



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ADAPTACION DEL VIRUS IBD PATOGENO DEL POLLO A LOS DIFERENTES TEJIDOS DEL EMBRION PARA USARSE EN EL PROTO- COLO DE PRODUCCION

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO BIOLOGO
P R E S E N T A
Elba Leticia Pérez Luque
QUERETARO, QRO. 1977

No. Reg. H53620

TS

Clas. 636.511

P438a

I N D I C E

	Pág.
Introducción	1
Capítulo I	
Propiedades del virus	2
Aspectos Generales de la multiplicación de los virus . . .	3
Alteraciones bioquímicas inducidas en las células in- fectadas por virus	6
Metabolismo enzimático de las células infectadas por virus	7
Factores que influyen en la multiplicación del virus . . .	9
Interferencia vírica	10
Alteraciones en la estructura celular y muerte de las células	11
Capítulo II	
Generalidades Clínicas de la Enfermedad de Bursitis . . .	13
Detección en el material biológico	13
Cultivo Preferente de Sustratos	14
Identificación Serológica	15
Diagnóstico Diferencial	16
Profilaxis	16
Condiciones para la multiplicación del virus en em- brión de pollo	17
Técnicas de Inoculación	18
Lesiones y modificaciones producidas por el creci- miento del virus	20
CAPITULO III	
Método Experimental para la Adaptación	23
Material	23
Procedimiento	23
CAPITULO IV	
Conclusiones y Resultados	27

Conclusiones y Resultados	31
Bibliografía	34

I N T R O D U C C I O N

Emplearé el término "Adaptación" para referirme al proceso que sufre un virus patógeno aislado del pollo al cultivarse en los diferentes órganos de un embrión, facilitando así la direrencia entre las características específicas de un embrión infectado con virus infeccioso de la enfermedad de Bursitis, en contraste con un embrión testigo normal.

Esta adaptación implica una serie de pases ya que algunos virus no producen lesiones en un primer pase, de esta forma deberán hacerse varios pases "Ciegos" para conseguir adaptación en el embrión.

El pase "Ciego" se efectúa cultivando en virus en embrión de pollo y cosechando sin tomar en consideración ningún signo característico de infección provocado por dicho virus. Así la inoculación de productos provenientes de embriones de un primer pase no matan al segundo pase. De esta manera logró la adaptación de un virus de pollo a embrión, que analizaré en el presente trabajo.

C A P I T U L O I

PROPIEDADES DEL VIRUS.

1.- El virus de la enfermedad infecciosa de Bursitis IBDV tiene un tamaño de partícula de 60 milimicras, es resistente al eter y al cloroformo y termoestable, sobrevive por 5 horas a 56° C.

Hay estudios que indican que el virus de IBD es un REOVIRUS, mientras que otros señalan que ocupa una posición taxónomica no determinada.

Su clasificación no es aún precisa debido a que sus propiedades Biológicas y Fisicoquímicas se están estudiando.

Basándonos en los estudios que afirman que el virus IBD es un REOVIRUS, partiré para hacer una ligera descripción de éstos, ya que es muy escasa la información que existe de ellos.

Los REOVIRUS (respiratory-enteric-orphon) constituye un grupo que se halla compuesto por un doble cordón de ARN.

La propiedad de resistencia al eter indujo su inclusión en los enterovirus, cuando se descubrieron en un principio. Los reovirus son así mismo resistentes a la acción del desoxicolato sódico y a un pH de 3.

Varias cepas de reovirus pueden cultivarse en membrana ríolantoidea formando lesiones pústulosas. Estos poseen un antígeno fijador del complemento.

Entre los hospedadores de los que se han aislado se hallan, el hombre, mono, chimpancé, bovinos, perros, ratones y gallinas.

El lugar de síntesis del reovirus es en el citoplasma, al igual que su maduración; poseen simetría cúbica con 92 capsómeros y no presentan cubierta.

II.- ASPECTOS GENERALES DE LA MULTIPLICACION DE LOS VIRUS.

Para que se produzca una multiplicación, así como una infección eficaz por un virus debe tener lugar una serie de acontecimientos que están íntimamente relacionados con las funciones celulares y son las siguientes:

- 1).- Fijación del virus.
- 2).- Penetración y liberación del ácido nucleico.
- 3).- Replicación del ácido nucleico, y codificación de los productos específicos del virus.
- 4).- Unión y maduración de las partículas víricas.
- 5).- Liberación del virus.

1).- La fijación de las partículas víricas a las células es inicialmente un fenómeno electrostático, como se pone en evidencia por la necesidad de cationes divalentes. Las partículas víricas y las superficies celulares tienen claras cargas negativas. La función de los cationes es casi probablemente la de reducir la repulsión electrostática mutua entre virus y célula.

Tras la unión electrostática inicial del virus con la superficie celular, el virus se une con receptor específico que puede ser una proteína o una lipoproteína. Cada receptor tiene una carga electrostática específica dispuesta completamente a la del virus que determina el debilitamiento del cápsido del virus y la liberación correspondiente del ácido nucleico. El punto más importante en el comienzo de las infecciones víricas, es la capacidad del receptor celular para romper el cápsido del virus.

- 2).- Penetración.

Los datos disponibles indican que tras su fijación a las células del huésped los virus se transportan intactos dentro de las vacuolas digestivas, con su ácido nucleico componente prote-

gido. Este transporte al interior de las células es un proceso activo inespecífico que depende de la temperatura, lo que permite suponer que el virus juega un papel pasivo en la penetración. Durante el periodo de ingestión llamado Pinocitosis, el virus queda sin protección por ruptura del cápsido. Se ha señalado también la ruptura del cápsido vírico dentro de las vesículas pinocitóticas en el Reovirus.

3).- Replicación del ácido nucleico.

Después de la liberación del ácido nucleico vírico del cápsido del virus, comienzan los acontecimientos biosintéticos que afectan la producción del virus. Estos pasos siguen en general un modelo preestablecido.

A).- El ADN o ARN sirven como modelo para la reproducción de muchas moléculas de ácido nucleico mediante reacciones catalizadas por las enzimas ADN polimerasa o ARN sintetasa, ésta última por el virus.

La serie de los sucesos que conducen a la producción de proteínas comprende la transcripción de la serie particular de la ADN a una molécula mensajera de ARN mediante uniones de bases. Se precisa de una ARN polimerasa para que este paso se produzca en el núcleo. El ARN mensajero pasa al interior del citoplasma y se fija a los ribosomas. Muchos ribosomas se fijan al cordón de ARN mensajero; éste racimo se llama poliribosoma. En el citoplasma se activan los aminoácidos por el ATP y reaccionan después con moléculas de ARN que transportan los aminoácidos al complejo-mensajero de ARN. En alguna parte de la molécula que transfiere el ARN se halla situado el código, una serie base que es específica para los aminoácidos transportados y complementaria para la palabra código mensajera de ARN para dichos aminoácidos; este lugar se halla probablemente en la región curvada. Como se sabe, se utiliza el molde ADN vírico, el ARN de determi

nados virus puede servir directamente como mensajero.

B).- El ARN mensajero del virus, tanto de los virus que contienen ADN como de los constituidos por ARN actúa como molde para la síntesis de a) las unidades estructurales de naturaleza proteica que forman eventualmente los cápsomos y b) las enzimas relacionadas con la replicación del virus.

El esquema completo de replicación depende de la célula viva y sigue generalmente el modelo normal de metabolismo celular del ácido nucleico, esto es, el ARN mensajero del virus actúa como el ARN celular normal, en cuanto debe unirse a los ribosomas para producir los compuestos víricos específicos y las enzimas necesarias para su síntesis, copulación y maduración.

4) UNION Y MADURACION DE LAS PARTICULAS VIRICAS.

La etapa final del ciclo de multiplicación comprende la reunión de las subunidades proteicas víricas con la molécula de ácido nucleico mediante enlaces no covalentes para formar la partícula vírica madura. No se ha establecido el mecanismo exacto de este proceso, aunque es probable que las subunidades proteicas víricas se unan mediante un proceso de autoagregación. El proceso de autoagregación es el resultado natural de la uniformidad de las subunidades víricas y de sus puntos de enlace idénticos. Estos hechos conducen automáticamente a estructuras altamente simétricas de energía mínima, para lo que no se precisa principios externos u orientadores a juzgar por la sencillez y eficiencias de éstas.

Todo implica que los cápsidos de los virus pueden no encerrar forzosamente su ácido nucleico componente. La microscopía electrónica y los estudios de centrifugación con gradiente de densidad demuestran claramente que muchas partículas en una preparación infecciosa tienen cápsidos vacíos o componentes incomple

tos de ácidos nucleicos; dichas partículas se llaman formas víricas incompletas

5) LIBERACION DEL VIRUS.

Existen marcadas diferencias entre los virus y sus formas de liberación. Por ejemplo, las partículas de herpesvirus se rodean de la cubierta y maduran en la membrana nuclear. Sus formas de separación de la superficie nuclear puede comprender la fijación de las partículas a una membrana con transporte posterior al interior de la célula en vesículas o mediante la fijación al retículo endoplásmico y transporte al exterior a través de un mecanismo de corriente dinámica. Los adenovirus que se desarrollan y maduran dentro del núcleo no tienen dicho mecanismo para liberación y tienden a ser retenidos por la célula. En general las partículas que proceden de los virus de ADN tienden a ser retenidos por la célula incluso después de producirse los efectos citopáticos víricos, mientras que la progenie de los virus de ARN se libera en cantidades considerables. Son excepción a esta regla los Reovirus que contienen cordones dobles de ARN y se comportan como los virus ADN.

ALTERACIONES BIOQUIMICAS INDUCIDAS EN LAS CELULAS INFECTADAS POR VIRUS.

La cuestión básica es el mecanismo de alteración inducida por el virus que conduce a la muerte de las células o a la aceleración de su crecimiento. La explicación esencial se encuentra en las actividades de varias proteínas codificadas por el genoma del virus. Para algunos virus más pequeños en los que el ácido nucleico contiene 4,000 a 6,000 nucleótidos hay suficiente información genética (suponiendo un código triple) para codificar de 1,500 a 2,000 aminoácidos o de 10 a 15 proteínas. Por otra parte el ADN del virus vacuna contiene aproximadamente 250,000 pares de nucleótidos que, en teoría, pueden proporcionar información para 400 o 600 proteínas. Estas proteínas pueden di

vidirse en dos clases: tempranas, tardías. Parece que la mayor parte de la síntesis de las proteínas tempranas se debe primeramente al funcionamiento genético de los genomas víricos progenitores y que la síntesis de las proteínas tardías es consecuencia en un principio de la actividad de los genomas víricos de la progenie.

Las proteínas tempranas comprenden las que inhiben la repli-cación del ADN de la célula huésped y la formación del ARN y la formación del ARN de dicha célula y su biosíntesis proteica. Se han incluido también las enzimas de las rutas biosintéticas del ácido nucleico y las proteínas de los cuerpos de inclusión víricos, puntos en los cuales se produce la replicación, agregación y maduración de los virus. Las proteínas tardías comprenden pro-teínas de estructura vírica y las que actúan en la represión o -desviación de la formación de la enzima inducida por el virus. Es necesario hacer notar que la síntesis de todas estas proteí--nas se halla bajo el control de los ácidos nucleicos víricos. Me-diante la utilización de inhibidores, como la actinomicina que -impide la transcripción a ARN a partir de los moldes de ADN y -de la puromicina o parafluorfenilalanina (PFA), que inhibe el --transporte de los mensajeros genéticos desde el ARN mensajero a la proteína, puede bloquearse la formación de diversas proteínas inducidas por el virus. Estos inhibidores se han utilizado para estudiar las alteraciones bioquímicas de las células por los vi-rus.

METABOLISMO ENZIMATICO DE LAS CELULAS INFECTADAS POR VIRUS.

La infección celular por un virus va seguida con frecuencia por la inducción de nuevas enzimas que pueden catalizar una - -reacción no observada en la célula sin infección o que tenga un efecto aditivo sobre una enzima presente naturalmente. Existen muchos datos de que algunas de las enzimas son inducidas de Novo a partir de la información codificada por el genómen vírico. Sin

embargo, las alteraciones enzimáticas observadas pueden ser un efecto secundario de la desorganización total de la célula como consecuencia del desarrollo vírico. Se mencionará las actividades enzimáticas particulares que se cree se regulen por la información codificada por el genómen vírico.

(ARN SINTETASA).

ARN polimerasa subordinada a ARN.

En las células normales todo el ARN se transcribe directamente a partir del ADN celular. En las células infectadas con virus ARN que se multiplican en el citoplasma, se impone teóricamente que se hallé presente una enzima que catalice la polimerización del ARN vírico partiendo de los moldes ARN celular. Esta enzima no se encuentra en las células normales, pero se ha encontrado en las células infectadas.

ADN polimerasa.

La función de la ADN polimerasa en la célula normal es catalizar la polimerización de los nucleótidos sobre un molde ADN celular. En las células infectadas se observa el incremento de los niveles de esta enzima. Si se añade Puromicina inmediatamente después de la infección de las células, se inhibe el esperado crecimiento de esta enzima. Lo que sugiere que la información para esta enzima codificada en el genómen del virus. Puesto que los virus que se multiplican en el citoplasma, en donde puede no existir normalmente la ADN polimerasa, es obvia la superioridad de la supervivencia de la enzima que es codificada por el genómen del virus.

TIMIDINA-QUINASA.

La infección de las células por diversos virus determina un incremento en los niveles de Timidina-Quinasa. Se desconoce la función exacta de la Timidina-Quinasa en las células normales.

Puede fosforilar el desoxirribonucleosidos libres (tiamina desoxirribosa) hasta un precursor de ADN utilizable. El resultado final puede ser la disminución de la timidina libre que controla de alguna manera las enzimas interesadas en la síntesis de ADN. Un aspecto interesante de la Timidina-Quinasa inducida por el virus vacunal es que se halla sujeta a un mecanismo de control. Normalmente en las células infectadas la producción de la enzima se interrumpe a las 10 horas. Puede inhibirse la acción interrumpidora si se añade actinomicina o puromicina tras la inducción de la enzima antes de que sea efectivo el mecanismo de control. En este caso hay un incremento de la enzima hasta de 40 veces. Esto permite suponer que el mecanismo de control se produce por una proteína codificada por un ARN mensajero transcrito a partir de las moléculas ARN vírico. No se conoce hasta el momento la naturaleza de la proteína que determina la interrupción -- del mecanismo.

ARGINASA.

Algunos virus son capaces de inducir niveles elevados de arginina. La enzima inducida difiere inmunológicamente y fisiológicamente de la enzima normal y se libera aparentemente por mecanismos normales de control celular. Se supone que su efecto real es la depleción de la arginina celular, lo que da lugar a la -- disminución de la cantidad de histonas ricas en arginina que se sintetizan. Puesto que las histonas se supone son los medios -- principales en la regulación de la actividad sintética del ADN normal de las células. Su carencia podría determinar el incremento de la tasa de crecimiento celular que presenta tras la infección.

FACTORES QUE INFLUENCIAN LA MULTIPLICACION DEL VIRUS.

En muchos de los sistemas virus-célula, unidad infecciosa -- esta relacionada generalmente con la presencia de 10^{-3} a 10^{-5} -- partículas víricas no infecciosas. Esta baja relación puede estar asociada con un revestimiento insuficiente de las partículas

víricas y con la degradación posterior del ácido nucleico vírico por las nucleasas celulares. El virus de la vacuna constituye una excepción, ya que casi cada una de las partículas del virus son capaces de infectar una célula.

Las temperaturas elevadas afectan con frecuencia la expresión del genoma del hospedador. A 40°C el poliovirus inhibe la síntesis de ARN celular, pero el ARN vírico es incapaz de multiplicarse y no se produce descendencia vírica. Se ha supuesto que el ARN dependiente de la ARN polimerasa inducida por el virus no es capaz de realizar la polimerización a esa temperatura. Este fenómeno puede relacionarse muy bien con la curación en las enfermedades virales en las que se produce una elevación en la temperatura corporal. Muchas partículas de una población vírica tienen genomas incompletos. Un ejemplo de ella lo proporciona los virus de la influenza; las células infectadas por dichas partículas producen nucleoproteínas y hemagglutininas, pero no virus maduros.

INTERFERENCIA VIRICA.

El efecto se ha demostrado generalmente infectando células con un virus, tras lo que se añade un segundo virus. La interferencia vírica se demuestra cuando el segundo virus es incapaz de multiplicarse o se inhibe intensamente. Existe cada vez mayor seguridad de que hay varios mecanismos de interferencia vírica; éstos mecanismos pueden clasificarse en dos grupos: 1) la interferencia producida por una proteína celular inducida por el virus, a la que se designa como interferona, y 2) la que no es debida aparentemente a la interferona, pero que está ligada a la presencia del virus o a las sustancias derivadas del virus.

La información genética para la producción de la interferona reside aparentemente en el genoma de la célula hospedadora. Los ácidos nucleicos víricos, los ácidos nucleicos bacterianos, --

las bacterias totales y las endotoxinas estimulan a la célula a producir sustancias semejantes a la interferona. Las interferonas no son específicas para el virus aunque presentan especificidad celular estricta; es decir, que manifiestan su poder inhibiendo los virus en las células de la misma especie animal en la que se ha producido. Los datos disponibles permiten suponer que la interferona bloquea el transporte del genoma vírico. La observación de que la interferona no se une al ácido ARN vírico ni reduce su infectividad hace suponer que una acción inhibitoria tiene lugar a nivel celular, además hay información de que impide que el ARN vírico se asocie con los ribosomas para formar los polirribosomas. Posiblemente mediante un mecanismo de obstáculos estereo.

La interferencia no mediada por la interferona se distingue a la debida a la interferona en que se requiere la presencia de un genoma replicante y del virus totalmente maduro. Es discutible el mecanismo básico de este tipo de interferencia intrínseca aunque puede hallarse relacionado con la competencia por lugares de multiplicación dentro de la matriz celular o con la incapacidad para el segundo virus por su poder de absorción como consecuencia de las alteraciones de los receptores locales celulares inducidos por el virus interferente.

ALTERACIONES EN LA ESTRUCTURA CELULAR Y MUERTE DE LAS CELULAS.

Muchas clases diferentes de alteraciones de la estructura íntima de las células se sabe son provocadas las infecciones víricas, aunque las más corrientes entre ellos afectan a la formación de complejos de membrana o de mallas extensas de la sistema.

La razón fundamental de tales alteraciones es la modificación bioquímica de las estructuras celulares que controlan la función afectada. Parece que el resultado final de las altera-

ciones de la estructura en un intento para eliminar y utilizar - las sustancias tóxicas. En la mayoría de los casos la respuesta es inadecuada puesto que las células mueren.

Las alteraciones comprenden la suspensión del metabolismo - de ARN y ADN y proteico. La pregunta básica en relación a como se alteran funciones, es especulativa en estos momentos. Se ha culpado tanto a las proteínas "tempranas" como las proteínas - - "tardías". Muchos virus pueden infectar a las células sin provocar su muerte. Pues no tiene ventaja alguna para el virus matar a su hospedador y se espera una cierta variación en las capacidades de virulencia de las cepas de los virus. En último caso, - la razón fundamental de que el virus no mate a las células, es - que no son competitivos el mecanismo vírico y el celular. Las cepas virulentas carecen probablemente de información genética para diversos inhibidores y sus proteínas víricas estructurales no son tóxicas para la célula hospedadora o no las acumulan nunca a niveles tóxicos dentro de la célula.

C A P I T U L O 2

GENERALIDADES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE BURSITIS.

La enfermedad infecciosa del virus de Bursitis resulta ser sistemática en los estados tempranos de los pollos en los cuales el virus puede estar presente en sus órganos excepto en el cerebro. La concentración de este virus es alta sobre todo en los tejidos de Bolsa de Fabricio y Bazo.

Desde que la viremia es transitoria, el bazo y bolsa serán removidos de los pollos en los primeros signos clínicos de la enfermedad, siendo preferido el bazo para el aislamiento del virus, y almacenado en congelación preferentemente -40°C o más bajo. Por otro lado en los estados agudos de la enfermedad hay necrosis de la bolsa de Fabricio inflamación, y también se encuentra gelatinosa amarillenta y plenamente hemorrágica en apariencia.

Los pollos preferentemente susceptibles son de 3 a 6 semanas de edad con las siguientes características físicas: depresión severa, disminución de plumaje, temblor e incoordinación; - baja mortandad pero puede alcanzar el 20% o más.

DETECCION EN EL MATERIAL BIOLÓGICO.

No hay evidencia que indiquen que el virus es transmitido en forma congénita, sin embargo, existe la posibilidad de que el virus pueda sobrevivir como un contaminante en el cacarón del huevo y de ahí que resulte una contaminación de la vacuna de virus preparada en embrión. La contaminación en este último puede ser detectada por inoculación del material aislado de pollos susceptibles al IBDV de 3 a 6 semanas por vía ocular. Se retienen al mismo tiempo controles negativos en aislamiento individual. A los 3 ó 4 días de inoculación se hace la necropsia de -

los pollos examinándose lesiones típicas burdas en el bazo, si las lesiones son dudosas en tejido puede ser examinado histológicamente: la infección, necrosis y edema serán observadas junto con la proliferación de células reticuloendoteliales.

NO HAY OTRO PATOGENO AVIAR CONOCIDO CAUSANTE DE LA PATOLOGIA DEL BAZO QUE COINCIDA CON LA PRODUCIDA POR EL IBDV.

Los controles negativos poseerán un bazo normal y no presentarán ninguna de las manifestaciones clínicas. La infección será más tarde confirmada en estos pollos al analizar el suero para IBDV con el respectivo antisuero para IBDV.

CULTIVO PREFERENTE DE SUSTRATOS.

Embriones de 7 a 11 días de edad se progenitores no espuestos a IBDV serán usados en un aislamiento tentativo.

La vía de yema puede ser usada en inoculación de embriones de 7 a 8 días, mientras que embriones de 9 a 11 días pueden ser inoculados por vía membrana corioalantoidea (CAM) o sitio saco-vitelino.

Hasta ahora los estudios indican que la vía de inoculación membrana corioalantoidea es más sensible para el aislamiento y cuatificación del virus de IBDV.

La suspensión para la inoculación es hecha moliendo el tejido en caldo nutritivo conteniendo antibióticos usados en aislamientos tentativos rutinarios para otros virus.

Generalmente los embriones susceptibles son infectados de 4 a 6 días; algunos embriones infectados pueden estar vivos 6 días después de ser inoculados.

Estos embriones presentan enanismo y puntos de necrosis en hígado y riñón.

Cosechando yema; membrana corioalantoidea, o otro tejido -- del embrión serán diluidos a una concentración 10^{-2} a 10^{-6} dosis infectante embrión (EID_{50}) por ml. o por grs.

Si el aislamiento ha pasado bastante tiempo en el embrión - el fluido alantoideo contendrá una baja concentración de virus. De una serie de pases de virus de IBD puede resultar una reducción en su virulencia para los pollos, así como la adaptación al embrión con una liberación de virus en el fluido intraembrionario.

IDENTIFICACION SEROLOGICA.

El IBDV es neutralizado por anticuerpos específicos obtenidos por inoculación de pollos susceptibles de 3 a 6 semanas de edad, éste revelará un elevado índice neutralizante de anticuerpos Log_{10} (3) en 3 semanas de inoculación.

La gría de progenitores no expuestos al virus representa un origen de embriones para la propagación del virus, así como también origen de pollos que pueden ser utilizados para producir anticuerpos de IBDV específicos que pueden ser detectados por reacciones de neutralización o precipitación Agargel. Otra técnica de importancia para la observación es la que se efectúa al tejido sospechoso de infección y consiste en la preparación de sueros inmunes con anticuerpos fluorescentes, esta técnica tiene la versatilidad de poder ser aplicada tanto en embriones como para los pollos que contengan el virus.

Dentro de estos análisis serológicos no hay reporte alguno que indique alguna variante serológica en el IBDV de aislamientos estudiados.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.

La clara lesión típica producida por el IBDV generalmente - es un buen signo para el diagnóstico, sin embargo, es necesario dar un diagnóstico definitivo, ya sea aislando el virus o neutra lizando con antisuero específico.

PROFILAXIS.

Una vez que se ha descrito la enfermedad infecciosa de Bursitis y sus manifestaciones, describiré el método profiláctico - para ella.

La inmunización se administra por vacunación de pollos de 5 a 10 días de edad, administrada por vía agua de bebida o en forma ocular. Debe considerarse que la mayor parte de los pollos - comerciales llevan anticuerpos maternos de IBDV cuyo periodo de vida media, como ya se sabe es arriba de las 5 a 6 semanas de -- edad.

Es difícil desencadenar una inmunidad mediante esta vacuna contra el virus patógeno de campo, pero puede reducir considerablemente las lesiones.

La vacuna se preparará con virus vivo inoculado en embriones y debe contener un mínimo de $10^{-3.3}$ EID₅₀ por dosis ave, éste requerimiento mínimo puede variar de acuerdo con la virulencia e invasividad del virus usado en la vacuna.

Si la vacuna es administrada como agua de bebida a pollos - de 4 semanas de edad como mínimo, será diluida a razón de 1000 - dosis pollo por 2 1/2 galones de agua.

CONDICIONES PARA LA MULTIPLICACION DEL VIRUS EN EMBRION DE POLLO

Esta comprobado que el embrión de pollo es susceptible a la mayoría de los virus, y, ha resultado útil en el diagnóstico de virosis, investigación y producción de vacuna.

Los huevos deben de proceder de gallinas libres de infección, ya que muchos agentes infectantes pueden pasar al huevo.

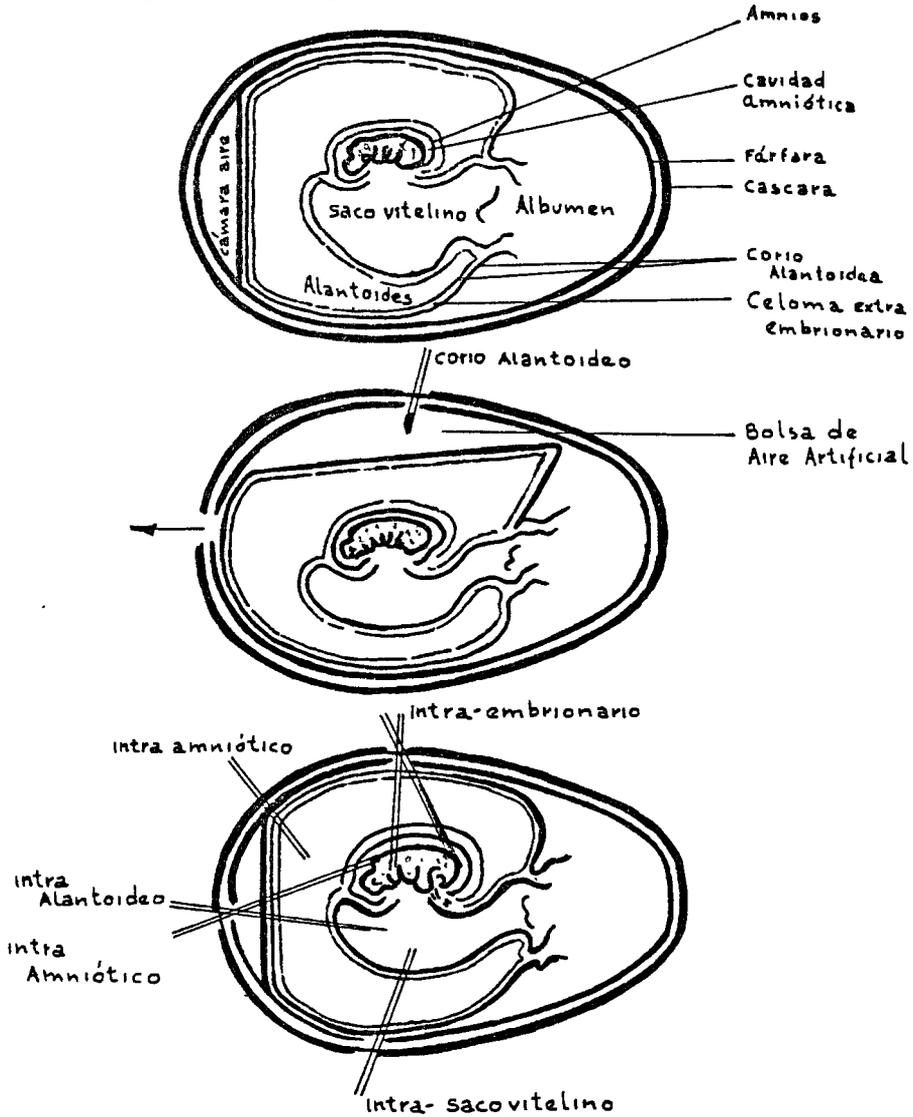
La incubación de los huevos antes de la inoculación suele ser de 38 a 39°C y debe mantenerse la humedad del 60%. Como mínimo deben voltearse los huevos una vez al día y de ser posible dos veces.

Una vez inoculados la incubación se realiza generalmente a temperatura de 35 a 37°C y los huevos ya no se voltean.

La duración de la incubación antes de la inoculación depende del tipo de ésta y de los virus a cultivar. Por ejemplo la inoculación en el saco vitelino, normalmente se hace en embriones de 7 a 9 días, mientras que la inoculación membrana corioalantoidea, se realiza en embriones de 10 a 13 días de edad. Los límites extremos de la edad de los embriones para efectuar la inoculación son de 6 a 15 días.

Antes de inocularse el huevo debe de examinarse para comprobar si tiene un embrión viable. Esto se efectúa con el ovoscópio en una habitación oscura; después de 5 a 6 días de incubación, los vasos hemáticos del corioalantoideo se distinguen fácilmente en el huevo fértil pero no en el infértil.

TECNICAS DE INOCULACION



I.- EN MEMBRANA CORIOALANTOIDEA.

II.- EN EL SACO VITELINO.

I.- MEMBRANA CORIOALANTOIDEA.- Cierta número de virus crecen óptimamente en el corioalantoideo, y ha sido útil no solamente para el aislamiento y multiplicación de muchos virus, sino también por las lesiones producidas, que pueden estudiarse. Es posible determinar la cantidad de virus existentes en el material problema, haciendo diluciones del mismo e inoculándolo a la membrana corioalantoidea. Tras un período de incubación, las lesiones o pústulas pueden contarse, calculando así la cantidad de virus existente en el material original. Se cree que en las membranas en que las lesiones están separadas claramente cada una corresponde a un virus.

Para la inoculación en membrana corioalantoidea deben elegirse embriones de 10 a 14 días de edad. De ordinario se emplea la técnica de "despegado de la membrana". Esto se consigue examinando primeramente el huevo con el ovoscopio y señalando una zona triangular de 1-1.5 cms. en uno de los lados, cuidando de evitar los grandes vasos hemáticos. Se emplea un pequeño taladro eléctrico con un disco cortante adecuado para evitar la lesión demasiado profunda, que pueda lesionar la delicada membrana corioalantoidea; para eliminar la pieza triangular de la cáscara, puede emplearse una aguja de inoculación y luego con una suave presión hacia abajo con el extremo de la aguja, se hace una incisión en la membrana que tapiza interiormente la cáscara. Se hace después un orificio en el polo obtuso del huevo a través de la cáscara y de la membrana correspondiente en la cámara de aire. Usando una pera de goma, se realiza una succión en este polo del huevo. Cuando se elimina el aire de la cámara de aire natural del huevo, se forma una cámara de aire artificial sobre el embrión, por la entrada de aire a través del orificio fraguado en la cáscara, separando así la membrana corioalantoidea de la -

cáscara. La membrana corioalantoidea se despegar de este modo y el contenido del huevo se desplaza hacia la cámara de aire natural. El inoculum se deposita directamente sobre la membrana con una jeringa o una pipeta y la abertura de la cáscara se cierra con parafina fundida, coloidón, engrudo o cinta adhesiva de celulosa. Los huevos así inoculados deben manejarse con cuidado e incubarse en posición horizontal para no modificar la posición de la membrana.

11.- EN SACO VITELINO.- Se realiza fácilmente practicando un orificio en la cáscara en la cámara de aire a unos 3 mm. de su borde. La posición y amplitud de la cámara de aire se marca con el ovoscopio. Para este tipo de inoculación es adecuada una jeringa de tuberculina armada con una aguja de 0.5 mm. de grosor y 25 mm. de longitud. La aguja se inserta directamente en el saco vitelino a través del orificio practicado en la cáscara, paralelamente al eje del huevo. La cantidad de inoculum puede variar de 0.05 ml. pero las cifras medias son de 0.1 a 0.3 ml.

LESIONES Y MODIFICACIONES PRODUCIDAS POR EL CRECIMIENTO DEL VIRUS

La muerte de los embriones va acompañada de colapso de los grandes vasos del corioalantoideo, de tal manera que se ven con dificultad al examen con el ovoscopio, mientras que son perfectamente visibles cuando el embrión está vivo. Los movimientos normales del embrión no se observan si está moribundo o muerto.

Si el embrión no ha muerto al cabo de 5 a 6 días después de la inoculación, se mata y examina para comprobar la presencia de lesiones.

El examen del embrión debe hacerse rápidamente después de la muerte, puesto que ciertas lesiones se enmascaran y oscurecen a causa de las alteraciones postmortales.

Se señalan a continuación algunas lesiones y modificaciones producidas por el crecimiento del virus.

- 1.- Muerte del embrión.
- 2.- Hemorragias de los tejidos subcutáneos.
- 3.- Congestión de los vasos de las alas y patas o de todo el cuerpo.
- 4.- Detención del crecimiento del embrión.
- 5.- Retracción del embrión.
- 6.- Disminución de la cantidad del líquido amniótico.
- 7.- Aumento de la cantidad del líquido amniótico.
- 8.- Engrosamiento y edema de la membrana corioalantoidea.
- 9.- Pústulas o zonas de infiltración leucocitarias, con frecuencia necrosis central.
- 10.- Lesiones microscópicas.
- 11.- Formación de cuerpos de inclusión.

Antes del exámen es conveniente refrigerar los embriones durante 4 o 5 horas. Esto reduce la hemorragia hacia los líquidos del embrión, si todavía está vivo. Si tienen que conservarse -- productos para realizar pases ulteriores, o para producir vacuna es importante desinfectar la cáscara con alcohol o tintura de iodo antes de abrir el huevo para impedir la contaminación bacteriana. Para recoger líquido alantoideo directamente del huevo mediante una jeringa o pipeta, eliminando un trozo de cáscara sobre la cámara de aire, rompiendo la membrana de la cáscara y la corioalantoidea que yase debajo.

Se emplean pinzas u otros instrumentos adecuados para mantener separado el embrión y sus membranas, evitando la obstrucción de la pipeta o jeringa. Una vez extraídos los líquidos del embrión, se saca éste de la cáscara para comprobar las lesiones macroscópicas. Puede recogerse diversas partes del embrión y de las membranas para realizar cortes histológicos. La observación de la membrana corioalantoidea inoculadas se consigue seccionando un casquete de la cáscara sobre la zona de la cámara de aire

artificial. Descubierta la membrana, puede recogerse cortando - sus bordes con unas tijeras. Las lesiones de las membranas pueden demostrarse más claramente haciendo flotar en suero fisiológico sobre una caja petri colocada sobre un fondo negro.

Si los productos tienen que conservarse durante cierto - tiempo antes de la reinoculación deben conservarse en un frigorífico. Aunque algunos virus permanecen viables durante meses, -- cuando se conservan en un frigorífico corriente, es mejor la congelación a temperatura de -35°C o más bajas.

Debe tenerse en cuenta que más de un 10% de las muertes de los embriones pueden producirse por causas inespecíficas. Tales muertes no deben confundirse con las producidas por el virus.

C A P I T U L O 3

METODO EXPERIMENTAL PARA LA ADAPTACION.

MATERIAL: Embriones de 10 a 11 días (SPF).
 Virus de IBD patógeno aislado.
 Sol. Desinfectante de alcohol o tintura de iodo.
 Perforador
 Resistol-sellador.
 Frascos o tubos de dilución.
 Pipetas de 1 ml.
 Jeringas de tuberculina.
 Jeringas de 5 ml.
 Agujas de 0.5 mm. de grosor, 22 mm. de longitud.
 Agujas de 0.5 mm. de grosor, 25 mm. de longitud.
 Marcador.

PROCEDIMIENTO:

- I.- Descongelación del IBDV patógeno aislado.
- II.- Parte del virus de IBDV es ampolletado para conservarse con servarse como semilla en nitrógeno líquido y parte estomada para hacer la prueba.
- III.- Se hacen diluciones del virus de IBDV de 10^0 a 10^{-4} ; se inoculan las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} para los dos tipos de inoculación; saco vitelino y membrana corioalantoidea. Se usaron embriones de 10 días para vía saco vitelino y 11 días para membrana corioalantoidea.

La cantidad de inoculum se estableció mediante previas experiencias con otros virus y basándonos en los requerimientos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norte América, y fue de 0.1 ml. por embrión, utilizando las técnicas antes mencionadas para cada tipo de inoculación.

El número de embriones inoculados fue de 10. Se dejaron 10

embriones testigo negativo para efectuar comparaciones posteriormente.

Se efectuó la iluminación de los embriones a partir de las 24 horas después de la inoculación.

Los embriones muertos entre las 24 y 48 horas, se desecharon por considerarse muertos por causas inespecíficas.

Los embriones muertos a partir de las 72 horas después de la inoculación se abrieron para observar características específicas de infección de Bursitis (IBDV).

El número de embriones muertos de la inoculación en saco vitelino fue de 7: 2 de la dilución 10^{-2} , 3 de la 10^{-3} y 2 de la dilución 10^{-4} todos ellos mostraron puntos de necrosis en hígado, enanismo, hemorragias en los riñones, así como el cuerpo del embrión francamente hemorrágico en comparación con los embriones testigo normales.

Basándonos en la mortandad y en las lesiones producidas en estos se estableció el día óptimo de cosecha, el cual fue el 7° día a partir de la inoculación.

IV.- COSECHA.- Se obtuvieron yema, membrana y embrión (sin patas y sin cabeza). Se abre el huevo en la forma antes descrita y con pinzas se saca el embrión, con unas tijeras de tipo quirúrgico se corta la cabeza y las patas, se recolecta en seguida la yema y finalmente la membrana.

Posteriormente se pasaron por licuadora, luego por gasa doble dos veces con el fin de obtener un líquido más fluible, cada una de las partes del embrión; de ahí se transfirieron a frascos ampollitas estériles cada una de las partes cosechadas. Los embriones deben ser SPF o sea procedentes de gallinas libres de infecciones.

V.- Se procedió a comprobar la presencia del virus en cada una de las partes del embrión cosechadas, para clasificar el sitio preferente para la multiplicación del virus y de esta forma nos conduzca a una cosecha más abundante en IBDV; todo esto se resume a una titulación (potencia) el cual se efectuó de la siguiente manera:

Se preparan 6 frascos o tubos de dilución con 9 ml. de sol. salina estériles.

Se toma 1 ml. de cualquier parte del embrión cosechado; empezamos con yema aunque puede ser de forma indistinta y se adiciona al primer tubo, de ahí se pasa 1 ml. al segundo tubo y así sucesivamente hasta el tubo 6, utilizando una pipeta por cada tubo; en esta forma obtenemos las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . A continuación se inoculan 10 embriones por dilución a partir de la dilución 10^{-2} a 10^{-6} con 0.1 ml. de inoculum usando jeringa de tuberculina, se sellan los embriones y se regresan a incubación. Se utiliza la vía de saco vitelino ya que por membrana corioalantoidea no observamos adaptación en una primera inoculación por cámara normal.

Se siguieron los mismos pasos anteriores con excepción de dos puntos:

A) Los embriones muertos después de las 48 horas se examinaron para las lesiones típicas de IBDV y se anotaron como positivos o negativos, según la presencia o no de éstas.

B) La cosecha no se efectuó el día establecido como día óptimo, sino que se consideró el 7º día como día de Lectura y se realizó de la manera siguiente:

Se abren los embriones partiendo de la dilución más baja a la más alta, se observa la presencia de lesiones típicas para el

virus de IBV en cada uno de ellos, anotando los resultados.

Los datos obtenidos en la primera lectura provenientes de los embriones positivos ayudaron a una lectura más exacta. De la misma forma se procedió con membrana y embrión.

Otras pruebas que se corrieron en las partes cosechadas independientemente del Título fueron las de Contaminación Bacteriana, Esterilidad y Salmonella.

La prueba de Contaminación Bacteriana consiste en sembrar - por Difusión en placa las muestras en medio de agar Cerebro Corazón.

La prueba de Esterilidad se efectuó sembrando las muestras en tubo con medios de Tioglicolato y Sabouroud.

La prueba de Salmonella se realiza con medios de Selenite - Caldo y Tripticosa Soya Caldo.

Como se observa cada uno de los medios son específicos para detectar diferentes tipos de microorganismos.

C A P I T U L O 4

CONCLUSIONES Y RESULTADOS.

- De acuerdo con lo mencionado en el Capítulo 1 página 7 ... "De que el virus vacunal en comparación con el virus patógeno tiene mayor información genética". Esto se debe a que el tamaño de -- partícula del virus patógeno es más pequeña. Puesto que el vi-- rus vacunal ha modificado su tamaño lo suficientemente grande - conteniendo en consecuencia mayor información genética; esto se logra mediante varios pases, así mismo disminuyendo su virulencia. En conclusión, a la vez que se ha hecho al virus vacunal - se ha obtenido su adaptación.

- Como señalé en el Capítulo 2 página 17 "Los huevos deben provenir de gallinas libres de infección, o sea SPF (libres de patógenos específicos)", puesto que si no fuese así, el huevo -- contendrá anticuerpos maternos e impediría la multiplicación del virus.

- En el mismo capítulo 2 página 17 "En el cual específico - temperaturas de incubación antes de la inoculación". Se ha demostrado teórica y prácticamente que a 38 - 39°C, humedad de 60% y volteo son parámetros esenciales que nos conducen a tener un embrión más resistente a la inoculación y por lo tanto capaz de producir una multiplicación mayor de virus. Una vez que se ha - formado el embrión ya no necesita esa temperatura sino un poco - más baja 35 - 37°C, puesto que después de la inoculación la temperatura de 38 - 39°C inhibe la descendencia vírica.

- En el Capítulo 3 página 23 "Realicé las diluciones de 10^0 a 10^{-4} ". Porque el requerimiento mínimo es de $10^{-3.3}$ que establece el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de - Norteamérica. Además por ser mi primera experiencia en dicho vi rus.

- Teóricamente para inocular por vía saco vitelino los embriones deben de ser de 7 a 9 días, pero se ha observado que estos no resisten la inoculación dándonos una elevada mortandad; por esto, para inocular en saco vitelino utilicé embriones de 10 días.

También la bibliografía nos indica que para inocular por vía membrana corioalantoidea, el embrión debe tener de 9 a 11 días para unos autores y de 10 a 13 días para otros. Yo utilicé embri--nes de 12 días.

- Capítulo 3 página 24 "Inoculé 10 embriones por cada dilución, ya que no sabía que mortandad iba a causar el virus. Para establecer el Día Optimo de Cosecha, se observó el proceso infeccioso producido por el virus en cada una de las partes del em---brión.

- Capítulo 3 página 25 "Los embriones inoculados en este --primer pase no mostraron lesiones pustulosas en la membrana corioalantoidea como lo presentan por ejemplo, el virus de la Viruela aviar, pues posiblemente formó lesiones microscópicas; - -puesto que en la cuantificación de Membrana corioalantoidea sí -dió título.

- Capítulo 3 página 25 ... "La cosecha se llevó a cabo por separado", para posteriormente cuantificar la presencia del virus en las partes cosechadas y clasificar en cual es más abundante; para establecer un protocolo de producción más exacto.

La cuantificación se efectuó como se señala en el capítulo 3 página 25, con yema, membrana y embrión. Los resultados fueron --los siguientes:

MEMBRANA	---	$10^{-2.8}$
YEMA	---	$10^{-4.4}$
EMBRION	---	$10^{-3.8}$

Datos obtenidos del primer pase para un embrión POSITIVO - al IBDV son:

Necropsis del Hígado, enanismo y encorvamiento del cuerpo del em brión, Riñones Hemorrágicos, además el cuerpo del embrión franca mente hemorrágico sobre todo en la parte posterior del cráneo.

Y la observación de mayor importancia fue que los embriones de - la dilución 10^{-2} estuvieron marcadamente positivos de allí se - obtuvo la dilución correcta para completar el protocolo de pro- ducción.

De esto concluyó que el virus se adaptó a todos los tejidos del cuerpo del embrión, aunque en Yema halla sido más elevado el Tí tulo debido a que hay mayor liberación del virus.

- Estudio posterior que efectué en cámara artificial sobre la -- membrana corioalantoidea del embrión el virus SI se Adaptó for-- mando lesiones pustulosas, pero con gran mortandad causada por - el traumatismo del embrión; como se utiliza embrión SPF es menos resistente a los traumatismos producidos al efectuar la Cámara - artificial y a la posible contaminación.

Por ello no es utilizada esta vía de inoculación por ser poco -- práctica y muy costosa.

NOTA.- Tanto la Inoculación como la Cosecha se efectuaron en con diciones completamente estériles.

- Capítulo 3 página 26 "Las pruebas de Contaminación bacte- riana, Esterilidad y Salmonella", que se corren en las muestras tomadas en la cosecha son para verificar si el cultivo puede -- considerarse para Semilla de Producción, respondiendo a las ca- racterfsticas de una semilla" libre de toda contaminación y Títu lo elevado".

- CONCLUSION FINAL.

- 1.- Inocular embriones SPF de 10 días por vía Saco Vitelino con inoculum preparado de 10^{-2} .
- 2.- Verificar presencia de lesiones en los embriones muertos antes del día de Cosecha.
- 3.- Cosechar Yema, membrana y embrión.

Después de haber hecho estos estudios, se hacen pruebas Piloto para la fabricación de esta Vacuna, se establecen los Protocolos de Control de Calidad y posteriormente se mandan Muestras para registro a la Secretaría de Agricultura y Ganadería.

PRODUCTO: IBDV EN MEMBRANA

FECHA DE INICIACION 5 de Mayo -77 FECHA TERMINADO 13 de Mayo -77

		DIAS EN PAVEBA														
DILUCION	E	1	2	3	4	5	6	7	D	+ / T	+	-	↑ T	↓ -	+ / T	% +
10 ⁻²	1				M				+	2/5	2	3	2	3	2/5	40%
	2					M			+							
	3								-							
	4								-							
	5								-							
10 ⁻³	6				M				-	0/5	0	5	0	8	0/8	0%
	7				M				-							
	8					M			-							
	9								-							
	10								-							
10 ⁻⁴	11					M			-	0/5	0	5	0	13	0/13	0%
	12								-							
	13								-							
	14								-							
	15								-							
10 ⁻⁵	16								-	0/5	0	5	0	18	0/18	0%
	17								-							
	18								-							
	19								-							
	20								-							
10 ⁻⁶	21								-							
	22								-							
	23								-							
	24								-							
	25								-							

EID50 = Log. de la Dil. arriba 50% + $\frac{\% \text{ arriba } 50\% - 50\%}{\% \text{ arriba } 50\% - 50\% \text{ debajo } 50\%}$

CALCULOS: -1.8 -2.8

EID50 = 10 per 0.1 ml = 10 Por ml.

PRODUCTO: IBDV EN EMBRION

FECHA DE INICIACION de Mayo-77 FECHA TERMINADO 13 de Mayo-77

DIAS EN PRUEBA

DILUCION	E	1	2	3	4	5	6	7	D	+ / T	+	-	↑ T	↓ -	+ / T	% +
10 ⁻²	1				M				+	5/5	5	0	7	0	7/7	100%
	2					M			+							
	3								+							
	4								+							
	5								+							
10 ⁻³	6								+	1/5	1	4	2	4	2/6	33.3%
	7								-							
	8								-							
	9								-							
10 ⁻⁴	10								-	1/5	1	4	1	8	1/9	9.0%
	11								+							
	12								-							
	13								-							
	14								-							
10 ⁻⁵	15								-	0/5	0	5	0	13	0/13	0%
	16								-							
	17								-							
	18								-							
	19								-							
10 ⁻⁶	20								-							
	21															
	22															
	23															
	24															

$$EID_{50} = \text{Log de la Dil. arriba } 50\% + \frac{\% \text{ arriba } 50\% - 50\%}{\% \text{ arriba } 50\% - 50\% \text{ de bajo } 50\%}$$

CALCULOS -2.8 -3.8

EID₅₀ = 10 por 0.1 ml. = 10 por ml.

PRODUCTO: IBDV EN YEMA

FECHA DE INICIACION de Mayo -77 FECHA TERMINADO 13 de Mayo -77

DIAS EN PRUEBA

DILUCION	E	1	2	3	4	5	6	7	D	+ / T	+	-	↑ T	↓ -	+ / T	% +
10 ⁻²	1				M				+	5/5	5	0	9	0	9/9	100%
	2				M				+							
	3					M			+							
	4								+							
	5								+							
10 ⁻³	6					M			+	3/5	3	2	4	3	4/7	57.1%
	7								+							
	8								-							
	9								+							
10 ⁻⁴	10								-	1/5	1	4	1	7	1/8	12.5%
	11								+							
	12								-							
	13								-							
	14								-							
10 ⁻⁵	15								-	0/5	0	5	0	12	0/12	0%
	16								-							
	17								-							
	18								-							
	19								-							
10 ⁻⁶	20								-							
	21															
	22															
	23															
	24															
25																

EID50 = $\text{Log de la Dil. arriba } 50\% + \frac{\% \text{ arriba } 50\% - 50\%}{\% \text{ arriba } 50\% - 50\% \text{ debajo } 50\%}$

CALCULOS: -3.3 -4.4

EID50 = 10 por 0.1 ml. = 10 por ml.

B I B L I O G R A F I A

- VIROLOGIA Y CULTIVO DE TEJIDOS - - - - - HAMISH CUMMING
 EDITORIAL EL MANUAL MODERNO S.A. - - - - - 1975
- BACTERIOLOGIA Y VIROLOGIA VETERINARIA - - - I.A. MERCHANT-R.A.
 PACHER.
 EDITORIAL ACRIBIA ZARAGOZA - - - - - 1970
- VIROLOGIA PRACTICA - - - - - CHARLES H. C.
 EDITORIAL ACRIBIA ZARAGOZA - - - - - 1959
- ISOLATION AND IDENTIFITIO OF AVIAN
 PATHOGENS - - - - - STEPHEN B. HITCHNER.
 CHAIRMAN
 CHARLES H. DOMERMUTH
 H. GRAHAM PURCHASE
 JAMES E. WILLIAMS
- THE AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN
 PATHOLOGISTS - - - - - 1975
- DIAGNOSTIC METHODS IN CLINICAL VIROLOGY - - N.R. GRIST,
 CONSTANCE A. ROSS
 AND ELEANOR J. BELL
- EDITORIAL BLACKWELL SCIENTIFIC
 PUBLICATION - - - - - 1974
- REQUERIMENT DEPARTMENT OF AGRICULTURE UNITED STATES
 ANIMAL AND PLANT HEALTH SERVICE
 VETERINARY SERVICES
 FEDERAL CENTER BUILDING
 HYATTSVILLE MARYLAND 20782
 1972.