

CAPITULO XIII

METODOS DE DIFUSION EN AGAR

1. INTRODUCCION

La inmunodifusión es una técnica por medio de la cual se visualiza una reacción de precipitación en un medio semi-sólido. Entre los varios agentes gelificantes, se cuenta el agar comunmente usado en estudios de virus animales.

Existen diferentes tipos de inmunodifusión de los cuales el de mayor aplicación a estudios virológicos es la doble inmunodifusión de Ouchterlony. Los principios reaccionantes, antígenos y anticuerpos, se difunden uno hacia el otro y precipitan en la zona en que las proporciones son óptimas. El precipitado se aprecia como una o varias líneas blancas u opalescentes que permanecen estables. La inmunoelectroforesis, un método analítico muy sensible es la combinación de la inmunodifusión doble y la electroforesis. La inmunodifusión radial de Mancini, permite una cuantificación exacta de antígeno, anticuerpos y complejo formado.

En el estudio del sistema del virus de la Fiebre aftosa se han utilizado los métodos antes descritos (Cowan y col, 1970;

Lobo y col, 1974). La aplicación de la inmunodifusión doble de Ouchterlony en la detección de anticuerpos anti-VIA en el laboratorio, ha sido de gran ayuda en la evaluación epidemiológica de la presencia de infección aftosa en áreas bajo la influencia de la campaña antiaftosa o en zonas que han sido declaradas libres de la enfermedad. También se ha empleado en el estudio de los componentes antigénicos del virus de la Fiebre Aftosa para relacionar su identidad e identificar el tipo de anticuerpos contra estos antígenos, presente en los sueros hiperinmunes obtenidos en el Laboratorio. Con la inmunodifusión radial, se han obtenido estimaciones cuantitativas de antígenos solubles y de inmunoglobulinas precipitadas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Inmunodifusión doble de Ouchterlony

- Preparación de las placas: Se emplean cajas de petri de 85 mm de diámetro a las cuales se les ha colocado 15 ml de una mezcla, por partes iguales de agar al 2% y de agar gel buffer.

Nota: Antes de preparar la mezcla agar-buffer, los componentes se deben llevar a 45°C para evitar solidificación del agar y así se mantienen hasta su uso.

Se cortan las celdas en el agar utilizando un molde de siete orificios, uno central y seis periféricos de 6 mm de diámetro con una distancia de 4 mm entre sí y 5 mm a la periferia. Se succiona el agar de las celdas con una bomba de vacío, utilizando presión negativa.

2.2 Determinación de anticuerpos anti-VIA

- Determinación de la dilución óptima de antígeno VIA y antisuero positivo.

El antígeno se titula colocando el suero control positivo en la celda central y diluciones del antígeno (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) en las celdas periféricas en el sentido de las manecillas del reloj (la central se numera 0 y las periféricas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en dicho sentido). El suero se titula de la misma manera, esta vez con el antígeno a dilución fija en la celda central y diluciones en la periferia. Cuando se está titulando antígeno o antisuero debe usarse un patrón en el cual todas las celdas sean de diámetro igual.

Las cajas se colocan en una cámara húmeda durante 48-72 horas cuando se hace la lectura. El título es la dilución máxima de antígeno o antisuero que ha formado una línea de precipitación clara con su reactante.

- Montaje e interpretación de la prueba.

Se coloca un suero control positivo a título de uso en las celdas 1 y 4 y los sueros problema en las celdas 2, 3, 5, 6. El antígeno se coloca en la celda central O. Todas las celdas se deben llenar hasta el nivel de la superficie del agar.

El diámetro de la celda central en este caso es de 4 mm y el de las celdas periféricas donde van los sueros de 6 mm para darle más de sensibilidad a los sueros problemas aumentando su concentración.

Los siguientes son los tipos de reacciones que pueden observarse: Gráfica 13

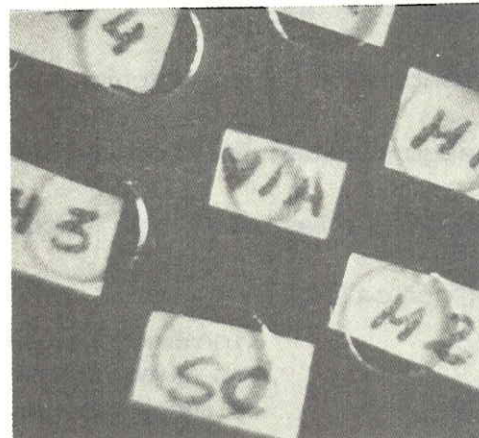
a. Reacción positiva : Se forma una banda clara y concisa de completa identidad con la banda formada por el suero control.

b. Reacción débilmente positiva o sospechosa: Se observa cuando el contenido de anticuerpos contra el antígeno VIA es bajo. Se forma un ligero espolón de identidad completa con la banda formada por el suero control.

c. Reacción negativa: Si el suero ^{no} contiene anticuerpos la banda de precipitación formada por el suero control,

es totalmente horizontal sin formar ningún espalón.

Gráfica 13. Reacciones
vía positivo
y negativo



- Manejo del antígeno

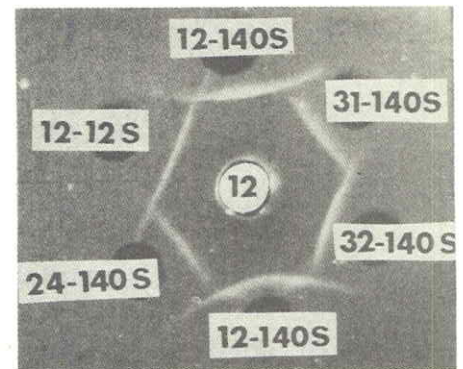
Se debe añadir al antígeno 0.02% de azida sódica (NaN_3) y guardarse en refrigeración. Conservando en congelación se ha reportado pérdida de efectividad en algunos lotes. El concentrado debe diluirse a título de uso en agar gel buffer a medida que se requiere para su uso.

2.3 Identidad de los componentes antigénicos y anticuerpos formados en el sistema del virus de la Fiebre Aftosa.

La inmunodifusión doble de Ouchterlony se utiliza en el sistema del virus de la Fiebre Aftosa para evaluar la integridad de los antígenos concentrados e inactivados así como en la identificación de los distintos componentes antigénicos del virus y del tipo de anticuerpos contra estos antígenos en los sueros inmunes e hiperinmunes obtenidos en el Laboratorio.

En el primer caso se enfrenta el antisuero hiperinmune frente a las distintas fracciones obtenidas en el proceso de concentración, inactivación y purificación del virus aftoso. En el segundo caso los antisueros inmunes, hiperinmunes o problemas frente a las distintas fracciones antigénicas. Gráfica 14

Gráfica 14. Reacción positiva de inmunodifusión entre un suero hiperinmune y distintas fracciones antigénicas de virus aftoso.



2.4 Inmunodifusión radial

Existe dos modalidades de este método: El método convencional, en el cual el suero va incorporado al agar y el método inverso cuando el antígeno es el reactivo incorporado al agar.

El más utilizado en el Laboratorio y que a continuación se describe es el método convencional, que permite cuantificar antígenos concentrados, fracciones antigénicas purificadas y complejos antígeno-anticuerpo formados.

a. Preparación de las placas: Se emplean placas plásticas de 6 cavidades de 35 mm de diámetro cada una en las cuales se coloca 3 ml de una mezcla de agar al 2% más el suero inactivado y diluido en agar gel buffer a la dilución deseada.

Ejemplo: Si se desean diluciones finales de suero 1/10, 1/20.....1/320 se procede de la siguiente manera:

0.6 ml (suero 1/1)	+	2.4	Agar gel buffer	=	3.0 ml 1/5
1.5 ml (" 1/5)	+	1.5	"	=	3.0 ml 1/10
1.5 ml (" 1/10)	+	1.5	"	=	3.0 ml 1/20
1.5 ml (" 1/20)	+	1.5	"	=	3.0 ml 1/40
1.5 ml (" 1/40)	+	1.5	"	=	3.0 ml 1/80
1.5 ml (" 1/80)	+	1.5	"	=	3.0 ml 1/160

Descartar 1.5 ml de 1/160

El volúmen final de cada tubo es de 1.5 ml

- A continuación se calienta las diluciones del suero a 45°C y se les añade a cada una 1.5 ml de una solución de agar al 2% y llevada a la misma temperatura. Las diluciones finales serán en este caso 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320

- Se mezclan suavemente evitando la formación de burbujas y se colocan individualmente en cada orificio de la caja.

- Se dejan solidificar y se guardan en refrigeración por 1 hora o a temperatura ambiente durante la noche.

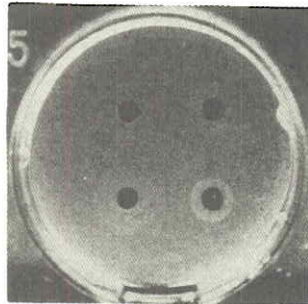
b. Montaje e interpretación de la prueba

Se cortan las celdas en el agar utilizando un molde de 5 orificios de 3.6 mm de diámetro cada uno (1 central y 4 periféricos). El agar se remueve por succión con la bomba de vacío. El antígeno se coloca con una micropipeta en cantidad de 10 ml a la concentración deseada (en términos de $\mu\text{gs/ml}$)

Ejemplo: Si se tiene una concentración de 800 $\mu\text{gs/ml}$ de antígeno concentrado y lo diluimos 1/2 se tendrá una concentración de 400 $\mu\text{gs/ml}$ y así sucesivamente.

- Las cajas son incubadas en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 5 días cuando se lee el diámetro de los anillos formados alrededor de las celdas, con una regla apropiada. El antígeno se difunde radialmente formando un anillo de precipitación con los anticuerpos en el suero e incorporados al agar.

El diámetro de los anillos es directamente proporcional a la concentración del antígeno en la celda e inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos. Es decir, a menor concentración de antígeno el diámetro del anillo será menor y a menor concentración de anticuerpos el diámetro del anillo será mayor.



Ejemplo gráfico de inmunodifusión radial

Conociendo la concentración del antígeno a distintas diluciones y el diámetro del anillo formado con un suero conocido se puede construir una curva estándar para el antígeno en estudio (\varnothing anillo vs concentración del antígeno) sobre la cual se puede conocer la concentración de un antígeno cualquiera del mismo tipo y subtipo.

También se emplea esta técnica para identificar an-

ticuerpos presentes contra los distintos componentes antigénicos del virus de la Fiebre Aftosa. En este caso se puede emplear una dilución fija del suero y concentraciones conocidas del virus concentrado y fracciones antigénicas obtenidas en el proceso de purificación del virus.