

RECOPIACION SOBRE VACUNA ANTI-AFTOSA

ELADIO JARAMILLO MORALES

Médico - Veterinario

(Continuación del número anterior)

Segunda parte

Elaboración de la vacuna.

- a) determinación de la cantidad de epitelio tipificado;
- b) instalación y maquinaria;
- c) preparación del extracto del Virus;
- d) esterilización de una "boule";
- e) absorción y atenuación del virus;
- f) operación final;
- g) control de la vacuna y del virus.

(SEGUNDA PARTE)

ELABORACION DE LA VACUNA

- a) — **Determinación de la cantidad de epitelio lingual tipificado para producir la vacuna.**

La cantidad de epitelio, como se ha dicho, varía entre 0,30-0,50 gramos por dosis. Sin embargo, variará según la necesidad de cada zona y su grado de infección, no obstante, la cantidad está entre un mínimo de 0,30 y un máximo de 0,50.

Para hacer el cálculo, se presume que a igual cantidad de epitelio, es-

tará considerada otros tantos de virus. El epitelio a usar en la producción de la vacuna, tiene 3 orígenes:

1). Epitelio natural obtenido en centros de producción de virus, que generalmente son los mataderos públicos o privados.

2). Epitelio del cultivo del virus por el método de Frenkel, junto al líquido de cultivo que es sumamente rico en virus.

3). El extracto de virus de cultivo del virus aftoso sobre extracto de células renales.

Ejemplo para una vacuna monovalente

Si preparamos 36.000 dosis de vacuna de 10 c.c. cada una, la cantidad del epitelio a emplear será $36.000 \times 0,40 = 14.400$ gramos de epitelio (14 kilos y 400 gramos).

Si se tratara de una vacuna bi-valente, esta cantidad vendrá dividida en 2 mitades, correspondientes a cada tipo de virus así:

7.200 gramos de epitelio virus A por ejemplo y 7.200 gramos de epitelio virus B por ejemplo.

Aunque la vacuna trivalente es menos frecuente, dado el caso de prepararla, se dividirá por 3 la cantidad de epitelió total así:

4.800 gramos de epitelió 0 por ejemplo. 4.800 gramos de epitelió A por ejemplo. 4.800 gramos de epitelió C por ejemplo.

Lógicamente, si el virus no es concentrado, las dosis vendrán aumentadas al doble y al triple para la vacuna bi-valente y la tri-valente así:

Monovalente = 10 c.c. Bi-valente = 20 c.c. Tri-valente = 30 c.c.

Cuando se usa conjuntamente el líquido de cultivo en Frenkel, con el epitelió, este vendrá considerado en la siguiente proporción:

10 c.c. de líquido sobrenadante de cultivo Frenkel, FC/1 son iguales a 1 gramo de epitelió de cultivo y aún iguales a 1 gramo de epitelió natural.

Para utilizarlo, se hará la reducción correspondiente según la cantidad de líquido a disposición.

El siguiente cuadro puede ilustrarnos mejor la variación de la cantidad de epitelió-virus, la constante distribución de los demás componentes y las dosis que corresponden a 300 c.c. de vacuna.

b) — Instalaciones y maquinaria

A causa de la labilidad del virus aftoso, por efecto del calor, se hace necesario, tomar todas las precauciones necesarias, para evitar su calentamiento durante el proceso de preparación.

Para tal objeto, es necesario disponer de un sistema de enfriamiento, adaptados a cada dispositivo, para mantener la solución de virus vecina a 2°C. Aún la temperatura del ambiente donde se prepara el extracto del virus, debe mantenerse a temperatura baja, de 10 a 12, en tierra caliente.

Para el acondicionamiento del aire en la sala de extracción del virus, se instalará un sistema frigorífico complejo, que producirá aire a 5°C, este consta de un motor de 304 C.v. y de

Dosis: 30. Monoval. 15 bival, 10 trival

VACUNA		AC-0A-0C	0-A-C
Hidroxi. Al.	60%	180	180
Sol. Tamp.	4%	12	12
Virus Ext.	35%	105	105
Mormal.	35% 0,08%	0,24	0,24
H ₂ O dest.	0,92%	2,76	2,76
Antibióticos =	0,75 por 100.000 c.c. de vacuna.		
Total	100	300	300
Epitelió	0,30 0 = 9 gms.	0 = 4,5 g. A = 4,5 g.	0 = 3 gms. A = 3 gms. C = 3 gms.

un sistema de serpentinas a expansión directa, rosando el aire proyectado de un ventilador a potencia, que antes de ser entubado a la centrífuga, viene enfriado, para evitar su calentamiento en el tiempo del trabajo.

Tanque de salmuera

El tanque de salmuera consta de un sistema frigorífico, motor, etc. y de un tanque en acero inoxidable, de 2.000 litros de capacidad, una bomba sobrepuesta aspira la salmuera a 2°C.

Maquinaria

1). Sierra para cortar el epitelio en pedacitos pequeños, esta puede ser el modelo empleado en las carnicerías para cortar los huesos y cartílagos. Esta sierra es a cuchilla en cinta y sin fin.

2). Trituracarne Berkel, con láminas superior e inferior, la superior del diámetro de 8 milímetros, la inferior con láminas de 2 milímetros.

3). Canecas especiales, en acero inoxidable para la suspensión del virus, ya sea en agua destilada o en el líquido restante de la cultura en Frenkel.

4). Recipiente en acero inoxidable y cilíndrico, provisto de potente agitador eléctrico, y situado a un metro de altura.

4). 2 centrífugas separadoras, una a cada lado del recipiente anterior, que separan el líquido de la parte sólida de epitelio.

5). 2 tanques a doble recipiente, en acero inoxidable donde va la suspensión obtenida en las centrífugas anteriores. Primer recipiente=virus, segundo=hielo.

6). Para cada tanque, una centrífuga Westfalia, K.DD.604, con orificio de salida, cada una de diámetro 3 o 2,5 cada Westfalia.

7). Tanque de salmuera, ya descrito en forma rectangular y con las conexiones necesarias, tubería.

8). 2 centrífugas KG.2006 Westfalia, tamaño medio.

9). Dispositivo de aire frío para cada centrífuga que poseen un dispositivo para poner un bloque de hielo, donde cae el extracto centrifugado anteriormente.

8). Tanque de salmuera, como el anterior, con dispositivo especial, puede utilizarse el mismo.

9). Centrífuga de tamaño grande, KG 4006, Westfalia.

10). Instalación para extractos filtrantes.

11). Pirex, para recibir el virus filtrado.

12). "Boules", provista de agitador, caldera para depositar la vacuna, doble cámara para el baño maría atenuador de la vacuna, extractos aislantes, termómetros, orificio de salida para la vacuna, motor para el agitador, caldera separada para calentar el agua, resistencias para calentar el agua, bomba aspirante y expelente para el baño maría, manómetro, surtidor de agua, salida para el agua, salida del agua de la caldera.

13). Máquinas embotelladoras.

14). Sala refrigeradora para conservar la vacuna producida.

c) Preparación del extracto de virus

El epitelio, ya sea obtenido natural o artificialmente (virus natural o de cultivo) se corta en pedacitos, con la

sierra, luego en la máquina de moler carne, vienen triturados, la primera trituración es más gruesa que la segunda.

Lavada del epitelio triturado, con agua destilada hasta obtener una mezcla de color gris rojizo.

La mezcla va directamente al recipiente provisto de 3 agitadores, donde recibe una fuerte agitación, es en esta operación donde el virus viene liberado de la célula, por la rotura de la membrana de esta, con la ayuda del agua destilada. Esta operación es muy importante. El epitelio, recibe hasta 7 lavados, ya que al ser centrifugado en la centrífuga separadora, la pasta de epitelio que queda en las paredes de la centrífuga, es de nuevo adicionada a más agua destilada, agitada y centrifugada, es de nuevo triturada en molino. El líquido así obtenido, va directamente a los tanques a doble recipiente, en el primero va hielo en pedazos y en el segundo el extracto de virus a centrifugar en la Westfalia tamaño pequeño.

La suspensión de virus fuertemente agitada, es centrifugada en centrífuga Westfalia K.DD604, orificio de diámetro 2,5 ó 3 mms. a 10.000 revoluciones por minuto.

Enfriamiento del virus a través de un tanque de salmuera helada.

Centrifugación número 2 en centrífuga Westfalia KG-2006, tamaño medio y a 8.400 revoluciones por minuto.

Nuevo enfriamiento del virus a través de la salmuera helada.

Centrifugación número 3 en Westfalia tamaño grande KG-4006.

Teniendo cuidado de no exponer el virus al medio ambiente, por medio de una instalación adecuada de tu-

bería, se hacen las conexiones convenientes para hacer pasar la solución de las centrífugas al tanque que contiene la salmuera.

Para mantener frío el virus, en el momento de entrar a la centrifugación se instalan dispositivos para colocar un bloque de hielo, sobre el cual la solución viral cae directamente.

Después de la última centrifugación el extracto pasa a un extracto filtrante clarificante EK Carlson, un extracto esterilizante EKS Seitz, un otro extracto esterilizante EKS Carlson.

La cantidad de virus filtrado, se mide en pirex, estos tienen una capacidad de 10 litros, antes de ser puestos en la boule, se toma una muestra cada 20 litros de líquido filtrado, que servirá para la desviación del complemento y diagnóstico de tipo.

En el mezclador (boule) se encuentran ya el hidróxido de aluminio y la solución tampón.

A los 15 ó 20 minutos de agitación, se agrega la solución de antibióticos.

d)—Esterilización de una "boule" o recipiente.

Es esta una operación muy delicada que requiere mucha atención, ya que el menor descuido puede causar daños irreparables en el sistema. La esterilización se hace con vapor fluente y a la presión de 0,2-0,3 at. por un tiempo de 30 minutos. El vapor entra por su respectivo conducto y sale por todas las salidas que posee la "boule" y que deben estar abiertas durante la operación. Cuando esta se ha terminado, se cierran las salidas dejando libre la salida del vapor acumulada en la caldera, esta salida se protege con

un filtro (algodón y gasa en forma de embudo) ya que al terminarse la salida del vapor, el aire exterior debe entrar a ocupar el volumen del vapor. Controlar la temperatura interna como la presión.

Antes de comenzar la esterilización el agua de la doble pared debe ser evacuada completamente.

Dejar enfriar completamente el sistema.

Lenar de agua el espacio de la doble cámara, que está listo a recibir una temperatura de 25°C.

La caldera interior que ocupará la vacuna, está provista de mezcladores y de aletas fijas que oponen resistencia al líquido agitado para que circule en diversas direcciones. El tubo por donde descenderá el extracto de virus, está situado a lo largo de la pared de la caldera y perforado especialmente, esto con el fin de que el virus se reparta igualmente en toda la masa del hidróxido-tampón.

e)—Absorción y atenuación del virus

1). El extracto de virus que ha sido preparado con la técnica descrita, puede conservarse en pirex estériles que se ponen en una sala frigorífica hasta su utilización. En caso contrario, puede pasar directamente del filtro a la "boule" donde ya se encuentra el hidróxido de aluminio y la solución tampón.

2). El hidróxido de aluminio se encuentra en canecas (de leche) que están provistas en su tapa de un dispositivo para ser accionadas con presión, éste consta de un tubo largo que llega hasta el fondo y un orificio que sirve para accionar la presión, el hi-

dróxido antes de entrar a la "boule" pasa a través de un filtro de alambre de cobre.

3). La solución tampón, sigue en orden al hidróxido y entra por presión a la "boule", ésta se conserva en pirex y es ya esterilizada.

4). La solución de formalina se prepara y se tiene lista.

5). La solución de antibióticos (neomicina) se prepara con la técnica descrita y se agregará de último.

f)—Operación Final.

Los diversos componentes vienen depositados en la caldera de la "Boule" en el siguiente orden:

- 1) Hidróxido de Aluminio.
- 2) Solución Tampón.
- 3) Poner a funcionar el motor del mezclador interno.
- 4) El extracto de virus, cae lentamente y en forma continua en la mezcla hidróxido-tampón.
- 5) Calentar el agua de la doble pared (intercapedine) a 25°C. Esta temperatura se controla durante todo el proceso de atenuación.
- 6) A los 10 o 15 minutos de haber finalizado la entrada total del Extracto de virus, se agrega la solución de formalina.
- 7) Agregar la solución de Antibióticos.
- 8) Iniciar el calentado de la vacuna que se prolonga por 44-48 horas.
- 9) Embotellamiento.
- 10) Permanencia en frigorífico durante cinco días.
- 11) Pruebas de control de la vacuna.

NOTA: La buena adsorción y la exacta atenuación del virus, dependen en gran parte de la precisión y calidad de las instalaciones, por lo tanto para producir una buena vacuna, la instalación y funcionamiento de los diversos aparatos debe ser perfecto.

Antes de dar a la venta pública la vacuna debe seguir los controles culturales, biológicos, de inocuidad y de eficacia.

g) —Control de la vacuna y del virus.

a). Muestras del virus centrifugado (centrífuga a paníere). Con estas muestras se hace la desviación del complemento, para demostrar que el virus ha pasado en suspensión.

b). Muestras del virus filtrado.

De cada diez litros de virus filtrado, se hace la desviación del complemento para demostrar la regularidad de la filtración y de la pasada del virus en el filtrado. Muestras a la $\frac{1}{2}$ de la filtración y al final para hacer las pruebas de la esterilidad.

Muestras de la mezcla de todo el virus filtrado, para hacer:

1. Desviación del complemento.
2. Pruebas culturales.
3. Determinación del título en ratones.

c). Muestras para el control de esterilidad de la mezcla que se encuentra en la boule, antes de comenzar a recibir el extracto de virus. Esta mezcla está constituida de hidróxido de aluminio y la solución tampón.

d). Muestras para el control de la esterilidad de la vacuna antes de añadirle la solución de formalina.

Muestras después de 48 horas de inactivación y al momento del embotellamiento para control de la esterilidad.

e) —Prueba de la esterilidad:

1. Del líquido entubado.
2. De las botellas y frascos.
3. De la vacuna inactivada y lista para el embotellamiento.

Pruebas de inocuidad de la vacuna producida.

Pruebas de actividad.

CONTROL DE LA ESTERILIDAD BACTERICA

De cada lote de vacuna, ya distribuida en frascos se toman cinco botellas, luego de agitarlas bien, se toma de cada una con una pipeta estéril la cantidad de vacuna necesaria para sembrar varios terrenos culturales.

La siembras se hacen así:

0,25 en 2 probetas de caldo glucosado pH = 7,6.

0,25 en 2 probetas conteniendo cada una 15 c.c. de agar glucosado ya disuelto y enfriado a 50 grados C., se agita y se vacía sobre placas de petri.

0,25 en caldo Tarozzi para anaerobios.

1 c.c. en 2 matraces conteniendo terreno líquido para investigar hongos.

Los 4 primeros terrenos vienen incubados a 37°C. por 7 días. Los matraces se tienen a temperatura ambiente por 15 días.

Resultado: La vacuna debe ser perfectamente estéril o solo contener raras colonias de gérmenes ubicuitarios.

CONTROL DE LA INOCUIDAD

1°—**Control en suinos y bovinos.** Se toman para el control 4 bovinos jóvenes (2 años) no vacunados y provenientes de zonas exentas de fiebre aftosa, se inoculan con 2 c.c. de vacuna por vía intralingual (10 puntos diversos con 0,2 c.c. C/u.

Toma diaria de temperatura y examen detenido en la boca para excluir la presencia de lesiones aftosas. Después de siete días de observación, se procede a la infección para ver si los animales son sensibles.

2°—**Control en ratones lactantes.** Con cada serie de vacuna se inoculan al menos cincuenta ratones lactantes. Cada uno recibirá 0,1 de vacuna por vía intraperitoneal. El período de observación es de ocho días.

A los muertos se les hace la desviación del complemento, sirven como antígeno, con ello se averigua la presencia del virus. Se puede inocular el curi por vía intraplantar, en ambos casos no debe presentarse actividad del virus aftoso correspondiente.

CONTROL DE LA EFICACIA

1°—En vacunas monovalentes se usan tres bovinos de los cuales dos vienen vacunados y uno queda como control.

2°—En vacunas bivalentes se usan seis bovinos de los cuales cuatro son vacunados y dos sirven como control.

Estos animales, se tienen separados por espacio de seis semanas, con toma de temperatura diariamente y examen clínico general. Después de tres semanas vienen infectados y puestos

en el establo de infección, ésta se hace por vía intralingual.

Al tratarse de vacunas vi-valentes: 2 vacunados y 1 de control vienen infectados con 1 de 2 virus y los otros con otro virus.

La vacuna se considera eficaz cuando:

1°—No se tienen aftas primarias ni secundarias.

2°—Cuando solo se obtiene una afta aparente sobre la lengua, o no se obtiene una elevación térmica más alta de 1°C. La observación viene hecha por quince días.

Registrar la temperatura a mañana y tarde.

Medio Sabouraud

Agua destilada.	1.000 c. c.
Peptona.	10 grms.
Glucosa.	20 grms.

pH = 5, 6-5,7 (sin ninguna adición).

Disolver en caliente, filtrar, distribuir y esterilizar a 120° por 20'.

Disolver por ebullición la peptona luego añadir la glucosa y filtrar a través de papel de filtro, distribuir y esterilizar a 120° por 25'.

Medio líquido al Tioglicolato.

(Ver preparación en hoja aparte)

Avar simple portado al estado líquido por temperatura.

Ejecución de las pruebas de control

Muestra tomada de la mezcla de: Hidróxido de Aluminio, y Solución Tampón. 1) **Se siembra en medio Sabu-**

raud. 0,25 c.c. de la muestra, ésta se deja al medio ambiente por espacio de cinco días. Examinar bien el medio y ver si hay presencia de hongos.

2). En una probeta conteniendo terreno al Tioglicolato, sembrar estérilmente 0,25 c.c. de la muestra en examen.

Medio líquido al Tioglicolato

Cisteína (disolver en agua)	0,75 gms.
Agar granulado (costantino)	0,75 gms.
Cloruro de Sodio	2,50 gms.
Dextrosa	5,50 gms.
Extracto de levadura de cerveza seco.	5,00 gms.
Digerido pancreático de caseína ó peptona Costantino Caseína.	15 gms.
Tioglicolato sódico 0,5 ó ácido tioglicólico	0,3 c.c.
Solución de Resasurina Sódica 1% o preparada.	1 c.c.
Agua destilada.	1.000 c.c.

Preparación. Mezclar todo con los 1.000 c.c. de agua bidestilada, calentar hasta completa solución (hervir por diez minutos para disolver el agar).

Disolver el tioglicolato de sodio ó el ácido tioglicólico en la solución y si es necesario, ajustar el pH con NaOH (solución normal) 10 ó 15 c.c. de manera que el pH final después de esterilizar sea de un pH = 7,10. Si es necesario, ajustar el pH final al mismo anterior.

Para el control de la vacuna Antiftosa, se siembra en este medio 0,25 ya sea de la mezcla Hidróxido-Tampón, o del producto terminado. Con esta prueba se pondrá en evidencia los aerobios y anaerobios. Llevar a la estufa a 37°C. por espacio de cinco días.

En agar fundido, depositar 0,25 de la muestra en examen, llevar el agar a la estufa a 37°C. por cinco días, sirve esta prueba como adyuvante de las anteriores y obtener colonias para diagnosticar la morfología de estas y hacer coloraciones si el caso lo requiere. Debe ser perfectamente limpia al cabo de cinco días si se trata de una vacuna en buenas condiciones.

Con la prueba en terreno al Tioglicolato se investigan la presencia de gérmenes anaerobios y aerobios.

Hacer los mismos exámenes con las siguientes muestras:

1. Muestra para el control de esterilidad de la vacuna antes de agregarle la solución de formalina.

2. Muestras para el control de esterilidad después de agregar la solución de formalina y 48 horas de inactivación.

3. Muestra del líquido entubado.

4. Muestra de las botellas.

Universidad Nacional
 Departamento de Bibliotecas
 Tercera parte
 BIBLIOTECA CENTRAL
 Sección de Publicaciones
 Desviación del Complemento en la
 Aftosa.
 Bogotá, D. E.

- envío de cepas del campo al laboratorio;
- preparación del suero hiperinmune y titulación;
- reacción de la desviación;
- preparación del sistema hemolítico;
- preparación del complemento;
- tipificación del Virus aftoso;
- Suero-neutralización en la aftosa.

(TERCERA PARTE)

DESVIACION DEL COMPLEMENTO EN LA AFTOSA

a) **Envío de 'Cepas' del campo, al Laboratorio para su identificación.**

Cada cepa que viene enviada al Laboratorio para la determinación, debe ser acompañada de un conjunto de informaciones que pueden servir como auxiliares al examen de la cepa en sí o en las sucesivas preparaciones de vacunas eficaces.

Esto no se ha hecho regularmente y con la actual organización, es más difícil de introducirla como cosa sistemática.

De tal manera se piensa (Dr. Bastoni) que cada muestra enviada a un Laboratorio para su identificación debe ser acompañada del siguiente formulario completamente elaborado.

Veterinario
 Depto... Municipio... Hacienda...
 Propietario
 Fecha del diagnóstico del afta.....
 Fecha de la vacunación
 Nro. de Serie de la vacuna
 Tipo..... Aparición de los primeros síntomas (fecha).....

Efectivo en el momento del diagnóstico.

Bovinos..... Toretes... Terneros....
 Cerdos..... Ovejas.... Cabras.....

Animales vacunados (repetir la especie)
 Gravedad de la enfermedad clasificándola por: ligera, media, grave, o por su localización: boca, pezuña, glándula mamaria.

Pérdidas registradas
 Disminución de la producción de leche
 Reconocimiento de animales vacunados, por el quiste formado por la vacunación anterior que se ha roto....
 La vacuna era congelada al momento del uso
 Observación particular

Técnica:

0,25 c.c. de suero positivo 0—A—C
 0,25 c.c. de antígeno (epitelio lingual triturado).

0,25 c.c. Complemento.

Agitar, dejar por 30 minutos a 37 grados C. (baño María).

0,5 c.c. de Sistema Hemolítico. (glóbulos rojos y suero hemolítico).

Agitar. Dejar reposar por 30 minutos a 37 grados C. (baño María).

Si hay hemólisis, no se tratará del tipo del afta en causa.

Antígeno. Triturar un gramo de epitelio con arena de cuarzo.

Agregar: Si virus natural 2,5 c.c. de sol. fis. fosfática. Si en vez, se trata de virus de producción, agregarle 5 c.c. de sol. fis. fosfática.

Estas suspensiones se ponen en probetas y se conservan a más 2, más 5 grados, en frigorífico y de un mínimo de dos horas a un máximo de 24 horas.

Centrifugar por diez minutos a 2.500 r.p.m.

Verter el líquido sobrenadante limpio en probetas, e inactivar por 30 minutos a 60 grad. C.

En el bovino, se prefiere como antígeno el epitelio lingual y en orden decreciente la linfa, el epitelio gingival,

etc., etc. Del epitelio lingual usar de preferencia la porción situada sobre la lengua. En el cerdo, utilizar el afta del hocico y de las pezuñas, estas últimas bien lavadas.

La cantidad mínima de antígeno natural es de 0,5 gms. adicionado de 1, 2-5 de sol. fis. fosfática.

Cuando el antígeno natural viene enviado en glicerina, lavarlo bien con agua pura o solución fisiológica repetidamente. El antígeno natural debe ser conservado en glicerina y solución fisiológica (partes iguales) a fin que el virus no se diluya mucho, es conveniente conservarlo con poco líquido. La glicerina tiene acción bacteriostática.

Para el virus natural, la desviación del complemento se hace a las diluciones de 1:3,5 1:7 y 1:14 de solución fosfática.

b) — Técnica de preparación de un suero hiperinmune para la desviación del complemento y titulación.

1. Inyectar por inoculación en el dérmis plantar, con buena técnica, un grupo de cobayos con el siguiente antígeno centrifugado por largo tiempo:

- Epitelio lingual de bovino af-
toso 1 parte
- Solución fisiológica Tampón
- Fosfática 5-10 c. c.

2. Si las aftas no se desarrollan bien en 24 o 48 horas, o no hay generalización al primer pase, se procede a dos o más pases en serie hasta obtener un virus bien adaptado al cobayo. El número de pases en serie debe ser limitado estrechamente, para no caer en posibles modificaciones del carácter bovino del antígeno.

3. Los epitelios plantares, recogidos, de los cobayos que han generalizado, sirven para la preparación del antígeno, para infectar un grupo de cobayos, productores de suero. El antígeno se prepara como sigue:

- Epitelio plantar de cobayo. . . 1 parte
- Sol. Fis. Tampón Fosfático. . 10 c. c.

Después de una larga centrifugación, el antígeno se inyecta en el dérmis plantar de los dos pies de cada uno de los cobayos del grupo.

4. Después de 24-48 horas, con las aftas bien desarrolladas pero no abiertas, se desprenden cuidadosamente los epitelios plantares, que se conservan en congelador. Hacerlo separadamente cobayo por cobayo, en pequeñas probetas estériles, marcando bien el número del cobayo al cual pertenece el epitelio.

5. Después de un mes de la infección, cuando los cobayos son curados perfectamente de la infección, se procede a la hiperinmunización, inoculando a cada una en la vena safena, el extracto de los dos epitelios correspondientes que el mes anterior se habían recolectado y que se han conservado en la nevera.

El antígeno se prepara como sigue:

- Dos epitelios correspondien-
tes a cada cobayo. 0,2 grms.
- Sol. Fisiológica, Tampón fos-
fática 1 c. c.

Reducir a una papilla homogénea en un mortero, centrifugar largamente, después inocular lentamente en la vena safena u otra vena superficial, previa incisión de la piel, cerrar la herida con un agrafe; usar jeringas y agujas desinfectadas para cada cobayo.

6. Después de ocho a diez días, sangrar totalmente el cobayo y recolectar el suero de cada una, en placas de petri y por separado.

7. El suero de cada cobayo se filtra por separado, a través de filtros esterilizantes de 2 cms. de diámetro. Con el filtrado se llena una ampolla de 1 c.c. y el resto se pone en otra ampolla de 5 a 10 c.c., conservar en una nevera después de inactivar a 60 grados al baño maría por 30 minutos.

8. El suero contenido en la ampolla de 1 c.c. sirve para hacer la titulación de cada suero por separado.

9. Descartar los sueros de los cobayos que no den un título satisfactorio, o que por tener un título muy alto, no tienen especificidad de tipo.

10. De los sueros restantes, se hacen uno o dos grupos, (título bajo y título alto) y se mezclan grupo por grupo. Se ponen en ampollas de 1 c.c., se inactivan de nuevo (baño maría a 60 grad. por 30 minutos). Titular las diversas mezclas y conservar al frigorífico para su uso corriente. Pueden durar hasta diez años.

Cómo obtener un suero antiaftoso trivalente de alto título.

(Congreso Veterinario, Londres, 1949)

Si se deja correr un lapso de tiempo (5-6-8 meses) o un año, entre la infección aftosa natural, o experimental de un bovino, que se incula después en dosis masiva con el mismo virus, este bovino reacciona dando un suero de cinco a diez veces más rico en cuerpos específicos que el suero del animal convalesciente, o hiperinmunizado con la técnica hasta ahora conocida.

Bovinos que han superado el afta de los tres tipos (natural o experimental) son dejados en buenas condiciones durante 5-8 meses. Son inoculados después con una dosis masiva por vía endovenosa, con los tres tipos de virus, obteniendo así aftas bucales.

A los diez días son sangrados totalmente, la sangre es defibrinada, centrifugada y filtrada a través de Seitz.

Se mezclan las cantidades de 500-600 litros para tener siempre un título óptimo y uniforme.

Titulación de un suero hiperinmune

Conociendo el tipo y la variante de suero producido en curies, se hace la titulación de cada uno por separado.

Preparación de los antígenos—Tome un gramo de epitelio tipificado y con la ayuda de 6 c.c. de sol. fis. se tritura en un mortero, con la ayuda de arena de cuarzo, centrifugarlo, tomar el líquido sobrenadante y llevarlo al baño maría a 60 grados por 30 minutos para su inactivación del poder anticomplementario, efectuar de nuevo su tipificación para estar seguro de que es el tipo deseado.

c)—Reacción de Desviación.

- | | |
|---|------|
| 1. Sueros de titular a la dilución deseada.. | 0.25 |
| 2. Antígeno 1:6 | 0.25 |
| 3. Complemento liofilizado. . . | 3 % |
| 4. Baño María a 37°, 30'.. . . | — |
| 5. Sistema hemolítico (glóbulos rojos 0,25 más suero hemolítico 0,25).. | 0.50 |
| 6. Baño María a 37° por 30'. | — |

lución de cloruro de sodio al 15% de manera de reemplazar por esta inactivación química, la termo-inactivación, cuya acción complica la fijación del complemento. Los bovinos excéntricos de infección aftosa anterior o actual, se inyectan tres veces intravenosamente la dosis son 1 gramo, 3 gramos y cinco gramos de virus. El suero anti-0 así obtenido 1/60 de título, el anti-A 1/80 y el anti-C 1/70. El método es muy cómodo y económico que el que se hace hiperinmunizando curries, los títulos son comparables y los resultados aceptables.

Este método de fijación del complemento en presencia de cloruro de sodio permite el estudio de la inmunidad humoral anti-aftosa en los bovinos, la detección de tipos de virus incluidos en vacunas utilizadas y el diagnóstico retrospectivo de la enfermedad.

(Atti, Soc. ital Sci veter, 1951 t. 5 pág. 417-419. Ver también Clín. Vet. 1951, pág. 353).

Titulación de un suero desviante

Antígeno 0	(1:6)	1 gramo de	
Antígeno A	(1:6)	1 gramo de	
Antígeno C	(1:6)	1 gramo de	
antígeno	5 c.c.	Sol.	Fis.
antígeno	5 c.c.	Sol.	Fis.
antígeno	5 c.c.	Sol.	Fis.

Diluciones del suero: 1:10 1:15 1:20
1:25, 1:30, 1:35.

Efectuar la desviación del complemento, clasificar con + + + + una desviación completa, con + + + + + la desviación incompleta. Se considera como título máximo, la dilución mayor que aún ha mostrado una desviación completa (+ + + +). Alistar para cada suero tantas series de probetas cuantas sean las diluciones a examinar.

Los varios componentes van usados a la misma dosis y en la misma modalidad descrita para la desviación del complemento.

Soluciones:

1 c.c. de suero +	9 c.c.	(NaCl)	=	1:10
1 c.c. sol 1:10 +	5 c.c.	(NaCl)	=	1:15
1 c.c. sol 1:10 +	1 c.c.	(NaCl)	=	1:20
1 c.c. sol 1:10 +	1,5 c.c.	(NaCl)	=	1:25
1 c.c. sol 1:10 +	2 c.c.	(NaCl)	=	1:30
1 c.c. sol 1:10 +	2,5 c.c.	(NaCl)	=	1:35

Para reducir la cantidad de suero se opera así:

0,5 (suero en examen) +	4,5	c. c.	(NaCl)	+	1:10
0,5 (solución 1:10) +	0,25	c. c.	(NaCl)	+	1:15
0,5 (' ' ') +	0,5	c. c.	(NaCl)	+	1:20
0,5 (' ' ') +	0,75	c. c.	(NaCl)	+	1:25
0,5 (' ' ') +	1	c. c.	(NaCl)	+	1:30
0,5 (' ' ') +	1,25	c. c.	(NaCl)	+	1:35

Se usa el suero fresco de cobayo macho en ayunas (se presenta aún en la sangre de todos los animales). El complemento viene conservando en frigorífico (su poder complementario se disminuye). La titulación del complemento es hecha en el día de la experiencia, que vale decir, antes de usarlo).

Como el antígeno del afta, tiene un poder anticomplementario, se hace necesario hacer la titulación del complemento en presencia del antígeno. En el Instituto Zooprofiláctico de Brescia, se usa el complemento al 33% que se encuentra liofilizado (3 c.c. de complemento 90 c.c. de sol. fisiológica).

El complemento se encuentra liofilizado a veces en ampollas de 3 c.c.

(Técnica Sierológica, Instituto Sieroterápico Milanese, Pág. 97).

El complemento se puede conservar por el método de Witte:

Acido bórico... 2 gms.
Sulf. potásico... 5 gms.
Agua destilada 50 c. c.

Mezclar a partes iguales con suero fresco de curí, manteniéndolo en nevera, así el complemento se mantiene activo por varios meses.

(Segre, Clínica Veterinaria, 1947-132).

Para la titulación del complemento en presencia del antígeno se alistan diversas diluciones del complemento partiendo de la dilución que representa el título del complemento conocido.

Si en todas las probetas hay hemólisis, el antígeno no tiene propiedades anticomplementarias, si en vez la hemólisis completa, solo aparece en las probetas sucesivas, significa que el an-

Probetas	Compl.	Glob. Roj. 5%	Suero H	Sol.	Fis.
1	0,2	1 c.c.	1 c. c.	0,8	c. c.
2	0,1	1 c.c.	1 c. c.	0,9	c. c.
3	0,05	1 c.c.	1 c. c.	0,95	c. c.
4	0,03	1 c.c.	1 c. c.	0,97	c. c.
5	0,01	1 c.c.	1 c. c.	0,99	c. c.
6	—	1 c.c.	1 c. c.	1	c. c.

Probetas	Antigen. Exámen	Complemento	Sistema H
1	0,25	0,25 - 1 %	0,5
2	0,25	0,25 - 1,5%	0,5
3	0,25	0,25 - 2 %	0,5
4	0,25	0,25 - 2,5%	0,5
5	0,25	0,25 - 3 %	0,5
6	0,25	0,25 - 3,5%	0,5

Baño María
37 grad. 30'

Baño María
37 grad. 30'

tígeno tiene propiedades anticomplementarias y no se puede usar.

Glóbulos Rojos

Se usan glóbulos rojos de carnero. Si se tienen los sueros hemolíticos, se pueden usar los Glóbulos Rojos de otro animal.

50 c.c. de sangre defibrinada de carnero, (agitar el recipiente provisto de perlas de vidrio), 15 a 20' agregar 50 c.c. de agua destilada, y centrifugar por veinte minutos. Repetir la lavada hasta que el líquido sobrenadante sea límpido (2 o 3 lavadas). La velocidad de centrifugación no debe ser muy elevada para no romper los glóbulos rojos. Decantando el líquido sobrenadante, los glóbulos rojos se pueden conservar por una semana a 2, 5 grados C. (Nevera).

Al momento del uso diluir 2,3 c.c. de suspensión de glóbulos rojos con 150 c.c. de solución fisiológica, agregar 1,75 c.c. de suero hemolítico (el suero hemolítico resulta de la dilución de 1 c.c. de suero h. inactivado (título 1:5.000 con 19 c.c. de sol. fis.).

Suero Hemolítico

Como animal productor de suero hemolítico se usa el conejo. Su inmunización se hace inyectando en el peritoneo y a intervalos de 5 a 6 días, por 3 a 4 veces, dosis ascendentes (hasta 20 c.c.) de glóbulos rojos lavados del animal de cuya especie se quiere obtener el suero hemolítico correspondiente.

Después de cinco días de la 3ª ó 4ª inyección, se hace una sangría de prueba y se titula el suero (título hemolítico). Si se ve que el título es de un alto grado, se sangra totalmente el animal y se recoge el suero en ampollas de 1 c.c.

El suero hemolítico así obtenido, se titula de nuevo, pero antes es necesario inactivarlo para liberarlo de su complemento, la inactivación se hace a sesenta grados por treinta minutos.

Para la desviación del complemento es necesario que la concentración del suero hemolítico sea de 2-3-4 unidades hemolíticas superiores a la concentración necesaria para obtener la completa hemólisis de los glóbulos ro-

Titulación del Suero Hemolítico

Probetas	Suero	Hemol.	Glob. rojos	Complemento
1	1 c. c.	(1: 100)	1 c. c.	0,1 c. c.
2	1 c. c.	(1: 200)	1 c. c.	0,1 c. c.
3	1 c. c.	(1: 300)	1 c. c.	0,1 c. c.
4	1 c. c.	(1: 400)	1 c. c.	0,1 c. c.
5	1 c. c.	(1: 800)	1 c. c.	0,1 c. c.
6	1 c. c.	(1: 1.600)	1 c. c.	0,1 c. c.
7	1 c. c.	(1: 3.200)	1 c. c.	0,1 c. c.
8	1 c. c.	(1: 6.400)	1 c. c.	0,1 c. c.

Baño María a 37 grad. por 30'.

jos. Suero hemolítico 1:5.000 - 1:3.000. En este caso, se diluye 1 c.c. de suero en 5 litros —3 litros de solución fisiológica.

1 c.c. de solución es necesaria para dar una completa hemólisis de 1 c.c. de suspensión de glóbulos rojos al 5%. Esta cantidad viene llamada **Unidad Standard**. Para la desviación del complemento es necesario, que el suero hemolítico tenga un título superior a 1:1.000. El suero hemolítico viene diluido en solución fisiológica estéril, esta solución se puede conservar en la nevera, por espacio casi de un mes.

El valor hemolítico de un suero en examen resulta correspondiente a aquella dilución máxima que ha mostrado una hemólisis completa.

Diagnóstico de una variante.

Lo primero que se hace con un antígeno desconocido es averiguar a qué clase de tipo pertenece, haciendo la desviación con los sueros específicos O-A y C. Encontrando el tipo a que pertenece, se continúan las pruebas para averiguar su variante.

Ejemplo: Si admitimos que el tipo encontrado es el O, se procederá así:

1. Antígeno seguramente O₁ más diluciones escalonadas de suero O¹ = 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80.

2. Antígeno seguramente O₁ más diluciones escalonadas de suero O² = 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80.

3. Antígeno seguramente O₂ más diluciones escalonadas de suero O₁ = 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80.

4. Antígeno seguramente O₂ más diluciones escalonadas de un suero O₂ = 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80.

5. Antígeno en examen, más diluciones escalonadas de suero O₁ = 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80.

6. Antígeno en examen, más diluciones escalonadas de un suero O² = 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80.

Si al hacer la desviación se obtienen los siguientes resultados:

Nº 1.....	título 1:60
Nº 2.....	'' 1:20
Nº 3.....	'' 1:20
Nº 4.....	'' 1:60
Nº 5.....	'' 1:20
Nº 6.....	'' 1:60

Esto nos dice que el antígeno en examen corresponde a la variante O².

NOTA: Se puede diluir el antígeno pero los resultados son menos evidentes, ya que la hemólisis se presenta a títulos más bajos.

Cuando los antígenos en examen son viejos o mal conservados, es necesario activarlos, pasándolos por bovinos.

El título de los sueros debe ser de 1:80 o más, sólo así se obtendrá un resultado satisfactorio.

e)—Preparación del complemento.

El complemento es el suero de cobayo centrifugado, que se puede conservar por medio de la congelación o la liofilización.

La sangría se hace, decapitando 5 o más cobayos (sección de carótidas y yugulares), la sangre se recibe individualmente en una placa de Petri, donde se deja coagular al medio ambiente, luego el coágulo, se corta en forma cuadrangular como muestra la figura número uno, utilizando para ello, un instrumento cortante (nava-

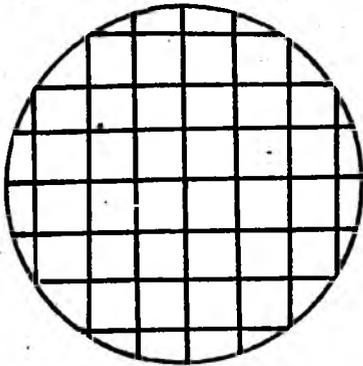


FIGURA No. 1

ja o cuchillo). Se llevan las placas a la estufa a 37° por 20 minutos, de aquí se pasan a la nevera donde per-

manecen por espacio de veinte minutos.

Se reúne el suero de las placas preparadas, aspirándolo con una pipeta Pasteur.

Centrifugarlo, por espacio de 30 minutos a 3.000 rev./m. El suero así obtenido, se distribuye en ampollas de 1 c.c. que se conservan en congelador.

Pueden ser liofilizadas, en este caso, se conservan en congelador y para utilizarlo, se restituye a su volumen normal.

Generalmente se usa a la solución 1:30 = 1 c.c. de complemento puro en 29 c.c. de Sol. fisiológica.

Dilución del Complemento al 3,3% para reducirlo a las siguientes diluciones:

Nuevo título	Compl. 3,3%	Complemento	Nuevo Compl.
3,20	10 c. c.	0,37	10,37
3,10	10 c. c.	0,62	10,62
3,00	10 c. c.	1,00	11,00
2,90	10 c. c.	1,40	11,40
2,80	10 c. c.	1,80	11,80
2,75	10 c. c.	2,00	12,00
2,70	10 c. c.	2,20	12,20
2,60	10 c. c.	2,70	12,70
2,50	10 c. c.	3,20	13,20
2,40	5 c. c.	1,90	6,70
2,25	5 c. c.	2,32	7,32
2,15	5 c. c.	2,70	7,70
2,00	5 c. c.	3,25	8,25
1,90	5 c. c.	3,70	8,70
1,80	5 c. c.	4,20	9,20
1,70	5 c. c.	4,70	9,70
1,60	5 c. c.	5,30	10,30

d)—**Preparación del Sistema Hemolítico para la desviación del complemento en la F. Afíosa.**

(Instituto Zooprofiláctico Sp. Brescia Italia).

Para la preparación de este sistema se hace necesario disponer:

- 1) Suero hemolítico titulado.
- 2) Glóbulos rojos de oveja o carnero lavados.
- 3) Solución fisiológica. (Sol. fis.).

En cuanto al suero hemolítico; es necesario fijar el Nro. de unidades a usar y que generalmente es de 4.

Para obtenerlas, se concentra cuatro veces el suero, así: si disponemos de un suero de un título a 1:5000, las cuatro unidades vendrán representadas por el mismo suero a un título 1:1250.

Glóbulos Rojos.

Se hace una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 4% = 4 c.c. de glóbulos rojos más 96 c.c. de solución fisiológica.

Como el sistema hemolítico debe contener igual cantidad de suero hemolítico y solución de glóbulos rojos, se deben determinar las cantidades de cada uno, manteniendo tanto el suero como los glóbulos rojos al mismo título de dilución.

Ejemplo: Para preparar 150 c.c. de un Sistema Hemolítico disponiendo de un suero a título 1:5000 y glóbulos rojos al 4%, para usar en la prueba final 4 unidades. **Operación.**

4 unidades de suero hemolítico al 1:5000 = 1:1250, 1 c.c. de suero puro más 1.249 c.c. de (NaCl).

0,5 c.c. en 625 c.c. de (NaCl).

0,125 c.c. en 156 c.c. de (NaCl).

Ya que es difícil medir 0,125 c.c. en una pipeta, se diluirá primero el suero a 1:10 y se toman de estos 1,25 c.c.

Glóbulos Rojos.

4 c.c. de g. rojos en 100 c.c. de sol. fis.
 3 c.c. de g. rojos en 75 c.c. de sol. fis.
 2 c.c. de g. rojos en 50 c.c. de sol. fis.
 1 c.c. de g. rojos en 25 c.c. de sol. fis.

La cantidad de 150 c.c. de Sistema Hemolítico debe contener:

75 c.c. de sol. fis. para el suero.
 75 c.c. de sol. fis. para los g. rojos que da un total de 150 c.c. de sol. fis.
 3 c.c. de glóbulos rojos al 4%.

1,25 c.c. de suero hemolítico al 1:20.

La concentración final de los glóbulos rojos es el 2%, ya que al mezclarse con igual cantidad de suero, su concentración inicial del 4% se transforma automáticamente al 2%.

f)—**Tipificación del virus afíoso.**

Antígeno — La muestra que llega al Laboratorio, enviada por un Veterinario, que se supone bien conservada y en la cantidad suficiente para ser examinada, viene liberada de su líquido conservante (glicerina, etc.), y lavada con agua corriente.

Pesar dos gramos.

En un mortero estéril, se tritura el epitelio que ha estado finamente picado con unas tijeras, para facilitar su maceración, se le agrega un poco de arena de cuarzo y 5 c.c. de m/180 (ver fórmula), si esta solución no está a la mano reemplazarla por agua destilada.

El total de la suspensión se pone en una probeta de centrífuga y se lleva a centrifugar por 15 minutos y a 2.500 revoluciones por minuto.

Tomar el líquido sobrenadante, inactivarlo por espacio de 30 minutos a 56 ó 60°C., con el fin de destruir su poder anti-complementario.

Para el virus natural, se hacen las siguientes diluciones del antígeno: 1:3,5, 1:7 y 1:14.

1 c.c. (antígeno puro) más 2,5 (fosf.) = 1:3,5.

1 c.c. (antígeno 1:3,5) más 1 (fosf.) = 1:7.

1 c.c. (antígeno 1:7) más 1 (fosf.) = 1:14.

Suero desviante — Preparado en curries, adultos y robustos, de peso 350 a 500 gramos. (ver técnica de preparación y titulación).

Complemento — Suero fresco de curí macho en ayunas. Titular el complemento antes de usarlo.

Glóbulos rojos — Se usan los de ovejito conservados en solución de Alsever y bien lavados.

Suero hemolítico — Se usa el preparado en conejos, y titulado antes de usarlo, e inactivado.

Preparación del sistema hemolítico. Glóbulos Rojos lavados al 2%. Suero hemolítico al 1:1.250 que se prepara así:

Si el suero es de título 1:5.000, a 1 c.c., se le agregan 90 c.c. de (NaCl) = 1:10.

1 c.c. (1:10) más 124 (NaCl) = 1:1250.

0,1 c.c. de suero titulado más 1,9 (NaCl) = 1:20.

1 c.c. de 1:20 más 15 c.c. de glóbulos rojos al 2%.

Reacción:

Antígeno diluido: 1:3,5, 1:7, 1:14 = 0,25.

Suero desviante: 0,25 en cada probeta de los sueros titulados (1:25) 0,08, A₇, C. Para cada dilución del antígeno 4 probetas.

Complemento al 0,33% = 0,25 c.c. Baño María a 37°, 30 minutos.

Sistema hemolítico = 0,50.

Baño María a 37°, 30 minutos.

Lectura — La probeta que presenta una desviación completa, representará según el tipo del suero desviante inmerso, el tipo de virus del epitelio del bovino enfermo.

g) — Sueroneutralización - (Aftosa)

a) **Dilución del suero.** Con este método se ve cual es la más alta dilución a la cual el suero es capaz de neutralizar el virus.

1) Diluciones del suero en examen 1:4, 1:8, 1:256. En cada dilución cambiar las pipetas y agitar por lo menos cuarenta segundos.

Si se usa suero de cobayos vacunados, éstos deben ser vacunados por lo menos treinta días.

2) Alistar una serie de probetas y en cada probeta poner 1 c.c. de la solución (ya indicada). No cambiar la probeta pero comenzar a medir de la dilución más alta.

3) Al tiempo, diluir 1:20 el suero normal de cobayo y distribuir 1 c.c. de tal dilución en una serie de probetas.

4) Extraer el virus en el siguiente modo: a 3 gramos de epitelio en procedencia, titulado y triturado, añadir 30 c.c. de M/180 (diluir al 1:10) y el conjunto, después de centrifugar, viene filtrado a la presión de 0,1, 0,2, al filtrado se hacen pasar de nuevo otros 30 c.c. de M/180. Se preparan las siguientes diluciones: 1:500. 1:50.000.000.

15 c.c. M/180 más 10 c.c. virus al 1:20 = 1:50.

30 c.c. M/180 más 20 c.c. virus al 1:20 = 1:50.

18 c.c. M/180 más 2 c.c. virus al 1:50 = 1:500.

18 c.c. M/180 más 2 c.c. virus al 1:500 = 1:5.000.

Agitar bien y cambiar pipeta cada vez.

5) Poner 1 c.c. de la dilución del virus en la probeta en la cual ha estado puesto 1 c.c. de suero normal de cobayo 1:20, quedando el virus diluido como sigue:

10⁻¹, 10⁻²... 10⁻⁶. O sea para obtener la titulación del virus en presencia de suero normal de cobayo.

6) El virus a emplear en la sueroneutralización y para operar con mayor seguridad, no debe ser usado al título determinado al momento de la producción, pero al título que descienda dé al menos una potencia, así, si al momento de la recolección el virus tenía el título de 10⁻⁶, vendrá usado a 10⁻⁵.

El título viene disminuído de una potencia para controlar la eventual baja del título que se puede verificar durante la conservación en congelador o por otra causa.

7) Poner 1 c.c. de tal dilución de virus en la probeta ya conteniendo el suero diluído. (El título del virus será así doblado ²).

La mezcla se hace dejando caer el virus en el suero y agitando suavemente sin hacer espuma y sin pipetear.

8) Dejar esta mezcla a temperatura ambiente y por una hora, al cabo de este tiempo, la mezcla va puesta en hielo.

El control de la sueroneutralización puede ser hecho ya sea con las pruebas biológicas (ratones) o con la placa plástica.

Para la prueba en ratones, se inocula una familia por dilución y 0,1 para cada ratón, partiendo de la concentración mayor, ya que siendo mayor la cantidad de suero debe ser menor la cantidad de virus.

Dilución del antígeno de cultivo y del líquido sobrenadante, para titular su poder desviante.

	DILUSIONES ANTIGENO				DILUSION SOBRENADATE		
	Antig. 1:6	Sol. fis.	Sol. final	Sobre. nad.	Sol. fis.	Dil. fin.	
1	puro	—	1:6	puro	—	1:1	siero O
2	puro	—	1:6	puro	—	1:1	siero A
3	puro	—	1:6	puro	—	1:1	siero C
4	0,75	0,25	1:8	0,75	0,25	1:1,33	Suero de la cepa sembrada.
5	0,75	0,50	1:10	0,75	0,50	1:1,66	
6	0,50	0,50	1:12	0,50	0,50	1:2	
7	0,50	0,75	1:15	0,50	0,75	1:2,5	
8	0,50	1	1:18	0,50	1	1:3	
9	0,50	1,50	1:24	0,50	1,50	1:4	
10	0,25	1	1:30	0,25	1	1:5	
11	0,25	1,25	1:36	0,25	1,25	1:6	

Complemento: 2,64% igual a 0,20 c.c. del complemento liofilizado al 3,3%.