

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOTECNIA**

**VALOR DE LA PRUEBA DE OUCHTERLONY EN EL
DIAGNOSTICO DE LA LARINGOTRAQUEITIS DE LAS
GALLINAS**

TESIS

**Que para sustentar examen profesional de:
MEDICO VETERINARIO ZOTECNISTA**

Presenta el Pasante:

JORGE PÉREZ GONZÁLEZ

MEXICO, D. F.

1962



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A mis padres,
con profundo cariño,
por sus innumerables
sacrificios.**

**A mis hermanos,
con gran afecto.**

**A todos mis maestros
respetuosamente**

**A todos mis compañeros
y amigos.**

64627

1967

*La realización del presente trabajo
se llevó a cabo en el Laboratorio
de Virología de la Escuela Nacional
de Medicina Veterinaria y Zootecnia.*

*A la Srita. M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ E.
a quien agradezco su valiosa
y gentil ayuda.*

CONTENIDO

- 1.—INTRODUCCION.**
- 2.—MATERIAL Y METODOS.**
- 3.—RESULTADOS.**
- 4.—DISCUSION.**
- 5.—CONCLUSIONES.**
- 6.—BIBLIOGRAFIA.**

INTRODUCCION

El presente trabajo tiene como finalidad plantear la posibilidad de contar con un método de diagnóstico de tipo inmunológico, que a la vez que sea práctico resulte efectivo para la identificación de aves afectadas de laringotraqueitis, pues las técnicas clásicas son bastante laboriosas y lentas en su ejecución, además proporcionan resultados con frecuencia dudosos.

La prueba de precipitación de Ouchterlony en medio semisólido, en recipientes separados (doble difusión) se basa en que, cuando un antígeno en solución es mezclado in vitro, con su antisuero específico generalmente se forma un precipitado flocular. Este precipitado está formado en su mayor parte de las globulinas que constituyen el anticuerpo, pero la sustancia antigénica esta también incluida en él. El antígeno usado en la prueba de precipitación es conocido como precipitinógeno, el anticuerpo como precipitina. Su unión forma el precipitado visible, que se aprecia con mayor facilidad en el medio semisólido.

Este ensayo tiene como base los trabajos de varios autores entre los cuales es preciso mencionar a: Ouchterlony (1) quien realizó estudios sobre la difteria humana; Jensen y Francis (6) quienes llevaron a cabo investigaciones sobre el virus de la influenza; a Molnar (7) quien con este mismo método demostró la reacción específica entre el virus del cólera porcino y el suero inmune, y a BBjorklund (4) el cual llevó a cabo amplios estudios sobre el mixoma y fibroma de los conejos, del Mal de Carré y del cólera porcino.

No es mi intención aportar algo nuevo, sino simplemente verter mi opinión sobre la proyección de principios científicos conocidos, con el único fin antes mencionado. Toca a otros hacer el juicio analítico de este ensayo y dictaminar sobre su valor.

Sin duda alguna pasará tiempo antes de que el presente método sea adoptado como forma rutinaria de diagnóstico, sin embargo no deja de ser alentador que en las primeras pruebas se hayan obtenido resultados satisfactorios. Será pues esta pequeña aportación el resultado de la síntesis de trabajos de notables autores. Justo es aclarar que, en principio es a ellos a quienes corresponde el mérito de lo útil que resulte la técnica aquí empleada.

Finalmente resta decir que, es mi sincero deseo que este intento de investigación cumpla su cometido y sea punto de partida de futuros trabajos de mayores alcances pues en este aspecto el campo por explorar, puede asegurarse que es ilimitado.

MATERIAL Y METODOS

Las precipitinas como otros anticuerpos son sustancias que aparecen en la sangre después de algunos días a partir de la inyección del precipitinógeno o antígeno. (14) Estos anticuerpos precipitantes pueden ser producidos mediante la inmunización de conejos, cobayos, perros, pollos, caballos, ovinos, bovinos etc.

La mayoría de los animales pueden producir precipitinas, pero los conejos resultan ser los animales más indicados para la obtención de los sueros precipitantes destinados al uso de los laboratorios, ya que se ha comprobado que esta especie produce una mayor concentración de anticuerpos de precipitación. De aquí que, fueran utilizados los conejos para obtener el antisuero necesario para la reacción antígeno-anticuerpo.

Para llevar a cabo la prueba son necesarios los siguientes elementos:

Suero inmune anti-laringotraqueitis.

Suero normal de conejo.

Medio semi-sólido de Agar.

Muestras de órganos sospechosos, en este caso laringe y tráquea.

Material de laboratorio.

A continuación se dan en detalle más o menos, los pasos a seguir para la preparación de cada uno de los elementos antes mencionados.

1.—*Preparación de los sueros.*

Se inocularon 6 conejos machos adultos, con un antígeno preparado con una cepa de virus *Tarpeia avium* (T. a.), aislada en embrión de pollo (10,13).

El virus fue suspendido en hidróxido de Aluminio e inyectado a los animales en dosis de 2.5 por vía paraneural y con intervalos de 2 días entre cada inyección. Después de la cuarta inoculación, es conveniente desensibilizar a los conejos con 0,1 ml. del mismo antígeno aplicado por vía intradérmica, media hora antes de aplicar la dosis respectiva.

Diez días después de la última dosis, se extraen de la vena marginal de la oreja, 5 ml. de sangre para ensayar el suero. Si la prueba preliminar frente al virus T. a. resultara negativa, se vuelven a inocular los conejos con otra serie de inyecciones.

2.—*Obtención y conservación de los sueros.*

Una vez inmunizados los conejos, se procede al sangrado total de los mismos, obteniendo la sangre directamente del corazón mediante el uso de una jeringa; se deposita en tubos estériles que son dejados en reposo en refrigeración durante 24 horas, con el fin de incrementar la cantidad de suero. El suero obtenido se centrifuga y se envasa en frascos estériles, para evitar su contaminación se le agrega merthiolate en una proporción de 1 x 10,000. Finalmente se Tyndalizan durante media hora en baño María a 56°C.

En forma similar se procede para la obtención del suero normal (de conejo) que se utilizará en la prueba, como control negativo.

Para determinar la potencia del suero preparado en conejos se hicieron pruebas de seroneutralización en embrión de pollo ba-

sada en el método de cuanteo de lesiones focales, descrita por Burnet (12).

Los índices de seroneutralización quedaron comprendidos entre 4.4 y 3.87 log. y el índice medio geométrico fue de 4.13 log.

3.—Preparación del Medio.

Se colocan 7.5 gramos de Agar (Bacto Agar Difco) en un matrón y se afora 1000 ml. con agua destilada. Se decanta a las 24,48 y 72 horas, teniendo cuidado de restituir exactamente el agua eliminada cada vez. Se ajusta el pH entre 7 y 7.2 y el filtrado de Agar se somete a la esterilización en el autoclave durante media hora a 120°C; al sacarlo del autoclave se le agrega merthiolate en cantidad necesaria para hacer una dilución de $1 \times 10,000$. Finalmente se vierten de 7 a 8 ml. del medio en cajas de Petri chicas, de 15 x 60 mm.; y 20 ml si se trata de cajas grandes de 10 x 100 mm. Se dejan a la temperatura ambiente para que solidifique el medio y después son puestas en refrigeración para evitar su desecación excesiva.

Los recipientes son perforaciones que se hacen en el medio, momentos antes de poner en contacto los reactivos, siendo de 10 mm. de diámetro el pozo central donde se colocará el antígeno; y de 6 mm. los circundantes, dispuestos en forma de pentágono para los sueros respectivos. la distancia entre los recipientes debe ser de 5 mm.

4.—Preparación de las Muestras

Las tráqueas procedentes de aves con síntomas clínicos de la enfermedad de laringotraqueítis, se trituran en el mortero de Tenbroeck, poniendo 1 gramo de tráquea y 4 ml. de agua destilada estéril, o cantidades mayores pero en proporción de 1:5; la molienda resultante se centrifuga y el líquido sobrenadante se envasa en frascos estériles. Es conveniente colocar las muestras en el congelador si no se van a emplear en seguida.

El mismo material sospechoso fue utilizado en el estudio Histopatológico y en la inoculación de embriones.

5.—*Técn.ca de la Prueba de Ouchterlony.*

a.—Con una pipeta de 1 ml. se colocan 5 gotas de la suspensión de la tráquea problema (antígeno) en el recipiente central.

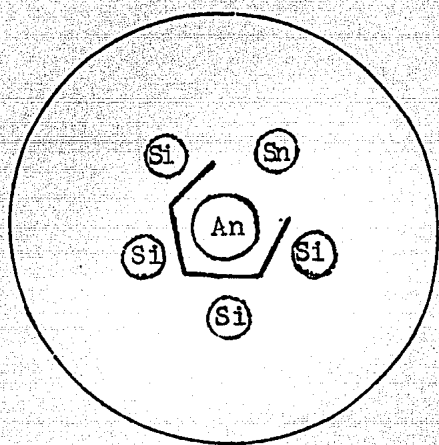
b.—En uno de los recipientes circundantes se vierten 3 gotas de suero normal y se marca para su posterior identificación.

c.—En los cuatro recipientes restantes se ponen 3 gotas de suero inmune, sin diluir.

d.—Las cajas son dejadas a la temperatura ambiente del Lab. que oscila entre 20 y 21°C., haciéndose observaciones cada 12 horas para determinar el momento de la aparición de las líneas de precipitación.

Las lecturas fueron hechas con ayuda de una lámpara de microscopio, colocada en un ángulo de 45°.

El esquema siguiente da una idea de la técnica descrita.



Si = Suero immune.

An = Antígeno.

Sn = Suero Normal.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se muestran en los cuadros 1 y 2.

En el cuadro No. 1 se advierte en cada caso que, no siempre coinciden los resultados obtenidos con las tres técnicas empleadas en el estudio de las muestras. El estudio histopatológico en todos los casos, fue hecho simultáneamente por el Laboratorio de Histología de la misma escuela.

De 25 muestras probadas se obtuvieron los siguientes datos:

12 muestras fueron positivas a la prueba de precipitación en un término de 24 horas.

5 resultaron positivas a la misma prueba a las 48 horas.

10 muestras resultaron positivas al estudio histopatológico.

12 dieron resultado positivo a la inoculación de embriones.

Para determinar la sensibilidad de la reacción de precipitación se inocularon lotes de aves de 7 a 8 semanas de edad, con la cepa de virus T. a., por vía intratraqueal e infraorbitaria inyectando en ambos casos 0.2 ml. de virus cultivado en embrión de pollo (10). Los resultados se resumen en el cuadro No. 2.

Cuadro No. 1

Muestras: No.	PRECIPITACION Resultados a las:		ESTUDIO HISTO- INOCULACION PATOLOGICO DE EMBRIONES	
	24 horas	48 horas		
1	+		+	+
2	+		—	+
3	+		+	—
4	—	—	—	—
5	+		+	+
6	—	—	—	—
7	+		—	+
8	+		—	+
9	—	—	—	—
10	—	—	—	—
11	+		+	+
12	—	+	+	+
13	+		+	—
14	—	+	—	—
15	—	—	—	—
16	—	+	—	+
17	—	—	—	—
18	+		+	+
19	—	—	—	—
20	—	+	+	+
21	+		+	+
22	—	—	—	—
23	+		+	—
24	+		—	—
25	—	+	+	+

Cuadro No. 2

Muestras de aves sacrificadas a las:	Prueba de Preci. Estudio Histopato- pitación en Placa:		lógico.
	24 horas	48 horas	
24 hs. después de la inoculación.	+	—	
48 horas ídem.	+	+	
72 " "	+	+	
96 " "	+	+	
120 " "		+	—

DISCUSION

Es necesario un entendimiento del mecanismo de la difusión en un medio semi-sólido y de la precipitación del antígeno y del anticuerpo, para la adecuada interpretación de las pruebas de inmunodifusión.

De aquí que, una corta revisión de la actual información sobre la difusión y la precipitación de un antígeno y de un anticuerpo será de suma ayuda en la discusión de los problemas que pueden afectar la interpretación de los resultados de las pruebas de inmunodifusión (1, 5, 6, 7, 9, 11).

La difusión de un antígeno y de un anticuerpo a través de un medio semi-sólido, se ajusta estrechamente a las leyes de la difusión de los gases (2, 3). La difusión de los reactivos consiste en movimientos de una área de alta concentración a zonas de baja o nula concentración. Indiscutiblemente esto se debe a una agitación térmica de las moléculas reaccionantes que causan una colisión entre unas y otras, con moléculas o iones alrededor de ellas y con las paredes del recipiente que las contiene, en una frecuencia proporcional a la concentración y la temperatura que las rodea; estas colisiones mutuas son la fuerza conductora de la difusión de los reactivos. El grado de las reacciones es regular y matemáticamente predecible.

La reacción se incrementa en proporción directa a la temperatura, a la viscosidad o estructura del medio semi-sólido o de-

bido a las dos condiciones. Y decrece en proporción indirecta a la concentración de los reactivos originales.

Durante el desarrollo de las pruebas, se encontró que la temperatura del Laboratorio (20-21°C.) fue adecuada para que se llevara a cabo la reacción de precipitación en forma satisfactoria.

Las reacciones pueden ser originadas por un antígeno soluble o por partículas completas del virus. Las líneas de precipitación fueron definidas y distinguibles en ocasiones desde las 16 horas de estar en contacto los reactivos. Y se encontró en todas las pruebas el mismo tipo de línea, lo cual nos induce a pensar que se trata de una misma cepa de virus T. a. sin variantes antigénicas.

En ningún caso se presentó el fenómeno de Leisegang (2), en vista de haberse utilizado anticuerpos de precipitación llamados de tipo "R" (rabit = conejo). Además los sueros fueron Tyndalizados para destruir los anticuerpos no específicos.

Los antígenos que fueron congelados a -20°C, por no haberse utilizado en seguida, se descongelaron a la temperatura ambiente para evitar la destrucción de la fracción precipitante del virus señalada en los trabajos de Mansi (5).

La razón de emplear tres gotas de los sueros, y cinco del antígeno dentro de los respectivos recipientes, obedece a que es la cantidad necesaria para llenarlos hasta el borde.

Por otra parte, el complejo formado por la precipitación del antígeno y del anticuerpo es visible e insoluble en zonas de exceso de alguno de los reactivos.

También se observó que la solución de merthiolate adicionada al medio fue insuficiente en algunos casos, para prevenir el desarrollo bacteriano en las cajas, por lo cual se hizo necesario añadir a las suspensiones de tráquea una cantidad tal, que diera

una solución de $1 \times 10,000$ con lo cual se previno e inhibió el desarrollo de gérmenes, sin interferir en las reacciones.

En el cuadro No. 2 se observa que la reacción de precipitación se verifica en un lapso de 24 a 48 horas después de poner en contacto los reactivos y se mantiene constante en las suspensiones de tráqueas procedentes de aves inoculadas experimentalmente, y sacrificadas cada 24 horas durante 5 días consecutivos.

En los estudios histopatológicos sólo se observaron los corpúsculos de Seifried (8) a las 48, 72 y 96 horas después de la inoculación de las aves.

La investigación histológica muestra la gran afinidad del virus por las mucosas de las vías respiratorias, particularmente por la laríngea y la traqueal. Parece ser, que ataca en primer lugar al revestimiento epitelial, que se necrosa pasando por las diversas formas de degeneración. Casi al mismo tiempo se desarrollan procesos inflamatorios de intensidad variable en la submucosa y en otras partes de la pared de la tráquea, que deben ser considerados como fenómenos secundarios, pero que en una o en otra forma contribuyen a la desaparición del epitelio traqueal y en consecuencia la investigación microscópica resulta negativa en períodos avanzados de la enfermedad.

De lo anterior se deduce que la reacción de precipitación es superior en eficacia, en comparación con el estudio histopatológico.

Cuando se trabajó con tráqueas de animales en período de recuperación, la reacción era más lenta, no haciéndose visible hasta las 48 horas después de poner en contacto los reactivos y las líneas de precipitación formadas, se mostraban menos definidas en comparación con las pruebas efectuadas con tráqueas de aves en el período agudo de la enfermedad. La menor intensidad de la reacción en aves en fase de recuperación, puede atribuirse a la presencia de anticuerpos neutralizantes del virus.

Para determinar la especificidad de la reacción se puso en

contacto una suspensión de tráquea procedente de las aves inoculadas, con el suero específico obtenido en conejo; este material posteriormente fue utilizado como fuente de antígeno y expuesto por segunda vez al suero inmune en otra caja, no habiéndose llevado a cabo la reacción de precipitación. De lo anterior se deduce que las partículas víricas fueron neutralizadas en la primera exposición frente al suero respectivo.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos sacar las siguientes conclusiones:

- 1a.—La prueba tiene valor por ser específica en alto grado.
- 2a.—La presencia de las líneas de precipitación obtenidas en la Prueba de Ouchterlony, se interpreta como positiva en el diagnóstico de laringotraqueítis.
- 3a.—No se observaron variantes antigénicas durante el desarrollo de las pruebas.
- 4a.—En aves en período de recuperación fue posible determinar la presencia del virus.
- 5a.—La reacción en medio gelificado mostró mayor precocidad en relación con las otras dos formas de diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—OUCHTERLONY, O. (1948).—Ark For. Kemi. Mineralogi. Oct. Geologi, 26 B, 1.
- 2.—ALFRED J. CROWLE. (1960).—Annual Review of Microbiology. 14, 161-164.
- 3.—M. W. WILSON. (1958).—Journal Immunology. 81, 4, 317-330.
- 4.—BJORKLUND, B. (1952).—Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 79, 319-324.
- 5.—W. MANSI (1957).—J. Comp. Path. and Therap. 67; 297-303.
- 6.—JENSEN, K. E., and FRANCIS (1953).—T. J. Immunology, 70; 321-324.
- 7.—MOLNAR, I. (1954).—Acta. vet. hung., 4, 297-303.
- 8.—O. SEIFRIED. (1936).—Histopatología.
- 9.—KORNGOLD and VAN LEEVEN (1960).—Int. Arch. Allergy, Vol. 17 Nos. 5-6.
- 10.—METHODS FOR THE EXAMINATION OF POULTRY BIOLOGICS.—Publication 705. Nat. Academy of Scienc., Nat. Res. Coun. Wash. (1959).

- 11.—WOERELE, H. (1961).—Mh. Tierheilk 13, 111-116.
- 12.—BURNET, F. M. (1936).—Jour. Exper. Med. 63, 685-690.
- 13.—MERCHANT y PACKER. (1958).—Bacteriología y Virología Veterinarias.
- 14.—BOYD, W. C. FUNDAMENTS OF IMMUNOLOGY.—Interscience Publishers Inc., New York (1956).