente en los conocimientos adquiridos con otros virus animales.

Elford y Andrewes en 1936 (40) en Sarcoma de Rous, y Burmester y col. en 1947 (17) en Leucosis Linfoidea, demuestran fehacientemente la presencia de un agente viral por medio de centrifugación diferencial.

Las primeras evidencias sobre la naturaleza física de la partícula viral de Sarcoma de Rous corresponde a Claude en 1947 (28) por medio del microscopio electrónico.

La fácil obtención de material de alto título de plasma de aves infectadas con la cepa BAI-A del virus de Mieloblastosis Aviar facilitó enormemente la purificación y caracterización química del virus, realizada por Bornard y Bear en 1959 (15) y Allison y Burke en 1962 (3), caracterizando al agente viral como un virus de RNA.

Las evidencias acumuladas en los últimos años sobre transmisibilidad, patología, epizootología y características citopatológicas, hicieron dudar a muchos investigadores sobre una etiología simple, para todas las enfermedades del Complejo. Es así que Biggs postula una probable doble etiología en 1966 (13) basado en características patológicas y epidemiológicas, confirmando en 1967 Churchill y Biggs (32) y Salomón, Witter, Nazerian y Burmester 1968 (93), una etiología diferente para Enfermedad de Marek, basándose en una estrecha co-

relación entre presencia de virus Herpes con efecto citopatológico en cultivo de tejidos y presencia de la enfermedad en pollos luego de inoculados con material celular de cultivos de tejidos. Evidentemente, el hecho de que la infección o transmisión de la enfermedad en estos experimentos se haya realizado con material celular, le dio carácter de circunstancial a estos hallazgos.

Burmester en 1969 (23), agrega datos adicionales que fortalecen la idea de una segunda etiología viral en las enfermedades del Complejo.

Nazerian y Witter publican recientemente la transmisión de la enfermedad con filtrados libres de elementos celulares confirmando en forma definitiva la etiología de la enfermedad de Marek.

Lee y col. en 1969 (58), presenta datos adicionales sobre la caracterización química del agente, encontrando un virus de DNA, que por sus características morfológicas, Nazerian, 1968 (66), corresponde a un virus Herpes.

Por lo tanto tenemos dos entidades patológicas muy similares con agentes etiológicos diferentes como integrantes del Complejo Leucósico Aviar.

En todas las enfermedades hay un gran número de cepas aisladas y caracterizadas, que se describirán con más detalle al referirnos a los virus en particular.

Para una mejor comprensión del tema lo dividiremos en cada una de las tres entidades y las trataremos por separado.

COMPLEJO LEUCOSICO AVIAR

Clasificación sobre bases etiológicas y patológicas

I — GRUPO LEUCOSIS SARCOMA.

- Leucovirus - RNA (Tumores virales aviaries).
- Leucosis linfoidea (Leucosis visceral, Linfocitoma, etc.).
- Eritroblastosis (Eritroleucemia).
- Mieloblastosis (Leucemia mieloide, leucemia, etc.).
- Mielocitomatosis.
- Fibrosarcoma, Endotelioma, Hemangioma, Nefroblastoma.
- Osteopetrosis

II — ENFERMEDAD DE MAREK.

- Herpesvirus - DNA (Neurolinfomatosis).
- Forma clásica y forma aguda (ambas linfoideas).
- Linfomatosis neurai (Parálisis de los pollos, etc.).
- Linfomatosis ocular (Ojo de pescado, Ojo gris, etc.).
- Linfomatosis visceral (Linfomatosis, etc.).

III — OTRAS SIN CLASIFICAR.

- Reticuloendoteliosis (Virus T.R.E., etc.).

Este tipo de clasificación elimina definitivamente la confusión existente entre ambas enfermedades.

I — GRUPO LEUCOSIS/SARCOMA

Tumores Virales Aviaries - Virus RNA Leucovirus.

1. Propiedades físicas

Las partículas virales infecciosas tienen un diámetro aproximado de 80 - 100 μ para virus de Sarcoma de Rous (RSV), Elford y Andrews 1936 (40) y de 144 μ para el virus de Mieloblastosis Aviar (AMV), Sharp y Beard 1954 (89), diferencias debidas a las técnicas empleadas en la medición, y no a las dimensiones reales de las partículas virales. Estos datos fueron posteriormente corroborados por microscopía electrónica.

El coeficiente de sedimentación es de 500 - 660 S (Svedelberg) para RSV Kahler 1954 (54), y de 500 - 600 S para AMV Sharp y Beard 1954 (89). El peso seco aproximado por partícula es de 7.5×10^{-10} ug (microgramos).

Debido a al alto contenido en lípidos de su membrana externa (envolop) manifiestan una gran sensibilidad al tratamiento con éter (sensibilidad que se manifiesta en todas sus envolturas excepto en el nucleocapsid), dando constancia de un alto contenido lipídico en todas sus mem-

branas, y ausencia de lípidos en el nucleocapsid. Por microscopía electrónica se determinó el proceso de salida del virus (budding), proceso que le brinda la envoltura externa al virus a partir de la membrana celular y de allí el alto contenido lipídico.

Son virus muy termolábiles, la vida media es de 100 - 120' a 37°C para Virus Asociado de Rous (RAV) subtipo I, Hanafusa 1964 (47). Distintas condiciones experimentales dan resultados diferentes en cuanto a termolabilidad se refiere, pero evidentemente las condiciones experimentales fueron muy distintas, al menos en tres de los factores principales:

- Diferentes cepas de virus pueden demostrar distinta sensibilidad.
- Origen (tejido) del virus.
- Composición del medio.

La temperatura ideal para el mantenimiento indefinido del virus es de — 60°C o menores, sin pérdida de infectividad por períodos superiores a los 5 años.

La liofilización es un proceso aconsejable, aunque debe realizarse con mucho cuidado, pues el virus es muy sensible a los procesos oxidativos.

Cómo suceden estos fenómenos de pérdida de infectividad por temperatura, es todavía una incógnita, aunque parecería que los procesos oxidativos llevan a la inactivación del virus, ya que los agentes reductores disminuyen extraordinariamente la inactivación, Engelberth y Holm 1938 (39).

El proceso de inactivación se comporta como una reacción enzimática de primer orden aunque en determinadas circunstancias, se diferencia de una reacción de este tipo, como ocurre por ejemplo con el tratamiento del material viral por sonicación previo al ensayo, donde se observa una clara desviación de la reacción de primer orden, concluyéndose entonces, que esta pérdida de infectividad se debe en su mayor parte a la formación de grumos (Clusters) virales.

Son muy estables a pH 5 - 9, pero inestables a pH más altos o más bajos.

Altamente resistentes a la inactivación por luz ultravioleta, unas 10 veces más resistente que el virus de Newcastle (NDV), pese a poseer parecidas características morfológicas, estructurales y sensibilidad a radiación X, Rubin y Temin 1959 (80).

2. Composición Química

El alto grado de pureza de los materiales empleados para el análisis químico del virus, requiere de técnicas delicadas para concentración de virus.

La composición química del virus de Mieloblastosis Aviar (AMV):

- 35 % lípidos
- 62.8 % proteínas
- 2.2 % RNA

La molécula de RNA es de cadena simple e integrada por dos componentes principales. Un componente sedimenta al doble del coeficiente de sedimentación del virus de Mosaico del Tabaco en 0.11 M C1Na, y es considerada como la molécula de RNA completa, el segundo componente está compuesto por subunidades del RNA principal rotas durante la puri-

ficación, Robinson y Duesberg, 1967 (78).

El análisis de bases del RNA viral difiere en la mayoría de los trabajos en la materia, probablemente debido a diferentes condiciones experimentales.

El análisis de las proteínas virales revela la existencia de dos componentes:

- 1 — identificable con la fracción de actividad fijadora del complemento.
- 2 — de naturaleza enzimática, sin significado funcional.

3. Ultraestructura

Por sombreado electrónico (Shadow-casting) se obtuvieron las primeras medidas virales en el microscopio electrónico de 80 a 100 mu para RSV.

En preparaciones ultrafinas es posible observar la morfología viral, con una envoltura externa (envelop) de 80 - 90 mu de diámetro, con prolongaciones exteriores en forma de tornillos (Knows). La envoltura externa cubre una segunda membrana llamada membrana interna que envuelve completamente el corazón (core) de un diámetro de 30 - 40 mu constituido por el RNA viral.

La partícula viral completa corresponde al tipo C, descrita por Bernhard 1958 (8), Bernhard 1956 (9), Haggeneau 1959 (45).

En preparaciones donde se emplea coloración negativa (negative staining) se observan las protrusiones peririféricas (Knows) ya descritas, muy semejantes a las existentes en los mixovirus, pero en este caso no se ha demostrado ninguna propiedad hemaglutinante.

La existencia de formas con cola en las preparaciones negativas, ha sido motivo de muchas discusiones, artificios para algunos, otros, sin embargo, consideran a éstas como formas de tipo L (L—forms), E. Alexander-Jackson 1969 (2).

4. Purificación

Se realiza a partir de tumor de pollos con la técnica de Moloney 1960

(65), en que la concentración final se realiza expresando el resultado en gr de tumor original. Es eficiente en cuanto a la concentración del material viral pero no elimina la totalidad de las impurezas celulares.

Los cultivos celulares son muy eficientes en la producción de virus en alto título, aunque no eliminan la contaminación celular. Aun así pueden obtenerse títulos de 1.0×10^9 /cc para alguno de los leucovirus.

La purificación del virus de Mieloblastosis Aviar (AMV) a partir de plasma de aves infectadas, es el mejor procedimiento cuando se incursiona en experiencias de naturaleza química, dado que se necesita virus de gran pureza, libre de contaminantes celulares, por ello es el material de elección, lográndose además títulos de hasta 10×10^{12} /cc, Bonard y Beard 1959 (15).

5. Propiedades controladas por el hospedador

El mecanismo por el cual la partícula viral emerge de la célula, es de gran importancia, ya que le confiere la cubierta externa. Por lo tanto, antígenos celulares integrarán la partícula viral, junto a antígenos específicos del virus.

Los anticuerpos contra el tejido normal de pollo y Antígeno de Forsman, inactivan a la partícula viral en presencia del complemento, prueba evidente de la presencia de antígenos celulares en la partícula viral.

El virus de Mieloblastosis Aviar (AMV) contiene adenosin-trifosfataasa (TPA) que actúa sobre el adenosintrifosfato (ATP) o inosintrifosfato (ITP) como sustratos, Green y Beard 1955 (44). Pequeñas cantidades de fosforilasa-fosfonucleótido permanecen adheridas a la membrana externa viral. Ambas enzimas se adquieren durante el proceso de salida del virus (budding) de la célula hospedadora.

6. Antigenicidad

La cubierta externa de la partícula viral contiene los antígenos específicos de tipo, que participan en las

reacciones de neutralización y anticuerpo fluorescente con suero preparado a partir de pollos inoculados con partículas virales infecciosas. Estas reacciones de neutralización se utilizan para identificar cepas antigénicamente diferentes, Distéfano y Dougherty, 1961 (36), Ishizaki y Vogt 1966 (53). Hay reacciones de neutralización cruzada entre varias cepas virales. La especificidad de los antígenos de la cubierta externa será discutida luego, en relación con las características de subgrupo de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma.

Los anticuerpos fijadores del complemento reaccionan con todos los virus del grupo Leucosis/Sarcoma. Se emplea suero producido en hamster (Syrian) el que desarrolla un tumor como resultado de la inoculación de la cepa Schmidt-Ruppin, Huebner, 1963 (52). El antígeno responsable de esta reacción se encuentra también en cultivo de tejido infectado con cualquiera de los virus pertenecientes a este grupo. Por microscopía de fluorescencia este antígeno ha sido identificado en la partícula viral, Kelloff y Volgt, 1966 (55). Los anticuerpos específicos de grupo (fijadores del complemento) no neutralizan la partícula viral. Esto indica que el antígeno específico de grupo está localizado dentro del capsid y no en la envoltura externa, reafirmado por el hecho de quedar en libertad luego del tratamiento de la partícula viral con sodio-dodecil-sulfato.

7. Ciclo de Infección

Cuando un cultivo de fibroblastos de embrión de pollo, alargados y chatos, se infectan con virus de Sarcoma de Rous (RSV), cambian morfológicamente, tomando forma esférica y refráctil, Manaker y Groupe 1956. Esta propiedad de transformar la morfología celular es la base del test de identificación viral in-vitro (focus assay).

El número de focos es directamente proporcional a la concentración de virus en el inoculum. Por lo tanto una

sola partícula de RSV es capaz de infectar una célula y transformarla.

El ciclo de crecimiento de estos virus ha sido estudiado in vivo e in vitro. Los sistemas in vivo guardan sólo su interés histórico, y no serán considerados en este trabajo.

Al infectar un cultivo de tejido con virus de Sarcoma de Rous el período de eclipse comienza dentro de la primera hora.

A las catorce horas, la síntesis de nuevo virus es evidente, creciendo en forma exponencial hasta los 4 días luego de la inoculación. Este aumento no representa una mayor cantidad de virus producido sino una mayor cantidad de células infectadas que entran en la fase de producción. Entre el tercero y cuarto día se establece un equilibrio entre el virus producido y el virus inactivado por temperatura.

El tiempo que tarda en ser eliminado el virus por la célula puede ser fácilmente calculado en la parte ascendente de la curva de crecimiento, tomando como base "la razón" entre virus intracelular y virus extracelular. Este tiempo de eliminación viral (reseasing time) es definido como el tiempo transcurrido desde que una partícula viral es completada en el citoplasma hasta que aparece en el medio extracelular. Para estos virus es muy corto, y lo prueba el hecho de que hay una mayor cantidad de virus extracelular que virus intracelular.

Estudiando con el microscopio electrónico células infectadas puede observarse que el virus es eliminado por gemación (budding) de la partícula viral en la membrana celular, Heine 1962 (50), Haguenu 1962 (46). El "budd" comienza a constreñirse en su base hasta que se desprende totalmente de la membrana celular.

Es frecuente observar agregados de virus en la membrana celular donde permanecen por largo tiempo. Luego de 24 horas de infección el antígeno específico de tipo se observa en la membrana celular, Vogt y Luykx 1963 (99). La cantidad de antígeno viral que es pequeña al principio, au-

menta gradualmente durante el ciclo de infección.

Los virus de Leucemia aviar, tales como mieloblastosis, eritroblastosis, Leucosis Linfoidea, etc., no inducen cambios morfológicos al infectar cultivo de fibroblastos de embrión de pollo, excepción de MC 29 Langlois. Bear 1969 (57), pero son continuamente producidos, por las células infectadas.

8. Mecanismo de Síntesis

Los virus tumorales aviares no contienen DNA, sólo RNA, Crawford y Crawford 1961 (34), Robinson 1965 (77), Duesberg 1969 (37), sin embargo para su replicación necesita de la síntesis de DNA, Bader 1964 (4), Temin 1964 (96), Bader 1966 (5), Knudson 1967, Melnik 1969. Los inhibidores específicos de DNA previenen la formación de partículas virales y la transformación celular si actúan en las primeras 8 horas de infección. Luego de 8 horas la actividad de los inhibidores de DNA es todavía discutida, Rubin 1969 (84), Melnik 1969. De acuerdo a Bader 1966 (6), es necesaria la producción de proteínas celulares en las 8 primeras horas siguientes a la infección. La producción de un template de DNA desde el cual el RNA viral se replicaría, podría explicar la necesidad de DNA en los primeros momentos de la síntesis viral. Sin embargo hasta que la forma replicativa del genome de estos virus sea hallada, la existencia de dicha forma replicativa del DNA es especulativa. Una segunda hipótesis podría ser la existencia de una proteína cuya presencia es necesaria para la iniciación de la síntesis viral y la transformación celular. El gene que codifica para esa proteína estaría reprimido en la célula normal pero luego de la infección celular por el virus, el genome celular requeriría un ciclo simple antes que se logre la desrepresión y la transcripción del genome.

9. Bases para la Clasificación en Subgrupos

Estudios recientes sobre las propiedades de la membrana externa de la

partícula viral, han revelado que por lo menos existen cuatro diferentes subgrupos, basándose en la *antigenicidad* expresada por los distintos tipos virales, *interferencia* entre los miembros del mismo subgrupo y *susceptibilidad de hospedador* en diferentes poblaciones genéticas. Ver tabla N° 1.

Los anticuerpos neutralizantes producidos en pollos infectados son específicamente dirigidos contra el antígeno específico de tipo de la cubierta externa viral. Usando técnicas de clonado, es posible aislar cepas puras de virus, que inoculados en pollos libres de infección, producirán antisueños específicos contra su envoltura externa.

Por reacciones de neutralización y anticuerpo fluorescente podemos clasificar la mayoría de los virus en cuatro subgrupos con reacciones de neutralización específica entre los miembros del mismo subgrupo, pero ninguna o al menos mínima reacción de neutralización entre los miembros de los distintos subgrupos. Ver tabla número 1.

Las células que han sido infectadas con un virus de Leucosis Linfoidea son resistentes a la sobreinfección con virus de Sarcoma de Rous (RSV). Esta es la base del test de RIF (Resistant Inducing Factor) para los virus de Leucosis. Rubin, 1960 (82). Ver cuadro N° 2.

El grado de efectividad de la interferencia depende de la combinación de los virus infectante o sobreinfectante (RIF y RSV, respectivamente). Los cuatro subgrupos están determinados por patrones de interferencia que se manifiesta exclusivamente entre miembros del mismo subgrupo.

Este fenómeno de interferencia es también una propiedad de la envoltura externa.

El virus infectante ocuparía los receptores celulares específicos, los que al estar ocupados por el virus RIF

(Leucosis Linfoidea), no permitirán la entrada del virus sobreinfectante (RSV), Steck y Rubin, 1966 (94).

La tercera propiedad de la envoltura externa define cuatro subgrupos virales A-B-C-D de acuerdo a la susceptibilidad de hospedador en fibroblastos de embrión de pollo genotípica y fenotípicamente diferentes. Esta es sin duda la más clara evidencia de la existencia de cuatro subgrupos virales con propiedades infectantes diferentes. Ver cuadro N° 3.

Los fenotipos celulares identificados hasta ahora son C/O, C/A, C/B, C/AB, donde C significa pollo (chicken), la barra resistente a y la letra mayúscula el subgrupo viral excluido. Vogt e Ishizaki, 1965 (101).

Los fenotipos son controlados por dos locus autosómicos independientes llamados Tva y Tvb (Tumor virus A y tumor virus B, respectivamente). Ver cuadro N° 4.

Los alelos que controlan susceptibilidad a^s b^s son dominantes sobre los alelos que controlan resistencia a^r b^r (hasta hoy no hay datos sobre susceptibilidad o resistencia para los subgrupos C y D).

Aparentemente los alelos para susceptibilidad controlan los sitios específicos de penetración viral. Por lo tanto la resistencia genética, actuaría al mismo nivel que interferencia (penetración o decapsidación).

El hecho de que las células resistentes puedan ser infectadas de alguna forma con el genoma del virus excluido (mediante mezclas fenotípicas) y producir progenie viral infecciosa, establece definitivamente que la cubierta externa viral controla las propiedades del subgrupo y no la célula hospedadora. La mayoría de los virus de leucosis aislados en condiciones de campo, corresponden al subgrupo A, y algunos al subgrupo B, se sospecha, además, la presencia del subgrupo C aunque nunca ha sido aislado.

TABLA Nº 1

VIRUS DEL GRUPO LEUCOSIS / SARCOMA

Neoplasia Inducida	<i>Subgrupo Viral</i>			
	A	B	C	D
Sarcomas (Pseudotipos)	BH-RSV-RPL 12 BH-RSV-RAV 1 BS-RSV-HPRS-F 42	BH-RSV-RAV 2 BH-RSV-RIF 2	BH-RSV-RAV 49 BH-RSV-RAV 7 BH-RSV-RAV 4	BH-RSV-RAV 50
Espontáneos	PRC 2-A PRC 4 29 RSV	HA-RSV PRC2 SR-RSV-2	PR-RSV B 77 MH2	SR-RSV CZ-RSV
Leucosis Linfoidea	RPL 12 HPRS-F 42 RAV 1	RAV 2 RIF 2 RAV 6	RAV 49 RAV 7 RAV 4	RAV 50
Eritroblastosis		ES 4	AEV-R	
Mieloblastosis	AMV-A	AMV-B		
Osteopetrosis	MAV-1 RAV 3 RAV 5 FAV 1 FAV 2 SR-RSV-1 FSV-FAV-1 FSV-FAV-2	ARC MAV-2		

CUADRO Nº 2

INTERFERENCIA ENTRE LOS VIRUS TUMORALES AVIARES

Virus Interferente	Subgrupo de RSV usado para enfrentamiento (Revelador)	
	A	B
Subgrupo A	Interferencia	No Interferencia
Subgrupo B	No Interferencia	Interferencia

CUADRO Nº 3

RESISTENCIA CELULAR CONTRA LOS VIRUS TUMORALES AVIARES

Fenotipo celular	Subgrupo de Virus Tumorales Aviaries	
	A	B
C/O	Sensible	Sensible
C/A	Resistente	Sensible
C/B	Sensible	Resistente
C/AB	Resistente	Resistente

CUADRO Nº 4

Nomenclatura Genotípica y Fenotípica para la resistencia celular a los virus tumorales aviaries controlados por los locus Tva y Tvb		
Genotipo	Fenotipo (celular)	Sensible (S) o resistente (R) a los distintos subgrupos de los virus tumorales aviaries de los subgrupos A y B.
		A B
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/O	S S
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/O	S S
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/A	R S
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/O	S S
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/O	S S
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/A	R S
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/B	S R
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/B	S R
a [*] a [*] b [*] b [*]	C/AB	R R

10. Virus del grupo Leucosis Sarcoma Defectivos

La cepa *Bryan High titer* del virus de Sarcoma de Rous (BH-RSV) produce áreas focales de células transformadas al infectar cultivos de fibroblastos de embriones de pollo en cultivos de tejido.

Estas células transformadas toman una típica apariencia redondeada y

al no existir inhibición por contacto crecen sin restricción hasta formar varias capas celulares que caracterizan al foco (foci).

Cuando esta preparación viral se diluye por encima de su punto final (end point) en lo que a formación de focos se refiere, podemos aislar otra partícula viral denominada Virus Asociado de Rous (Rous Associated Virus). RAV que no produce efecto citopatológico y está siempre pre-

sente en las preparaciones de BH-RSV. Luego de la propagación del Virus Asociado de Rous por varios pasajes en fibroblastos de embrión de pollo, induce resistencia al posterior enfrentamiento con Virus de Sarcoma de Rous.

RAV y RSV no se diferencian ni en termolabilidad, sitio de maduración celular, crecimiento, especificidad inmunológica (el antígeno específico de grupo gs. es común a ambos), características fenotípicas de la envoltura externa y susceptibilidad celular. La única diferencia es la incapacidad de formar focos en cultivo de tejidos y sarcomas en pollos por parte de RAV. De la inoculación en pollos resulta la aparición de leucosis linfoidea, por lo que son incluidos en el grupo de virus Leucosis/Sarcoma.

Si se aíslan por clonado, focos de células transformadas usando baja multiplicidad de infección (inoculum que producirá poco efecto citopatológico en el cultivo) al propagarse en medio adecuado, estas células transformadas se propagan en forma indefinida manteniendo sus características morfológicas, pero fallan en la producción de virus infecciosos, ya sea RSV o RAV, presentes en el inoculum original.

Sin embargo la adición de RAV a estas células transformadas y clonadas, inicia la síntesis de RSV y RAV en grandes cantidades, con las características del virus RAV infectante.

Estas evidencias demuestran en forma más que suficiente la defectividad de RSV, ya que necesita la ayuda de un virus ayudante (Helper) (RAV) para la síntesis de un virus infectante completo.

Cualquiera de los virus de campo aislados de casos de Leucosis Linfoidea actúa como virus ayudante de la producción viral en estas células No Productoras.

De las cepas testadas hasta ahora BH, Harris y Fujiyami han demostrado ser defectivas en tanto no lo son Schmidt-Ruppin (SR) y Prague (PR).

Las células transformadas por el RSV, llamadas NP (non producers)

forman la base del test de NP que detallaremos más adelante siendo hoy conocidas como L-R (células de Rous negativas a Leucosis).

La propiedad defectiva de RSV radica en su genome que es incapaz de dirigir la síntesis de su cubierta externa (envelop) necesitando para ello la ayuda de un virus ayudante. Ver cuadro N° 5.

Por lo tanto el virus ayudante colaborará en la síntesis de su cubierta externa al infectar la misma célula, es decir RSV usará la cubierta externa del virus (RAV) ayudante, y por lo tanto adquirirá sus características fenotípicas.

Es en esta forma como se producen las mezclas fenotípicas virales, si por ejemplo, infectamos simultáneamente un cultivo celular de células fenotípicamente determinadas como C/O con un virus del subgrupo A y otro del subgrupo B tendremos células infectadas por ambos virus cuyas cubiertas externas, serán mosaicos antigénicos de los virus infectantes (A y B), pero llevarán el genome de uno u otro. Este hecho posibilitará que ese virus infecte y multiplique en células que previamente le eran resistentes, ya que como vimos anteriormente la resistencia o susceptibilidad a la infección en lo que concierne a la partícula viral, depende de su envoltura externa. y ésta será una mezcla de ambas envolturas externas (A y B).

Este fenómeno refirma que la resistencia o susceptibilidad a la infección se manifiesta en los procesos de decapsidación o penetración y no en la multiplicación, Piraino 1967 (73).

Las células L-R (NP) resultantes de la infección de una célula susceptible a la infección, por una partícula de RSV defectiva, fueron consideradas por muchos investigadores como No Productoras absolutas, confirmando la hipótesis de defectividad del Virus de Sarcoma de Rous.

Recientes investigaciones demuestran la falla del sistema celular empleado anteriormente en la detección de virus infeccioso producido por las

células NP, llamadas correctamente L-R de acuerdo a la terminología empleada para la nomenclatura de bacteriófagos, Hanafusa 1968 (48).

Vogt 1967 (102), y Weiss 1967 (103) y 1968 (104), demuestran la síntesis de virus infeccioso detectable en fibroblastos C/A y C/O. Esta susceptibilidad de hospedador por demás inusual, los llevó a llamarlos RSV (0), característico además por su alto grado de interferencia con miembros del subgrupo B.

Hay dos tipos de RSV (0), uno producido por célula L-R α conocido como RSV (0) α sin hospedador conocido y otro producido por las células L-R β , llamado RSV (0) β con baja infecciosidad en fibroblastos C/O, C/A e interferencia con miembros del subgrupo B.

La producción de estos tipos virales no está determinada solamente por el genome viral, sino por una más estrecha interacción célula-virus, tal como lo sugiere Hanafusa 1970 (49).

CUADRO Nº 5

FUNCIONES CONTROLADAS POR: <i>Virus Ayudante</i>	FUNCIONES CONTROLADAS POR: <i>Genome de RSV</i> (independientes del ayudante)
Maduración Viral Especificidad antigénica de la cubierta externa Susceptibilidad de hospedador Patrón de interferencia	Replicación del RNA viral Transformación de la célula infectada Morfología celular Morfología del foco Presencia de Gs., antígeno específico de grupo.

11. Ocurrencia

La presencia del virus causal de Leucosis Linfoidea ha sido demostrado en casi todas las poblaciones de pollos controladas, ya sea por la presencia de virus o la presencia de anticuerpos neutralizantes. (El aislamiento del virus se realiza en aves adultas o en su progenie, ya que se transmite en forma vertical, vía embrión).

Es frecuente la ocurrencia de virus del subgrupo A en condiciones de campo, los virus del subgrupo B son menos frecuentes, y los del grupo C hasta ahora son sólo mantenidos y estudiados en condiciones de laboratorio.

La infección ocurre antes de llegar las aves a la madurez sexual, pero la incidencia de la enfermedad es baja en esta época, aumentando paulatinamente con el correr del tiempo.

La presencia de la enfermedad es de tipo enzoótico, aunque a veces se han reportado casos epizooticos de osteopetrosis o hemangiomas.

El hospedador natural del virus es el pollo, pero por pasajes sucesivos y rápidos se posibilita su adaptación a un hospedador inusual, inclusive mamíferos. De todos los virus tumorales conocidos, el virus de Sarcoma de Rous es el poseedor del más ancho espectro de susceptibilidad. Ahlstrom 1964 (1).

12. Transmisión

La mayoría de los datos acumulados por la bibliografía acerca de la transmisión de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma, están relacionados a Leucosis Linfoidea.

La transmisión de la enfermedad ocurre en forma horizontal o vertical, Burmester y Walter 1961 (20), 1962 (21) y Rubin, Cornelius y Fanshier 1961 (83), ave a ave la primera y madre a hija la segunda, vía huevo.

El virus se elimina por saliva y heces, Burmester 1954 (19), por lo que las aves pueden fácilmente infectarse por vía aerógena.

Sin embargo la transmisión horizontal de la enfermedad se realiza en forma ineficiente, pues el virus se inactiva fácilmente en el exterior, y entonces el contacto entre ave y ave se hace necesario para la transmisión horizontal, Burmester 1954 (19). A la infección horizontal, por contacto o por aerosoles resulta una inmediata respuesta inmunitaria con producción de anticuerpos que pueden detectarse fácilmente por test de neutralización.

La transmisión vertical es la más importante, ya que resulta en la perpetuación del virus y provee la fuente de infección por contacto a los demás. En casos de campo pueden identificarse cuatro tipos distintos de respuestas a la infección viral:

1. Virémicos sin anticuerpos, fueron infectados a temprana edad o in ovo, son inmunotolerantes. Las hembras con estas características son las principales sembradoras del virus.
2. Alto nivel de anticuerpos, no se detecta virus.
3. Aves con anticuerpos, pero que ocasionalmente siembran virus.
4. Aves sin virus y sin anticuerpos

Los machos no transmiten la enfermedad por vía congénita, pese a la demostración de partículas virales en sus órganos seminales. En contraste, la mayoría de los embriones de

hembras virémicas, serán constantemente virémicos.

Los principales índices de mortalidad se registran en los lotes provenientes de aves virémicas y no, de no virémicas.

El aislamiento de virus de saliva de pollos de 1 día de edad confirma que están infectados in ovo, y permanecerán inmunotolerantes durante toda la vida, actuando como fuente de infección horizontal para los demás pollos del plantel.

De los pollos infectados congénitamente o por contacto en los primeros días de vida, sólo pocos desarrollan tumores en condiciones naturales. En el desarrollo tumoral incidirá fundamentalmente la constitución genética del hospedador.

Actualmente se considera la existencia de dos niveles de resistencia a Leucosis Linfoidea, se presume la existencia de un tercer nivel aún no demostrado.

Cuando el virus infecta el animal, las primeras manifestaciones están dadas por la susceptibilidad o resistencia celular como ya lo explicamos anteriormente, ésta correspondería a la primera barrera de defensa y está determinada genéticamente por la existencia de un alelo autosómico recesivo para los subgrupos A y B.

Infectada la célula, sucede la multiplicación viral y la subsecuente producción de anticuerpos (no hay producción de anticuerpos si no hay multiplicación viral) y pueden entonces desarrollarse o no tumores. Esta es la segunda barrera de defensa, es decir, la de desarrollar o no, tumor. Esta segunda barrera podría ser de naturaleza inmunitaria; o bien la formación de tumor puede corresponder a una determinada cantidad de virus mínima como para inducir neoplasia.

Un ejemplo muy interesante lo dan las líneas genéticas de pollos de alto grado de consanguinidad, mantenidas en el Regional Poultry Research Laboratory East Lansing, Michigan. Ver cuadro N° 6.

CUADRO Nº 6

Línea	Fenotipo	Susceptibilidad celular a infección viral	Formación de tumor
7	C/AB	resistente a A-B	no
6	C/O	susceptible A-B-C-D	no
15 I	C/O	susceptible A-B-C-D	sí

Es por esto que la selección por resistencia a cualquiera de estos dos niveles adquiere importancia. La primera barrera interviene en forma de resistencia a la infección y reduce la incidencia de la enfermedad. Los test realizados en poblaciones comerciales demuestran la existencia de los alelos para resistencia a los subgrupos A y B.

El segundo mecanismo de defensa permanece aún indefinido, y los resultados no son conclusivos, indicando la existencia de una gran variabilidad a este nivel.

La introducción de genes que inducen resistencia en las líneas comerciales es muy atractiva sobre todo en el caso del primer nivel de defensa (donde está), controlado por un solo gen simple.

Además la introducción de un gen que ofrezca resistencia a la infección, finalmente conducirá a la erradicación completa de la enfermedad.

13. Espectro tumoral

Cuando una cepa viral del Grupo Leucosis/Sarcoma se propaga en forma seriada utilizando altas dosis de virus, se obtiene una respuesta tumoral similar luego de cada pasaje (considerando la utilización de una misma fuente de aves susceptibles). Un buen ejemplo es el virus de Sarcoma de Rous que siempre induce tumores sólidos del tejido conectivo. Sin embargo las cepas que producen tumores del tejido hematopoyético a veces producen tumores sólidos. El espectro tumoral puede demostrarse fácilmente en el pleitropismo de res-

puestas que manifiestan los distintos virus testados.

Casi siempre al producirse un cambio en el método de transmisión se produce una variación en la respuesta tumoral.

Hay dos teorías para explicar esta variación. Una expresa que un solo virus es capaz de producir las distintas respuestas. La segunda, que cada manifestación patológica es producida por una cepa viral diferente, y por lo tanto la mayoría de las cepas que producen más de una respuesta tumoral serían mezclas de cepas virales. No existen evidencias conclusivas de ninguna de las dos hipótesis, y las dos posibilidades son factibles.

Hay pruebas experimentales suficientes con virus de Sarcoma de Rous y Mieloblastosis Aviar, de que el pollo luego de infectado será pronto virámico y varios de sus sistemas celulares (conectivo y mielopoyético) soportarán la multiplicación y transformación viral, pero otros, como el epitelial, no soportarán el crecimiento tumoral, por lo tanto hay una especificidad de tejido en lo que respecta a espectro oncogénico.

Hay datos que sugieren que el sistema genético que controla la infección y multiplicación viral, es completamente independiente de la causante transformación celular como lo discutiremos más adelante.

El mejor ejemplo de la especificidad de los virus tumorales aviares es la relación existente entre virus y células susceptibles de la Bolsa de Fabricius en la producción de Leucosis Linfoidea. Aun cuando diferentes ti-

pos celulares son infectados, la transformación neoplásica sólo ocurre en la Bolsa de Fabricius. Luego de un largo período latente, las células de la Bolsa de Fabricius migran a otros tejidos y desarrollan allí tumores visibles a simple vista. La extracción de Bolsa de Fabricius antes de la periferización celular de Bolsa de Fabricius impide la aparición de Leucosis Linfoidea; la bursectomía influye en la incidencia de Leucosis Linfoidea si se realiza hasta tres meses luego del nacimiento.

Volviendo al tema inicial, si variamos algunos factores en la inducción del tumor, la respuesta del inoculum será diferente. Burmester y Fredrickson 1961 (20).

Los factores que influyen en esta variación son:

1. Origen del virus.
2. Dosis de virus administrada.
3. Ruta de inoculación.
4. Influencia del hospedador.
5. Edad.

14. Patología

Eritroblastosis

Muy rara en condiciones de campo, aparece frecuentemente en inoculaciones experimentales con cualquiera de los virus de Leucosis Linfoidea. El cuadro patológico es muy parecido a los de leucemia eritroidea en medicina humana.

La etiología viral de esta leucemia es bien conocida, y hay varias cepas que producen una respuesta de 100 % de eritroblastosis luego de inoculadas a pollos susceptibles de 1 día de edad, la enfermedad aparece a las 4 semanas. Si se inocula con una dosis menor de virus o se retarda la inoculación, el espectro patológico cambia y desciende la proporción de eritroblastosis aumentando la proporción de Leucosis Linfoidea.

Diagnóstico macroscópico: La alteración más característica se observa en hígado y bazo, aparecen agrandados y de color rojo brillante. Ascitis es un hallazgo frecuente y en mé-

dula ósea se observa una liquefacción característica de color rojo.

Diagnóstico microscópico: Es en médula ósea donde se aprecian los cambios más drásticos. La arquitectura característica con focos bien delimitados y aislados de células eritroideas intrasinusoidales, está completamente alterada. Los sinusoides del hígado y bazo están repletos de células eritroideas de tipo neoplásico, resultando la conocida leucoestasis (leukostasis) que caracteriza a esta leucemia intravascular, Feldman y Olson, Biester y Swarte 1964 (42).

Mieloblastosis:

Es una de las primeras manifestaciones virales leucémicas estudiadas, Ellermann y Bang 1908 (38). La cepa más característica es la AMV aislada por Beard. La sangre periférica está repleta de formas mieloblásticas inmaduras en los casos agudos. Son comunes cuentas de hasta el 70 % de glóbulos blancos inmaduros, aunque pueden encontrarse formas subagudas con pocas células inmaduras circulantes. Diluciones de este virus producen nefroblastoma y osteopetrosis.

Diagnóstico macroscópico: La médula ósea aparece hiperplástica, de color marrón. Hay hepatomegalia y esplenomegalia con tumores difusos en riñón. El diagnóstico diferencial con eritroblastosis, no es fácil aunque la diferencia en la coloración de los órganos viscerales (hígado y bazo intensamente rojos en eritroblastosis), médula ósea roja en eritroblastosis y marrón en mieloblastosis y la presencia de ascitis en eritroblastosis ausente en la mayoría de los casos en mieloblastosis.

Diagnóstico histológico: Las células neoplásicas varían en su morfología pero son de un tamaño aproximado a las 10 u. Es frecuente observar prolongaciones citoplásmicas. El citoplasma es basófilo con gránulos y vacuolas, la diferencia con linfocitos grandes, es fácilmente apreciable ya que estos últimos tienen la

cromatina agrumada y halo perinuclear.

Hay células en distinto grado de maduración, pero la médula ósea es el órgano básico constituido por una sólida masa celular de mieloblastos. La cuenta de mieloblastos en sangre periférica puede llegar a 1.000.000 por cm^3 . Si la inoculación de virus se realiza a las 8 semanas, la Bolsa de Fabricius, actúa como antagonista y la enfermedad no desarrolla, en oposición a Leucosis Linfoidea, Baluda 1967 (7).

Mielocitomatosis

Está estrechamente relacionada a mieloblastosis, ya que el grupo celular susceptible es de la serie granulocítica, pero a diferencia de mieloblastosis presentan una forma más madura.

La enfermedad es de etiología viral, Mladanov 1967 (64), reproducible por repetidas inoculaciones, y asociada a mieloblastosis. Es de aparición muy poco común y ocurre frecuentemente en aves maduras, como una manifestación subleucémica o aleucémica.

Diagnóstico macroscópico: Es frecuente la aparición de focos blandos, de color pálido o amarillento dispersos en los tejidos viscerales o en los huesos blandos (quilla por ejemplo).

Diagnóstico microscópico: Compactos nódulos de mielocitos con núcleo mono o bilobulado, gránulos acidófilos en citoplasma, que los hace indistinguible de un estado preosinófilo o preheterófilo.

En la médula hay una proliferación de mieloblastos en capas, no como en mieloblastosis que forman una masa compacta.

Fibrosarcoma-Endoteloma-Hemangioma-Nefroblastoma

Estos son considerados tumores sólidos. Las cuatro son de etiología viral y corresponden junto a las anteriormente nombradas al espectro de

la cepa RPL-12. De estos tumores el más frecuentemente hallado en condiciones de campo es el fibrosarcoma del cual el Sarcoma de Rous es un clásico ejemplo.

El Sarcoma de Rous es usualmente un fibrosarcoma sólido y denso, cuando ocurre en tejidos duros, pero tienen características de mixofibromas cuando ocurre en tejidos blandos.

Hemangiomas y Endotelomas son frecuentes en hígado, con lesiones hemorrágicas por rotura de capilares, dispersas en distintas partes.

Los nefroblastomas son muy similares a los nefromas embrionarios humanos, nunca producen metástasis y aparecen en aves adultas, es de frecuente observación en algunas cepas de Mieloblastosis Aviar (AMV).

Osteopetrosis

Causada por RPL 12, AMV y recientemente purificada una cepa que produce 100 % osteopetrosis (Moscovici, University of Florida). Es una displasia diafisaria progresiva que afecta generalmente los huesos largos. Ocurre exclusivamente en los machos. El proceso proliferativo envuelve trastornos con nueva formación de hueso, que se agrandan notablemente con muy poca médula ósea, Bell y Campbell 1964 (10). Pese a ser un proceso proliferativo no es considerado neoplásico.

Leucosis Linfoidea

Esta enfermedad fue observada en 1896 por Caparini. La cepa RPL-12 caracteriza a este cuadro patológico pese a cubrir además un gran espectro del área tumoral.

Ocurre generalmente en aves adultas, con lesiones en hígado y bazo.

Ningún órgano está exento de manifestar linfomas, sin embargo no se han observado proliferaciones neoplásicas en el sistema nervioso central.

La patogénesis de la enfermedad ha sido demostrada experimentalmente.

El virus ataca primero las células de los folículos de la Bolsa de Fabricius, Cooper, Burmester 1968 (31).

Si la bolsa se extrae por métodos quirúrgicos o se impide su desarrollo por inoculación de andrógenos o derivados, la enfermedad no desarrolla ante la falta de las células receptoras (*target*). Es por eso que a esta enfermedad se la denomina dependiente de la Bolsa de Fabricius.

Las células infiltrativas y proliferativas de tipo linfoblástico primitivo, algunas veces referida en la literatura como hemocitoblasto o de tipo hemocitoblástico, productoras además de gammaglobulina.

El concepto actual considera indispensable la presencia de células de la Bolsa de Fabricius para la aparición de la enfermedad, en la que primero ocurriría la transformación celular, y luego de un período de latencia, migraría a los tejidos viscerales proliferando en forma neoplásica.

Las aves bursectomizadas permanecen virémicas durante toda su vida, pero sin producción de tumores y una marcada incapacidad en la producción de anticuerpos neutralizantes. Sugiriendo una marcada dicotomía en transformación celular (oncogénesis viral) y multiplicación viral a nivel de hospedador, hecho que reafirma la existencia de más de un nivel de defensa, Schudel (88).

Todos los intentos realizados para reconstruir aves bursectomizadas con trasplantes de este órgano y así aclarar la patogénesis de la enfermedad, han resultado hasta hoy infructuosos, Schudel 1970 (88).

La transformación neoplásica en Bolsa de Fabricius es siempre intrafolicular, lo que facilita la diferenciación patológica con enfermedad de Marek en que la infiltración es interfolicular.

Los acúmulos linfocitos son extravasculares a diferencia de eritroblastosis en que son intravasculares.

El principal sistema afectado es el linfopéyico, con leucemia o no, aunque a veces el sistema hematopéyico

está relacionado en forma directa (médula ósea), Hemboldt y Fredrikson 1968 (51).

15. Posibilidades de Control

Erradicación

La infección causada por virus del grupo Leucosis/Sarcoma ha sido erradicada en una serie de experimentos en poblaciones avícolas destinadas a propósitos experimentales.

Los resultados indican claramente que cuando la infección ha sido eliminada del plantel, no son necesarias medidas extremas de aislamiento para impedir la infección.

No hay vacuna utilizable, ni nunca se ha intentado su producción.

El que un programa de erradicación sea un procedimiento aplicable prácticamente depende de tres factores:

- a) Costo del programa de test.
- b) El grado de infección del plantel.
- c) La posibilidad de reinfección.

Se han desarrollado varios sistemas de test para la detección de virus o anticuerpos de leucemia linfoidea, la mayoría depende de cultivo de tejido por lo que son relativamente caros.

A) Elementos de control

Test de RIF: Rubín 1960 (82).

Las bases fueron detalladas anteriormente.

Fue el primer test con que se contó en condiciones experimentales, y con el que se inició la producción de "SPF flocks", grupos de pollos libres de enfermedad (Specific Pathogen free flock). Los principales inconvenientes de este test son:

- a) Un largo período de test.
- b) Los fibroblastos de embrión de pollo deben ser mantenidos por largo tiempo en excelentes condiciones.
- c) Sólo detecta virus de un subgrupo a la vez, por lo que para evitar errores hay que efectuar por lo menos tres test simultáneos (uno para cada subgrupo).

Test de COFAL: Sarma 1964 (85).

Es un test de fijación de complemento y depende de la presencia del antígeno específico de grupo en el nucleocapsid del virus. El antisuero utilizado para reconocer el antígeno problema, es producido en hamster, paloma o conejo. Como el antígeno *gs* es común a todos los subgrupos del grupo Leucosis/Sarcoma, se detectan todos los subgrupos con facilidad.

Test de L-R: Long-Rispens-Okazaki 1970 en prensa (60), Schudel 1970 (87).

Basado en la activación específica de las células L-R ya descrita. Cuando estas células crecen en presencia de un virus de leucosis sintetizan virus en forma completa que es fácilmente demostrable en cultivo de fibroblastos apropiados. En 12 días se pueden dar un resultado del test. El virus producido por las células puede inocularse en huevos, pollos o cultivo de células.

Permite identificar todos los miembros del grupo e individualizarlos. Es el más sensitivo de todos los test.

Test de inmunofluorescencia

Usado indistintamente para la detección de virus o anticuerpos de acuerdo al test empleado, es específico de subgrupo por lo que se deben utilizar sueros específicos a cada subgrupo.

Test de neutralización

Para la detección de anticuerpos, como dependen de las características de la cubierta externa debe utilizarse virus específico de cada subgrupo.

B) Resistencia Genética

Tal como mencionáramos en páginas anteriores la selección por resistencia a la infección es actualmente una buena posibilidad de erradicación de la enfermedad, o por lo menos para su control.

La erradicación probablemente ocurra antes de llegarse a un 100 % de resistencia. Sin embargo los criado-

res deben considerar distintos factores que pueden influenciar la economía de sus planteles, y tal vez considerar también que no sólo pueden seleccionar para el primer nivel de defensa sino para el segundo, o sea, la aparición de tumores.

II - ENFERMEDAD DE MAREK

Con el nombre de Enfermedad de Marek se describe a una enfermedad infecciosa y linfoproliferativa de las aves, conocida comúnmente por un gran número de sinónimos (neurolinfomatosis, parálisis de las aves, parálisis de Marek, etc.).

Pese a ser conocida por más de 50 años se la ha confundido en el diagnóstico de su forma patológica visceral con Leucosis Linfoidea, causada por un virus RNA como vimos anteriormente. Recientes adelantos en el estudio etiológico de Enfermedad de Marek justifican la separación llevada a cabo por Biggs en 1960 (11), de Leucosis Linfoidea.

Es una enfermedad de etiología viral, infecciosa y contagiosa en cuyo cuadro patológico intervienen formas neoplásicas del tejido linfoideo y procesos inflamatorios con una característica predilección por el sistema nervioso periférico.

Causada específicamente por un virus del grupo Herpes de características oncogénicas (DNA), aislada por varios grupos de investigadores en forma simultánea.

Las evidencias de oncogénesis producidas por un virus Herpes en Enfermedad de Marek aumenta la expectativa de los medios virológicos mundiales ya que podría adquirir gran importancia como modelo experimental. Hace no mucho tiempo se aisló un virus Herpes del adenocarcinoma de rana o tumor de Lucké Faucett D. W. 1956 (41) y Lunger P. D., 1965 (61) y en 1966 Raucher y col. (75) publican el hallazgo de un virus Herpes asociado a sistemas celulares de Linfoma de Burkitt. Por último Meléndez en 1970 (63) consigue la reproducción de linfomas de gran ma-

lignidad, en monos, empleando un virus Herpes.

Los virus Herpes están distribuidos en todo el reino animal y la relación virus y enfermedad (en nuestro caso neoplasia) debe ser tomada con cautela. Aun así el presente trabajo aporta suficientes evidencias como para confirmar la etiología viral de Enfermedad de Marek, aunque no aclarar definitivamente el problema de su actividad oncogénica.

1. Etiología

Churchill y Biggs en 1967 (32), aislaron un virus Herpes íntimamente asociado al sistema celular empleado (riñón de pollo) y simultáneamente Solomon J. y col. (93) en el Regional Poultry Research Laboratory East Lansing, aislaron un virus de características similares en cultivos de fibroblastos de embrión de pato. La caracterización final como virus Herpes la dio Nazerian en 1968 (66) (67), con microscopía electrónica en fibroblastos de embrión de pollo y pato.

Posteriormente se registraron aislamientos de virus Herpes de características similares a los ya mencionados confirmando los aislamientos iniciales.

En muy pocas oportunidades se han observado partículas de virus Herpes en tumores viscerales o lesiones neurales de la enfermedad, en cambio sí se observan con regular asiduidad en cultivo de tejidos obtenidos de aves infectadas con virus Herpes. Sin embargo se han observado partículas virales de tipo C en nervios y linfocitos, de casos de Enfermedad de Marek, Distéfano y Dougherty 1964 (36), Wight y col. 1967 (105).

En 1969 K. Cook (30), sugiere la existencia de Virus de Reticulo endoteliosis (RE) y virus sinsicial respiratorio (SRV) en las preparaciones obtenidas de casos de enfermedad de Marek.

Estos datos son posteriormente rectificados ya que estos virus se presentaban como contaminantes de sus

medios de cultivos y no correspondían a agentes etiológicos de Enfermedad de Marek.

En 1969 Witter y col. (107) aporta datos convincentes sobre la etiología de la enfermedad, aunque persiste en ellos la duda de la transmisión de la enfermedad por filtrados libres de células, que posteriormente fue aclarado como veremos más adelante.

Resumiendo, las evidencias circunstanciales de que un virus Herpes es el agente causal de enfermedad de Marek son los siguientes:

1. En todas las cepas de virus de Enfermedad de Marek fue posible aislar un virus Herpes, resultando negativo el intento de aislar virus Herpes de pollos mantenidos en condiciones de aislamiento.
2. Fue aislado en un 68 % de poblaciones avícolas con o sin historia de aparición de Enfermedad de Marek en forma clínica, Burmester 1969 (23).
3. Se aisló de 85 pollos sobre 86 con lesiones macro y microscópicas.
4. Se obtuvo una correlación del 87 % entre cultivos de células infectadas, con efecto citopatológico evidente, y producción de la enfermedad al inocular a pollos.

Por último, este virus Herpes recogido de foliculo de pluma de pollos infectados, tratado convenientemente a fin de liberarlo de material celular, resultó altamente infeccioso, luego de la inoculación a pollos. Siendo ésta una prueba confirmatoria de que un virus Herpes es el agente etiológico de Enfermedad de Marek (MDV o MDHV), Nazerian y Witter 1970 (68).

En base a la morfología de la partícula viral, su contenido en ácido nucleico, actividad de inhibidores de síntesis y estrecha asociación celular el agente etiológico de Enfermedad de Marek ha sido clasificado como miembro del grupo B de los virus Herpes.

2. Propiedades Físicas

La partícula viral infecciosa corresponde por sus características morfológicas a un virus Herpes con 162 capsómeros y dos envolturas de naturaleza celular. Su ácido nucleico es DNA constituyendo la parte central de su nucleocapsid. Mide de 150-200 μ y es muy difícil observarlo en preparaciones libres de células. Nazerian 1970 (69).

El gradiente de densidad en cloruro de cesio del DNA viral, es de 1,716 gn/cm^3 a diferencia del DNA celular que es de 1,702 gn/cm^3 . Lee y col. 1970 (59), datos que corresponden a la cepa GA de Enfermedad de Marek muy similares a los obtenidos por el mismo grupo con la cepa JM.

3. Propiedades químicas

Lee y Nazerian, y Burmester 1970 (59), concluyen que para la cepa GA, asumiendo que la molécula de DNA es linear, la composición de bases es de 57 % de guanina más citosina en contraste a un 43 % de las mismas bases en el DNA celular.

La exacta proporción de constituyentes químicos y las características químicas de su envoltura externa no han sido aún determinadas.

Las observaciones primitivas de la inhibición de la síntesis viral por compuestos químicos, específicamente in-

hibidores de la síntesis del DNA, como 5-bromo-desoxiuridina y la constitución química de los corpúsculos de inclusión indican que esta enfermedad, es causada por un virus DNA, Churchill y Biggs, 1967 (32), Witter, Burgoyne, Salomon, 1968 (106).

4. Ultraestructura

El efecto citopatológico se manifiesta en cultivo de fibroblastos de embrión de pato y cultivo de células renales de pollo, algunas cepas dan efecto citopatológico en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo.

No hay evidencias de efecto citopatológico en células de mamíferos bajo las condiciones experimentales empleadas.

El efecto citopatológico se manifiesta por la formación de placas focales discretas. Las placas contienen células esféricas, predominantemente policariocitos, con cuerpos de inclusión intranucleares Felguen positivos indicando que la inclusión contiene DNA.

Es posible distinguir entre el efecto citopatológico producido por las cepas de virus de Enfermedad de Marek y la cepa vaccinal obtenida de pavo.

Pese a que hay gran similitud entre el efecto citopatológico sobre cultivo de fibroblastos de embrión de pato y riñón de pollo es posible establecer diferencias (cuadro Nº 7).

CUADRO Nº 7

<i>Efecto citopatológico</i>		
— Tiempo luego de inoculación	Fibroblastos de embrión de pato 6-9 días	Riñón de Pollo 3-7 días
— Tamaño	Mayor de 1 mm.	Mayor de 0.5 mm.
— policariocitos esféricos	+	+
— células irregulares	+	—

En los cuerpos de inclusión intranucleares es posible observar partículas virales. La mayoría de las partículas virales observadas en el núcleo correspondían a viriones desnudos, aunque también se observan viriones completos pero dentro de vesículas nucleares. Parecería que en caso de replicación viral in-vivo la cantidad de virus con cubierta externa en citoplasma es mucho mayor a la replicación in-vitro y probablemente influiría en la eficiente salida de partículas virales infecciosas.

En coloraciones negativas de las partículas virales es posible observar una cubierta externa, nucleocapsid y un material filamentososo entre capsid y cubierta externa.

Aún se necesita mayor énfasis en los estudios ultraestructurales de la partícula viral.

En el epitelio de los folículos de pluma los cambios ultraestructurales con aparición de cuerpos de inclusión nucleares y gránulos citoplásmicos aparecen a nivel de la capa transitiva de la epidermis. Es posible observar inclusiones citoplásmicas con gran cantidad de partículas virales en su interior.

5. Purificación

Es imposible hasta hoy hablar de preparaciones purificadas, excepto en las experiencias de composición química ya mencionadas.

La estrecha asociación celular hace que desde el punto de vista práctico sea imposible encarar la obtención de materiales purificados sin una preparación viral de muy alto título ya que la infectividad del material disminuirá al encontrarse libre de elementos celulares.

Recientes investigaciones prometen ampliar el campo de posibilidades en esta área, ya que permitirán obtener material infeccioso libre de elementos celulares, empleando para ello virus extraído de los folículos de pluma de aves previamente infectadas, Nazerian y col. 1970 (68), Calnek 1969 (26).

6. Antigenicidad

Por inmunofluorescencia es posible identificar antígenos específicos en el citoplasma de células infectadas in-vitro o en epitelio de folículos de pluma, como en un gran número de tejidos correspondiendo esta fluorescencia a la presencia de partículas virales, Calnek 1970 (26), Purchase 1969 (74).

Al infectarse una célula renal, se forman nuevos antígenos a nivel de membrana celular, tal como ocurre en otros virus inductores de transformación celular, Chen, Purchase 1970 (27).

En el suero de aves infectadas se detectan hasta cuatro bandas de precipitación diferentes en el test de difusión en agar.

La infección viral determina la aparición de anticuerpos precipitantes en el animal hospedador. También la de anticuerpos fluorescentes.

7. Ocurrencia

En condiciones naturales, cuando la infección se establece en un plantel, 100 % de las aves son infectadas aunque no manifiesten síntomas clínicos o patológicos de la enfermedad.

Aparentemente los pollos están libres de infección al nacer, y si están infectados esto ocurre en muy bajo nivel, Witter 1970 (108), Sevoian 1968 (92). A los 9-16 días de edad comienza a detectarse virus circulante y en distintos tejidos, en aves inoculadas por vía intraperitoneal al nacer. Lo mismo sucede en aves expuestas en forma natural a la enfermedad al nacer. Las lesiones microscópicas aparecen entre las 4-5 semanas. Los anticuerpos precipitantes se detectan entre las 6-7 semanas.

Si se detecta la presencia de anticuerpos maternos, la respuesta se retrasa pero no disminuye el porcentaje de infección, aunque datos preliminares establecen una correlación entre mortalidad y presencia de anticuerpos maternos.

La extirpación de la Bolsa de Fabricius a edad temprana seguida de exposición natural a la enfermedad o inoculación no influye en la respuesta a la enfermedad, Payne 1970 (en prensa).

8. Trasmisión

La trasmisión horizontal de la enfermedad, es la forma más común y la de mayor implicancia epidemiológica, Sevoian 1968 (92), Witter 1970 (109) lo demostraron, pese a realizar conclusiones diferentes frente a resultados muy parecidos. El autor se solidariza con la opinión de Witter, ya que la trasmisión vertical de la enfermedad si existe es debida a condiciones excepcionales y no la vía natural de trasmisión.

Hasta el hallazgo de un virus libre de células a partir de epitelio de folículos de pluma, la trasmisión experimental de la enfermedad ocurre sólo en presencia de células viables.

El virus está presente en la cavidad nasal y oral de las aves infectadas, eliminándose por tracto digestivo, facilitando así una rápida diseminación de la enfermedad, Sevoian y Chamberlain 1963 (90), Witter y Burmester 1968 (106), Kenzy y Biggs 1967 (56).

Sobrevive por largos períodos en la suciedad de los gallineros y camas de pollos, Biggs y Payne 1967 (14), Witter, Burgoyne y Burmester 1968 (106).

El material obtenido de la desca-mación epitelial de aves enfermas es posible desecarlo y congelarlo, sin pérdida de la infectividad, por largos periodos de tiempo. Estos resultados, demostrados por Calnek, sumados a los de existencia de virus libre de elementos celulares en folículos de pluma, aclaran más el panorama epidemiológico de la Enfermedad de Marek, ya que esto significaría la vía de salida del virus del animal infectado. Las evidencias que hasta hoy tenemos, sugieren a las vías respiratorias como puerta de entrada del virus.

Se ha probado la existencia de virus infeccioso en un escarabajo de

tierra, el *Alphitabius diaperinus*, lo que amplía aún más las consideraciones epidemiológicas.

No hay diferencias en mortalidad por Enfermedad de Marek en lotes de pollos vacunados contra encefalomiélitis aviar y no vacunados, Davis, Dawe y Brown 1969 (35).

Mucho se ha hablado de la influencia de coccidiosis en Enfermedad de Marek y viceversa, pero hasta hoy, no hay absolutamente nada probado en ambos sentidos, varios intentos de investigadores reconocidos han fracasado rotundamente.

9. Patología

Desde el punto de vista clínico se reconocen dos manifestaciones de Enfermedad de Marek:

- a) *Clásica*: Los nervios periféricos son los más afectados y por lo tanto las manifestaciones de parálisis y trastornos motores caracterizan a este cuadro.
- b) *Aguda*: Con predominio de tumores viscerales y lesiones nerviosas menos frecuentes, el curso de la enfermedad es muy corto y la mortalidad es muy alta. Ataca frecuentemente pollos jóvenes y es propia de los modernos sistemas de explotación.

Diagnóstico: Se detallarán brevemente algunos caracteres de interés. El carácter diferencial de las lesiones de Enfermedad de Marek con las de Leucosis Linfoidea, será motivo de una publicación posterior.

Macroscópicamente, los nervios periférico, vago, ciático, braquial, celiaco, etc. y los plexos correspondientes son los más frecuentemente afectados, agrandados dos o tres veces su tamaño normal, o bien con pérdida de la coloración y estriación. Es frecuente la aparición de tumoraciones nodulares aisladas.

Las formas viscerales no son diferenciables en forma macroscópica de las de Leucosis Linfoidea, ya que ocupan la misma distribución a excepción de Bolsa de Fabricius. Los ór-

ganos más frecuentemente afectados son: ovario, hígado, riñón y bazo, con menor frecuencia pero sin ser excepcionales en pulmón, corazón, Bolsa de Fabricius, músculo esquelético e intestino.

Microscópicamente, las lesiones neurales están constituidas por células pleomórficas, linfocitos grandes, medianos y pequeños, células plasmáticas y un tipo celular aberrante conocido como células de Marek. Pueden parecer de tipo inflamatorio con edema y pequeños linfocitos o bien neoplásico en los casos avanzados de la enfermedad.

Pese a afectar el tejido hematopoyético, es aleucémica, y sólo puede parecer leucémica en los últimos estadios de la enfermedad. Generalmente son anémicos antes de morir.

En los órganos viscerales el pleomorfismo celular de las lesiones es el criterio más significativo para la diferenciación con Leucosis Linfoidea. Cambell en 1956, sostiene que la primera lesión observable a nivel microscópico es una necrosis focal con infiltración linfocitaria, negada luego por Biggs en 1965. Sin embargo a criterio del autor es un hallazgo bastante frecuente en casos tempranos de la enfermedad.

10. Control

Desde el punto de vista genético, Cole (29) demostró la posibilidad de obtener líneas resistentes y susceptibles en sólo dos generaciones.

Stone (95), del Regional Poultry Research Lab., indica que la mortalidad debida a Enfermedad de Marek está controlada por tres locus por lo menos y que resistencia es dominante sobre susceptibilidad. Comprobó además que la Línea 6 de ese laboratorio es muy susceptible a la infección, respondiendo con los títulos más altos de anticuerpos precipitantes pero es la más resistente al desarrollo tumoral, comparada con otras dos líneas y sus cruza, sugiriendo un mecanismo de bases similares al que esta

misma Línea 6 de pollos experimenta en Leucosis Linfoidea.

Casi todos los centros de investigación del mundo dedicados al estudio de Enfermedad de Marek tratan de encarar el control de la enfermedad por vía de la vacunación.

Hay tres tipos de cepas vacunales:

- a) Atenuadas, obtenidas de pollo, sin transmisión horizontal.
- b) Atenuadas, obtenidas de pollo, con transmisión horizontal.
- c) Obtenidas de otro animal hospedador.

Al primer tipo corresponde la vacuna elaborada en el Houghton Poultry Lab., por Churchill y Chubb y Payne 1969 (33). Es una cepa atenuada por pasajes en cultivo de células renales de pollo. Da una protección bastante cuestionable, hasta hoy, pues en todos sus experimentos, pese a tener una buena exposición en sus aves control (sin vacunar), tienen una alta tasa de mortalidad en las aves vacunadas.

Rispens, comunicación personal (76), aisló una cepa atenuada de un brote de Enfermedad de Marek, luego de varios pasajes en cultivo de tejido, con el solo propósito de propagación, que al inocularse a pollos otorgaba una buena protección, y se transmitía en forma horizontal; los resultados son hasta ahora satisfactorios, pese al escaso número experimental. Ofrece sin embargo la particularidad de su transmisión horizontal, que si no se manifiesta por una mutación hacia patogenicidad, ofrecería características por demás interesantes, ya que inoculando unas pocas aves se lograría la protección de la totalidad del plantel.

En el Regional Poultry Research Laboratory de East Lansing, el equipo bajo el mando del doctor B. R. Burmester trabaja en base a una cepa de virus Herpes aislada de pavos, que es apatógena para pavos y para pollos. Posee componentes antigénicos comunes con el virus de Enfermedad de Marek, demostrables por inmunodifusión e inmunofluorescencia, pero

fácilmente diferenciable por su efecto citopatológico en cultivo de tejidos. Hay más de 380.000 aves inoculadas en condiciones de campo, con resultados hasta hoy altamente satisfactorios, pese a no lograrse una buena exposición, Okazaki, Purchase y Burmester 1970 (79).

Como inconvenientes comunes a las tres vacunas, es que necesitan de preparaciones celulares infecciosas como material a inocular, lo que dificulta el manejo de las cepas vacunales. su producción y traslado, inconvenientes que se obviarían con la posibilidad de liofilización sin pérdida de viabilidad viral en el procesamiento.

Otra posibilidad de control de la enfermedad es la aplicabilidad de la crianza de pollos en condiciones de aislamiento con presión positiva o negativa según el caso. Sólo una experiencia en condiciones comerciales de este tipo ha resultado satisfactoria, y todos los intentos de repetirla han resultado infructuosos. Que estos sistemas sean aplicables o no dependerá de:

1. Ausencia de transmisión vertical.
2. Procedimientos eficaces para eliminar la contaminación en los alojamientos.
3. Posibilidad de contar con alojamientos económicos que eliminen la infección del ambiente externo.

Agradecimiento: Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. B. R. Burmester, sin cuya cooperación y guía

III - OTRAS SIN CLASIFICAR

Reticuloendoteliosis. (RE) o virus T

En 1958 Twiehaus (98), aisló un virus de un pavo adulto con lesiones de leucosis. Sevoian en 1964 (91) trabajando con este virus propone su introducción en el Complejo Leucósico Aviar, llamándolo virus T a la cepa de reticuloendoteliosis con que trabajó.

Zeigel en 1966 (110) demuestra que este virus induce reticuloendoteliosis en pollos, identifica a un virus de RNA, de 180 mu de diámetro, y muy parecidos a los de Leucosis Linfoidea. Multiplica en células endoteliales y emerge por gemación a través de la membrana celular.

Theilen en 1966 (97) demostró la patogenicidad para pollos, pavos y perdiz.

Finalmente Witter en 1970 (109), demostró la existencia de lesiones macroscópicas linfoproliferativas neurales similares a las causadas por enfermedad de Marek. Estas lesiones constan en su mayoría de células plasmáticas y pueden diferenciarse de las de Enfermedad de Marek. Sin embargo la falta de transmisión horizontal de la enfermedad y su escasa patogenicidad en condiciones naturales posibilita la diferenciación de ambas enfermedades.

Como vemos, no hay suficientes conocimientos sobre reticuloendoteliosis como para incluirla junto a las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar.

este trabajo no podría haber sido realizado. Al Dr. O. García, por sus agudas y productivas críticas

B I B L I O G R A F I A

1. Ahlstrom, C. G. Nat. Cancer Inst. Monogr. 17, 299-319. 1964.
2. Alexander-Jackson. Scient. Research. Dec. 22. 1969.
3. Allison y Burke. J. Gen. Microbiol. 27, (181-194). 1962.
4. Bader. Virology 22, 462-468. 1964.
5. Bader. Virology 29, 452-457. 1966.
6. Bader. Survival Carcinogenesis. Nagoya. Japón, pág. 144. 1966.
7. Baluda. Virology 32, 428-437. 1967.
8. Bernhard. Cancer Research 19, 491-509. 1958.
9. Bernhard. Bull. Cancer. 43, 407-422. 1956.
10. Bell y Cambell. J. Comp. Path. 71, 85-93. 1964.
11. Biggs. P. Brit. Vet. Journal. 117-326. 1960.
12. Biggs. P. Poultry Review. 1963.
13. Biggs, P. Advances in Cancer Research. Acad. Press. 1966.
14. Biggs y Payne, J. Nat. Cancer Inst. 39, 267-280. 1967.
15. Bonard y Beard. J. Nat. Cancer Inst. 23, 183-197. 1959.
16. Bonard y Beard. J. Nat. Cancer Inst. 30, 290-297. 1963.
17. Burmester B. y Waters. Poultry Science 35, 7-26. 1947.
18. Burmester, B. Poultry Science 35, 1089-1093. 1953.
19. Burmester y Gentry. Cancer Research 34, 42. 1954.
20. Burmester y Fredrickson. Acta Oncológica. 1961.
21. Burmester, B. R. Cold Harbor Sym. 27, 471-477. 1962.
22. Burmester, B. R. Agri. Res. Pub. N° 44-195. 1967.
23. Burmester, B. Recent Results in Cancer Research. Springer Verlag. 1969.
24. Burmester y Walter, J. Nat. Cancer Inst. 26, 511-518. 1961.
25. Caparini. Clin. Vet. Milan. 19, 433-435. 1896.
26. Calnek, B. y Aldinger. Avian Disease 14. 1970.
27. Chen, L. y Purchase, G. H. Virology 40, 410-412. 1969.
28. Claude, J. Cancer Research 7, 421-450. 1947.
29. Cole. En prensa. 1970.
30. Cook, K. J. Nat. Cancer Inst. 43, 203-212. 1969.
31. Cooper, Burmester y col. J. Nat. Cancer Inst. 41, 373-382. 1968.
32. Churchill y Biggs. Nature 215, 528-530. 1967.
33. Churchill, Chubb y Payne. Nature 221, 744. 1969.
34. Crowford y Crowford. J. Virology 13, 227-232. 1961.
35. Davis, Dawe y Brown. Avian Dis. Vol. XIII, N° 4. 1969.
36. Di Stefano y Dougherty. J. Nat. Cancer Inst. 33, 921-934. 1964.
37. Duesberg, P. P. Nat. Acad. Science U.S.A., 54, 1511-1518. 1968.
38. Ellerman y Bang, Badet. Abt. I. Orig. 46, 595-609. 1908.
39. Engelberth y Holm. Acta Path. Micro. Scand. 37, 138-144. 1938.
40. Elford y Andrews. Brit. J. Exp. Path. 17, 422-430. 1936.
41. Fawcett, D. J. Bioph. Bioch. Cytol. 2, 725. 1956.
42. Feldman y Olson, Biester y Swarte. 1965.
43. Furth, J. Physiol. Rev. 26, 47. 1946.
44. Green y Beard. J. Nat. Cancer Inst. 16, 163-172. 1955.
45. Hageneau. J. Nat. Cancer Inst. 20, 633-649. 1959.
46. Hageneau, J. Microsc. I. 445-454. 1962.
47. Hanafusa, H. Proc. Nat. Acad. Science U. S. A., 51, 41-48. 1964.
48. Hanafusa, T. Virology 34. 1968.
49. Hanafusa, H. y T. Hanafusa. Virology 40. 1970.
50. Heine, U. J. Nat. Cancer Inst. 28, 41-105. 1962.
51. Hemboldt y T. Fredrickson. Nat. Cancer Inst. Mono. 32, 1968.
52. Huebner, R. P. Nat. Acad. Science U. S. A. 54, 742-749. 1963.
53. Ishizaki y Vogt. Virology 30, 377-384. 1966.
54. Kahler, J. J. Nat. Cancer Inst. 15, 337-339. 1954.
55. Kelloff y Vogt. Virology 29, 377-384. 1966.
56. Kenzy y Biggs. Vet. Record. 80, 565-568. 1967.
57. Langlois y Beard. Cancer Research 26, 2056-2074. 1969.
58. Lee, Roizman, Spear y Burmester. Proc. Nat. Acad. Sci U. S. A. 64, 952-966. 1965.
59. Lee, Nazerian y Burmester. J. Virology, en prensa. 1970.
60. Long, Rispens y Okazaki. Avian Disease, en prensa. 1970.
61. Lungner, P. An. N. York Acad. Sci. 126-289. 1965.
62. Marek, J. Deuschetierarztl Wochschr. 15, 417-421. 1907.
63. Melendez, L. y col. Lab. Animal Care, 19, 372. 1969.
64. Mladenov, J. Nat. Cancer Inst. 38, 251-285. 1967.
65. Moloney, J. J. Nat. Cancer Inst. 34, 4-16. 1960.
66. Nazerian, K. y col. Proc. Soc. Exp. Biol. y Med. 127, 177-182. 1968.
67. Nazerian, K. Proc. Elec. Microscop. Soc. 26 th. Annual Meeting. 1968.
68. Nazerian y Witter. J. of Virol. 388-397. 1970.
69. Nazerian, K. Septime Congress Inter. de Micr. Elec. Crenoble. 1970.
70. Okazaki, Purchase y Burmester. Avian Disease 2, 413-429. 1970.
71. Pantina, G. Vet. Ital. 8-33. 1957.
72. Pappenheimer y col. J. Exp. Med. 49, 63-102. 1929.

73. *Piraino, F.* Virology 32, 700-707. 1967.
74. *Purchare, G. H. J.* Virology 3, 557-565. 1969.
75. *Raucher, F. y col.* Cancer Research 26, 1176. 1966.
76. *Rispens, B.* Comunicación personal.
77. *Robinson, W. P.* Nat. Acad. Science U. S. A. 54, 137-144. 1965.
78. *Robinson y Duesberg.* Survival Carcinogenesis Monograph, in Tumor Viruses. 1967.
79. *Rolof.* Mag. ges Thierheilk 34, 190. 1868.
80. *Rubín, H. y Temin, H.* Virology, 7, 75-91. 1959.
81. *Rubín, H.* Virology 11, 28-47. 1960.
82. *Rubín, H. P.* Nat. Acad. Science U. S. A. 46, 1105-1119. 1960.
83. *Rubín, Cornelius y Fanshier.* Proc. Nat. Acad. Science U. S. A. 47, 1058-1059. 1961.
84. *Rubín, H. P.* Nat. Acad. Science U. S. A., 60, 482. 1969.
85. *Sarma, P.* Nat. Canc. Inst. Monog. 17, 481-493. 1964.
86. *Sarma, P.* Virology 23, 313-321. 1964.
87. *Schudel, A. A.* Tesis para Magister Scientiae. Fac. C. Vet. 1970.
88. *Schudel, A. A.* En prensa.
89. *Sharp y Beard.* Biochem. Biophys. Acts. 14, 12-17. 1954.
90. *Sevoian y Chamberlain.* Avian Dis. 7, 102-105. 1963.
91. *Sevoian, M.* Nat. Cancer Inst. Mono. 14, 99-119. 1964.
92. *Sevoian, M.* Poultry Science, 47, 1646. 1968.
93. *Solomon, J. y col.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 173-182. 1965.
94. *Steck y Rubin.* Virology 29, 642-655. 1968.
95. *Stone, H.* Comunicación personal.
96. *Temin, H.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 322-329. 1964.
97. *Theilen, G. J.* Nat. Cancer Inst. 37, 730-743. 1966.
98. *Twiehaus, M.* Sin publicar. 1958.
99. *Vogt y Luykx.* Virology 20, 75-87. 1963.
100. *Vogt, P.* Advances in Virus Research. 11. Acad. Press, 294-374. 1965.
101. *Vogt y Ishizaki.* Virology 26, 664-672. 1965.
102. *Vogt, P.* Proc. Nat. Acad. Science. U. S. A., 58, 101. 1967.
103. *Weiss.* Virology 32, 719-730. 1967.
104. *Weiss, R. A. J.* Gen. Virol. 5, 511-533. 1969.
105. *Wight, P. A.* Nature 216, 804-805. 1967.
106. *Witter, R. y col.* Avian Dis. 12, 522-530. 1968.
107. *Witter, R. y col.* Avian Dis. 13, 171-184. 1969.
108. *Witter, R. y col.* Avian Disease 14, 1970.
109. *Witter, R. y col.* En prensa. 1970.
110. *Zeigel, R. J.* Nat. Cancer Inst. 37, 730-743. 1966.

PRODUCCION DE TOXINA TETANICA EN DOS MEDIOS DE CULTIVO DIFERENTES (1)

Raúl Demarchi, Mirta Casagne, Carlos Gómez, Ernesto Fischer, Nélica Martínez
y Dante Bernagozzi

R E S U M E N

En el presente trabajo se comparan dos medios de cultivo para la producción de toxina tetánica. El medio de cultivo clásico a base de digerido de estómagos de cerdo y agua de carne, y un medio sintético con hidrolizado tripsico de caseína y peptona de soya.

El medio sintético permite obtener un toxoide cuya actividad es semejante a la del toxoide obtenido con el medio clásico con un costo inferior en un 24 % considerando únicamente el valor de la materia prima y cuyos valores de nitrógeno son de 2,7 gamas por Lf frente a 9 gamas por Lf del obtenido por el del medio clásico.

Por lo expuesto los autores consideran justificado el empleo del medio sintético pues permite abaratar la producción y provee productos de alta purificación. Los estudios continúan a fin de determinar las variables que inciden en la producción "standarizada" de toxinas y la eficacia de los antígenos obtenidos de las mismas.

TETANIC TOXIN PRODUCTION IN TWO DIFERENT CULTURE MEDIUM

S U M M A R Y

In this work we use two comparative culture medium of tetanic toxin production One of the culture medium is a classic broth upon the base of digested pig stomach with meat broth and the other is synthetic tripsic hydrolized caseine and soys pepton.

The sinthetic medium yield a toxoid in which the activity is similar to that obtained by the classical medium and is 42 percent less expensive considering the value of raw material in which the nitrogen value is 2,7 gammas by Lf obtained from the classic medium.

The author consider the employ of sinthetic medium usefui because it will permit the low cost of toxoid production and give a high purify product. Studies will be continued to determine the variabilities that they will be do to the standard productions of toxine and the power efficiency of obtained antigens.

(1) Trabajo realizado en la Cátedra de Inmunología General y Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

A N T E C E D E N T E S

La educación sanitaria de las poblaciones, en lo que se refiere a la protección de ciertas enfermedades mediante la vacunación específica, ha hecho que cada día sea más urgente la necesidad de elaborar substratum específicos de gran actividad, de escasa reacción secundaria y bajo costo.

Por tal motivo, en las últimas décadas muchos investigadores se han abocado al estudio y conocimiento de las propiedades biológicas y ecológicas de ciertas bacterias productoras de toxinas, lo que permitió reemplazar las fórmulas empíricas preconizadas por Roux y Yersin y Roux y Martin en la preparación de medios de cultivos basados en las mezclas del resultado de la digestión de estómagos de cerdo y agua de carne, por medios de composición química definida: Pappenhein y Johnson; Pappenhein y Robinson y Muller y Miller.

Sin embargo, a pesar de la composición química definida de estos medios de cultivo, aún hoy subsisten inconvenientes que derivan de la calidad de los elementos que intervienen en la fórmula, del volumen del medio, de la calidad de la siembra y hasta de su conservación.

Estas dificultades, que se presentan con relativa frecuencia en los laboratorios dedicados a la elaboración de vacunas y sueros terapéuticos, nos han sugerido la idea de estudiar el problema, tratando de obtener toxina tetánica de buena calidad, con rendimiento estable y de bajo costo.

Para tal fin, hemos comparado dos medios de cultivo: uno, de frecuente uso todavía en los laboratorios de nuestro país, que consiste en ligeras modificaciones del primitivo de Roux y Martin, y otro, con hidrolizado triptico de caseína y peptona de soya.

MATERIAL Y METODO

En el presente trabajo hemos comparado los resultados de dos medios de cultivo cuya fórmula se detalla a continuación:

Medio "A": A base de digestión de estómago de cerdo y agua de carne.

Composición:

Estómago de cerdo, lavado desengrasado y picado ..	150 grs.
Agua	1000 ml.
Acido clorhídrico D1,18 ...	10 ml.

En frascos Pyrex de 9.000 ml. de capacidad, se realiza la digestión durante 2 horas a 48°C. Luego se somete a una temperatura de 85°C durante 15 minutos y se enfría rápidamente, para dejarlo luego en reposo durante 48 horas en la cámara frigorífica a 8°C. Los flóculos que aparecen se separan por filtración en placa de Seitz.

El agua de carne, se prepara por maceración a temperatura ambiente o en la cámara frigorífica, en la proporción de:

Carne de ternera desengrasada y picada	2 kgs.
Agua destilada	3 lts.

Posteriormente se somete a ebullición durante 30 minutos y se pasa por trapo de queso mojado. Se completa a volumen inicial.

Preparación del Medio:

Digestión de estómago de cerdo	1 parte
Agua de carne	1 parte

Se calienta la mezcla a 50°C, se lleva a pH 6,3-6,4; se hierve durante 3', se filtra para separar el floculado y luego se esteriliza a 110°C durante 30 minutos.

Medio "B": Este medio se obtuvo del comercio ya preparado y desecado. Su composición es la siguiente:

Hidrolizado triptico de caseína	17.0 grs.
Peptona de soya	3.0 grs.
Cloruro de sodio	5.0 grs.
Fosfato dipotásico	2.5 grs.
Glucosa	2.5 grs.
Agua destilada	1000 ml.
pH: 7,3	

Esterilización a 120°C durante 15 minutos.

A ambos medios de cultivo se les agregó después de la esterilización el 1 % de glucosa esterilizada por tinalización.

Cl. Tetanii:

La cepa usada para estos estudios fue la Copenhaguen, mantenida en agar blando glucosado. La siembra de los medios antes mencionados se efectuó con 10 ml. de un cultivo de 24 ho-

ras en medio Tarozzi, por cada 7 litros de caldo.

Incubación:

Siete días a estufa a 37°C, sin pasaje de hidrógeno.

Toxina:

Se obtuvo mediante la filtración de los medios de cultivo por placa clarificante en filtro de Seitz y por bujía Berkelfeld "W".

Toxoides:

Se obtuvo después de la filtración por el agregado de formol al 40 % en la cantidad del 6 por mil e incubación a la estufa de 37° C. durante 7 días.

Toxicidad:

La toxicidad de las toxinas se midió mediante la inoculación de 1 ml. de diluciones múltiples de 1/10.000 hasta 1/100.000, en 3 lauchas de 20 grs. de peso, en un periodo de observación de 96 horas.

R E S U L T A D O S

Los resultados que se consignan en este trabajo corresponden al valor

medio de cinco experiencias realizadas para cada medio de cultivo.

CUADRO Nº 1

Medio de cultivo "A": D. L. M. por ml.:	40.000
Medio de cultivo "B": D. L. M. por ml.:	100.000

De acuerdo a las cifras anteriores podemos apreciar que el Medio de cultivo "B" compuesto por hidrolizado triptico de caseína, ha dado 2 veces y media más toxina que el medio "A", compuesto por digestión péptica de estómago de cerdo.

Con estos valores, se procedió a transformar las toxinas en toxoides de acuerdo a la técnica descripta precedentemente. Las pruebas de inocuidad de los mismos se realizaron mediante la inoculación de 0,5 mililitros de toxoides a 6 lauchas de 20 grs. de peso cada una, con un periodo de observación de 30 días.

Concentración y purificación de los toxoides:

Para la concentración y purificación de los toxoides se siguió la técnica de Modern y Ruff, basada en la precipitación alcohólica a punto isoelectrico de 4,7 y a temperatura de menos de 14 grados centígrados.

Valoración de los toxoides concentrados:

Previa clarificación por placas en filtros Seitz y esterilización por bujía Berkelfeld "W", se realizaron controles de esterilidad en agar simple,

caldo simple y en Tarozzi. Las pruebas de inocuidad se realizaron en lauchas de 20 grs. de peso.

La valoración se realizó por la prueba "in vitro" de floculación frente a un suero patrón de 100 Lf por mililitro.

Floculación:

Medio "A" valor: 30 Lf por ml.

Medio "B" valor: 60 Lf por ml.

Comparación de la pureza de los toxoides:

A fin de poder establecer el grado de pureza de los toxoides concentrados, se realizó un estudio comparativo de los medios de cultivo, valorando la cantidad de nitrógeno por ml. del medio y su relación con los Lf mediante el método de Kjeldahl antes y después de la purificación cuyos resultados se consignan en el cuadro N° 2.

CUADRO N° 2

	Toxoide Nativo		Toxoide Purificado	
	mg. N/ml.	mg. N/Lf	Gama N/ml.	Gama N/Lf.
Medio "A"	3,40	0,65	270	9
Medio "B"	2,80	0,28	162	2,7

Como podemos observar por el cuadro precedente, la purificación del Medio "A", solamente alcanzó a 117 veces mientras que con el Medio "B" sobrepasó las 500 veces.

Poder Antigénico de los toxoides purificados:

Esta prueba no se hizo con el objeto de comparar la eficacia de un toxoide con respecto al otro, sino simplemente verificar si el toxoide obtenido en el medio de cultivo "B", era por lo menos tan antigénico como los obtenidos en el medio de cultivo "A", que ha sido repetidamente estudiado en nuestro medio, por Sordelli y Ferrari, Modern y Ruff y Manzullo y Arzeno.

Para tal fin solamente hicimos pruebas de protección "in vivo", inoculando para cada toxoide, 6 conejos de 2.000 grs. por vía subcutánea con 10 Dosis Test del antígeno y 21 días más tarde se les hizo una descarga de 1.000 Dosis Letales Mínimas, para cobayo, de una toxina patrón.

Los controles, también conejos de 2.000 grs., en cantidad de 2 por cada partida, inoculados también con 1.000 D. L. M. (cobayo) de la toxina patrón, mueren entre las 48 y 72 horas

Estos resultados demuestran que en el medio de cultivo "B", hidrolizado triptico de caseína y peptona de soya, se produce toxina cuyo poder antigénico es por lo menos semejante al medio clásico "A", preparado con hidrolizado de estómago de cerdo y agua de carne.

Los estudios para resolver problemas inherentes a la cantidad de inóculo, tipo de cepa, variaciones de las distintas marcas del producto que se encuentran en plaza, y la eficacia de éstas obtenidas en el medio "B", continúan.

Costo de producción de la toxina:

Difícil es tratar de comparar costos de un producto en una institución oficial, ya que en estos organismos intervienen una serie de imponderables que distorsionan el valor real de un producto; es por eso que solamente tendremos en cuenta aquí el costo en plaza de la materia prima para 100 litros de medio de cultivo:

Medio "A": carne y es-

tómago de cerdo .. = 20.600 \$ $\frac{m}{n}$

Medio de cultivo "B"

desecado = 36.000 \$ $\frac{m}{n}$

Sin contar mano de obra, que en el primero se calculan 16 horas mientras que en el medio "B" solamente 4 horas, podemos decir de este último caldo que su costo es de un 45 % más que el medio clásico, pero como

su rendimiento es del 150 % más toxina que el "A" resulta en última instancia que el costo por Lf es de un 42 % más económico que el medio clásico.

DISCUSION

En el presente trabajo se comparan dos medios de cultivos para la producción de toxina tetánica.

El medio de cultivo "A", clásico, a base de digerido de estómago de cerdo y agua de carne, y el medio "B", con hidrolizado triptico de caseína y peptona de soya; este último obtenido en plaza en forma de un polvo deshidratado.

Sembrados ambos medios con 10 mililitros de un cultivo de *Cl. tetanii* de 24 horas de incubación, se han obtenido los siguientes resultados:

1º) Medio "A": 40.000 D. L. M. para laucha de 20 grs. Medio "B": 100 mil D. L. M. para laucha de 20 grs.

2º) En la purificación y concentración de los toxoides se ha obtenido en ambos la misma pérdida.

3º) Aunque no se estudió exhaustivamente el poder antigénico del medio de cultivo "B" como productor de substractum específico eficaz, podemos decir que la actividad de los toxoides obtenidos en este medio es semejante a la obtenida en el medio clásico.

4º) El costo de producción teniendo en cuenta solamente la materia prima es en el medio "B" del 42 % más económico por Lf que el medio de cultivo "A".

5º) En lo que respecta a la purificación de los toxoides podemos decir que el medio "B" permite obtener valores de Nitrógeno de 2,7 gamas por Lf, mientras que con el medio "A" sólo se obtuvieron 9 gamas de Nitrógeno por Lf.

De acuerdo a estos resultados consideramos justificado el empleo de un medio de cultivo compuesto por hidrolizado triptico de caseína y peptona de soya para la producción de toxina tetánica, ya que no solamente abarata la producción, sino que permite obtener productos de alta purificación.

Estos estudios continúan a fin de determinar las distintas variables que inciden en producción standarizada de toxinas y la eficacia de los antígenos obtenidos de las mismas.

BIBLIOGRAFIA

Dawson y Mauritzen (1968). *Aust. J. Biol. Sci.* t. 21; pág. 559.
Happle (1968). *Chem. Indust.* pág. 670.
Latham, Bent y Levine (1962). *Appl. Microbiol.* t. 10, pág. 146.
Manzullo y Aizeno (1948). *Semana Médica* número 2.869, enero 1948.

Modern y Ruff (1949). *Rev. del Instituto Malbrán*, t. 14, Nº 1, pág. 180.
Muller y Müller (1967). *J. Bact.*, t. 6, pág. 580.
Ramon, G. (1940). *Rev. Immunol.*, t. 6, pág. 65
Raynaud, Tupin y Bizzini (1968). *Progress. Immunobiol. Standard*, t. 3.
Sordelli, Modern y Ferrari (1936). *Rev. Inst. Ba t.*, V. VII, pág. 622.

SECCION II

Trabajos de Profesionales Ajenos a la Facultad

CAPITULO I

Temas de Investigación

TRATAMIENTO DE LANARES AFECTADOS DE SARNA
PSOROPTICA PROCEDENTES DE TRES ARROYOS Y
LA PLATA CON UNA MISMA DROGA ACARICIDA

Por Hipólito C. Lasta

R E S U M E N

Se describe el resultado obtenido al bañar 4 lanares provenientes del partido de La Plata, afectados de sarna psoróptica, comparados con 4 lanares originarios del partido de Tres Arroyos, en idénticas condiciones de parasitación.

Se comentan consideraciones de quimiorresistencia, como asimismo algunas experiencias adquiridas en la labor profesional, mencionándose algunos detalles sobre la correcta o incorrecta forma de efectuar bañaciones en algunos establecimientos ganaderos.

TREATMENT ON SHEEPS AFFECTED BY PSOROPTIC MANGE FROM
THE TRES ARROYOS AND LA PLATA DISTRICT WITH
THE SAME ACARICIDE DRUG.

S U M M A R Y

It has been described the result obtained when dipping four sheep who came from La Plata district, affected by psoroptic mange in comparison with four sheep from the district of Tres Arroyos, in the same parasitation conditions.

There are chemoresistance considerations as experiences obtained from professional work, with the mention of some details about the correct or incorrect way to perform dippings in certain stock raising establishment,

ANTECEDENTES

Con la intención de aportar algún dato o experiencia más para tratar de dilucidar el muy debatido tema de resistencia de los ácaros a las drogas acaricidas en la zona Sudeste de la provincia de Buenos Aires y especialmente en el partido de Tres Arroyos, realizamos este trabajo de confrontación en el tratamiento de lanares afectados de sarna psoróptica de dos orígenes, en iguales condiciones de parasitación y con el mismo producto comercial sarnífugo.

El doctor Juan José Boero, cita la posibilidad de existencia de dos clases de resistencia a las drogas acaricidas: Resistencia Natural y Resistencia Adquirida o Inducida, habiendo partidarios de una u otra teoría. Reseñando algunos conceptos sobre las mismas, diremos que la circunstancia de ser resistente a una determinada droga es atributo o carácter de una parte de los individuos de la especie, tal es lo que expresa los postulados o la doctrina de la Resistencia Natural, sosteniendo que es un carácter ligado al sexo y hereditario. La teoría de la Resistencia Adquirida sostiene a su vez que los ácaros adquieren resistencia a un tipo de droga cuando los mismos han sido expuestos anteriormente a dosis subletales de la misma que le permite posteriormente resistir dosis mucho más potentes que las iniciales.

Menciona también el doctor Boero, que ya en el año 1942 había advertido dificultades en el control de la garrapata (*Boophilus microplus*) con los baños arsenicales. Años más tarde se comprobó fehacientemente que había adquirido una resistencia definida a las drogas arsenicales, que le permitía sobrevivir frente a dosis tóxicas para el ganado. Respecto a este ectoparásito fue factible alguna explicación, por algunos aspectos morfológicos y estructurales muy significa-

tivos y además por el lapso de vida libre de estos parásitos, pero en cambio para la sarna psoróptica ovina es más difícil la dilucidación del problema por varios motivos, entre los que debe citarse el ciclo evolutivo más breve y su vida estrictamente parásita, sin conexiones con el medio ambiente.

De ser cierta y que impere en la zona de Tres Arroyos la Resistencia Adquirida o Inducida, no estamos de acuerdo en cuanto a la génesis de la misma, sostenida por algunos, especialmente en lo que se refiere a la pureza de las drogas acaricidas existentes en el comercio, pues, en base a la experiencia adquirida en la visita a numerosos establecimientos con majadas de la zona y presenciar además considerables balneaciones anti-sárnicas, afirmamos, que el factor principal del origen de la mencionada resistencia es la incorrecta forma en que la gran mayoría de los ganaderos de la zona efectúan las balneaciones. Destacamos al respecto, que de 50 establecimientos visitados, en 46 de ellos las balneaciones eran hechas en forma incorrecta, especialmente en lo que se refiere a reposición y refuerzo del antisárnico. Todos lo hacían, siendo éste un detalle muy común de observar, al pasar una cierta cantidad de lanares por el baño y no en base a los litros de líquido consumido por el paso de los mismos, como lo indica la técnica. Desde luego que cuando lo hacían era ya tarde.

En definitiva, existe la certeza de la existencia de fenómenos de resistencia de los ácaros de sarna ovina, a los insecticidas modernos. No hay duda que la naturaleza interpone efectivas defensas para no perder sus especies, contrarrestando la pérdida de individuos que el hombre pretende por todos los medios a su alcance eliminar.

MATERIAL Y METODO

Para la prueba que nos ocupa fueron llevados a Tres Arroyos cuatro lanares Hampshire Down del partido de La Plata, pertenecientes al establecimiento propiedad del señor J. C. Scotini, ubicado en la localidad de Abasto. Fueron trasladados a Tres

Arroyos el día 18 de junio de 1967, con la finalidad de que se adapten y que las lesiones sárnicas se encuentren en las mismas condiciones, especialmente higroscópicas, que la de los lanares locales. El período de aclimatación fue de 25 días.

LANARES TRATADOS

Lanares La Plata

Nº 1: Carnero	6 dientes
Nº 2: Borrega	2 dientes
Nº 3: Oveja	6 dientes
Nº 4: Borrega	2 dientes

Lanares Tres Arroyos

Nº 1: Borrego	2 dientes
Nº 2: Borrego	2 dientes
Nº 3: Capón	4 dientes
Nº 4: Oveja	4 dientes

En el cuadro Nº 1 se detallan las lesiones que presentaron los lanares de La Plata, destacando que la característica de la lesión está expresada por la cantidad de cruces.

Como es posible apreciar, los lanares presentan numerosas lesiones, como asimismo ácaros en fosetas intraorbitarias, en diversos estados evolutivos.

Los lanares de Tres Arroyos fueron cuatro de raza Lincoln, pertenecientes al establecimiento propiedad de la firma B. H., ubicado en el cuartel 8º (San Mayol). En el mismo se habían efectuado varias balneaciones antisárnicas, con el mismo producto que se utilizó para la experiencia, destacando que incurrian en el mis-

mo defecto o error que la generalidad de los ganaderos de la zona. Efectuaban el refuerzo y la reposición con posterioridad a lo indicado por el laboratorio productor.

Las lesiones sárnicas de los lanares de ambos grupos diferían en muy poco. Los de La Plata presentaban una dermatosis descamativa más amplia, costra desecada algo más evidente que los de Tres Arroyos. En éstos no había gran caída de lana, siendo el largo de la misma, igual en ambos grupos, notándose algo más húmeda en los lanares de Tres Arroyos.

En el cuadro Nº 2 se consignan las lesiones de los lanares de Tres Arroyos.

Lugar de la prueba: La misma se llevó a cabo en las instalaciones de la Sociedad Rural de Tres Arroyos, situada en la intersección de las rutas nacionales 3 y 228.

Bañadero utilizado: Consistió en uno portátil de chapa galvanizada, construido con 2½ tamboros comunes de combustible. Se utilizaron 400 litros de agua dulce, considerando que como eran pocos lanares no sería importante el arrastre de agua por el paso de los mismos.

Antiséptico empleado: En la prueba se utilizó un producto fosforado compuesto por los siguientes elementos:

Ester (2-Isopropil-4 metil-pirimidil (6) dietílico) del ácido tío fosfórico de grado técnico	40 g %
Carbonato de Magnesio	10 g %
Celite	39 g %
Alquil-Nitrofenil-Sulfonato sódico modificado	6 g %
Humectante no iónico (Alquil-aril-poli-glicol) al 30 %	5 g %

Se utilizaron 100 grs. del producto para 400 litros de agua.

Primer baño: La primera balneación se efectuó el día 13 de julio a las 9.30 con sol radiante y una temperatura de 7,7°C.

En primer término se bañaron los lanares de La Plata, luego los de Tres Arroyos, habiendo arrastrado ambos grupos 25 litros de la emulsión. Posteriormente los lanares fueron alojados en distintos corrales, renovándoseles los bebederos y comederos que anteriormente utilizaran para descartar un posible contagio de ácaros que hubieran permanecido en los mencionados elementos.

Segundo baño: Se efectuó a los 10 días del primero, es decir, el 23 de julio, reinando buenas condiciones climáticas, temperatura de 10°C a las 10 horas. Se bañaron en el mismo orden que en la primera oportunidad, con las tres clásicas inmersiones de cabeza, para permitir la acción del producto en las fosetas infraorbitarias, siendo éste un detalle tan importante, que muchos atribuyen los fracasos de baños, a la incorrecta o falta de inmersión de la cabeza del lanar, pues es conocida la habitual presencia de colonias de ácaros en la mencionada zona. En esta oportunidad arrastraron 30 litros de agua, que desde luego fuera renovada, del primero al segundo baño, habiendo permanecido un minuto, los lanares en el mismo.

Observación de los lanares: A diez días del segundo baño revisamos minuciosamente, los ocho lanares tratados, contando con la valiosa colaboración de los colegas doctores Miguel Pagliero y Venancio Calzada. Revisamos a simple vista, recurriendo a lupas, comúnmente denominadas "de bolsillo", de 10 a 20 aumentos, cuando deseábamos visualizar detenidamente una partícula, ácaro, zona de interés, etc.

En los lanares originarios de La Plata, no se encontró ninguna lesión sospechosa, que pudiera posteriormente evolucionar. Pudimos apreciar, aproximadamente al tercer día de la primera balneación, la completa desaparición del prurito, no ocurriendo lo mismo con los lanares de Tres Arroyos. En éstos se encontraron lesiones, producidas por colonias de ácaros, las que se consignan en el cuadro Nº 3.

Como se aprecia en el cuadro mencionado, disminuyó la parasitación del lanar N° 1, excepto en barriga, donde se observó una lesión algo más extendida. En el lanar N° 2, no se observó mejoría, por el contrario, aumentó la cantidad de ácaros en ciertas regiones, destacando que no apareció ninguno en fosetas. El lanar N° 3 fue el que mejor respondió a la acción del antisárnico, notándose poca parasitación en zona de entrepierna, cola y paleta derecha. En el lanar N° 4 se observó también una apreciable disminución de ácaros con relación a la parasitación que presentaban antes del tratamiento, pero continúa principalmente afectado en cruz y lomo, persistiendo 4 hembras adultas en foseta infraorbitaria derecha y una ninfa en izquierda.

Revisáronse nuevamente a los 20 días del 2º baño, los dos grupos. El cuadro de lesiones correspondiente a los lanares de Tres Arroyo es el que figura en el cuadro N° 4.

Se observa una disminución del número de ácaros presentes en las lesiones, excepto en el lanar N° 2. En el N° 3 se encontró un solo ácaro en foseta infraorbitaria izquierda.

También se revisaron los cuatro lanares de La Plata y como ocurriera

anteriormente, no se aisló ningún ácaro vivo.

La última revisión de los lotes se efectuó el día 24 de agosto, es decir a los treinta días de la segunda balneación con el resultado que se conigna en el cuadro N° 5.

Como se aprecia en el cuadro citado, en el lanar N° 1 persiste el ácaro en foseta derecha, encontrándose colonias en las regiones de cruz y barriga, además de ácaros aislados en lomo y pecho. En el N° 2, que fuera el más afectado, continúa con el ácaro en foseta infraorbitaria derecha, siendo en las regiones de grupa izquierda, pecho, paleta derecha y costillar izquierdo las únicas zonas donde no se encontraron lesiones con ácaros. Con respecto al lanar N° 3, no se halló ningún ácaro, destacando que no presenta movilidad el de foseta infraorbitaria izquierda. Por último, el lanar N° 4, presenta lesiones "vivas" en cruz, pecho y costillar derecho y tres ácaros en foseta derecha, dos inmóviles con principios de citoplasmolisis y uno con movimientos apenas perceptibles.

También se revisaron minuciosamente por última vez los lanares de La Plata, y como ocurriera anteriormente, no se encontró ningún ácaro vivo, observando que la piel se regenera normalmente.

DISCUSION

La diferente reacción en ambos grupos, ante el tratamiento antisárnico con un mismo producto, opino

que se debe a la resistencia —natural o adquirida— de los ácaros a la droga fosforada.

CONCLUSIONES

1º) En la prueba realizada, según los cuadros 2, 3, 4 y 5 (lanares origen Tres Arroyos) se concluye que no hubo acción alguna sobre el *Psoroptes ovis*, excepto en el lanar Nº 3, con el antisárnico utilizado.

2º) En la prueba realizada, según el cuadro Nº 1 y observaciones posteriores (lanares origen La Plata), se concluye que hubo franca efectividad sobre el *Psoroptes ovis* con el antisárnico utilizado.

BIBLIOGRAFIA

Boero, J. J. 1967. Resistencia de los insecticidas. *Rev. Medicina Vet. (Bs. As.)* 48 (3): 195.

Boero, J. J. 1967. Parasitosis animales. (Bs. As.) (I): 20.

Gelormini, N. 1954. Enfermedades parasitarias de los animales en la Rca. Argentina. (Bs. As.) (I): 338.

LANARES DE LA PLATA — LESIONES ORIGINALES
Cuadro Nº 1

Lanar Nº	Foseta infraor- bitaria	Cuello	Cruz	Lomo	Grupa derecha	Grupa izquierda	Entre- pierna y cola	Pecho	Paleta derecha	Paleta izquierda	Costillar derecho	Costillar izquierdo	Barriga
1	D: 2 áca. I: 1 áca.	+	++++	+++	+	+	++	+	+++	+++	++	+++	+++
2	D: 1 I: —	++	++	+++	++	++	+++	+	++++	+++	+++	++++	++
3	D: 3 I: 1	+	++	+++	+++	++	++	++	+	+	+++	++	+
4	D: 2 I: 2	++	+++	++++	++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++

++ : Picadura simple, pocos con numerosos ácaros.

+++ : Picadura evolucionada, regular cantidad de ácaros.

++++ : Lesión costrosa limitada.

+++++ : Lesión costrosa extendida ácaros.

LANARES DE TRES ARROYOS — DIEZ DIAS DEL SEGUNDO BAÑO
Cuadro N° 3

Lanar N°	Foseta infraorbitaria	Cuello	Cruz	Lomo	Grupa derecha	Grupa izquierda	Entre-pierna y cola	Pecho	Paleta derecha	Paleta izquierda	Costillar derecho	Costillar izquierdo	Barriga
1	D: 2 I: —	+	+++	++	—	—	—	+	+	—	—	—	++
2	D: — I: —	++	+	+++	+++	+	++	+	++	++	+++	++	++
3	D: — I: 2	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—
4	D: 4 I: 1	+	++	++	+	—	—	+	—	+	+	—	—

LANARES DE TRES ARROYOS — VEINTE DIAS DEL SEGUNDO BAÑO
Cuadro N° 4

Lanar N°	Foseta infraorbitaria	Cuello	Cruz	Lomo	Grupa derecha	Grupa izquierda	Entrepierna y cola	Pecho	Paleta derecha	Paleta izquierda	Costillar derecho	Costillar izquierdo	Barriga
1	D: 1 ác. I: —	—	++	+	—	—	—	+	—	—	—	—	++
2	D: 1 I: —	++	+	+++	++	—	+	+	+	++	++	+	++
3	D: — I: 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	D: 2 I: —	+	+	+	—	—	—	+	—	+	++	—	—

LANARES DE TRES ARROYOS — TREINTA DIAS DEL SEGUNDO BAÑO
Cuadro N° 5

Lanar N°	Foseta infraor- bitaria	Cuello	Cruz	Lomo	Grupa derecha	Grupa izquierda	Entre- pierna y cola	Pecho	Paleta derecha	Paleta izquierda	Costillar derecho	Costillar izquierdo	Barriga
1	D: 1 I: —	—	++	+	—	—	—	+	—	—	—	—	++
2	D: 1 I: —	++	+	++	+	—	+	—	—	++	++	—	++
3	D: — I: —	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	D: 1 I: —	—	+	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—

INDICE ALFABETICO DE AUTORES

Nros. 1 - 2 y 3

BADE, G. M. ver de Vega F.	19
BADE, G. M. ver de Vega F.	25
BERNAGOZZI D., ver Demarchi R. y otros	93
BILBAO, A. F., ver Redelonghi R. B. y otros	7
BILBAO, A. F., ver Redelonghi R. B. y otros	13
BOSCH, R. A., ver Redelonghi R. B. y otros	7
BOSCH, R. A., ver Redelonghi R. B. y otros	13
BRANDETTI E., ver Led J. E. y otros	57
BRANDETTI E., <i>Amidostomum anseris</i> (Zeder, 1800) en gansos de zonas aledañas a La Plata	61
BURMESTER, B. R., ver Schudel A.	33
BURMESTER, B. R., ver Schudel A.	49
CASAGNE M., ver Demarchi R. y otros	93
DEMARCHI R. Producción de toxina tetánica en dos medios de cultivo diferentes	93
FISCHER E., ver Demarchi R. y otros	93
GOMEZ C., ver Demarchi y otros	93
LASTA H., Tratamiento de lanaras afectados de Sarna psoróptica procedentes de Tres Arroyos y La Plata, con una misma droga acaricida	101
LED J. E., Determinación del ciclo biológico de <i>Capillaria bursaata</i>	57
LED, J. E., ver Brandetti E.	61
MARTINEZ N., ver Demarchi R. y otros	93
PANETTIERI, G. H., ver Led J. E. y otros	57
REDELONGHI, R. B., El trasplante adenohipofisario a la cámara anterior del ojo en pollos	7
REDELONGHI, R. B. Evolución de la potencia gonadotrófica hipofisaria en pollos	13
SCHUDEL A., Identificación y caracterización del virus del grupo Leucosis Sarcoma: I) Aislamiento mantenimiento de células L-R	33
SCHUDEL A., Identificación y caracterización del virus del grupo Leucosis Sarcoma: II) Activación y ensayo de células L-R	49
SCHUDEL A., Complejo leucósico aviar: Revisión de conceptos	67
TRUMPER S. J., ver Redelonghi R. B. y otros	7
TRUMPER S. J., ver Redelonghi R. B. y otros	13
VEGA de F., Estudio de los proteinogramas normales y contribución al diagnóstico clínico de la Anemia Infecciosa en los equinos por electroforesis en papel	19
VEGA de F., Estudio electroforético en papel sobre sueros de bovinos normales	25

EL TRASPLANTE ADENOHIPOFISARIO A LA CAMARA ANTERIOR DEL OJO EN POLLOS

Por Remo B. Redelonghi, Samuel J. Trumper, Ana R. Bilbao y Ricardo A. Bosch

R E S U M E N

En el presente trabajo se describe una técnica de homotrasplante adenohipofisario a la cámara anterior del ojo en pollos. La evolución del trasplante es seguida macroscópicamente mediante observaciones diarias y los cambios microestructurales sufridos por la glándula son descriptos a las 24 horas, 7 días y 15 días.

EVOLUCION DE LA POTENCIA GONADOTROFICA HIPOFISARIA EN POLLOS DESDE LOS 15 A LOS 260 DIAS DE EDAD

Por Remo B. Redelonghi, Samuel J. Trumper, Ana R. Bilbao y Ricardo A. Bosch

R E S U M E N

En el presente trabajo se evaluó la potencia gonadotrófica hipofisaria y los pesos corporal, de la cresta, testicular e hipofisario de pollos de raza Leghorn Blanca desde los 15 a los 260 días de edad. Se observa un incremento de la potencia gonadotrófica relativa a partir de los 140 días de edad que se eleva notablemente entre los 110 y 260 días de edad. Este valor se compara con los correspondientes a los otros parámetros señalados.

ESTUDIO DE LOS PROTEINOGRAMAS NORMALES Y CONTRIBUCION AL DIAGNOSTICO CLINICO DE LA ANEMIA INFECCIOSA EN LOS EQUINOS POR ELECTROFORESIS EN PAPEL

Por Fermin de Vega y Graciela M. Bade

R E S U M E N

- 1) Fueron realizados los proteinogramas de 20 equinos normales y se calcularon los valores medios normales.
- 2) Posteriormente se efectuaron proteinogramas de 4 equinos con anemia infecciosa.
- 3) De la confrontación de los valores normales y patológicos surgieron diferencias de significativa importancia en el estudio evolutivo de esta enfermedad.

THE ADENOHYPOPHYSIS TRANSPLANTATION TO ANTERIOR
CHAMBER OF THE EYE IN COCKERELS

S U M M A R Y

We described a method for adenohipophysis homotransplantation to the anterior chamber of the eye. The evolution of the transplanted tissue was carry on by macroscopical daily observations. We described the microstructural changes of the gland 24 hr, 7 and 15 days after transplantation.

EVOLUTION OF THE PITUITARY GONADOTROPHIC POTENCY IN
COCKERELS FROM 15 TO 260 DAYS OF AGE

S U M M A R Y

In the present work is evaluate the pituitary gonadotrophic potency and the body, comb, testicular and hypophyseal weight of White Leghorn cockerels from 15 to 260 days of age. We observed an increase of the relative pituitary gonadotrophic potency from 140 days of age and between 110 to 260 days. This result is compared with the other refered parameters.

PAPER ELECTROPHORETIC STUDIES OF NORMAL EQUINE SERUM
AND EQUINE INFECTIOUS ANEMIA SERUM AS CONTRIBUTION
FOR THE CLINIC DIAGNOSTIC.

S U M M A R Y

- 1. Proteinogram of 20 normal equine serums and calculation of the normal average was performed.*
- 2. Proteinogram of 4 animal serums with equine infectious anemia was realized subsequently.*
- 3. Of the confrontation of normal and pathological values, differences of significative importance in the evolutive study of this disease were found.*

ESTUDIO ELECTROFORETICO EN PAPEL SOBRE SUEROS DE BOVINOS NORMALES

Por Fermín de Vega y Graciela M. Bade

R E S U M E N

- 1) Se realizó el estudio electroforético sobre papel de suero de 29 bovinos clínicamente normales de 2 y ½ a 3 años de edad, de raza Aberdeen Angus y de ambos sexos.
- 2) Se detallaron estadísticamente los valores de las proteínas totales y fraccionadas en albúmina y globulinas alfa, beta y gamma. Además se registró la relación albúmina globulina (coeficiente proteico).
- 3) Los valores obtenidos se compararon con los aportados por otros autores, llegándose a establecer resultados muy concordantes.

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL GRUPO LEUCOSIS - SARCOMA

I. Aislamiento y mantenimiento de células L-R

Por Alejandro A. Schudel y B. R. Burmester

R E S U M E N

Se describe el aislamiento y mantenimiento de células L-R.

Las células L-R resultan de la infección solitaria de una partícula viral de virus de Sarcoma de Rous, parcialmente defectiva, a una célula susceptible, en ausencia de infección simultáneamente por un virus ayudante o asociado.

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL GRUPO LEUCOSIS - SARCOMA

II— Activación y ensayo de células L-R Por Alejandro A. Schudel

R E S U M E N

Las células L-R descritas en este trabajo, se obtuvieron por la inoculación de RSV parcialmente defectivo en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo C/O. Bajo las condiciones empleadas en este sistema de test no se obtuvo la misma respuesta a los tres diferentes subgrupos virales del grupo Leucosis/Sarcoma que fueron testados. Queda por determinar si esta diferencia, es debida a las características de las cepas virales empleadas, a las células en que se realizó el ensayo o es una característica de los clones empleados en esta experiencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos no hay ningún tipo de interferencia a falla en la sensibilidad en el test empleado, por la producción de RSV (0) si es que se produce.

La reproducibilidad de los resultados, la facilidad con que se realiza el test, el corto período de tiempo empleado, comparado con otros métodos y la simpleza del test, hacen de esta metodología un instrumento con grandes posibilidades de aplicación en la práctica del laboratorio de diagnóstico.

PAPER ELECTROPHORESIS STUDY IN NORMAL BOVINE SERUM

S U M M A R Y

1. *Electrophoretic paper study of 29 clinically normal bovine serums was realized. This work was performed in Aberdeen Angus bovine of 2½ - 3 years old and both sexes.*
2. *Statistical values of total proteins, alfa, beta and gamma globulins and their proteic coefficient was detailed.*
3. *Values concordant with other authors was obtained.*

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LEUCOSIS/SARCOMA GROUP OF VIRUSES

I. *Isolation and maintenance of L-R cells*

S U M M A R Y

The isolation and maintenance of the L-R cells was described.

L-R cells are the result of a solitary infection of a single Rous Sarcoma partially defective particle, to a susceptible cell in the absence of a simultaneous infection by an helper virus.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LEUCOSIS/SARCOMA GROUP OF VIRUSES

II. *Activation and essay of L-R cells*

S U M M A R Y

The L-R cells described here were originated from C/O chick embryo fibroblast and the virus produced after their activation was assayed in C/O fibroblasts. The fibroblast came from RIF free SPF stock.

Under the conditions described here, the clones of L-R cells isolated did not show similar susceptibility to the different virus subgroup tested, Where this phenomenon was due to the susceptibility of the clones, the assay cells system used, or the strain of virus tested, was not determined.

The results obtained with samples from field conditions and experimentally inoculated birds, showed that in this procedure the system of testing the RSV (0) production by the L-R cells (if any), did not interfere in the system, nor with the sensivity of the test.

DETERMINACION DEL CICLO BIOLÓGICO DE CAPILLARIA BURSATA

Por Jorge Eugenio Led, Eugenio Brandetti, Guillermo Horacio
Panettieri

R E S U M E N

Comprobada la parasitosis por Capillaria bursata, los autores logran reproducir la enfermedad en pollos mantenidos libres de toda infestación, dándoles a ingerir lombrices recogidas en el gallinero del que procedían las aves originalmente necropsiadas, demostrando así el ciclo indirecto de este nematode y el papel de Eisenia sp. como hospedador intermediario.

AMIDOSTOMUM ANSERIS (ZEDER, 1800) EN GANSOS DE ZONAS ALEDAÑAS A LA PLATA

Eugenio Brandetti y Jorge Eugenio Led

R E S U M E N

Se comunica el hallazgo de Amidostomum anseris (Zeder, 1800) en gansos de zonas aledañas a la ciudad de La Plata.

COMPLEJO LEUCOSICO AVIAR: Revisión de conceptos

Alejandro A. Schudel

R E S U M E N

El Complejo Leucósico Aviar comprende por lo menos dos enfermedades con características etiológicas y patológicas propias. En los últimos años se han realizado importantes avances en la investigación de las enfermedades del Complejo Leucósico Aviar. Esta publicación pretende reunir los datos antiguos, trabajos actuales y nuevos conceptos, como así también señalar problemas importantes a criterio del autor, aún no solucionados.

BIOLOGICAL CYCLE DETERMINATION IN CAPILLARIA BURSATA

S U M M A R Y

After the verification of the parasitic infection caused by Capillaria bursata the authors reproduced the disease in parasites free chicken, feeding the birds with earth worm collected from the poultry yard, where were the birds come from and necropsied. The workers demonstrated by this way the roll of Eisenia sp. as intermediary host of this nematode and its indirect biological cycle.

AMIDOSTOMUM ANSERIS (ZEDER, 1800) IN GOOSE
IN THE ENVIRONS OF LA PLATA CITY

S U M M A R Y

It is communicated the find of Amidostomum anseris (Zeder, 1800) in goose, in the environs of La Plata City.

AVIAN LEUCOSIS COMPLEX: REVIEW OF CONCEPTS

S U M M A R Y

The avian Lecousis Complex is by definition a group of et least two well defined aetiological and pathological entities.

In the last few years there has been an important increase of research with remarkable findings in this area of work, and this paper sumarize the old and current developments, new advances an unsolved problems in the view of the author.

PRODUCCION DE TOXINA TETANICA EN DOS MEDIOS DE CULTIVO DIFERENTES

Raúl Demarchi, Mirta Casagne, Carlos Gómez, Ernesto Fischer, Nélida Martínez
y Dante Bernagozzi

R E S U M E N

En el presente trabajo se comparan dos medios de cultivo para la producción de toxina tetánica. El medio de cultivo clásico a base de digerido de estómagos de cerdo y agua de carne, y un medio sintético con hidrolizado tripsico de caseína y peptona de soya.

El medio sintético permite obtener un toxoide cuya actividad es semejante a la del toxoide obtenido con el medio clásico con un costo inferior en un 24 % considerando únicamente el valor de la materia prima y cuyos valores de nitrógeno son de 2,7 gamas por Lf frente a 9 gamas por Lf del obtenido por el del medio clásico.

Por lo expuesto los autores consideran justificado el empleo del medio sintético pues permite abaratar la producción y provee productos de alta purificación. Los estudios continúan a fin de determinar las variedades que inciden en la producción "standarizada" de toxinas y la eficacia de los antígenos obtenidos de las mismas.

TRATAMIENTO DE LANARES AFECTADOS DE SARNA PSOROPTICA PROCEDENTES DE TRES ARROYOS Y LA PLATA CON UNA MISMA DROGA ACARICIDA

Por Hipólito C. Lasta

R E S U M E N

Se describe el resultado obtenido al bañar 4 lanares provenientes del partido de La Plata, afectados de sarna psoróptica, comparados con 4 lanares originarios del partido de Tres Arroyos, en idénticas condiciones de parasitación.

Se comentan consideraciones de quimiorresistencia, como asimismo algunas experiencias adquiridas en la labor profesional, mencionándose algunos detalles sobre la correcta o incorrecta forma de efectuar bañeaciones en algunos establecimientos ganaderos.

TETANIC TOXIN PRODUCTION IN TWO DIFERENT
CULTURE MEDIUM

S U M M A R Y

In this work we use two comparative culture medium of tetanic toxin production One of the culture medium is a classic broth upon the base of digested pig stomach with meat broth and the other is synthetic tripsic hydrolized caseine and soys pepton.

The sinthetic medium yield a toxoid in which the activity is similar to that obtained by the classical medium and is 42 percent less expensive considering the value of raw material in which the nitrogen value is 2,7 gammas by Lf obtained from the classic medium.

The author consider the employ of sinthetic medium useful because it will permit the low cost of toxoid production and give a high purify product. Studies will be continued to determine the variabilities that they will be do to the standard productions of toxine and the power efficiency of obtained antigens.

TREATMENT ON SHEEPS AFFECTED BY PSOROPTIC MANGE FROM
THE TRES ARROYOS AND LA PLATA DISTRICT WITH
THE SAME ACARICIDE DRUG

S U M M A R Y

It has been described the result obtained when dipping four sheep who came from La Plata district, affected by psoroptic mange in comparison with four sheep from the district of Tres Arroyos, in the same parasitation conditions.

There are chemoresistance considerations as experiences obtained from professional work, with the mention of some details about the correct or incorrect way to perform dippings in certain stock raising establishment.