

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**DETERMINACION DE LA INMUNIDAD CELULAR EN AVES
VACUNADAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
POR MEDIO DE LA PRUEBA DE MIF.**

T E S I S

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

EMETERIO SALDIVAR ZUÑIGA

**ASESORES: M.V.Z. LAURA PATRICIA NOE
M.V.Z. JUAN GAY GUTIERREZ**

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 1980



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.

C O N T E N I D O

A)	RESUMEN	3
B)	INTRODUCCION	4
C)	MATERIAL Y METODOS ..	7
D)	RESULTADOS	10
E)	DISCUSION	15
F)	CONCLUSION	18
G)	BIBLIOGRAFIA	19

**DETERMINACION DE LA INMUNIDAD CELULAR EN AVES
VACUNADAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
POR MEDIO DE LA PRUEBA DE MIF.**

SALDIVAR ZUNIGA EMETERIO

ASESORES:

M.V.Z. LAURA PATRICIA NOE

M.V.Z. JUAN GAY GUTIERREZ

RESUMEN:

Utilizando la prueba de Factor Inhibidor de la Migración (MIF) para determinar la inmunidad celular se examinaron 100 muestras de sangre, de pollos de engorda vacunados contra la Enfermedad de Newcastle (ENC), procedentes de diferentes granjas y rastros de la periferia de la Ciudad de México.

Se encontró un 84% de las muestras positivas y un 16% negativas frente al virus de la ENC, lo que indica que este virus es capaz de sensibilizar en forma específica a los linfocitos lo cual permite una detección de una respuesta inmune de tipo celular.

JULIO DE 1980

INTRODUCCION:

Las aves representan en la escala filogenica, la primera especie de vertebrados que posee una clara - separación en el sistema linfode, lo cual les da ca pacidad para responder ante un estímulo antigénico -- tanto en forma humoral, linfocitos B, como celular, linfocitos T; ambos tipos celulares derivan de una -- sola célula hematopoyética primitiva, localizada en el saco vitelino que alrededor del noveno día del desarrollo embrionario emigran para ser activadas en la médula ósea y de ahí al timo y a la bolsa de Fabalcio (9,10,11,20).

Estas células una vez activadas producen, en el - caso de los linfocitos B, células plasmáticas con capacidad de sintetizar anticuerpos específicos y en el caso de los linfocitos T sensibilizados, linfocinas - que coadyuvan en la eliminación del antígeno (13,15, 16,19,24).

La suma de ambas respuestas, tanto la celular como la humoral representan en forma global la reacción del organismo a un elemento antigénico extraño y permiten por lo tanto, para fines de diagnóstico, detectar y evaluar la respuesta inmune (6,7,26).

Para medir la respuesta inmune humoral en la en-

fermedad de Newcastle se han utilizado pruebas in vitro como : precipitación, fijación de complemento, inhibición de la hemaglutinación y sueroneutralización (2,12,27).

En la actualidad el desarrollo de técnicas in vitro, como el cultivo de leucocitos aplicado al estudio de la respuesta inmune de base celular en la enfermedad de Newcastle (3,14) ha abierto nuevos campos para evaluarla a través de la detección de las linfocinas. Estas sustancias son eliminadas al medio de cultivo por los linfocitos sensibilizados, al ponerse en contacto con el antígeno que estimuló su producción (17,25,26,28).

Actualmente, se conocen varios tipos de linfocinas con acciones específicas demostrables in vitro, entre ellas pueden mencionarse: factor de transformación, linfotoxina, factor reactivo cutáneo, factor de agregación de macrófagos, factor químico tático, inhibidores de la proliferación, interferón, factores mitogénicos y factor inhibidor de la migración de macrófagos (MTF) (13,25,27,28).

El MTF, es un ácido glicoprotéico cuyo peso se calcula entre 35 y 50,000 daltones, el cual permanece activo después del calentamiento a 56°C durante 30 minutos, no es dializable y su actividad no es modificada por la DNasa ni por la RNasa pero sí por la tripsina (17,20,22).

La detección in vitro de la actividad del MTF fue introdu

cida por George y Vanham trabajando con células peritoneales de cobayo sensibilizadas por antígenos específicos (3,4,5,6,7).

Otros estudios han demostrado que bastan pequeñas cantidades de linfocitos sensibilizados para producir el fenómeno (3,17, 18), y que éste resulta de utilidad en la evaluación in vitro de las respuestas de hipersensibilidad tipo IV (1,5,6,7).

El objetivo de este trabajo es determinar la respuesta inmune de tipo celular, en aves vacunadas contra la enfermedad de -- Newcastle por medio de la prueba de MTF.

MATERIAL Y METODOS:

MATERIAL: A) Sangre de 100 pollos de engorda vacunados contra -
La Enfermedad de Newcastle, (EMC) procedentes de -
diferentes granjas de la periferia de la Ciudad de
México.

B) Antígeno de Newcastle-----Vacuna de virus "vivo"

C) Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) Modificado

METODO: El medio de cultivo (MEM-Modificado) fue preparado de -
la siguiente manera (8).

- 1- 20 ml de MEM 5X
- 2- 3 ml de Glucosa al 3%
- 3- 5 ml de Bicarbonato de Sodio al 3%
- 4- 10 ml de Lacto Albúmina al 5%
- 5- 10 ml de Suero Fetal Bovino al 10%
- 6- 52 ml de Agua Bidestilada Esteril
100 ml.
- 7- 135 UI/ml. de penicilina.

Este medio fue ajustado a un p.H final de 8.2 usando una -
solución de bicarbonato de sodio al 2%.

Para la prueba de la inhibición de la migración se obtuvo
ron 10 ml de sangre de cada ave, usando como anticoagulante 1 ml

*Laboratorios DIFCO, Detroit, Mi. U.S.A.

de E.D.T.A al 1.5 % en Solución Salina Fisiológica.

La sangre se centrifugó en tubos de 7 mm de diámetro por 120 mm de largo, a 1,500 R.P.M durante 20 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en solución salina fisiológica. La suspensión fue centrifugada a 1,500 RPM por 20 minutos y lavada dos veces más en solución salina fisiológica. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el paquete de glóbulos blancos fue extraído con tubos capilares, a los que se les selló uno de sus extremos.

Los tubos capilares así preparados fueron centrifugados a 1,000 R.P.M durante 5 minutos y cortados en la interfase celular-líquido.

La parte que contenía los glóbulos blancos fue colocada en el fondo de una cámara de Bloom, sobre una gota de silicona estéril. En la cámara adyacente se colocó otro tubo, con glóbulos blancos, de la misma muestra.

Las cámaras fueron selladas con cubreobjetos y parafina: una de las cámaras, la testigo, fue llenada con el medio de cultivo arriba descrito y la otra, cámara problema, se llenó hasta la mitad con el medio de cultivo y se le adicionó 0.1 ml del antígeno (virus de ENC) terminándose de llenar con el mismo medio después de lo cual los orificios de las cámaras fueron selladas con parafina y éstas se mantuvieron en posición vertical durante 5-10 minutos. Finalmente las muestras fueron colocadas en ca

para húmeda e incubadas durante 24-48 horas a 37°C.

La lectura se realizó proyectando las áreas de migración - sobre un papel, delimitando éstas con lápiz y recordándolas procurando no tocar las áreas de migración con los dedos.

Luego se pesaron en una balanza de precisión y el área que correspondió a los cultivos sin antígeno, testigo, se tomó como el 100% de migración entre el testigo y el problema fue conside rado como índice de la inhibición de la migración. Valores supe riores al 15% se consideraron como positivos a MIF.

No. 2 y en el cuadro No. 2 y en las muestras negativas fué apenas apreciable no llegando al porcentaje indicado por la técnica como mínimo positivo, observada en la foto No. 1 y el cuadro No. 3.

CUADRO No. 1

RESULTADOS Y TOTALES DE MUESTRAS TRABAJADAS:

No. De MUESTRAS PROBADAS.....100

No. DE MUESTRAS POSITIVAS..... 84

No. DE MUESTRAS NEGATIVAS..... 16

CUADRO No. 2

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA MIGRACIÓN DE LAS MUESTRAS POSITIVAS

<u>TOTAL DE MUESTRAS</u>	<u>PORCENTAJE DE INHIBICIÓN</u>
9.....	100%
1.....	91%
1.....	84%
2.....	80%
1.....	71%
3.....	70%
2.....	73%
1.....	70%
3.....	67%
10.....	63%
5.....	46%
1.....	40%
2.....	39%
6.....	38%
5.....	37%
3.....	36%
3.....	35%
4.....	34%
1.....	33%
1.....	32%
4.....	30%
1.....	29%
2.....	28%
3.....	26%
3.....	25%
1.....	24%
1.....	23%
2.....	22%
1.....	21%
2.....	20%
<u>TOTAL</u> 84	

Tomando como 100% de migración al control y restando el --
porcentaje del problema según se indicó en el método.

CUADRO No. 3

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA MIGRACION EN LAS MUESTRAS NEGATIVAS

<u>TOTAL DE MUESTRAS</u>	<u>PORCENTAJE DE INHIBICION</u>
2.....	14%
1.....	12%
1.....	11%
1.....	10%
1.....	9%
2.....	8%
1.....	7%
1.....	5%
3.....	4%
3.....	0%
<hr/>	
TOTAL 16	

Tomando como el 100% del testigo y restando el porcentaje del problema, según se indicó en el método.

DISCUSIÓN:

El Factor Inhibidor de la Migración (NIF) ha servido para demostrar la inmunidad celular en aves vacunadas contra la Enfermedad de Newcastle (5,16).

Esta se llevó a cabo en un medio de cultivo (NEM-Modificado) con el cual la migración fue franca en donde no tenía antígeno observándose un abanico y la inhibición se observó en donde sí había antígeno.

COMENTARIOS SOBRE LA TÉCNICA:

Los siguientes puntos técnicos pueden ser especialmente importantes para sucesivas aplicaciones de la prueba, aunque no se puede decir con seguridad que cualquiera de ellos es absolutamente esencial.

- 1) Con la modificación del medio del cultivo (NEM) y el ajuste de su pH a 8.2 se obtuvieron mejores resultados que a pH inferior (exp. personal).
- 2) La recolección de los glóbulos blancos se facilita, centrifugando la sangre en tubos de diámetro reducido, ie 7 mm.
- 3) El lavado de los glóbulos blancos con solución salina, evita que estos se aglutinen.
- 4) Para obtener una mayor cantidad de glóbulos blancos, es con-

veninete manipularlos lo menos posible.

- 5) Después de la recolección de los glóbulos blancos, se deben trabajar rápidamente para que no haya mortalidad.
- 6) La neutralización de la cámara húmeda ayuda a mantener la temperatura requerida para una buena migración de los glóbulos blancos.
- 7) La migración de los glóbulos blancos empieza dentro de los siguientes minutos a la incubación.
- 8) Fallas al rellenar los capilares significa decremento en la viabilidad celular y puede interferir con los resultados. — (experiencia personal).

Estos puntos se tomaron en cuenta en el análisis de la respuesta inmune de tipo celular contra la Enfermedad de Newcastle en aves, para la obtención de los resultados.

Al revisar los resultados del cuadro número 2 se nota que los porcentajes de inhibición de los animales positivos a la prueba de NTF fueron mucho más altos que el límite del 15% señalado por la técnica, lo cual es indicio de la sensibilidad que poseen los linfocitos T, circulantes de los animales muestreados.

La especificidad de la prueba queda demostrada al analizar

Los resultados negativos contenidos en el cuadro número 3, donde se puede observar que casi el total de los animales negativos a MTF mostraron 0% de la inhibición de la migración, es decir una migración similar en la cámara testigo y la problema. Y sólo dos de los animales muestreados se acercaron al 15%.

Lo anterior indica que el virus de la EMC es capaz de sensibilizar en forma específica a los linfocitos (6,7,10,11,25).

Este estado de sensibilidad, en los linfocitos permite la detección de una respuesta inmune aún en ausencia de anticuerpos, hecho que es común ya que la persistencia de los linfocitos es mucho mayor que el de los anticuerpos. (6,7,25).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestra la sensibilidad de la prueba de MTF. Por lo que sugiere se realicen pruebas comparativas que permitan valorar la eficiencia de esta técnica frente a las tradicionalmente utilizadas.

CONCLUSIONES:

La prueba de NTF demostró tener un 84% de sensibilidad para medir la respuesta inmune de tipo celular en la EMC; lo cual se considera como una prueba in vitro confiable, para la detección de Inmunidad de base celular.

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

- 1 - B. Banacerra F, *Cytophilic Immoglobulins and Delayed Hypersensitivity Federation Proceedings Vol. 27 No. 1 - 1968.*
- 2 - Beard, C.W. and Baugh Jr., M. *Immunity to Newcastle Disease. Am. J. Vet Res., 36:509-512 - (1975).*
- 3 - Cohen H.C. A.Goss, T. Yosida and Cohen: *Inhibition of Migration of tumor Cell in vitro by - Lymphokine containing supernatants the - Journal of Immunology printed in U.S.A Vol. 121 No. 3 1978.*
- 4 - David Yokon R. *Macrophages Migration Intersociety -- Symposium Federation Proceedings 27(1) 6-15 1968.*
- 5 - David J.R. *Migration Inhibitory Factor and Mediators of Cellular Hypersensitivity in - vitro Progress Immunology Ed. Bernard Amos. First International Congress of Immunology Academic Press P.P. 399-412 1971.*
- 6 - David J.R. Laurence H.S. and Thomas L. : *Effect of Sensitive Cells in the presence of antigen*

Journal of Immunology 93:274-278. -
1964.

- 7 - David J.R., Al-Askari, S. Lawrence, Thomas I. : The Specific of Inhibitions of Cell Migration by antigens Journal of Immunology 93: 264-274. 1964 .
- 8 - Gay Gutierrez Manuel. Departamento de Virología de - La U.N.A.M. : Comunicación Personal.
- 9 - Garza R.J. Aspectos Inmunológicos de La Enfermedad de Newcastle. Veterinaria Mex. 7: 45-49 (1976).
- 10- Glick B. The bursa of Fabricius a central Issue Bio Science 20:602-604 (1970).
- 11- Hammer, D.K. The immune System In chickens. Avian-Path. 3: 65-78 (1978).
- 12- Hanson R.P. Newcastle Disease. En Disease of Poultry, Ed, por M.S. Hofstad, 7 th. Ed. - the Iowa State University Press, U.S.A 1978.
- 13- Hebert, W.J. Veterinary Immunology Blackwell Scientific Publications Londres, 1974.

- 14- López L.M. *Estudio comparativo entre la prueba intradérmica y prueba de MIF para - detección de tuberculosis en ganado Bovino. Tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México., D.F. 1978.*
- 15- Kramer, T.T. *Cell mediated immunity AMJ. Vet. -- Res, 36: 492-493- (1975).*
- 16- Leslie G.A. *Ontogeny of the chicken Humoral Immune Mechanism A.M.J. Vet. Res, 36:482-485 (1975).*
- 17- Morita T.C. Okada; Izma, and M Soekama of Macrophage-Migration Inhibition test for Newcastle Disease virus in chickens. *Avian Disease Vol. 20 No. 2: 230-235. 1975.*
- 18- Nancy Adelman, Stanley Cohen; and Takeshi Yokida : - *Strain Variations in murine MIF productions the Journal of Immunology -- printed in U.S.A. Vol. 121 No. 1 1978.*
- 19- Perelman A.B. y López C.T.E. *Efecto de una vacunación con virus vivo ó virus inactivado de la ENC sobre la inmunidad materna y - su relación con la resistencia a dicha*

- 20- Peterson, R.D.A. *The ontogeny of the Immune system.*
A.M.J. Vet. Res. 36: 486-487 (1975).
- 21- Rocklin R.E. *Production of Migration Inhibitory -
Factor by Non Dividing Lymphocytes. -
The Journal of Immunology Printed in --
U.S.A. Vol. 110 No. 3 1973.*
- 22- Roy A. Fox Douglas S. Gregory, and Joseph D. : *Feldan
Macrophage Receptors for Migration --
Inhibitory Factor (MIF) Migration sti-
mulatory Factor (MSM). And Agglutinating-
Factor the Journal of Immunology. Vol.
112 No. 5 1974.*
- 23- Schamartz, L.D. *Manual de Sanidad Avícola Unión tipog-
ráfica Editorial Hispano Americana -
México, D.F. 1974.*
- 24- Timms, L. and Alexander D.J. : *Cell Mediated Immune -
Response of chickens to Newcastle Di-
sease Vaccines. Avian Path; 51-59(1977).*
- 25- Tizant I. and R.: *Veterinary Immunology Saunders. ---
Philadelphia, London, Toronto 1977.*
- 26- Tron Fierros M.J.: *La prueba de MIF para el diagnósti-
co de Brucelosis Porcina. Facultad de*

*Medicina Veterinaria y Zootecnia -
1980.*

- 27- *Vonziegler Nava Alfonso: Estudio Comparado de Métodos para diagnóstico de Laboratorio de La Enfermedad de Newcastle . 1954.*
- 28- *Milster. Newmañ² Salmon Gordon³ Ulrich Hammerling, Anna Senik, and Barry R. Bloom.: Production de Migration Inhibition Factor (MIF) - and in induce of plas minogeno of Cell in MLC the Journal of Immunology prited in U.S.A. Vol. 120 No. 3 1978.*