

# LA PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO EN LA ANAPLASMOSIS \*\*

L. O. MOTT,\* D. V. M. y D. G. GATES,\* V. D. M., M.S.

El Bureau de Industria Animal se ha visto en la necesidad de disponer de un test diagnóstico de la anaplasmosis.

El estado agudo de esta enfermedad puede ser seguido, ya sea por anemia y muerte o por el restablecimiento con una activa inmunidad acompañada por la persistencia del agente infeccioso, haciendo, en la mayoría de los casos, portadores de la enfermedad durante toda su vida. Estos portadores parecen normales y no pueden ser diferenciados de animales no infectados y pueden permanecer como una constante fuente desconocida de infección.

## DIAGNÓSTICO

La enfermedad puede diagnosticarse con exactitud en los casos agudos mediante comprobación en las células rojas sanguíneas de corpúsculos marginales cuando el porcentaje de estas células rojas afectadas es de 0,5 % o más; si lo que parecen corpúsculos marginales están en un porcentaje inferior al 0,5 % en relación a las células rojas, un diagnóstico positivo es dudoso, porque en numerosas ocasiones se han encontrado algunos corpúsculos similares en animales normales. En portadores de anaplasmosis, la enfermedad puede diagnosticarse con exactitud por extracción del bazo, lo cual induce a una agudización de la enfermedad acompañada por la aparición de cuerpos marginales en las células rojas sanguíneas; o la sangre puede extraerse de los portadores sospechosos y luego inyectarla en vacas maduras o terneros susceptibles cuyos bazos se han extraído a fin de hacerlos más susceptibles, desarrollándose en ellos la enfermedad dentro de los sesenta días, si el dador estuviese infectado con anaplasmosis.

\* De la División de Patología del Bureau de Industria Animal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

\*\* Traducido por el Dr. Raúl Edin Castro, del Servicio de Premunición del Laboratorio de Biología Animal "Dr. M. C. Rubino" de la Dirección de Ganadería; de *Veterinary Medicine*, Año 1949, Julio; pp. 296-299.

Otros tests diagnósticos se han aplicado a la anaplasmosis con muy poco éxito. El test de fijación del complemento, cuando se aplicó a la anaplasmosis en dos investigaciones previas, evidenció que este test puede tener valor práctico para diagnóstico.

### PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS

Los autores, reconociendo la importancia de este trabajo previo, empezaron a investigar métodos prácticos de producción de antígenos con los cuales se pudiesen producir más grandes cantidades de un antígeno satisfactorio para el test de fijación del complemento. En un número de bovinos se hicieron antígenos de sangre en considerable volumen de células rojas sanguíneas lisadas, lavadas, citratadas, de casos agudos de anaplasmosis. Estos antígenos fueron preparados de acuerdo a la técnica usada por el Ejército para la producción de un antígeno usado con el test de fijación del complemento para el diagnóstico de la malaria. Un número de dificultades fueron encontradas y superadas en la producción de este antígeno.

El número promedio de cuerpos marginales por células infectadas y la aproximación patrón de invasión parásita que acompaña un aumento en las células rojas parasitadas, está mostrado en el cuadro 3. Estos antígenos de sangre de bovinos parecen ser específicos para la anaplasmosis y dieron algunas buenas reacciones positivas y negativas con muestras de conejos sueros positivos y negativos. Sin embargo, los tests fueron un poco difícil de leer a causa del alto color hemoglobínico contenido y los estudios continuaron para eliminar este objetable hecho.

Otro antígeno de anaplasmosis, antígeno de sangre precipitado al dióxido de carbono fué preparado de acuerdo al método descrito por Heidelberger y Mayer. Los antígenos preparados por este método de vacas normales e infectadas de anaplasmosis y caballos normales se encontró que no son satisfactorios para los trabajos de fijación del complemento en las anaplasmosis. Los investigadores observaron que una considerable cantidad del antígeno estaba perdiéndose durante el proceso con esta técnica, y también se notó una marcada diferencia en los resultados del procedimiento de células rojas de bovino y equino. Varios cambios en la técnica fueron hechos y se hicieron tests para corregir las fallas del método de producción, después la mayoría de los antígenos se prepararon de casos agudos de anaplasmosis con alto número de células rojas parasitadas que produjo un mejor antígeno que el antígeno de sangre de bovino preparado del mismo animal y fueron también librados del objetable alto color hemoglobínico contenido.

### FUENTE DE MATERIAL

La fuente del material infectivo de anaplasmosis puede ser sangre de un caso agudo o de un conocido animal portador. El tiempo aproximado que se requiere para producir un caso agudo cuando se comienza con un portador como una fuente animal, está mostrado en el cuadro 2 y puede ser comparado con el uso de sangre de casos agudos mostrados en el cuadro 1. Se ha demostrado que sangre citratada congelada de un caso agudo almacenada durante trece

meses a temperatura de  $-50^{\circ}$  a  $-70^{\circ}$  cuando se inyecta a una vaca normal resulta un caso agudo con veinticuatro días de período de incubación. Una cantidad similar de material infectante del mismo caso agudo sacado en el mismo momento pero inyectado inmediatamente a un animal susceptible, resulta un caso agudo con inmediata multiplicación parásita sin un período de incubación. Esta diferencia en el período de incubación demuestra la gran pérdida del agente infectante por congelamiento y descongelamiento.

La inactivación del agente infectante de anaplasmosis por congelamiento y descongelamiento en más de noventa animales bovinos que fueron inyectados con células infectadas, lavadas de veintiséis casos agudos, las células fueron rápidamente congeladas y descongeladas seis veces antes de ser inyectadas. Ninguno de los noventa animales inyectados se infectaron de anaplasmosis. El uso de sangre almacenada en hielo seco de casos agudos parece no tener ninguna ventaja sobre el uso de sangre de portador al reducir el comienzo del tiempo de producción porque los períodos de incubación obtenidos con ambos métodos son prácticamente los mismos.

## RESUMEN

### PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS EN ANIMALES

Los mejores animales para la producción de antígenos aparentemente son terneros normales vigorosos de 12 a 18 meses de edad, pesando de 400 a 600 libras, machos o hembras, a los cuales se les ha extraído el bazo treinta o sesenta días antes de la fecha de inoculación. Terneros más jóvenes son adecuados pero no reddtúan suficiente sangre. Animales más viejos con y sin bazo han sido usados con algún éxito, pero se encontró que ellos eran mucho menos uniformes en susceptibilidad que los animales más jóvenes. Es también aconsejable usar animales que nunca hayan sido inoculados con ningún producto biológico, incluyendo sangre normal o suero de otros animales normales, porque tales inoculaciones parecen influenciar la susceptibilidad de los terneros y probablemente causan algunas de las variaciones de la susceptibilidad en los animales más viejos, los cuales, generalmente, han tenido algunas inyecciones, tales como vacunaciones o inoculaciones, en su vida.

Esta causa de la variación de la susceptibilidad se menciona como un importante agregado a las cinco causas generalmente atribuidas de variación informadas por Lotze, a saber: 1) edad y condición; 2) resistencia individual; 3) cantidad y carácter de la inoculación; 4) capacidad del individuo para regenerar las células rojas; 5) virulencia del agente específico.

### MÉTODOS DE INOCULACIÓN

La inoculación del agente infectivo de la anaplasmosis es uno de los más importantes pasos en la producción de un buen antígeno. El uso de sangre del portador a una dosis a razón de 10 a 50 c.c. para cada pasaje sucesivo cosechado de cada caso agudo en el pieo de su infección aguda, usualmente requiere 4 ó más pasajes sobre un período de tres a cuatro meses para producir un antígeno satisfactorio.

Estudios de la infectividad durante un período de dos años, en el cual sesenta animales fueron usados, haciendo rápidos pasajes en series de tres a quince animales por serie; mostraron que uno o dos pasajes de un caso agudo

puede resultar un alto porcentaje de células rojas infectadas y producir un antígeno satisfactorio cuando dosis infectivas masivas son dadas intravenosamente. La sangre de dadores agudos se cosecha en un igual volumen de solución Alsever, en el momento de infectividad máxima de las células rojas y poco después.

En este momento el volumen de las células rojas usualmente promediará más o menos un 10 % del total del volumen sanguíneo.

La solución Alsever se usa en lugar del anticoagulante citrato de sodio porque parece disminuir la cantidad de hemolisis de las células rojas fuertemente parasitadas, las cuales son mucho más frágiles que las células rojas de un animal normal. La suspensión de células rojas en solución Alsever se centrifuga en botellas "pyrex" de 250 c.c. a 1.900 r.p.m. durante veinte minutos, después de los cuales el líquido sobrenadante se sifonea y se da a las células rojas un lavado por resuspensión en solución fisiológica salina y se centrifuga otra vez durante treinta minutos a 1.900 r.p.m.

El suero salino sobrenadante se saca, el volumen de las células rojas amontonadas se mide y las células rojas se resuspenden en un igual volumen de solución fisiológica y esta suspensión salina de células rojas parasitadas se inyecta intravenosamente en el próximo animal de pasaje. El tamaño de las dosis infectantes debe variar de acuerdo al tamaño del animal de pasaje que será expuesto. A dosis de 500 c.c. de células rojas amontonadas suspendidas en 500 c.c. de solución fisiológica, fué la dosis usual elegida para el animal promedio de pasaje.

Esto representa las células de más o menos cinco litros de sangre de un dador en estado agudo. Considerable precaución se debe usar cada vez que dosis infectivas grandes de casos agudos se inoculan intravenosamente en los animales que serán expuestos; como síntomas de severo shock pueden comenzar de algunos minutos a algunas horas después de la intervención y resultar muertes de los animales expuestos con la pérdida del material de pasaje. Este tóxico o agente productor del shock se encontró que está presente en el suero de animales infectados y en sus células rojas lavadas. En consecuencia, el margen de seguridad de las dosis grandes se aumenta por extracción del suero y resuspensión de las células rojas infectadas en solución fisiológica, antes de inocularse. Además, al darse en varias dosis el material infectivo, a intervalos de una a dos horas se aumenta el margen de seguridad. La mayoría de los casos que muestran estos síntomas de shock responderán temporariamente al tratamiento con una inyección intramuscular de epinefrina (epinefrina hidroclicorada) pero puede matar más tarde (de la noche a la mañana) a menos que los animales expuestos estén mantenidos bajo constante observación durante un período de veinticuatro horas postexposición, tiempo durante el cual la epinefrina debe ser administrada cada vez que los síntomas de shock reaparezcan. No es usualmente necesario administrar epinefrina más frecuentemente que una sola vez cada hora en casos severos. La dosis única de epinefrina al uno por mil que se usó, osciló de uno a cinco centímetros cúbicos, dependiendo de la reacción del animal.

Antígenos satisfactorios se han preparado de terneros y vacas esplenectomizados y de vacas con bazo. Es necesario observar el curso de la enfermedad muy estrictamente, haciendo registros diarios de la reacción térmica, volumen de las células rojas, numeración de los parásitos de las células rojas y reacciones clínicas, puesto que el animal puede pasar el pico de la invasión parásita de las células rojas y morir antes que las células rojas parasitadas puedan ser cosechadas.

Cuadro N° 1

Efecto del volumen de las dosis sobre la duración del período de incubación.  
Animales surtidores en estado agudo.

Número del animal surtidor	Número del animal inculado	Dosis en c.c. de sangre anaplasmósica (aguda)	período de incubación (días)
Vacas no esplenectomizadas			
3017	2418	0.0002	32
3017	2928	0.0002	34
3055	2831	0.0003	21
3055	2738	0.0003	31
3055	2777	0.0003	31
1868	1848	15.0	22
Terberos esplenectomizados			
2528	2563	150.0	17
193 J	2879	200.0	10
2259	2680	200.0	6
2596	2375	400.0	3
2942	2941	500.0	** 1
2941	2926	500.0	** 1
2826	2818	1000.0	** 1
2818	2853	1000.0	** 1
2868	2856	2000.0	** 1
Vacas esplenectomizadas			
2936			
2937	2705	* 4300.0	** 1
2938			
2946			
2936			
2937	2126	* 4300.0	** 1
2938			
2946			
2936			
2937	2766	* 4300.0	** 1
2938			
2946			

\* La dosis de sangre infectiva tabulada representa el volumen de la sangre anaplasmósica aguda. Sin embargo solamente las células rojas sanguíneas de esta sangre resuspendida en solución fueron inyectadas en los animales.

\*\* Indica un período de incubación de 1 día o menos.

La velocidad observada del aumento de las células rojas parasitadas en estos casos agudos infectados artificialmente se duplica cada veinticuatro horas y usualmente alcanza el máximo dentro de siete a nueve días. La sangre usualmente se cosecha de animales infectados, poco después que se alcanza el grado máximo de la invasión parásita de las células rojas.

El área operatoria se lava, se afeita, se desinfecta y se anestesia localmente. La sangre se recoge de la arteria carótida en frascos cerrados conteniendo solución Alsever si es para reinoculación y en frascos conteniendo citrato de sodio cuando se usa para la producción de antígenos. El procedimiento de la centrifugación y extracción del suero de la sangre citratada, se comienza inmediatamente que se cosecha la sangre; entonces se lavan las células seis veces en solución fisiológica. A un volumen de las células rojas lavadas se le agrega aproximadamente treinta volúmenes de agua destilada helada saturada de dióxido de carbono, la cual es entonces agitada y colocada en un refrigerador toda la noche.

Un precipitado blanco rosado se forma y se deposita en el fondo del recipiente. Al día siguiente, el líquido sobrenadante se saca. El precipitado se centrifuga y se lava en agua destilada helada hasta que el líquido sobrenadante no contenga color; esto usualmente lleva tres o más lavados. El precipitado de dióxido de carbono es soluble en agua salada y generalmente muestra una reacción ácida de más o menos  $\text{pH}$  4. La cantidad de precipitado lavado amontonado se mide, la acidez se neutraliza con 1,2 % de bicarbonato de sodio y solución fisiológica se agrega en suficiente cantidad para hacer una concentración standard de antígeno igual a tres veces el volumen del precipitado amontonado. Terminadas estas operaciones el producto es pipeteado en ampollas, liofilizado, cerrado al vacío y almacenado a temperatura de  $-50^{\circ}$  a  $-70^{\circ}$  hasta que se use. El antígeno al ser usado se le restaura su volumen original

## Cuadro N° 2

Efecto del volumen de la dosis sobre el período de incubación; surtidores son animales portadores.

Número del animal surtidor	Número del animal inoculado	Dosis c.e.	Período de incubación (días)
2026	Ternero 2940	10	33
2026	" 2956	10	39
2026	" 2943	10	33
2026	" 2793	50	39
1368	" 2976	280	24
2580	" 3055	500	14
2580	" 3017	1000	11
2580	" 3027	1000	9
2026	Novillo 3023	1800	12
3055	" 3022	2800	6

con agua destilada prolijamente agitado, entonces se centrifuga lentamente para depositar cualquier partícula disuelta y el material sobrenadante se saca para trabajos de fijación de complemento.

Antígenos satisfactorios se han preparado de acuerdo a los métodos descritos más arriba y almacenados durante dos años a temperaturas de  $-50^{\circ}$  a  $-70^{\circ}$  sin ninguna pérdida apreciable de la antigenicidad. Sin embargo, muestras testigos almacenadas a temperaturas de refrigeración, parecen mostrar una marcada pérdida de antigenicidad, después de algunos meses de almacenamiento.

Cuadro N° 3

Efecto del aumento en el porcentaje de las células parasitadas sobre el patrón aproximado del aumento de los parásitos en las células rojas sanguíneas.

Porcentaje de células \* infectadas mostrando aproximadamente:

Porcent. de cél. pa- rasitadas	Nº prom. de epos. por cél. infectada	1 epo. por cél.	2 epos. por cél.	3 epos. por cél.	4 epos. por cél.	5 epos. por cél.	6 epos. por cél.	7 epos. por cél.
5	1	100	—	—	—	—	—	—
10	1.12	88	12	—	—	—	—	—
20	1.26	77	20	3	—	—	—	—
30	1.34	70	24	4	1	—	—	—
40	1.43	66	26	6.4	1	0.5	—	—
50	1.60	54	28	10	3.5	1.1	0.1	—
60	1.83	40	30	18	4	2	0.5	—
70	2.06	38	38	16	7	2	1	—
80	2.56	24	25	30	13	6	1	0.6

## BIBLIOGRAFÍA

- MOHLER, J. R.—Informe del Jefe del Bureau de Industria Animal de los Estados Unidos, p. 43; 1931-1932.
- REES, CH. y MOHLER, W. M. (1934).—*J. Am. Vet. Med. Assn.* 38: 669 (Noviembre).
- KENT, J. F. y REIN, C. R.—The complement fixation test for the serum diagnosis of malaria. Comunicación personal.
- HEILDELBERGER, M. y MAYER, M. M. (1944).—Normal human stroma as antigens for complement fixation in the sera of patients with relapsing vivax. *Science*, 100: 359-360 (Octubre 20) 1944.
- LOTZE, J. (1947).—Variables and constants in experimental bovine anaplasmosis and their relationship to chemotherapy. *Am. J. Vet. Res.* 8: 263-274 (July).

\* Células numeradas: 7,120 normales y 2,827 infectadas.