

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS CON ACTIVIDAD FIJADORA DE COMPLEMENTO DEL SUERO DE UN BOVINO INFECTADO CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA

MAISONNAVE, J.
D.V. MSc.

técnico del depto. de virología del Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino" casilla de correo 6577, Montevideo, Uruguay.

Trabajo realizado en la Universidad de Auburn
Alabama, USA, 1980.-

RESUMEN

Las inmunoglobulinas (Ig) séricas, de un toro con anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina (LB), fueron separadas por filtración en gel de Sephadex G-200 e identificadas por la prueba de inmunodifusión (ID) en gel de agar con antiseros específicos de clase. Fue estudiada la actividad fijadora de complemento de las fracciones conteniendo IgG e IgM frente a antígenos del vi-

rus de LB. Las fracciones de IgG tenían concentraciones de anticuerpos fijadores de complemento más altas que las fracciones de IgM, pero ambas clases de Ig tuvieron actividad de anticuerpo fijador de complemento contra los antígenos del virus de LB.

Palabras claves: Bovinos, inmunoglobulinas, Leucosis bovina.

VETERINARIA 18 (81) 72-86, jul - set, 1982

INTRODUCCION

Estudios epidemiológicos y experimentales han implicado a un virus que tiene muchas de las características morfológicas descritas para los virus oncogénicos tipo C y es considerado miembro de la familia Retroviridae, como agente etiológico de la forma enzoótica adulta de la leucosis bovina (3, 5, 8, 11, 16). Han sido observadas partículas del virus de la leucosis bovina (LB) en linfocitos de vacas con linfosarcoma y en algunas con linfocitosis y se ha aislado el virus de líneas celulares derivadas de linfosarcomas (4, 5). Se ha demostrado que el virus de LB causa linfosarcoma en ovinos (14). El ganado infectado con el virus de LB desarrolla anticuerpos circulantes a varios antígenos asociados al virus (3, 10, 12, 16). Se ha encontrado una incidencia más alta de anticuerpos contra el virus de LB en rodeos con historia de linfosarcoma que en rodeos sin enfermedad clínica (10, 12, 16), aunque esta relación no siempre se cumple (*).

Existen una serie de pruebas serológicas para detectar animales infectados con virus de LB:

1. Prueba de fijación de complemento (12).-
2. Inmunodifusión en gel de agar (13).-
3. Prueba de inmunofluorescencia (5).-
4. Radio-inmuno-ensayo (5).-
5. Prueba de neutralización del virus (7).-
6. Prueba de ELISA (1).-

Las tres últimas pruebas son consideradas las más sensibles (5).

Los anticuerpos fijadores de complemento son más frecuentes en ganado que muestra signos clínicos de la enfermedad que en ganado infectado pero que no muestra sintomatología (9). La prueba de fijación de complemento (FC) para detectar anticuerpos contra el virus de LB parece tener más sensibilidad y especificidad que la prueba hematológica (claves hematológicas), casi la

Comunicación personal del Dr. I.R.D. Schultz, Universidad de Auburn AL.

misma sensibilidad que la prueba de inmunofluorescencia y más sensibilidad que la inmunodifusión (ID), utilizando el antígeno p24 (3).

Los resultados de la prueba FC se correlacionan bien con los de ID pero los títulos de FC varían en un amplio rango; los resultados de FC son cuantitativos.

El presente trabajo describe la identificación de las clases de inmunoglobulinas con actividad fijadora de complemento para antígenos del virus de LB.

MATERIALES Y METODOS

ANTIGENOS DEL VIRUS DE LB

Se probaron tres antígenos del virus de LB diferentes*:

1. Virus libre de células producido en riñón fetal de ovino (FLK).-
2. JABIAH.-
3. PM10-12/79, los dos últimos utilizados comúnmente para gel inmunodifusión.-

Los antígenos fueron estudiados en su:

1. Actividad anticomplementaria.-
2. Actividad hemolítica.-
3. Actividad no específica.-
4. Actividad específica con anticuerpos al virus de LB.-

El antígeno FLK libre de células fue el único que no mostró actividad anticomplementaria siendo el utilizado en estos estudios. El antígeno fue concentrado cinco veces (por concentrador Minicon B 15) y titulado por el sistema en microplaca (9, 17, 18), utilizándose la dilución 1/8.

* Obtenidos del Dr. R.D. Schultz, Universidad de Auburn-Alabama, USA.-

SUERO Y ANTISUERO

El suero positivo a LB fue obtenido de un toro (Marge EAIC) con anticuerpos precipitantes a los antígenos gp y p24 determinados por gel ID, dichos anticuerpos han sido comprobados durante 10 años sin que el animal presentase signos clínicos o histológicos de leucosis. El suero fue inactivado a 56°C durante 30 minutos.

El suero fresco normal de bovino fue obtenido del ternero número 451 (negativo a LB) y fue manipulado de manera de conservar el complemento para proveer el factor del suero fresco normal bovino necesario para la fijación del complemento de cobayo por antígeno y anticuerpos en suero bovino inactivado por calor. El suero normal de bovinos de menos de un año de edad es preferible porque, generalmente, muestra menos reacciones inespecíficas con antígenos tisulares que el suero de bovinos adultos (2, 12). El suero normal fue fraccionado en pequeñas cantidades y congelado inmediatamente, conservándose a -20°C; de esta manera conserva su actividad por unas tres semanas. El suero bovino fresco fue agregado según recomendaciones (2, 12) al 5% en el diluyente del complemento.

El suero negativo a LB fue obtenido del Dr. R. Schultz. Anti-IgG y anti-IgM fueron preparaciones comerciales*. Los antisueros para albúmina bovina e IgA fueron obtenidos del Dr. R. D. Schultz.

COMPLEMENTO Y HEMOLISINA

Fueron estudiadas preparaciones comerciales de complemento de conejo y cobayo. Para este estudio el complemento de cobayo fue el más útil (6).

El complemento y la hemolisina fueron titulados por el sistema de microtitulación en block. El complemento de cobayo fue utilizado a una dilución de 1/1200 conteniendo una unidad hemolítica (100%) (2, 8, 12, 17, 18).

SOLUCION SALINA DE BUFFER VERONAL (VBS)

Para la prueba de fijación de complemento se utilizó diluyente comercial en tabletas ** para FC a un pH de 7.2.

SEPARACION DE INMUNOGLOBULINAS

El suero, previamente a ser fraccionado por gel filtración en Sephadex G-200, fue dializado durante 24 hs. a 4°C contra 10 volúmenes de 0.01M Tris HCl, pH 8.0, conteniendo 0.02 de Azida Sódica (NaN₃) como preservativo. Dos ml_g de dicho suero positivo a LB fueron fraccionados en Sephadex G-200 en columnas de 2.5 x 100,*** utilizando 0.1M Tris HCl, pH 8.0, con 0.02% NaN₃. Se colectaron fracciones de 4 ml_g, medidas por absorbancia a 280 nm (Figura 1); dichas fracciones fueron conservadas a 4°C (15).

IDENTIFICACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Antes de su utilización se hicieron mezclas de las fracciones, según la ubicación que tuvieron en la gráfica de la Figura 1, se liofilizaron y luego se reconstituyeron según se muestra en la Tabla I.

DOBLE DIFUSION EN AGAR

La clase de inmunoglobulina presente en cada fracción mezclada de G-200 fue determinada por doble difusión en 0.75% agar Noble*, 0.75% de gel agarosa (HEEO ME) con 0.075M de buffer barbital. Cada fracción fue enfrentada a antisuero monoespecífico preparado en conejos de IgG, IgM, IgA bovina y albúmina.

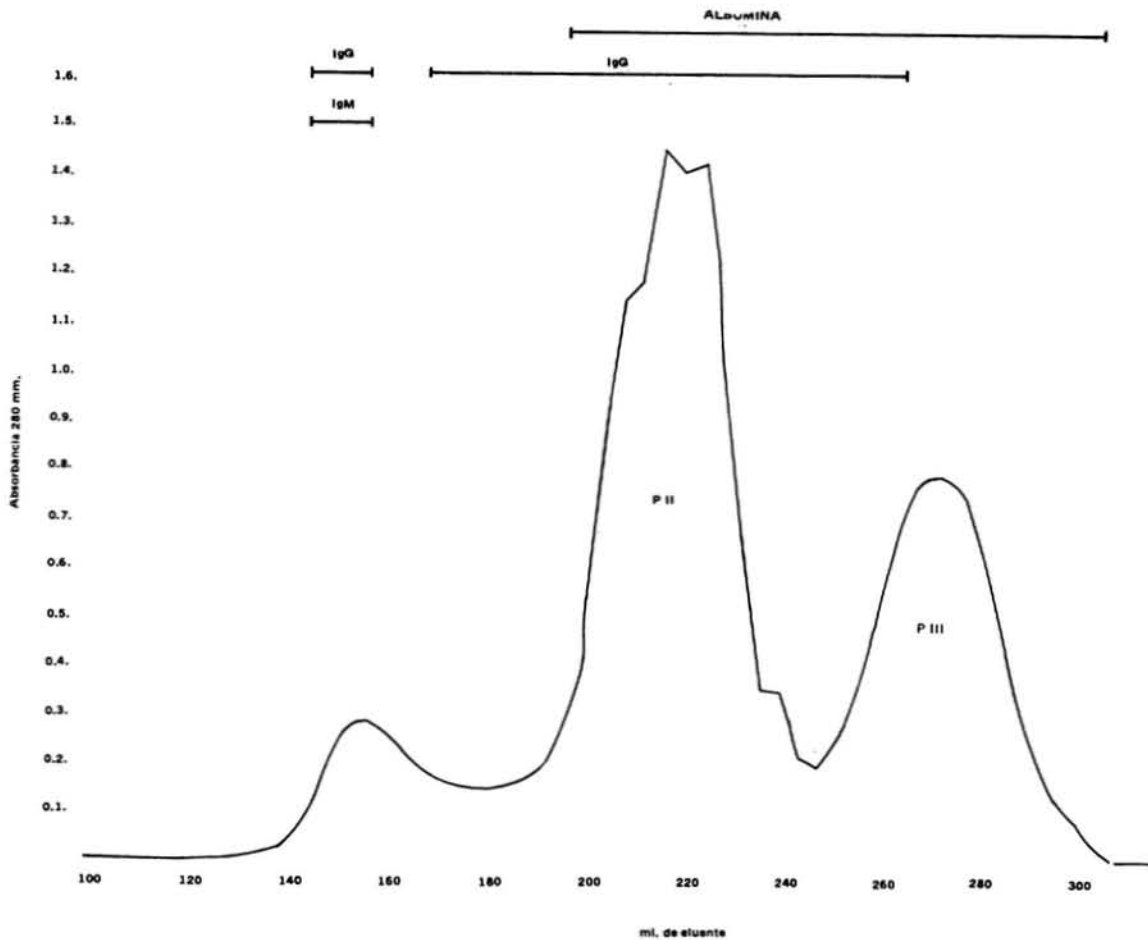
PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO MODIFICADA

Previamente a su uso en la prueba de FC las fracciones obtenidas por gel filtración fueron dializadas duran-

TABLA I

| Ml. de eluyente de G - 200 | Tubo número | Proteína sérica | Después de liofilizado reconstituido a x ml. |
|----------------------------|-------------|-----------------|--|
| 136-140 | 1 | | 2 ml. |
| 144-148 | 2 | IgM & IgG | 2 ml. |
| 152 | 3 | IgM & IgG | 1 ml. |
| 156 | 4 | IgM & IgG | 1 ml. |
| 160 | 5 | - | 1 ml. |
| 164 | 6 | - | 1 ml. |
| 168-172 | 7 | IgG | 2 ml. |
| 176-180 | 8 | IgG | 2 ml. |
| 184 | 9 | IgG | 1 ml. |
| 188 | 10 | IgG | 1 ml. |
| 192 | 11 | IgG | 1 ml. |
| 196-200 | 12 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 204-208 | 13 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 212-216 | 14 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 220-224 | 15 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 228-232 | 16 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 236-240 | 17 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 244-248 | 18 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 252-256 | 19 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 260-264 | 20 | IgG & Albumina | 2 ml. |
| 268-272 | 21 | Albumina | 2 ml. |
| 276-280 | 22 | Albumina | 2 ml. |
| 284-288 | 23 | Albumina | 2 ml. |
| 292-296 | 24 | Albumina | 2 ml. |
| 300-304 | 25 | Albumina | 2 ml. |

FIGURA 1 Fraccionamiento del suero por filtración en Sephadex G - 200



te 24 hs. a 4°C contra 10 volúmenes de VBS. La prueba de FC fue realizada en microplacas de polivinyl chloride, flexibles, 96 hoyos, fondo cónico**, utilizándose duplicados de diluciones seriadas de dos en dos del suero positivo y de las fracciones conteniendo IgG e IgM. El antígeno FLK de LB libre de células fue adicionado en cantidades de 0.025 ml. a cada hoyo; una dilución de 1/20 del complemento con 5% de suero bovino fresco fue agregada en cantidades de 0.05 ml. por hoyo; el complemento fue mantenido en un baño de hielo. Se hicieron controles para: complemento, inmunoglobulinas, antígeno, suero positivo, suero negativo, VBS y eritrocitos de ovino.

Antígeno y anticuerpos de la enfermedad epizoótica del ciervo (EHD) *** fueron utilizados como controles adicionales. El antígeno de EDH tenía un título de 1/10 y el anticuerpo de 1/40 previamente determinados.

Las placas fueron incubadas a 4°C durante 16 a 18 hs., los eritrocitos sensibilizados de ovino (SRBC) fueron agregados en cantidades de 0.025 ml. y las placas incubadas a 37°C durante media hora (en baño María); las placas se sacudieron después de 15 minutos de incubación.

El volumen total de cada hoyo de la microplaca era de 0.125 ml. Las placas fueron mantenidas a 4°C hasta que los controles de SRBC estuviesen estabilizados, aproximadamente una hora. Los títulos fueron tomados como el recíproco de la dilución más alta que previno la hemólisis del 50% de los eritrocitos (2, 8, 12, 17, 18).

*** Proporcionados por NADC.-

RESULTADOS

SEPARACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS

El suero fraccionado en Sephadex G-200 dio tres picos según mediciones de absorbancia a 280 nm. (Figura 1).

IDENTIFICACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS

El contenido de inmunoglobulina de cada fracción mezclada fue identificada por doble difusión utilizando antisuero de cada clase. Como control en cada caso se utilizó suero entero. La porción ascendente del pico I contenía IgM e IgG, la porción descendente del pico I solo IgG; tanto la porción ascendente como la descendente del pico II contenía IgG y albúmina. La porción ascendente del pico III contenía IgG y albúmina; la porción descendente del pico III contenía albúmina. Las fracciones de la parte descendente del pico I fueron concentradas cinco veces y probadas para su contenido en IgA; no se encontró IgA en las fracciones concentradas ni en ninguna otra fracción (Figura 1, Tabla I).

PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

Los resultados de la prueba de FC del suero entero y de las fracciones del suero del toro con anticuerpos precipitantes contra LB mostraron concentraciones más altas de anticuerpos fijadores de complemento en las fracciones de IgG que en las fracciones de IgM (Tablas II y III).

TABLA II
DILUCIONES

| Suero o fracciones de Ig | Sin diluir | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 |
|--------------------------|------------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|
| Suero entero | 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 60 | 100 | 100 | 100 |
| IgM & IgG t.2 | 80 | 100 | 100 | 100 | | | | | | |
| IgM & IgG t.3 | 60 | 90 | 100 | 100 | | | | | | |
| IgM & IgG t.4 | 60 | 90 | 100 | 100 | | | | | | |
| IgM pura** | 40 | 50 | 60 | 100 | | | | | | |
| IgG t. 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| IgG t. 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| IgG t. 16 | 0 | 0 | 70 | 100 | | | | | | |
| IgG t. 17 | 0 | 0 | 10 | 90 | | | | | | |

* = 0% de hemólisis; 0 = No hemólisis

** = la fracción de IgM pura del mismo animal positivo a LB fue obtenida de W. Chambers

Estos resultados son promedios de varias pruebas de FC.

Estos resultados fueron obtenidos luego de haber realizado las pruebas de fijación de complemento varias veces.

DISCUSION

En el suero examinado, las fracciones conteniendo IgG tuvieron títulos fijadores de complemento más altos que las fracciones conteniendo IgM, aunque IgM es aproximadamente 10 a 1000 veces más eficiente en fijar complemento que IgG. Los títulos fijadores de complemento más altos de las fracciones conteniendo IgG pueden explicarse de varias maneras:

1. La mayoría de los anticuerpos contra LB pueden ser IgG y no IgM. En muchas infecciones crónicas hay inducción de títulos altos de IgG. Como LB es una infección crónica y este toro estuvo infectado por 10 años, podemos esperar encontrar títulos más altos de IgG que de IgM.
2. El porcentaje de IgM recuperado de la separación de Sephadex G-200 puede haber sido baja y no ser representativa del suero entero. Son necesarios más estudios para poder hallar que porcentajes de IgG y de IgM se recuperan después del fraccionamiento de Sephadex G-200.

Se encontró IgG en fracciones colectadas de la columna de Sephadex G-200 que no se esperaba. Una de las muchas razones puede haber sido que parte de IgG fue agregada y, por lo tanto, salió de la columna con las moléculas más grandes.

El complemento de conejo no funcionó en este estudio; dio aglutinación en cualquiera de las diluciones utilizadas. Una explicación para esto podría ser que la mayoría de los sueros de conejo tengan anticuerpos de

TABLA III

TITULOS FC

| | | |
|--------------------|---|----|
| IgG tubos 14 & 15 | > | 8 |
| IgG tubo 16 | > | 2 |
| IgG tubo 17 | > | 4 |
| IgM tubos 2, 3 & 4 | < | 1 |
| Suero entero | > | 32 |

Forssman naturales; por lo tanto, actuaría como si hubiese un exceso de hemolisina.

No se pueden hacer conclusiones significativas del estudio de un solo animal infectado de LB pero puede abrir nuevos intereses para nuevas investigaciones necesarias en esta y muchas otras áreas relacionadas con leucosis bovina.

En ninguna de las fracciones se pudo detectar IgA, incluso después de concentrar las fracciones en las cuales IgA era esperada. La explicación podría ser que IgA específica para el virus de LB no estaba presente en concentraciones suficientes en el suero como para ser demostradas por gel difusión; pero el análisis separado del mismo suero realizado en otra investigación no mostró presencia de IgA.

El factor acrecentador que suministra el suero fresco normal de bovino, se sabe que tiene muchas de las características químicas del factor C₁ pero su mecanismo de acción no ha sido determinado aún (12).

SUMMARY

Serum immunoglobulins (Ig) from a bovine leukosis virus (BLV) antibody positive bull were separated by gel filtration on Sephadex G-200 and identified as to class by double diffusion in the agar gel immunodiffusion test with class specific antisera. The fractions containing IgM and IgG were tested for complement-fixing activity

to BLV antigens. The IgG fractions had higher concentrations of complement-fixing antibodies than IgM fractions, but both classes of Ig appeared to have complement-fixing antibody activity to BLV antigens.

Key words: Bovidae, Immunoglobulins, Bovine leukosis

VETERINARIA 18 (81) 72 - 76, jul - sept, 1982

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Behrens, V.G., Ziegelmaier, R., Toth, T. et al.- Rinderleukose-Diagnostik: ELISA. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr. 92: 429 - 432 (1979).-
- Boulanger, P.- Technique of a modified direct complement fixation test for viral antibodies in heat-inactivated cattle serum. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 24: 262 - 269 (1960).-
- Burny, A., Bex, F., Chantrenne, H. et al.- Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leucosis. Adv. Cancer Res. 28: 251 - 311 (1978).-
- Ferrer, J.F., Bhatt, D.M., Marshak, R.R.- Studies on the relationship between infection with Bovine C-type virus, leukemia and persistent lymphocytosis in cattle. Cancer Res. 34: 893 - 900 (1974).-
- Ferrer, J.F., Baliga, V., Diglio, C., Graves, D., Kenyon, S.J., Mc Donald, H., Piper, C., Wu, K.- Recent studies on the characterization of the bovine leukemia virus (BLV), development of new methods for the diagnosis of BLV infection. Vet. Microbiology 1: 159 - 184 (1976).-
- Grant, C.K.- Complement specificity and interchangeability: measurement of hemolytic complement levels and use of the complement-fixation test with sera from common domesticated animals. Am. J. Vet. Res. 38: 1611 - 1617 (1977).-
- Gupta, P., Ferrer, J.F.- A critical comparison of the virus neutralization, radioimmunoprecipitation and immunodiffusion tests for the serologic diagnosis of BLV infection. Ann. Rech. Vet. 9: 683 - 688 (1978).-
- Gustafson, G.A., Pearson, J.E.- Modified direct Bluetongue complement-fixation test. NADC, Ames, Iowa.-
- Levy, D., Deshayes, L., Parodi, A.L., Guillermain, B.- Bovine leukemia virus specific antibodies among French Cattle. I. Comparison of complement fixation and hematological tests. Int. J. Cancer 19: 822 - 827 (1977).-
- Levy, D., Deshayes, L., Parodi, A.L., Levy, J.P., Stephenson, J.R., Devan, S.G., Gilden, R.V.- Bovine leukemia virus specific antibodies among French cattle. II. Radioimmuno assay with the major structural protein (BLV p24). Int. J. Cancer 20: 543 - 550 (1977).-
- Miller, J.M., Miller, L.D., Olson, C. et al.- Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 43: 1297 - 1305 (1969).-
- Miller, J.M., Van der Maaten, M.J.- A complément-fixation test for the Bovine Leukemia (C-type) virus. J. Nat. Cancer Inst. 53: 1699 - 1702 (1974).-
- Miller, J.M., Van der Maaten, M.J.- Serologic detection of bovine leukemia virus infection. Vet. Microb. 1: 195 - 202 (1976).-
- Olson, C., Miller, L.D., Miller, J.M., Hoss, H.E.- Brief communication: transmission of lymphosarcoma from cattle to sheep. J. Nat. Can. Inst. 49: 1463 - 1466 (1972).-
- Pharmacia Fine Chemicals. Gel filtration theory and practice. (1980).-
- Portetelle, D., Kettmann, R., Mammerickx, M. et al.- Biochemical features of bovine leukemia virus. Vet. Microbiology 1: 129 - 158 (1976).-
- U.S. Department of Health, Education and Welfare Public Health Service. Center for Disease Control. A guide to the performance of the standardized Diagnostic Complement-Fixation Method and Adaptation to Microtest. (1974).-
- U.S. Public Health Monograph 74. Standard CF Method and adaptation to Micro Test. (1965).-

Recibido para su publicación 24 de abril de 1982.

URUSAL

PARA GANADO

Formulado para complementar en forma eficiente y equilibrada el aporte mineral en la nutrición animal.

ANTIL S.A. CUAREIM 1961
Tel. 90 60 17 - 20 66 27 - 20 39 29

SUPLEMENTO MINERAL

| | | |
|-----------------------------------|-------------|-----|
| Fósforo (P) | 7,00/ 8,00 | o/o |
| Calcio (Ca) | 16,00/18,00 | o/o |
| Cloruro de sodio (NaCl) | 41,00 | o/o |
| Magnesio (Mg) | 1,00 | o/o |
| Hierro (Fe) | 0,10 | o/o |
| Cobre (Cu) | 0,10 | o/o |
| Azufre (S) | 0,10 | o/o |
| Manganeso (Mn) | 0,01 | o/o |
| Cobalto (Co) | 0,0025 | o/o |
| Zinc (Zn) | 0,0472 | o/o |
| Selenio (Se) | 0,0007 | o/o |
| Iodo (I) | 0,0044 | o/o |
| Minerales Totales | 98,00 | o/o |
| Melaza | 2,00 | o/o |
| Humedad | 3,00 | o/o |