

Obtenidos los valores  $r_1$  y  $r_2$ , se calculó la relación bilateral para los siete antígenos mediante la fórmula (7):

$$R = 100 \quad r_1 \times r_2$$

### 3.4.2 Técnicas Inmunológicas.

Para el estudio de clasificación definitiva y conocimiento de la cobertura inmunológica de las cepas A6304, A7510 y A8046, se aplicaron métodos cualitativos y cuantitativos.

#### 3.4.2.1 Prueba de microneutralización.

En esta prueba se enfrentaron los sueros inmunes de bovinos vacunados y sangrados a los 30 días de la vacunación con las cepas A6304 y A8046 a 12 cepas virales del tipo A (A27/67, A6000, A6111, A6304, A6336, A7510, A8046, A8481, A8480, A8517 y A8954).

Sobre las placas plásticas rectangulares Linbro\* se distribuyeron por celda 0.05 ml de los sueros en diluciones base 2

---

\* Linbro Chemical Co., Inc. Modelo IS-FB-96.

(1/4....1/512), 0.05 ml de virus equivalente a 50 DITC 50% y  $10^{4.5}$  células (línea BHK) suspendidas en 0.05 ml. En forma similar se hicieron controles de toxicidad e infecciosidad de los sueros, dosis infectantes reales aplicadas y formación de la monocapa celular.

Las placas cubiertas se llevaron a estufa con humedad permanente, flujo de 0.4 lts/minuto de  $CO_2$  al 5% y flujo de 8 lts/minuto de aire al 95%. Luego fueron sometidas a temperatura de 37°C durante 72 horas. Al término de este tiempo, se realizó lectura y se calculó el título neutralizante del suero por el método acumulativo de Sperman Carber (57). Esta prueba fué sometida a tres repeticiones.

#### 3.4.2.2. Prueba de Índice C.

Se utilizaron vacunas comerciales suministradas por la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios (VECOL). Los lotes vacunales 10 y 13 fueron preparados con la cepa viral A6304 y enfrentados en la prueba a los virus A6304, A7510 y A7742 Sab/74. Los lotes vacunales 01, 26 y 28 fueron pre-

parados con la cepa viral A8046 y enfrentados a los virus A6304, A7510, A7808, A8046 y A27 Santander/75.

Se emplearon lotes homogéneos de cobayos de 4 a 6 meses de edad, con más de 500 gramos de peso. Para cada valencia de vacuna se utilizaron 24 cobayos y el mismo número de testigos.

Los cobayos fueron vacunados por vía subcutánea con 1/10 de la dosis bovina. La descarga viral se realizó 21 días después por inoculación IDP en una extremidad con 0.1 ml de la dilución correspondiente. Las cuatro diluciones preparadas contenían  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  y  $10^4$  dosis infectantes cobayos 50% (DIC 50%). Las cepas de descarga fueron de origen bovino, adaptadas a cobayo con un máximo de cuatro pasajes. Para cada dilución se utilizaron de cuatro a seis animales.

La prueba se prolongó para su lectura final hasta por siete días. Las dosis generalizantes 50% de las titulaciones del virus en los cobayos vacunados y testigos fueron calculadas según el método de Sperman Carber a partir de los datos de gene-

realización. El principio del Índice C está definido por la relación:

$$\text{Índice C (IC)} = \frac{\text{Testigos (T)}}{\text{Vacunados (V)}}$$

Los índices se determinaron tomando la diferencia entre el título del virus en animales del grupo control y el título del virus en grupos de animales vacunados.

#### 3.4.3. Estudio de Estabilidad de Cepas.

Para determinar la estabilidad de las cepas estudiadas, se emplearon materiales virales procedentes de epitelio original bovino, de cultivos celulares y de ratones lactantes.

El virus obtenido de material epitelial bovino fué caracterizado utilizando como marcador la prueba de subtipificación por fijación del complemento. Las cepas A6304, A7510, A8043, A6000 y A8480 fueron sometidas a dicha prueba realizando tres repeticiones y empleando 2 y 2.5 UFC 50% de antígeno previa titulación a 3 y 4 UHC 50%.

El enfrentamiento se hizo ante una gama de sueros hiperinmunes correspondientes a los subtipos A18-Venezuela, A24-Cruzeiro, A26-Argentina, A27-Colombia, A31-Colombia, A32-Venezuela y ASabana/74-Colombia y los sueros homólogos de las cepas empleadas en este estudio.

A partir del epitelio bovino, se adaptaron los virus a células de la línea BHK realizándose diez pases acompañados de su respectiva subtipificación para compararlos con las observaciones obtenidas en los virus originales de epitelio bovino.

Además, los virus obtenidos de los pases 1, 5 y 10 en células BHK fueron inoculados en ratones lactantes de cinco días hasta un tercer pasaje con cada uno de ellos. El material antigénico extraído de las carcacas fué analizado con la prueba de subtipificación para establecer su comportamiento en relación con los virus originales de epitelio bovino y de cultivo celular.

## 3.4.3.1. Aislamiento de placas.

Con los virus en estudio se observó la formación de placas a nivel de los pases 1, 5 y 10 en células BHK estudiándose las placas mediante prueba de subtipificación.

Se utilizaron frascos plásticos para cultivo celular con una área de 75 cm<sup>2</sup>, uno por dilución.

Los virus se diluyeron en medio Earle 1 X adicionado de penicilina y estreptomina, considerando las diluciones de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup>. De cada una de ellas se inoculó 0.5 ml por frasco, con incubación a 37°C por una hora. Pasado el período de incubación se retiró el inóculo de los frascos y se agregó la mezcla a partes iguales de agar noble previamente licuado por calor y Earle 2 X. Se agregó 20 ml de la mezcla por frasco y se dejó solidificar durante 20 minutos. Luego se llevaron a incubación durante 60 horas en posición invertida. Pasado este tiempo se adicionó una segunda capa de la mezcla adicionada de rojo neutro a una

concentración final de 1:15.000 (P/V). Se dejó endurecer la nueva capa y se llevó a incubación por doce horas más a 37°C en posición invertida. Lo anterior permitió un contraste que dejó visualizar las placas en las diluciones mayores.

A continuación, con una pipeta Pasteur de punta curva y perilla se absorbieron las áreas correspondientes a células afectadas por el virus en forma de placas y se suspendieron en 2 ml de medio Earle 1 X. Después de la congelación se hizo replicación en monocapas de cultivo celular.

Los virus obtenidos fueron subtipificados para establecer las características antigénicas. De acuerdo a ellas en algunos casos se realizó un nuevo plaqueo a partir del material de primer clonaje sobre diluciones  $10^{-0}$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ . Debido a una mayor multiplicidad de los virus replicados se consideraron diluciones de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  para el nuevo clonaje.

Para la lectura de las titulaciones se fijaron las células con formol al 10% durante 15 minutos. Luego se desechó la ca-

pa de agar-earle-rojo neutro y se lavó con agua corriente. Finalmente se aplicaron 5 ml de colorante cristal violeta preparado al 1% en alcohol. Se dejó el colorante por 10 minutos y se lavó con agua corriente.

Los títulos se determinaron teniendo en cuenta la última dilución donde fué posible observar placas y relacionado el número por el logaritmo de la dilución.

#### 3.4.3.2. Selección por bloqueo.

Los virus fueron sometidos a la prueba de bloqueo inmunológico utilizando sueros inmunes de cobayos específicos de los subtipos A27, A24, A32 y A Sabana/74. Se tomaron  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  DICT 50% y se mezclaron con diluciones 1/20 y 1/100 de los sueros inmunes. La mezcla, previo calentamiento a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, se inoculó en volumen de 1 ml en frascos plásticos con 15 ml de medio Earle. Se llevaron a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. El material obtenido de cada una de las cajas fué sometido a la prueba de subtipificación.

### 3.5. ANALISIS ESTADISTICO

En los estudios serológicos de fijación del complemento se establecieron promedios aritméticos, relación unilateral y bilateral. En las pruebas de microneutralización igualmente se aplicó el promedio aritmético y se determinó la desviación standard.

La prueba de ANAVA se aplicó sobre un diseño de bloques completos al azar considerando los valores obtenidos con el antígeno de epitelio lingual de las cepas A6000, A6304, A7510, A8046, A8381 y A8480, estudiadas frente a cada suero hiperinmune en la prueba de subtipificación.

Con los valores obtenidos en las pruebas de subtipificación aplicadas a los antígenos de epitelio lingual, los pasajes 5 y 10 en células BHK, los materiales virales anteriores en Ser. pasaje de ratón lactante y los clones pequeños y grandes del 5 y 10 pasaje de células de las cepas A6000, A6304, A7510, A8046, A8381 y A8480, se determinó individualmente la tendencia hacia cada antígeno por medio del análisis de regresión.

si3n lineal m3ltiple. La computaci3n de los datos se hizo en una calculadora Hewlet-Packard\* bajo programas previamente estandarizados en la Divisi3n de Estadística y Biometria del Instituto Colombiano Agropecuario.

Los resultados de los experimentos que no permitieron análisis estadístico fueron sometidos a análisis descriptivo o gráfico.

---

\* Hewlet Packard, Co., Loveland, Colorado.