

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE CINCO CEPAS DE VIRUS DE LA
INFLUENZA EQUINA A/Equi 2 POR LA PRUEBA
DE SUERO NEUTRALIZACION



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A

GLORIA

LOPEZ

OJEDA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

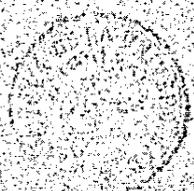
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

601



COMPARACION DE CINCO CEPAS DE VIRUS DE LA
INFLUENZA EQUINA A/Equi 2 POR LA PRUEBA
DE SUERO NEUTRALIZACION



BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

TESIS PROFESIONAL

GLORIA LOPEZ OJEDA

México, D. F.

1958

Con agradecimiento a mis
asesores técnicos.

M.V. Aurora Velázquez E.
Jefe del Depto de Micro
biología. De la Escuela
Nacional de Medicina
Veterinaria y Zootécnica.

M.V. Raymundo G. Cunha.
Coordinador de Patolo
gía del Proyecto de -
Educación Veterinaria
de la F.A.O. y U.N.A.M.

Este trabajo fué realizado en
el Laboratorio de Virología e
Inmunología de la Escuela Na-
cional de Medicina Veterinaria
y Zootecnia.

Con cariño y ternura a quién ha sabido encausar mi vida.

Sr. Everardo López M.

Al dulce e inolvidable recuerdo de mamá.

Sra. Juana Ojeda de L.

A mi hermana.

Srita Consuelo López Ojeda.

INTERODUCCION

La designación "Influenza Equina" era empleada en Patología animal desde el año de 1800, para describir una enfermedad respiratoria de los caballos, de causa imprecisa (1,7).

SOVINOVA y col. (11) aclararon la etiología de la Influenza Equina haciendo el aislamiento del virus causante y situandolo en el grupo de Influenza A, al que pertenecen virus de procedencia humana suina y aviar (3). Un estudio mas profundo y posterior, en los Estados Unidos reveló que esta enfermedad podria ser producida por dos tipos de virus inmunológicamente distintos que recibieron de acuerdo con la nomenclatura internacional, las designaciones de A/Equi 1 y A/Equi 2 (9,13).

La importancia del estudio del virus de la Influenza Equina no es solamente por causar esa enfermedad de los caballos como tambien por sus relaciones con la Influenza de otras especies animales y humana. En México, CUNHA y col. (4,5) aislaron diversas cepas de virus identificandolas como del subtipo A/Equi 2 y rotulandolas como A/Equi 2 /México 1-5/66.

Un estudio comparativo de estas cepas fue realizado por VILLASENOR (12) utilizando la prueba de inhibición de hemoaglutinación.

Juzgamos ser de interes que se profundizara este estudio comparativo a fin de conocer mejor las propiedades inmunológicas de estas cepas pues el control de la enfermedad se basa en el empleo de vacunas que deben ser específicas.

En el presente trabajo, se presenta el estudio comparativo entre esas cinco cepas de virus, mediante el exámen de los anticuerpos neutralizantes producidos por cada una de las referidas cepas.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS DE VIRUS. Se utilizarán las cepas de virus A/Equi 2 /México - 1/66, 2/66, 3/66, 4/66 y 5/66 (5) las cuales fueron proporcionadas - por el Laboratorio de Virología e Inmunología de esta escuela. Líquido alantoideo de huevos embrionados inyectados con cada una de estas cepas era la fuente de virus.

SUEROS. Se empleo sueros hiperinmunes de gallos inoculados separada- mente con las muestras enumeradas y especificadas. Los gallos con un peso aproximado a 2.5 hg eran inoculados con líquido alantoideo - virulento por via intravenosa con dosis de 5 ml. Las aves inmuniza - das con las cepas México 2, 3, 4, 5, recibieron una segunda inocula - ción de líquido alantoideo virulento cuya dosis era de 10 ml, por - vía intraperitoneal. A los 16 días despues de la última inoculación - de virus los gallos eran sangrados por punción cardiaca, la sangre - dejada coagular y el suero obtenido por decantación y posterior cen - trifugación a 2 000 r.p.m durante 20 minutos. Los sueros eran calen - tados a 56°C por 1/2 hora para su inactivación.

Para cada suero se determino su título neutralizante frente a cepa - homóloga . Suero normal de gallo fue tambien empleado.

HUEVOS EMBRIONADOS. de 10 a 11 días de edad de gallinas Leghorn de - un proveedor comercial fueron usados en este trabajo.

PRUEBA DE SUERO NEUTRALIZACION. En una serie de tubos de hemólisis - de 10 x 1 cm., se preparaban diluciones cuadruplas de suero con solu - ción salina, a partir de 1:2 hasta la dilución mas alta que se dese - aba utilizar para cada suero. A cuatro de sus diluciones se agregaba un volumen igual de una dilución fija de virus estimada entre 100 y 500 DI 50%.

Las mezclas de suero y virus permanecian a temperatura ambiente por 1/2 hora y enseguida se colocaban en baño de hielo. Cada dilución - suero virus era inoculada en cuatro huevos embrionados utilizandose

asi 16 embriones por cada suero; al suero normal de gallo se empleaba como testigo.

En cada prueba el virus era titulado haciendose diluciones decuplas del líquido alantoideo infectado en caldo nutritivo con antibióti--cos e inoculandose las diluciones de 10^{-5} hasta 10^{-10} .

Los huevos embrionados inoculados eran incubados a 37°C y examina--dos entre 16 y 20 horas y los muertos eran descartados. Los huevos --con embriones vivos se volvian a incubar y entre 40 y 44 horas se --sacaban de la incubadora colocandose en refrigeración para poste --rior colecta del líquido alantoideo de cada uno de estos y por sepa--rado.

Cada líquido alantoideo cosechado era examinado para determinar su--capacidad hemoaglutinante en tubo. La presencia de actividad hemoag--glutinante era indicativo de la presencia de virus. La ausencia de --hemoaglutinación indica la neutralización del suero o la ausencia --de virus en su titulación.

El título del virus y de los sueros fue determinado por el método --de REED y MUENCH. (8,10).

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION. La capacidad hemoaglutinante de los líqui--dos alantoideos era examinada por la prueba de Hemoaglutinación --en tubo (2), haciendo una serie de diluciones dobles en solución sali--na fisiológica a partir de 1/6 hasta 1/320. A cada tubo con 0.5 ml de dilución adicionabase una cantidad igual de glóbulos rojos de galli--na al 0.5% dejando las gradillas a temperatura ambiente durante una--hora, cuando se hacia la lectura de la prueba, tomandose como positiva los líquidos con título 1:10 en adelante.

RESULTADOS

Las pruebas de Suero Neutralización fueron realizadas ,verificando se la capacidad neutralizante de los 5 sueros inmunes frente a una cepa de virus.

Así,5 pruebas fueron realizadas en las cuales empleabase los mis - mos sueros variando en cada prueba la cepa de virus.

Los resultados de estas pruebas encuentranse expresados en los cua - dros 1 al 5.En el cuadro número 6 presentamos un sumario de los - resultados de las pruebas anteriores,registrandose las dosis neu - tralizantes 50% de cada suero frente a las diferentes cepas de vi - rus.

De su lectura observase que cada suero mostró una capacidad neutra - lizante similar para las diferentes cepas de virus examinados.

DISCUSION



BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

Los resultados presentados en el cuadro 6 no revelan diferencias serológicas entre las cepas estudiadas.

La variación de título registrada no parece significativa entre una y otra prueba. Apenas el suero México 2 mostró una variación mas amplia para el virus México 5 ; así mismo fue menor de dos diluciones y no se observó lo mismo en sentido contrario, esto, es, con el suero México 5 y virus México 2.

Estos resultados confirman los antecedentes obtenidos por la prueba de Inhibición de Hemoaglutinación y esta de acuerdo con las modernas concepciones de las fracciones antigénicas de los virus de Influenza. Según estas el antígeno responsable de la producción de anticuerpos inhibidores de hemoaglutinación y de anticuerpos neutralizantes de la infecciosidad son similares y situanse en la membrana del virión (6).

CONCLUSION.

Los resultados de las pruebas de Suero Neutralización presentadas -
no demuestran ninguna diferencia aerológica entre las cepas de vi -
rus de la Influenza Equina A/Equi 2 : México 1/66, México 2/66 -
México 3/66 México 4/66 y México 5/66.

Cuadro # 1

Suero Neutralización de diferentes sueros
frente a la cepa A/Equi 2/México 1.

Sueros Inmunes	Diluciones de suero							DN 50*	
	Cepas	1:2	1:8	1:32	1:128	1:512	1:2048	1:8192	Log
Mex.1	0/4**0/4	3/4	4/4	-	-	-	-	-1.3	1:20
Mex.2	-	-	0/4	4/4	4/4	4/4	-	-2.3	1:200
Mex.3	-	-	-	0/4	4/4	4/4	4/4	-2.4	1:250
Mex.4	-	-	-	0/3	0/4	3/4	4/4	-3.1	1:1200
Mex.5	-	-	-	0/4	0/3	2/4	3/3	-3.3	1:2000

*Dosis Neutralizante 50%

**Número de líquidos con hemoaglutinación positiva / número de líquidos examinados.

Virus A/Equi 2 /México 1 : 220 DI 50%.

Cuadro # 2

Suero Neutralización de los diferentes suero
frente a la cepa A/Equi 2 /México 2.

Sueros Inmunes	Diluciones de suero						DN 50*	
	1:2	1:8	1:32	1:128	1:512	1:2048	Log	Diluciones
Cepas	1:2	1:8	1:32	1:128	1:512	1:2048	Log	Diluciones
Mex.1	0/4**	0/4	4/4	4/4	-	-	-1.2	1:15
Mex.2	-	-	0/4	0/4	2/4	3/3	-2.7	1:512
Mex.3	-	-	0/4	0/4	2/4	3/4	-2.8	1:710
Mex.4	-	-	0/4	1/4	0/4	3/4	-3.0	1:1000
Mex.5	-	-	0/4	0/4	2/4	3/4	-2.8	1:710

*Dosis Neutralizante 50%

**Número de líquidos con hemoaglutinación positiva / número de líquidos examinados.

Virus A/Equi 2 /México 2 : 52 DI 50%

Cuadro # 3

Suero Neutralización de los diferentes sueros.
frente a la cepa A/Equi 2 / México 3.

Sueros Inmunes	Diluciones de suero							DN 50*	
	1:2	1:8	1:32	1:128	1:512	1:2048	1:8192	Lgg	Diluciones
Cepas	1:2	1:8	1:32	1:128	1:512	1:2048	1:8192	Lgg	Diluciones
Mex.1	0/4**0/4	3/4	4/4	-	-	-	-	-1.3	1:20
Mex.2	-	-	0/4	0/3	3/4	4/4	-	-2.5	1:320
Mex.3	-	-	-	0/4	0/4	3/4	4/4	-3.1	1:1200
Mex.4	-	-	-	0/4	0/4	2/4	4/4	-3.3	1:2000
Mex.5	-	-	-	0/4	2/4	3/3	4/4	-2.7	1:500

*Dosis Neutralizante 50%

**Número de líquidos con hemoaglutinación positiva / número de líquidos examinados.

Virus A/Equi 2 / México 3 : 220 DI 50%

Cuadro # 4

**Suero Neutralización de los diferentes sueros
frente a la cepa A/Equi 2 México 4.**

Sueros Inmunes	Diluciones de suero							DN 50*		
	Cepas	1:2	1:8	1:32	1:128	1:512	1:2048	1:8192	Lóg	Diluciones
Mex.1	0/4**	0/4	3/4	4/4	-	-	-	-	-1.3	1:20
Mex.2	-	-	0/4	1/4	4/4	4/4	-	-	-2.3	1:200
Mex.3	-	-	-	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	-2.4	1:250
Mex.4	-	-	-	0/3	0/4	1/4	4/4	4/4	-3.5	1:3200
Mex.5	-	-	-	0/3	0/4	4/4	4/4	4/4	-3.0	1:1000

*Dosis Neutralizante 50%

**Número de líquidos con hemoaglutinación positiva / número de líquidos examinados.

Virus A/Equi 2 /México 4 : 320 DI 50%

Cuadro # 5

Suero Neutralización de los diferentes sueros
frente a la cepa A/Equi 2 / México 5.

Sueros Inmunes	Diluciones de suero							DN 50*	
	1:2	1:8	1:32	1:128	1:512	1:2048	1:8192	Log	Diluciones
Cepas	1:2	1:8	1:32	1:128	1:512	1:2048	1:8192	Log	Diluciones
Mex.1	0/4**0/3	2/4	4/4	-	-	-	-	-1.5	1:32
Mex.2	-	-	0/4	4/4	4/4	4/4	-	-1.8	1:70
Mex.3	-	-	-	0/4	2/4	4/4	4/4	-2.7	1:500
Mex.4	-	-	-	0/4	1/4	3/4	4/4	-3.0	1:1000
Mex.5	-	-	-	0/4	0/4	4/4	3/3	-3.0	1:1000

*Dosis Neutralizante 50%

**Número de líquidos con hemoaglutinación positiva / número de líquidos examinados.

Virus A/Equi 2 / México 5 : 350 DI 50%

Cuadro # 6

Resultado de las pruebas de Suero Neutralización de los diferentes sueros frente a las cepas de virus.

Cepas	Virus	Mex.1	Mex.2	Mex.3	Mex.4	Mex.5
Mex.1	220*	-1.3**	-2.3	-2.4	-3.1	-3.3
Mex.2	32	-1.2	-2.7	-2.8	-3.0	-2.8
Mex.3	220	-1.3	-2.5	-3.1	-3.3	-2.7
Mex.4	320	-1.3	-2.3	-2.4	-3.5	-3.0
Mex.5	350	-1.5	-1.8	-2.7	-3.0	-3.0

*Dosis Infectante 50%

**Log de la Dilución de suero que representa la dosis de neutralización 50%.

Referencias.

- 1- Anonimo.-1965 Special Report Animal Influenza N°5
Communicable Disease Center, Atlanta Georgia + June 1965.
- 2- Anónimo.-1963 Methods for the examination of Poultry
Biologics Public. N°1038
Nat. Acad. Sci. Nat. Res. Council. Washington U.S.A.
- 3- Andrewes, G.-1964
Viruses of Vertebrates
Balliere Tindall Cox, 1 vol. London.
- 4- Cunha, R.G, González, L.G, Guzman M., Sandoval, D.R.-1966
Influenza Equina en México: Aislamiento y Estudio de la
Cepa A/Equi 2 /México 1 /66.
- 5- Cunha, R.G y González, L.G.-1967
Estudio de un brote de Influenza Equina en México causado
por el virus A/Equi 2.
Bol. Col. Nac. Med. Vet. y Zoot. México 4 ; 29-39.
- 6- Cruickshank, J.G.-1964
The Structure of Myxoviruses and its Biological
Significance In Cellular Biology of Myxoviruses Infections-
Edited by Wolstenholm G.E.W y Knight, J.
J.A. Churchill Ltd. London.
- 7.- Doll E.R. - 1963
Equine Influenza. In Equine Medicine and Surgery by J.F. Bone
et Ed. Amer Vet. Publication Inc. Illinois U.S.A.
- 8.- Lennette, E. Schmidt. Eds.-1964
Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases-3rd Ed.
Amer. J. Publ. Health. Ass. Inc. New York.
- 9.- Mc. Queen J.L. Davenport, F.M. Minuse, E.-1966
Studies of Equine Influenza in Michigan. 1963 I-Etiology
Amer. J. of Epidemiology 83 : 271-279.
- 10- Reed, L.J. y Muench, H.-1938
A method for estimating fifty per cent endpoint.
: Amer, Jour, Hyg. 27 : 493.
11. Sovina, O, Turova, B; Pou-tska F. e Nemeč, J.- 1957
Isolation of a virus causing respiratory disease in horses-Cal.
Epidem. 6 : 213. (also in Acta Virologica (Prana) 1958. 2 : 52-61.
12. Villaseñor V.R.-1967
Comparación de las cepas de Virus Influenza Equina A/Equi 2/Mé-
xico 1 - 5/66 por la prueba de Inhibición de Hemaglutinación.
Esc. Nal. Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M.- Tesis.
13. Waddell G.H; Teighland M.B; Siegel K.N.- 1963
A new Influenza virus Associated with equine respiratory disea
se. J. Amer Vet. Ass. 143 : 590.