



43
281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**

**MANUAL ILUSTRADO DE PRACTICAS DE
VIROLOGIA VETERINARIA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A

ANTONIETA AIDA JAVIER GONZALEZ

ASESOR DE TESIS:

**MVZ. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ
RODRIGUEZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
MATERIAL Y METODOS	4
UNIDAD 1	
COLECCION Y ENVIO DE HUESTRAS	6
1.1 Colección y conservación de muestras	11
1.2 Envío de muestras al laboratorio	18
1.3 Rotulación	18
1.4 Nomenclatura de los cuadros de las principales enfermedades virales	23
Cuadro 1 Enfermedades en aves	24
Cuadro 2 Enfermedades en bovinos	25
Cuadro 3 Enfermedades en caninos	29
Cuadro 4 Enfermedades en cerdos	31
Cuadro 5 Enfermedades en felinos	34
Cuadro 6 Enfermedades en equinos	35
Cuadro 7 Enfermedades en ovinos	37
UNIDAD 2	
EQUIPO UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA	39
2.1 Material y equipo utilizado en el Laboratorio de Virología	41
2.2 Lavado de material	53
2.3 Esterilización de material	55

UNIDAD 3

INOCULACION DE ANIMALES DE LABORATORIO POR DIFERENTES VIAS.	57
3.1. Vías de inoculación.	63
3.2. Animales de laboratorio.	64
3.3. Observación después de la inoculación.	68
3.4. Titulación	70
3.5. Técnicas de inoculación en animales de laboratorio.	74

UNIDAD 4

INOCULACION DE EMBRIONES DE POLLO POR VARIAS RUTAS CON DIFERENTES VIRUS AVIARIOS.	79
4.1. Desarrollo del embrión.	82
4.2. Anatomía y fisiología.	83
4.3. Inoculación del embrión.	90
4.4. Vías de inoculación (usos)	97
4.5. Técnicas de inoculación.	100
4.6. Cosecha de líquidos.	107
4.7. Técnicas de cosecha.	109
4.8. Titulación	111
4.9. Propagación de varios virus en embriones de pollo	113

UNIDAD 5

PREPARACION DE CULTIVOS CELULARES Y DE ORGANOS	114
5.1. Efectos de los virus en las células.	117

5.2 Métodos para determinar el crecimiento viral	122
5.3 Clasificación	124
5.4 Medios de cultivo	126
5.5 Fuentes de tejido para cultivo	127
5.6 Preparación de células para cultivo	128
5.7 Preparación de cultivos	131
5.8 Titulación	138
5.9 Recuento celular	139
5.10 Conservación	141

UNIDAD 6

HEMOAGLUTINACION E INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION	145
6.1 Hemoaglutinación	147
6.2 Factores que influyen en la hemoaglutinación	149
6.3 Hemoaglutinación pasiva o indirecta	151
6.4 Inhibición de la hemoaglutinación	154

UNIDAD 7

INMUNOFLUORESCENCIA	160
7.1 Algunas aplicaciones de la Inmunofluorescencia	161
7.2 Inmunofluorescencia Directa	165
7.3 Inmunofluorescencia Indirecta	173

UNIDAD 8

DESINFECTANTES	176
8.1 Tipos de desinfección.	179
8.2 Desinfección de tipo físico.	185
8.3 Desinfección de tipo químico	188
8.4 Desinfectantes usados en la emergencia de enfermedades cuarentenables	192
8.5 Protección personal contra el efecto de los distintos desinfectantes por utilizar.	194

UNIDAD 9

PREPARACION Y UTILIZACION DE VACUNAS	195
9.1 Inmunidad activa	196
9.2 Vías de administración	199
9.3 Tipos de vacunas	204
9.4 Inactivación y atenuación de microorganismos utilizados en la elaboración de vacunas.	206
9.5 Manejo de las vacunas.	208
9.6 Recomendaciones útiles en la aplicación de las vacunas.	210
9.7 Fracasos de la vacunación.	212

APENDICE

A. Reactivos básicos	221
B. Medios de crecimiento y mantenimiento	228
C. Reactivos para serología.	233

D. Tinciones	233
E. Reactivos miscelaneos	234
DISCUSION	235
REFERENCIAS	237

INDICE DE FIGURAS

		Pag.
1.1.A	Selección de la muestra adecuada	8
1.1.B	Manejo adecuado de especímenes	8
1.2	Factores que ayudan a un aislamiento exitoso	9
1.3	Tejidos por los que el virus muestra predilección.	12
1.4	Colección de especímenes clínicos (exudados)	17
1.5	Envío de material biológico al Laboratorio de Virología	20
2.1	Inoculación de animales	42
2.2	Inoculación de cultivo celular	44
2.3	Inoculación en cultivo celular	45
2.4	Inoculación en cultivo celular	46
2.5	Material general	48
2.6	Sistema de microtitulación	50
3.1.A	Cultivo en embrión de pollo	58
3.1.B.C	Preparación de medios hísticos	59
3.2	Factores que se toman en cuenta al utilizar animales de Laboratorio	60
3.3	Usos del ratón lactante y del adulto	65
3.4	Otros animales de Laboratorio.	67
3.5	Otros animales de Laboratorio.	69
3.6	Manejo del animal antes de la inoculación (tranquilización)	75
3.7	Diferentes vías de inoculación	76
3.8	Diferentes vías de inoculación	78
4.1.A	Propagación del virus.	81

4.4.B	Titulación	81
4.1.C	Fuente de tejido	81
4.2	Desarrollo del embrión (0-10 días)	86
4.3	Desarrollo del embrión (11-18 días).	87
4.4	Factores que influyen sobre el crecimiento de virus	89
4.5	Determinación de la viabilidad y edad del embrión	90
4.6	Estructuras del embrión.	93
4.7	Algunos efectos patológicos en el embrión de pollo	95
4.8.A	Inoculación en saco alantoideo	101
4.8.B	Inoculación en saco amniótico.	101
4.9.A	Inoculación en saco vitelino	104
4.9.B	Inoculación en MCA	104
4.10	Inoculación en el propio embrión	106
5.1	Fuentes de células vivas para multiplicación viral	115
5.3	Preparación de cultivo de órganos (traquea)	125
5.4	Cultivo celular.	129
5.5	Cultivo de órganos (riñón)	132
5.6	Aparato para cultivo de órganos.	137
5.7	Recuento celular	140
6.1	Ejemplo de Inhibición de la hemoaglutinación	146
6.2	Prueba de hemoaglutinación (fundamento)	148
6.3	Prueba de hemoaglutinación (procedimiento).	153

6.4	Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (fundamento)	155
6.5	Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (procedimiento)	159
7.1	Colorantes utilizados en la prueba de inmunofluorescencia	163
7.2	Reacción de inmunofluorescencia	166
7.3	Prueba directa de inmunofluorescencia (diagnóstico de rabia)	168
7.4	Prueba indirecta de inmunofluorescencia (diagnóstico de virus de la leucemia felina)	175
8.1	Secuencia para el procedimiento de limpieza y desinfección	180
8.2	Diferentes tipos de haz para aspersión	182
8.3	Acción letal de la luz ultravioleta	187
9.1	Vías de aplicación de las vacunas (ovino ; aves)	200
9.2	Vías de aplicación de las vacunas (equino)	201
9.3	Vías de aplicación de las vacunas (ovino, cerdo)	202
9.4	Como llenar una jeringa	203

INDICE DE DIAGRAMAS

	Pag.
Nb. 1 Departamento para la preparación de cristalería	52
Nb. 2 Laboratorio de diagnóstico	62
Nb. 3 cosecha y conservación de líquidos	108

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

La elaboración de este "Manual Ilustrado de Práctica de Virología", tiene el propósito de familiarizar al estudiante que por vez primera estará en contacto con este tipo de microorganismos, los cuales requieren para su identificación de una metodología muy especial.

Para la realización de este manual se tomaron en cuenta las necesidades que la materia de Virología requiere en su parte teórica, la cual se ve apoyada en gran medida por la parte práctica, por lo que es necesario familiarizar al alumno con el estudio y manejo adecuado de los virus, así como con las técnicas y procedimientos para obtener un diagnóstico acertado de las enfermedades virales, ya que en algunas ocasiones los diagnósticos resultan erróneos por no tener los conocimientos básicos de los virus.

Debido a que muchos de estos diagnósticos se basan ya sea en el aislamiento viral o bien, por pruebas serológicas rápidas, es necesario que el alumno tenga el conocimiento básico en lo que se refiere al material de laboratorio para así poder obtener un diagnóstico acertado.

Ya que en el país, la mayoría de este tipo de pruebas son llevadas a cabo o asesoradas en gran parte por el M.V.Z.; se ve la necesidad de que exista un manual ilustrado, al cual el alumno pueda recurrir y le sirva de apoyo y guía en su práctica profesional para orientar sus diagnósticos, o para llevar a cabo alguna investigación relacionada con esta área, por ejemplo: titular, valorar vacunas, aislar virus, preparar sueros inmunes, etc.

También servirá para conocer el manejo y la forma adecuada de tomar y enviar las muestras que deberán ser remitidas a un centro de diagnóstico, así como la correcta interpretación de los resultados.

Además orientará al alumno acerca de las medidas de desinfección y profilaxis en caso de brotes de cualquier enfermedad exótica, enzoótica y epizootica, con el fin de evitar la diseminación del virus, tipo de desinfectante a usar y método de desinfección más recomendado de acuerdo al caso de que se trate. Así mismo a llevar a cabo un buen manejo y mantenimiento de los animales empleados en el laboratorio, por lo que es necesario conocer las principales vías de inoculación, para título de vacunas, aislamiento viral o diagnóstico de las enfermedades virales.

O B J E T I V O S

- * Familiarizar al estudiante de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista con el material y equipo necesario en el Laboratorio de Virología.
- * Ayudar al alumno a conocer los procedimientos y técnicas básicas útiles en el Laboratorio de Virología.
- * Proporcionar apoyo y consulta a los alumnos que cursan la materia de Virología Veterinaria.
- * Orientar al alumno para que sea capaz de coleccionar y enviar muestras adecuadas de enfermedades virales para su diagnóstico.
- * Adiestrar al estudiante sobre el uso adecuado de los desinfectantes y métodos de desinfección usados en virología y por el Médico Veterinario en el ejercicio de su profesión.

MATERIAL Y METODOS

El procedimiento que se usó para la elaboración del presente manual fue el siguiente:

- Colección.
- Revisión bibliográfica de diferentes fuentes relacionadas con el área.
- Selección del material más adecuado.
- Ordenamiento del material.

Por consiguiente, el contenido desglosado en las siguientes unidades.

UNIDAD 1

Colección y envío de muestras.

UNIDAD 2

Equipo utilizado en el Laboratorio de Virología.

UNIDAD 3

Inoculación de animales de laboratorio por diferentes vías.

UNIDAD 4

Inoculación de embriones de pollo por varias rutas con diferentes virus aviarios.

UNIDAD 5

Preparación de monoestratos celulares y cultivo de órganos.

UNIDAD 6

Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación.

UNIDAD 7

Inmunofluorescencia.

UNIDAD 8

Desinfectantes.

UNIDAD 9

Preparación y utilización de vacunas.

UNIDAD 10

Apéndice.

U N I D A D I

COLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS

OBJETIVOS:

- Adiestrar al estudiante en la selección de la muestra más indicada a enviar a un laboratorio de diagnóstico, de acuerdo a la enfermedad o enfermedades virales presentes.
- Orientar al alumno para la realización de un envío adecuado de la muestra (rotulación, medios de transporte, precauciones, etc.).

INTRODUCCION.

La importancia de la colección y envío de muestras adecuadas, radica en poder demostrar principalmente el efecto y/o la presencia de partículas virales, así como, para llevar a cabo su aislamiento e identificación exitosa, con la finalidad de elaborar un buen diagnóstico de la enfermedad o caracterización del agente.

Para llevar a cabo la identificación del agente causal de una virosis; la selección de la muestra se hace de acuerdo al diagnóstico clínico y la etapa en la cual se encuentra la infección. -

La selección de la muestra adecuada, su transporte hacia el laboratorio y el uso de cultivos celulares apropiados, aumenta substancialmente las posibilidades de aislar el virus presente (5).

Fig. 1.1.A.

**Factores que determinan la efectividad de la
colección de especímenes:**

- . Tiempo de colección.
- . Tejido seleccionado.
- . Manejo y conservación adecuada de los especímenes (56).

Fig. 1.1.B.

Factores que ayudan a un aislamiento exitoso:

- *Colección del material adecuado en la etapa apropiada de la enfermedad.
- *Manipulación adecuada del material inmediatamente después de su colección y durante su envío al laboratorio.
- *Colección del material clínico o de autopsia más apto de contener el virus.
- *Método de colección, preservación y transportación de especímenes.
- *Selección del huésped de laboratorio más apropiado y susceptible (1,50). Fig. 1.2

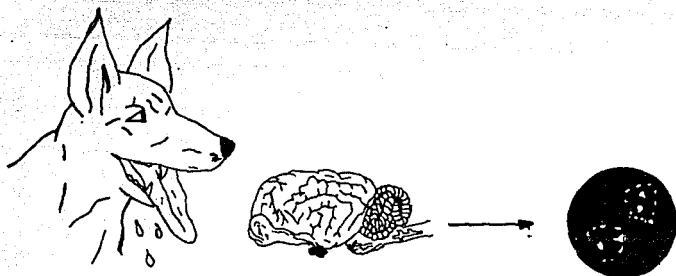


Fig. 1.1.A Selección de la muestra adecuada.

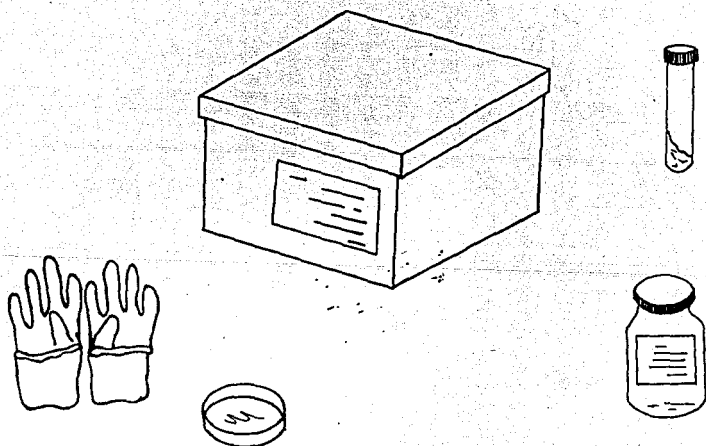
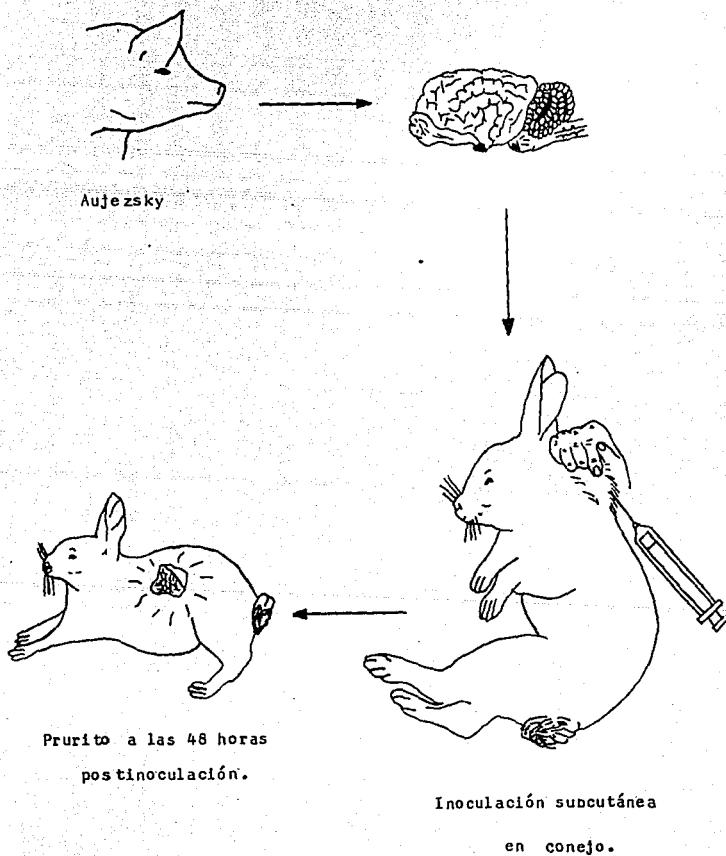


Fig. 1.1.B Manejo adecuado de especímenes.

Fig. 1.2 Factores que ayudan a un aislamiento exitoso.



Si se requiere aislar el agente, la toma ideal debe hacerse en el momento en que se supone que la concentración de virus es máxima, es decir, en la fase inicial de la enfermedad, antes de que haya producción de anticuerpos y disminuya la cantidad de virus presente (19,26,38,39,45,50,52,53).

Procedimientos básicos mediante los cuales puede establecerse el diagnóstico de laboratorio de una virosis.

- 1) Examen microscópico de tejido a fin de detectar alteraciones patológicas características del agente; estos son sencillos de realizar, pero presentan ciertas limitaciones. Son de valiosa ayuda diagnóstica.
- 2) Aislamiento e identificación del agente productor del síndrome. Son de aplicación limitada y constituyen una arma de investigación más que nada, pues rara vez estos métodos nos brindan mayor información que la que obtendríamos mediante procedimientos serológicos más rápidos y baratos.
- 3) Demostración de aparición o aumento del título de anticuerpos específicos durante el curso y después de la enfermedad. Son de mayor aplicación diagnóstica (50).

La decisión sobre cuál procedimiento habrá de usarse estará dada por la naturaleza de la infección, período de la enfermedad en que está el animal y por las facilidades con las que cuenta el laboratorio (30,42,50).

1.1 COLECCION Y CONSERVACION DE MUESTRAS.

La clase o tipo de muestra a coleccionar dependerá del síndrome presente, puede ser: lavados oculares, esputos, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, etc.

En caso postmortem se coleccionan aquellos tejidos por los que el virus muestra predilección. Fig. 1.3

Virus neurotrópicos: cerebro, médula espinal. Ej.: Rabia, Polio mielitis, Encefalomiélitis, Coriomeningitis linfocítica, etc.

Virus dermatrópicos: piel. Ej.: Viruela, Vaccinia, Varicela, - Herpes Zoster, Herpes Simple, etc.

Virus respiratorios: pulmón, líquido pleural. Ej.: Influenza, - Rubéola, Catarro común, etc.

Virus pantotrópicos: hígado, bazo. Ej.: Fiebre amarilla, etc.

La decisión sobre el tipo de espécimen a coleccionar en caso de enfermedades virales generalizadas, las cuales no presentan signos característicos es muy difícil (1,15,28,45,46,50,52,53).

Las muestras de animales muertos o sometidos a necropsia deben obtenerse en término de pocas horas, ya que en caso contrario los virus pueden ser destruidos por desecación, inactivación térmica o descomposición bacteriana (46). Deberán ser coleccionados en forma aséptica tomando todo tipo de precauciones (26,50, 52,53).

HISTOTROPISMO

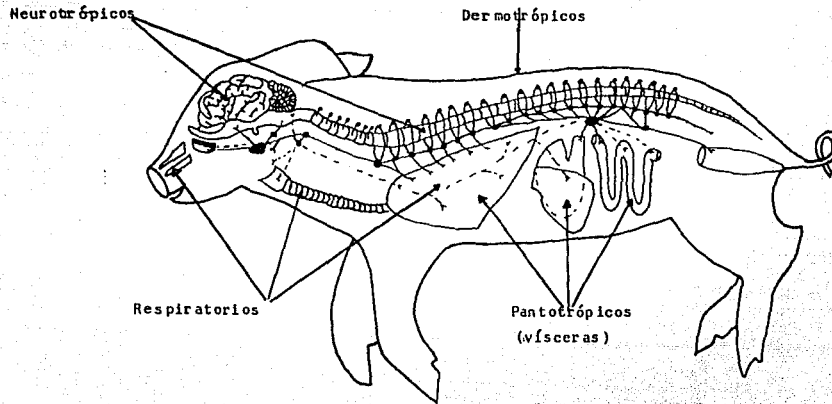


Fig. 1.3 Tejidos por los que el virus muestra predilección.

●Cadena ganglionar.

Pueden ser colectados en tarros, bolsas de plástico, tubos estériles de boca ancha, frascos con rosca, etc. (42,50,52,53,-59).

A. FROTIS.

Si se toman frotis, estos deberán prepararse en portaobjetos limpios, extendiendo el material en tal forma, que quede una capa fina y se deja secar al aire. Debe presentar elementos tisulares pues el diagnóstico dependerá de la presencia de cuerpos o células que muestren determinada alteración patológica (50).

Todo portaobjetos con material clínico debe identificarse - en forma clara incluyendo la condición en la que se obtuvo la muestra, a fin de que en el laboratorio se empleen los métodos tintoriales más apropiados. En caso de enfermedades altamente contagiosas, se debe instruir al personal de laboratorio que manipula estos portaobjetos (50).

B. MUESTRAS PARA HISTOPATOLOGIA.

Los tejidos para examen histopatológico deben ser recogidos tan pronto como sea posible después de la muerte para reducir a un mínimo el efecto de la autólisis, "NUNCA DEBEN SER CONGELADOS ANTES DE LA FIJACION" (42). El material de biopsia o autopsia se coloca en una solución fijadora tan pronto como sea posible, la solución de Zenker con formalina al 10% es un buen preservativo para propósitos generales, aunque existen preservativos para propósitos específicos (26,42,50).

Las muestras de los diversos órganos deben ser cortadas a menos de 1 cm. de espesor (de preferencia 7 mm.) y deben colocarse inmediatamente en por lo menos 10 veces su volumen en solución de formalina al 10%, tampón de fosfato para la fijación. Los tejidos se deben dejar en este fijado agitándolos de vez en cuando por lo menos 24 horas (42).

La muestra tomada para examen debe ser representativa de la lesión y si es posible debe incluirse parte de los tejidos vecinos aparentemente normales. Deben enviarse muestras de todos los órganos. Siempre es conveniente congelar y guardar parte del órgano, de tal forma que puedan llevarse a cabo pruebas ulteriores en espera de los resultados del examen de histopatología (42).

C. SANGRE.

Debido a que el diagnóstico serológico de las enfermedades virales se basan en la aparición o en el aumento del título de anticuerpos durante el curso de la enfermedad, es necesario por lo menos dos o más muestras de sangre durante las diferentes etapas de la enfermedad (sueros pareados), (9,30,46,50).

La primera en la fase aguda y la segunda de 10 a 14 días después, en infecciones virales en que los anticuerpos aparecen tardíamente, será necesaria una tercera muestra, lo cual se lleva a cabo generalmente un mes después de la primera (50).

Debe extraerse entre 10-15 ml. de sangre en animales de talla mediana, usando una jeringa estéril, no se usarán anticoagulantes ni preservativos, ya que pueden interferir con las reacciones serológicas (30,50). Una vez coagulada la sangre, se obtiene el suero por centrifugación y será congelado a temperatura de -10 a -20°C. (9,19,38,39,50,52,53).

"Nunca debe congelarse sangre completa pues de produce hemólisis de la misma" (39,50).

D. SUERO.

El suero debe manipularse con métodos asépticos ya que la presencia de microorganismos contaminantes pueden hacerlo un material insatisfactorio (9,50). Algunos preservativos son anti-complementarios y otros ejercen un efecto deletéreo sobre los virus, por lo que pueden obtenerse falsos positivos y negativos especialmente en reacciones de neutralización (9,50).

El suero puede guardarse durante cortos períodos a 4 °C y luego ser usado por el hecho de que existan sustancias neutralizantes termolábiles, puede ser guardado durante largos períodos a -20 °C (9,30,39,50). Los sueros mantenidos a temperaturas de -10° a -20°C., en congelador eléctrico puede depositarse en tubos con tapa o rosca u otro tipo de cierre, pero si se usa nieve carbónica es imprescindible emplear ampollitas selladas a la llama a fin de proteger el material contra efectos deletéreos del CO₂, ya que éste, tiene propiedades viricidas (26,50,52,53,56).

F. HECES.

Las muestras de torundas rectales a pesar de estar contaminadas deben manipularse en forma aséptica con el fin de no introducirles contaminantes y de exponer al personal de laboratorio innecesariamente; en caso de contenido intestinal, si es posible adicionarle antimicrobianos y antimicóticos (penicilina, estreptomycin, micostatin), (5,50).

Las heces se congelarán a -20°C . o serán refrigeradas para diagnóstico virológico; los hisopos rectales son refrigerados a 4°C . (59). Para tomar muestras de heces, se toma una bolsa de polietileno a modo de guante y se introduce el dedo índice en el recto del animal a muestrear, estimulando la defecación. Cuando se obtiene el volumen de materia fecal deseado se revierte la bolsa de polietileno, se cierra tratando de evacuar el aire y finalmente se rotula (59).

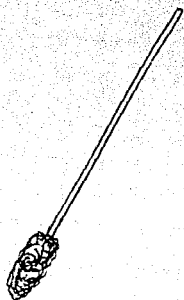
G. FLUIDOS.

El material fluido, como lavados faríngeos, líquido cefalorraquídeo y materiales sólidos como heces o tejidos, deben ponerse en recipientes estériles y refrigerarse inmediatamente (12, -50).

Para evitar el desecamiento de torundas, éstas deberán colocarse en un tubo que contenga una pequeña cantidad de caldo nutritivo o alguna sustancia similar (50). Fig. 1.4 A,B,C,D.

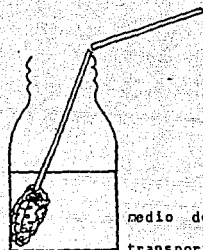
Fig. 1.4. COLECCION DE ESPECIMENES CLINICOS.

(exudados)



Exudado

Fig 1.4.A.

medio de
transporte.

Técnica de ruptura.

Fig. 1.4.B.

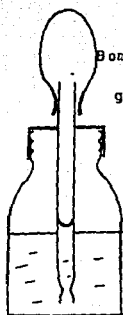
medio de
transporte.

Fig. 1.4.C.



lavado nasal.

Fig. 1.4.D.

Una vez en el laboratorio, las muestras se guardan preferiblemente en congeladores de -70°C . Un buen número de virus puede preservarse en congeladores de -20° a -25°C , pero la infecciosidad de otros disminuye considerablemente a estas temperaturas en pocos meses (38,39,50,59).

1.2 ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

Para el envío de muestras a un laboratorio de diagnóstico - deben tomarse en cuenta las siguientes consideraciones, en la mayoría de los casos las muestras deben tratarse como material potencialmente infeccioso (30).

El medio más eficaz y seguro para el envío de muestras al laboratorio es el mensajero directo, pero en algunas condiciones se requiere del servicio postal (tren, avión, etc.); cuando este último es el que se usa, las muestras deben reunir los siguientes requisitos: deben estar colocadas en recipientes dobles (dos cajas o bien una caja y bolsa de plástico), ya que esto mejora el aislamiento y aumenta la resistencia del recipiente (19,30). Entre las bolsas o frascos que contiene la muestra y la caja externa se coloca un material que amortigue los golpes y absorva la humedad (papel, aserrín, etc.), la caja externa se cierra en tal forma que todas las esquinas y tapas queden cerradas con cinta adhesiva, esto a su vez aumenta la resistencia del recipiente (30,42,59).

La refrigeración de muestras durante el envío por correo a veces es necesario para conservar la viabilidad de organismos y evitar la descomposición de los tejidos (30,39,42,59). El suero y materiales para aislamiento viral deben estar por lo menos refrigerados pero de preferencia congelados para su envío al laboratorio (30,39,59).

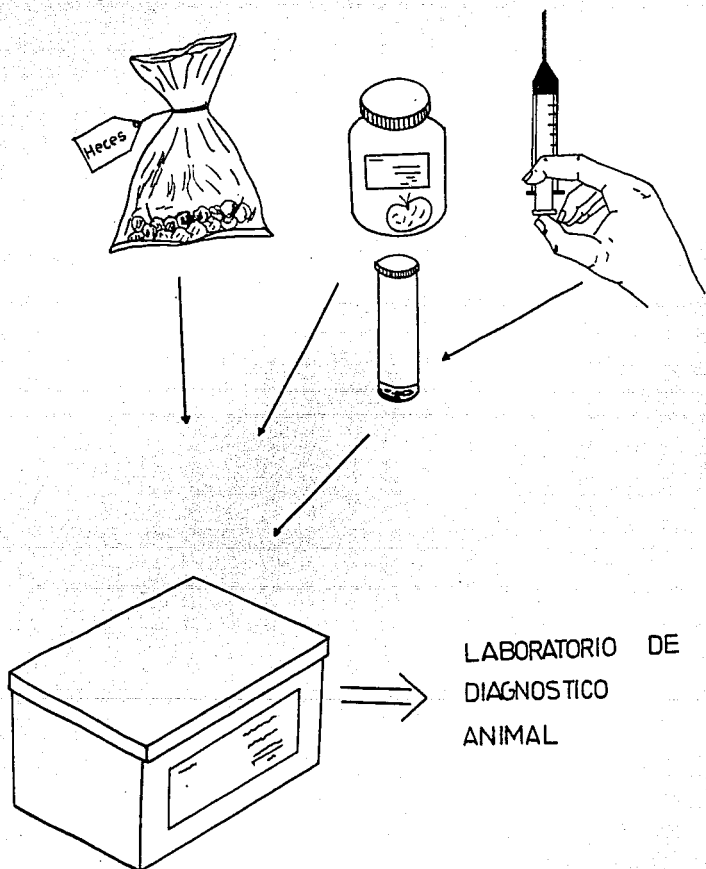
El paquete debe ser etiquetado: "MATERIAL DE CONGELADO - URGENTE", empacado en hielo seco y una explicación breve del contenido (material biológico, manéjese con cuidado, precaución, etc.), debe evitarse enviar frascos con tapas flojas o empaques defectuosos (30). Se incluye cierta información del paciente y de la muestra, siendo muy recomendable el envío de una buena historia clínica; si esto no es posible, debe acompañarse la muestra con detalles mínimos sobre la sospecha clínica a fin de procederse en el laboratorio a montar la prueba indicada y que ésta pueda interpretarse en la mejor forma (42,50). Fig. 1.5

Los ejemplares deben ser enviados por vía aérea o por ferrocarril expreso (19,52,53). Otras muestras conservadas en medios líquidos pueden enviarse por correo en recipientes fuertes que no excedan de 7.6 cm. de diámetro (19).

1.3 ROTULACION

Se puede llevar a cabo mediante el uso de tela adhesiva o etiquetas autoadhesivas, llevará los siguientes requisitos:

Fig. 1.5 Envío del material biológico al Laboratorio de Virología.



- * Establecimiento o número de protocolo.
- * Fecha de toma de la muestra.
- * Animal al que pertenece (nombre, número, etc.).

Datos anamnésticos:

-Generales:

Nombre y ubicación geográfica del establecimiento, tipo de explotación, cantidad de animales, antecedentes sanitarios.

-Particulares:

Especie, raza, sexo, edad, historia clínica, morbilidad, mortalidad, diagnóstico clínico, diagnóstico presuntivo, datos de la necropsia, resultados obtenidos, número de animales afectados, vacunaciones, tratamientos, casos similares en el área.

-Sobre la muestra:

Tipo de muestra, fecha de recolección, método, fecha de remisión, conservación, medios.

-Adicionales:

Datos de establecimientos vecinos, reservorios, vectores, etc. (19,42,59).

Las muestras deben llegar lo más pronto posible al laboratorio (15,56,59). Las que han sido sometidas a refrigeración deben llegar de preferencia dentro de las primeras 24 horas después de su extracción (15,59).

No es recomendable enviar muestras los fines de semana, períodos cercanos a vacaciones, días festivos y horas no hábiles - ya que se corre el peligro de que las muestras no se reciban, no se trabajen o se haga un mal procesamiento de ellas. Si esto no puede evitarse se debe llegar antes a un acuerdo previo con el laboratorio (19,30).

La obtención de las muestras debe hacerse por un Veterinario o bajo su dirección (19).

A continuación se resumen las principales enfermedades haciendo mención del material clínico adecuado a remitir en cada caso, así como, las pruebas diagnósticas a utilizar, tipo de animales susceptibles para su inoculación y aislamiento y el tipo de cultivo celular más apropiado para cada caso.

1.4 NOMENCLATURA DE LOS CUADROS DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES VIRALES

AF- anticuerpos fluorescentes = IF inmunofluorescencia.

FC- fijación de complemento.

HA- hemaglutinación.

HI- inhibición de la aglutinación.

ID- inmunodifusión.

HE- microscopía electrónica.

P.P precipitación en gel agar.

RIA Inmunovaloración.

RIE radio inmuno ensayo.

SN- suero neutralización.

NV- virus neutralización.

CPE Efecto citopático.

EEE Encefalitis Equina del Este.

EEO Encefalitis Equina del Oeste.

EEV Encefalitis Equina Venezolana.

REFERENCIA: 13,18,19,23,24,35,46,52,53,61.

ENFERMEDADES EN AVES

Cuadro No. 1

ENFERMEDAD	MATERIAL CLINICO	TIPO DE CULTIVO CELULAR, ANIMAL DE INOCULACION, PRUEBA DIAGNOSTICA.
BRONQUITIS INFECCIOSA.	Tráquea, pulmón, sacos aéreos, intestino y - pulmón.	Cultivo celular de pollo CPE. Embrión de pollo de 9-11 días de edad. VN, IF Directa, HI, ELISA, P.P.
ENCEFALOMIE- LITIS AVIAR	Cerebro, médula espi- nal.	Fibroblastos de embrión de pollo-CPE. Embrión de pollo-saco vite lino. Cultivo celular de riñón - de mono -CPE. VN, IF.
GUMBORO	Bolsa de Fabricio, - hígado, riñón, pulmón y sangre.	Cultivo celular de bolsa - de Fabricio, riñón y fibro blastos de embrión de pollo -placas 3-5 días. Membrana corioalantoidea - de aves. VN, IF, P.P.
INFLUENZA AVIAR	Pollo intacto muerto, pulmón, tráquea, sacos aéreos, riñón, bazo y suero.	Embrión de pollo-cavidad - alantoidea: aislamiento e identificación. VN, HI, ID doble.
LARINGOTRA- QUEITIS AVIAR	Pulmón, tráquea, exuda do traqueal y conjuntiva. val.	Células de riñón y pulmón de embrión de pollo-sinci- tios. Células Hela -CPE. Embrión de pollo membrana corioalantoidea-pústulas opacas. VN, AF, HE, P.P.

NEWCASTLE

Pulmón, corazón con saco pericárdico intacto, hígado, riñón, bazo y suero, cerebro, porción ter del intestino.

Cultivo celular de epitelio renal de pollo. Embrión de pollo; saco - alantoideo y amniótico. Histopatología. IF, HA, HI.

HAREK

Piel, bazo, tejido tumoral y otras células linfoides, extremidades de la pluma.

Fibroblastos de embrión de pavo. Células renales de pollo: inclusiones intranucleares. ID, IF, VN, IF Indirecta, P.P.

VIRUELA

Lesiones, costras.

Cultivo de membrana coria lantoidea: lesiones focales, inclusiones intracitoplasmáticas acidofilas. Signos clínicos, HE.

ENFERMEDADES EN BOVINOS

Cuadro No. 2

ENFERMEDAD	MATERIAL CLINICO	TIPO DE CULTIVO CELULAR, ANIMAL DE INOCULACION, PRUEBA DIAGNOSTICA.
ADENOVIRUS BOVINO	Tráquea, pulmón, exuda do nasal, conjuntiva, heces, ganglios linfá- ticos, raspado intesti- na.	Inoculación en cultivo ce- lular de testículo y riñón bovino - CPE, e inclusio- nes intranucleares tipo A. SN, VN, FC, P.P., HA pasiva, HI.
CORONAVIRUS	Intestino, heces.	Células renales de embrión bovino, células Vero, PK15, BEK. AF, HE.
DIARREA VIRAL BOVINA	Descarga nasal, heces, sangre, cornetes, gan- glios linfáticos e in- testinos, descarga ocu- lar, orina y fetos abor- tados.	Células de pazo embrionario, tráquea, cornetes de bovino. Membrana corioalantoidea - placas. AF, VN, SN, P.P.
ESTOMATITIS PAPULAR	Suero y tejido afectado.	Cultivo celular - CPE. Demostración de virus median- te ME.
ESTOMATITIS VESICULAR	Fluido de vesículas, sa- liva, mucosas y membranas afectadas durante la en- fermedad.	Cultivo celulares - CPE. Membrana corioalantoidea y cavidad amniótica de embrión de pollo. Inoculación de cerdos, bovi- nos, equinos y conejillo de Indias. VN, HI, AF, P.P., HE. SN.

FIEBRE AFTOSA	Fluido de vesículas, lengua, mucosas y membranas afectadas, sueros pareados, epitelio desprendido.	Células de riñón de cerdo, carnero y cabra, células de pulmón de conejo. Embrión de pollo-membrana corioalantoidea. Ratones lactantes de 6-8 días. FC, VN, AF, P.P.
FIEBRE CATARRAL MALIGNA	Sangre completa, animales febriles, adrenales, riñón, leucocitos y tiroides fresca, ganglios linfáticos, cerebro, mucosas afectadas, tracto digestivo, hígado.	Células de tiroides de ternero - sincitios vacuolados e inclusiones intranucleares tipo A. Inoculación intracerebral en conejos con tejido infectado. VN, FC.
LINFOSAR- COMA BOVINO	Sangre y ganglios linfáticos.	Cultivo de linfocitos estimulados por mitógeno. Cultivos linfoblásticos continuos. RIA, VN, IF, RIE, P.P.
PARAIN- FLUENZA 3	Exudado nasal, pulmón, sueros pareados.	Células HeLa, HEP-2, Vero y embriones de pollo; produce un tipo sincitial de CPE, inclusiones intranucleares e intracitoplasmáticas. VN, HI, AF, SN, P.P.
PARVOVIRUS BOVINO	Muestras fecales, raspado intestinal, intestino delgado, exudado nasal, tejidos y sangre - de fetos.	Células de riñón, pulmón y testículo fetal - CPE, inclusiones intranucleares tipo A. AF, SC, SN, HA.
PAPILOMA- VIRUS	Verrugas.	Embrión de pollo membrana corioalantoidea-aislamiento viral. Inoculación de cobayo y hamster.

**PSEUDO-
RRABIA**

Fluido edematoso, tronco nervioso de área afectada, médula espinal, encéfalo y porción de tejido subcutáneo.

Testículo y riñón de conejo-CPE.
Embrión de pollo-membrana corioalantoidea.
Inoculación subcutánea en conejos produce prurito en 2-3 días.
Aislamiento viral en conejos.
VN, AF, SN, P.P.

**RINOTRA-
QUEITIS
INFECCIOSA
BOVINA**

Exudado nasal, conjuntival, vaginal y prepucial, tráquea, pulmón y riñón. Hígado y pulmón fetal.

Cultivo celular CPE característico.
Células de embrión de criceto y suero fetal bovino.
Aislamiento viral.
AF, VN, AF indirecta, HA pasiva.

**ROTA VIRUS
BOVINO**

Muestras fecales diarreas, epitelio intestinal.

Cultivo celular de riñón de embrión bovino - aislamiento viral.
HA, HI, ELISA, FC, AF, NE.

ENFERMEDADES EN CANINOS

Cuadro Ib. 3

ENFERMEDAD	MATERIAL CLINICO	TIPO DE CULTIVO CELULAR, MATERIAL DE INOCULACION, PRUEBA DIAGNOSTICA.
CORONAVIRUS CANINO	Heces frescas, Intestino.	Células primarias de riñón canino. Histopatología. AF, ME.
DISTERPER CANINO	Exudado conjuntival, - orina, heces, intestino, estómago, vejiga, cerebro y pulmón.	Células de epitelio intestinal, estómago y pulmón-cuerpos de inclusión. Cultivo celular de riñón de perro. Embrión de pollo - MCA. Desmielinización y presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en cerebelo son característicos. AF, SN.
HEPATITIS CANINA	Hígado, orina, exudado nasal, sueros pareados, vesícula biliar.	Cultivo celular de riñón de perro-CPE, cultivo celular de riñón de cerdo-CPE e inclusiones intranucleares. Células primarias testiculares y de riñón de perro. VN, AF, FC.
HERPESVIRUS CANINO	Pulmón, riñón, hígado, secreciones nasales.	Cultivo celular -CPE. Células de pulmón y riñón canino. Células de pulmón humano, riñón de ternero y cerdo. Histopatología. VN, AF.
LARINGOTRA- QUEITIS CANINA	Exudado nasal y faríngeo, tráquea, pulmón y nódulos linfáticos retrofaríngeos.	VN, AF, HI.

PARVOVIRUS CANINO	Heces frescas, intestino, corazón, timo, bazo.	Cultivo de células caninas inclusiones intranucleares tipo A. HA, AF, HI, SN, NE.
RABIA	Cerebro, glándulas sali- vales. .	Cultivo celular de riñón - de criceto y ratón-CPE. Fibroblastos de embrión de pollo. Ornajo inoculado intracere- bral e intramuscular, ratón lactante intracerebral. Cuerpos de negri en neuronas de hipocampo mayor, tinción de giemsa y Seller. Inoculación intracerebral - con una suspensión de cere- bro. AF directa, FC, VN.

ENFERMEDADES EN CERDOS

Cuadro No. 4

ENFERMEDAD	MATERIAL CLINICO	TIPO DE CULTIVO CELULAR, ANIMAL DE INOCULACION, PRUEBA DIAGNOSTICA.
AUJESZKY	Cerebro, pulmón, tonsilas, bazo, riñón.	<p>Mostrato de testículo-conejo.</p> <p>Riñón de mono, conejo y cerdo.</p> <p>Riñón fetal-CPE en 46 horas, postinoculación.</p> <p>Embrión de pollo membrana - corioalantoidea-placas.</p> <p>Inoculación de conejos-prurito.</p> <p>AF, VN, SN, P.P.</p>
COLERA PORCINO	Riñón, bazo, tonsilas, nódulos linfáticos, cerebro y sangre.	<p>Células primarias porcinas de bazo, riñón, médula ósea, testículo, ganglios linfáticos, leucocitos y células PK-15.</p> <p>Inoculación de susceptibles e inmunes con sangre de cerdo infectada.</p> <p>AF, VN, FC, HI, HA, P.P. SN, ELISA.</p>
ENCEFALITIS HEMOAGLUTINANTE DEL CERDO.	Tonsilas, pulmón, estómago, intestino delgado, cerebro, médula espinal, sueros pareados.	<p>Células de riñón de cerdo-sincitios.</p> <p>AF, HI.</p>
ENFERMEDAD VESICULAR DEL CERDO	Fluido de vesículas, piel, mucosas y membranas afectadas, sangre con anticoagulante, epitelio vesicular y suero.	<p>Cultivo celular de riñón de cerdo CPE.</p> <p>Ratones lactantes recién nacidos-inoculación intracerebral e intraperitoneal.</p> <p>FC, VII, P.P. ME.</p>

ENFERMEDAD DE TESCHEN	Cerebro, médula espinal, intestino.	Células de riñón de cerdo-CPE. Embrioblastos de pollo. Embriones de pollo en membrana corioalantoidea-pústulas. Células testiculares de <u>co</u> <u>bayo</u> y conejo. VN,AF, P,P, Neutralización cruzado FC.
EXANTENA VESICULAR	Fluido de vesículas, mucosas y membranas afectadas, sangre con anticoagulante y sueros pareados, riñón, pulmón, <u>hígado</u> , testículo, amnios.	Cultivo de riñón fetal de cerdo. FC, VH, P.P.
GASTROENTE RITIS TRANS MISIBLE	Porción de yeyuno e ileón, heces, sueros pareados.	Células de testículo de cerdo-CPE. Células primarias de riñón, tiroides, testículo y glándulas salivales de perro. Frotis intestinal-atrofia de vellosidades. AF,SN,VH.
INFLUENZA PORCINA.	Exudado nasal, pulmón, tráquea, ganglios linfáticos bronquiales, sueros pareados.	Células primarias de pulmón de cerdo y riñón fetal porcino. Células de riñón de ternero. Fibroblastos de embrión de pollo. Embrión de pollo-cavidad - alantoidea. HI,AF,HA,FC, P.P.
PESTE PORCINA AFRICANA	Sangre, bazo, riñón, tonsilas, ganglios linfáticos: mandibulares, parótida, inguinal externo, gastrohepático y mesentéricos, líquidos tisulares, todas las secreciones y excreciones de <u>cerdos</u> infectados.	Monoestrato de medula osea roja y de glóbulos blancos de cerdo-CPE. Riñón de cerdo-CPE. Inoculación de susceptible. AF, FC, ELISA, P.P.

**PARVOVIRUS
PORCINO**

Tejido de feto (macerado, momificado y fetos vivos) y nacidos vivos, moco vaginal, tubo intestinal, - cerebro, pulmón, cornetes nasales, sueros pareados, ganglios linfáticos, hígado y placenta.

Cultivo primario de células testiculares, tiroideas fetales.
Cultivo primario de riñón de cerdo-inclusiones intranucleares y CPE.
HI-suero y fluidos fetales.
AF. VN.

ROTAVIRUS

Porción pequeña de intestino delgado, diarrea, - suero.

Células primarias de riñón de cerdo, Células PK-15.
Histopatología.
AF, ELISA, ME.

ENFERMEDADES EN FELINOS

Cuadro No. 5

ENFERMEDAD	MATERIAL CLINICO	TIPO DE CULTIVO CELULAR, ANIMAL DE INOCULACION, PRUEBA DIAGNOSTICA
CALCIVIRUS	Exudado nasal, orofaríngeo y ocular, pulmón y tráquea.	Cultivo celular de gato CPE. VN, AF, SN, P.P.
LINFOSARCOMA FELINO	Sangre fresca, médula ósea, suero, tumor.	AF, ELISA.
PANLEUCOPENIA FELINA	Intestino delgado, sangre, nódulos linfáticos, mesentéricos y bazo.	Línea diploide de timo felino. Cultivo celular de riñón de cerdo-CPE. Línea celular de riñón felino-(NLFK)- produce placas. Células felinas-inclusiones intranucleares. Hemograma, histopatología. VN, HI, AF, P.P.
PERITONITIS FELINA.	Sangre, suero y fluido peritoneal.	Líneas celulares continuas. Ratones lactantes-Intracerebral. AF, VN, P.P.
RINOTRAQUEITIS FELINA.	Exudado nasal, pulmón, traqueal, riñón, laringe.	Células de pulmón y riñón - felino-cuerpos de inclusión intranucleares tipo A. Inclusiones intranucleares tipo A en células epiteliales de membranas y mucosas afectadas. Histopatología. VN, HI.

ENFERMEDADES EN EQUINOS

Cuadro No. 6

ENFERMEDAD	MATERIAL CLINICO	TIPO DE CULTIVO CELULAR, ANIMAL DE INOCULACION, PRUEBA DIAGNOSTICA.
ADENOVIRUS EQUINO	Secreción lagrimal, nasal.	Células de riñón fetal - equino-CPE. IF, HI, VN.
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	Suero, sangre completa o leucocitos.	Cultivo primario de leucocitos equinos-CPE. FC, P.P., AF, RIE, Pda de Coggins.
ARTERITIS VIRAL EQUINA	Secreción conjuntival, nasal, sangre, hígado y bazo de fetos abortados.	Cultivo de células de riñón de criceto, conejo y equino. VN, FC.
EEE EEO EEV	Tejido cerebral, suero, plasma del animal febril, líquido cefalorraquídeo, sangre, secreciones nasofaríngeas.	Embrión de pollo cavidad - arantoidea - muerte 24-40 horas. Ratones, cobayos y conejos de 1 día. Inoculación intracerebral de ratones adultos o lactantes. Histopatología. VN, FC, AF, HI.
ENCEFALITIS	Cerebro, suero.	Ratones lactantes intracerebralmente les causa encefalitis y muerte. VN, FC, HI.
EXANTEMA COITAL EQUINO	Fragmentos de mucosas - afectadas de vulva y - pene, secreción vaginal.	Cultivo celular de equino CPE en 24 horas postinoculación. VN.

HERPESVIRUS (Rinoneumonitis).	Exudado nasal y ocular, examen de células exfoliadas del aparato respiratorio, sueros pareados, tejido pulmonar y hepático de fetos abortados. Bazo y ganglios linfáticos.	Cultivo celular de equino y conejo - CPE. VN, FC, HI, AF.
INFLUENZA EQUINA	Exudado nasal, sueros - pareados, muestras nasofaríngeas.	Cultivo primario de células renales de equino, bovino y mono. Aislamiento e identificación del virus. HI, HA, VN.
PESTE EQUINA AFRICANA	Sangre en estado febril, bazo, sueros pareados, riñón y ganglios linfáticos.	Células Vero y NS- Placas. Células BHK - CPE. Inoculación intracerebral en ratones. Inoculación intravenosa en caballos susceptibles. VN, FC, HA, P.P.
ROTA VIRUS	Heces.	Cultivo celular equino. AF, FC, P.P.
VIRUELA EQUINA	Piel y mucosas afectadas.	Cultivo celular equino. Microscopía electrónica.
RABIA O DERIRIENGUE	Cerebro, glándulas salivales, sueros pareados.	Cerebro - corpúsculos de Negri. Cultivo de células nerviosas de embrión de pollo. Hamster, ratón, conejo - Intracerebral. AF, VN, HE.

ENFERMEDADES EN OVINOS

Cuadro No. 7

ENFERMEDAD	MATERIAL CLINICO	TIPO DE CULTIVO CELULAR, ANIMAL DE INOCULACION, PRUEBA DIAGNOSTICA.
ECTINA CONTAGIOSO	Biopsia de áreas afectadas, suero.	Cultivo de monoestrato de piel embrionaria de borrego, riñón de borrego. Células testiculares de bovino-CPE característico. FC, AF, SN, P.P., ME.
ENFERMEDAD DEL VALLE DE RIFF	Hígado, sueros pareados, sangre completa, bazo y cerebro.	Hígado-inclusiones intranucleares, focos necróticos. Inocular ratones mueren en 2-4 días. VN, FC, AN.
HERPESVIRUS	Bazo, pulmón e hígado, exudado nasal y vaginal.	Cultivo celular -CPE.
LENGUA AZUL	Material colectado de lesiones.	Células de riñón ovino y bovino-CPE. Embrión de pollo. Inoculación de ovejas con sangre infectada. FC, SN, P.P.
NEUMONIA PROGRESIVA (Maedi/Visna)	Pulmón, cerebro.	Cultivo celular -CPE. Aislamiento viral. VN, FC, P.P.
SCRAPIE	Médula espinal, cerebro.	Cultivo celular de astrocitos no hay CPE. El diagnóstico se basa en signos clínicos y cambio patológicos en SNC.

VIRUELA

Suero, sangre, lesiones,
costras.Cultivo de células de -
riñón de ovino y caprino
CPE.Cultivo celular de piel,
riñón y testículo de -
ovino, caprino y ternero
CPE, inclusiones intraci
toplasmáticas.

Embriones de pollo.

FC, AF, SN, P.P., HE.

UNIDAD 2

EQUIPO UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA

OBJETIVOS:

- . Familiarizar al estudiante con el material y equipo utilizado en un Laboratorio de Virología Veterinaria.
- . Adiestrar al estudiante en el manejo y cuidado adecuado del material (preparación, limpieza, etc.).

INTRODUCCION:

La selección y uso adecuado del material de laboratorio es fundamental para el éxito del experimentado. La eficacia del trabajo exige disponer de material adecuado en cantidad y calidad, tenerlo en buenas condiciones, convenientemente preparado e identificado y bien ordenado para poder usarlo, inmediatamente, en cualquier momento (26).

El lavado de material empleado en cultivo de tejidos, es uno de los procesos en los cuales se debe exigir el mayor esmero, ya que las superficies de cristal pueden estar limpias tal como

habitualmente se define la limpieza y sin embargo ser completamente inadecuadas para los métodos de cultivo de tejidos (37).

El material de cristalería que debe emplearse en un laboratorio de cultivo de tejidos, debe ser de buena calidad, ya que la toxicidad del vidrio, impide el crecimiento celular. A menudo, células que se multiplican abundantemente en ciertas áreas de la superficie de cristal mueren en áreas vecinas, a veces las áreas tóxicas no afectan a las células hasta que se adhieren y comienzan a multiplicarse (26,37,50).

Gran parte de las técnicas requieren de material estéril por lo que deben observarse precauciones de asepsia en el manejo del mismo para evitar infecciones. Todo material debe esterilizarse inmediatamente después de su empleo, para que pueda ser manipulado sin peligro de infección cuando se vaya a limpiar o preparar para su uso ulterior (26).

2.1 MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA

INOCULACION DE ANIMALES	FUNCION
. Animales no infectados. Fig. 2.1.A	
. Animales infectados. Fig. 2.1.B	
. Incinerador - autoclave	Depositor de cuerpos infectados.
. Instrumentos (navaja, tijeras, forceps), <u>facilitadores</u> .	Examinación de animales <u>postmortem</u> .
. Esterilizador.	Esterilización, desinfección de instrumentos.

INOCULACION DE EMBRIONES

. Ovoscopio (Prueba fertilidad). Fig. 2.1.C	Examinación e inoculación de embriones.
	Inoculación de huevos.
. Incubadora de huevos:	
No infectados. Fig. 2.1.D	
Infectados Fig. 2.1.C	Incubación de huevos inoculados.
. Disección del embrión.	

Fig. 2.1 INOCULACION DE ANIMALES



Fig. 2.1.A.

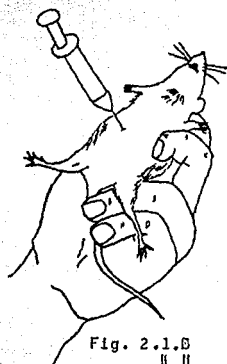


Fig. 2.1.B

INOCULACION DE EMBRIONES

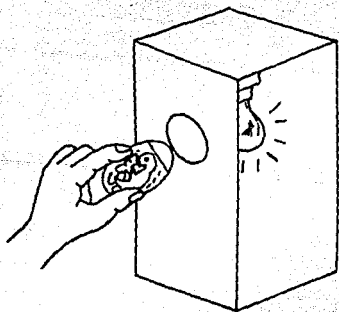


Fig. 2.1.C.

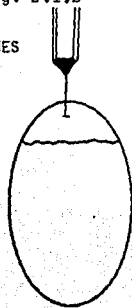


Fig. 2.1.C.



Fig. 2.1.D.

Fig. 2.2 INOCULACION DE CULTIVO CELULAR.

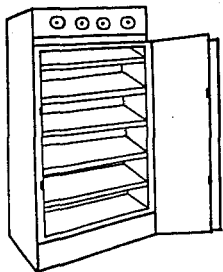


Fig. 2.2.A.

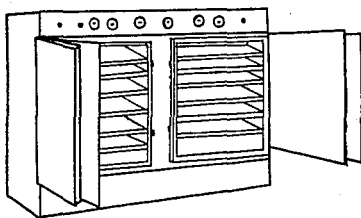


Fig. 2.2.B.

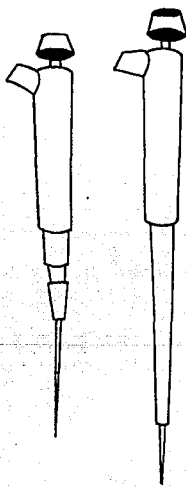


Fig. 2.2.C.

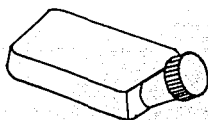


Fig. 2.2.D.

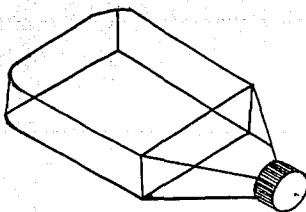
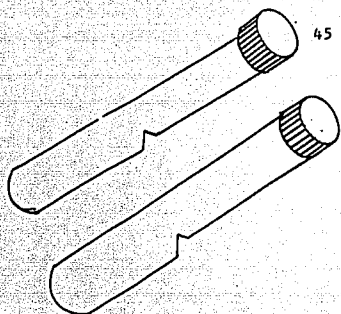
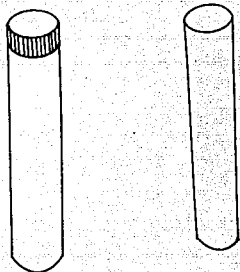


Fig. 2.2.E.





45

Fig. 2.3.A.

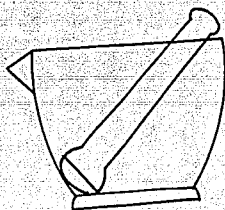
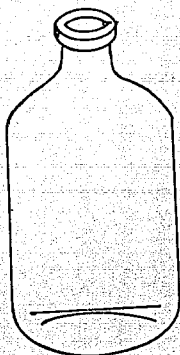


Fig. 2.3.D.

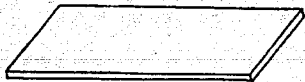
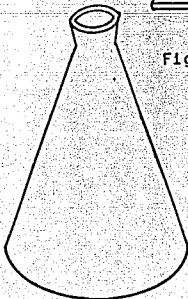


Fig. 2.3.E



Fig 2.3.E



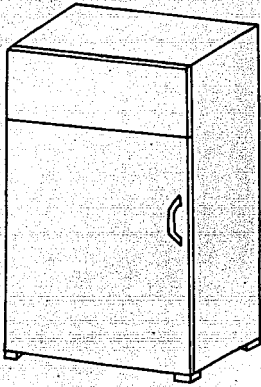


Fig. 2.4.A

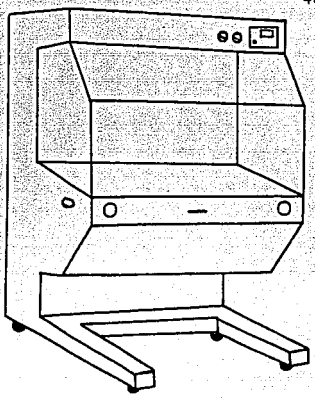


Fig. 2.4.B

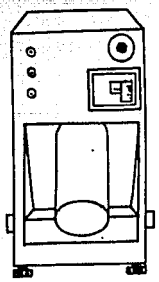


Fig. 2.4.C

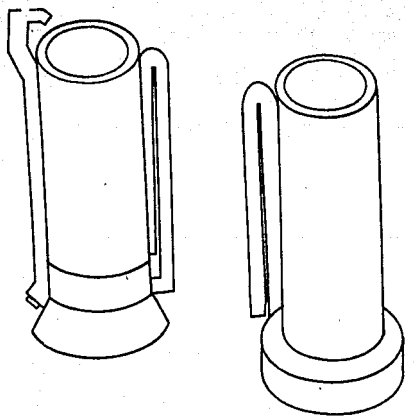


Fig. 2.4.D

- . Campana de flujo laminar.
Fig. 2.4.B
 - . Cuarto de seguridad.
- Preparación de cultivos celulares.
Manipulación de virus y especímenes.

GENERAL

- . Autoclave/esterilización.
 - . Balanza granatoria.
 - . Balanza analítica.
Fig. 2.4.C
 - . Lavapipetas.
Fig. 2.4.D
 - . Centrífuga refrigerada.
 - . Ultracentrífuga.
 - . Desionizador y destilador de agua.
 - . Homogenizador de sangre.
 - . Ph metro.
Fig. 2.5.A
 - . Liofilizadora.
Fig. 2.5.B
 - . Vibromezclador.
Fig. 2.5.C
 - . Tubos de serología.
- Esterilización de soluciones y cristalería, etc.
Preparación de medios y soluciones.
Preparación de medios y soluciones.
Preparación de especímenes y manipulación general en el laboratorio.
Purificación de virus (y serología).
Soluciones, preparación de medios y cristalería.
Especímenes y preparación de cepas virales.
Preparación de medios y soluciones.
Preparación de cepas virales.
Pruebas de aglutinación.

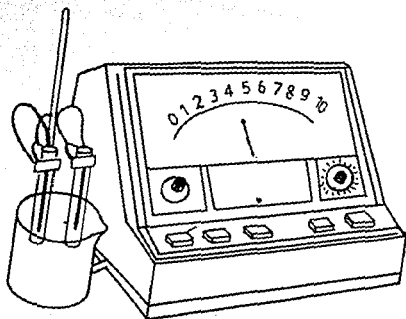


Fig. 2.5.A

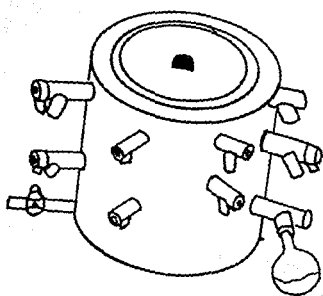


Fig. 2.5.B

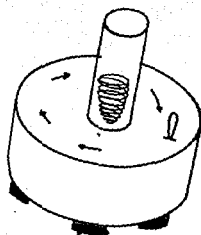


Fig. 2.5.C

. Sistema de mantenimiento
-20°C.

. Baño maría.

. Sistema de microtitulación
para microdiluciones; semi-
automática, automática.
Fig. 2.6

. Pipeta mecánica.
Fig. 2.6

Almacenaje y preparación de -
suero.

Inactivación de suero (56°C),
e incubación antígeno-anticuer-
po (37°C), etc.

Microdilutores.

Preparación inicial de dilucio-
nes de suero.

Referencia: 25,29,40,63.

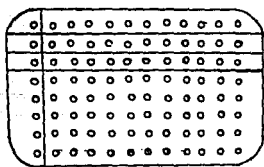
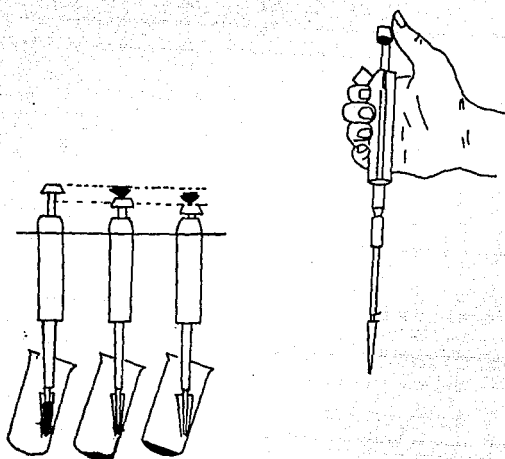


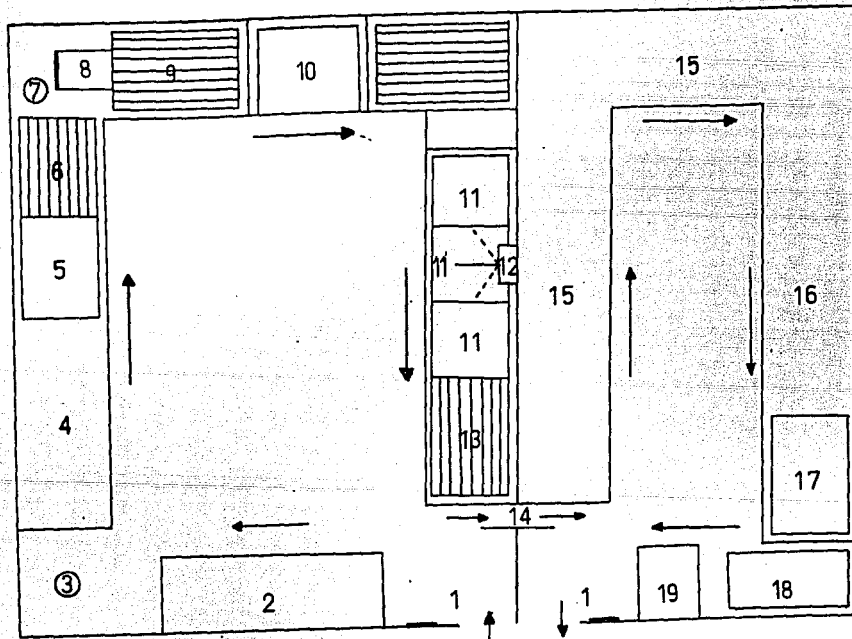
Fig. 2.6 Sistema de microtitulación.

DEPARTAMENTO PARA LA PREPARACION DE CRISTALERIA

Las flechas indican la dirección del flujo de sucio a limpio.

- 1.- Puertas (entrada y salida).
- 2.- Colección de cristalería sucia.
- 3.- Autoclave vertical para descontaminación.
- 4.- Colección de vidriería descontaminada.
- 5.- Tarja de acero inoxidable.
- 6.- Drenaje de 5.
- 7.- Lavador de pipetas automático.
- 8.- Cepillado de tubos y botellas.
- 9.- Tarja de acero inoxidable con doble drenaje.
- 10.- Secado de cristalería, caldera.
- 11.- Triple tarja de acero inoxidable con agua desionizada.
- 12.- Desionizador de agua.
- 13.- Drenaje para 11.
- 14.- Cabina de material limpio.
- 15.- Inspección de material de cristalería y empaquetado.
- 16.- Empaquetado y esterilización del material.
- 17.- Esterilización por calor húmedo del material de cristalería.
- 18.- Autoclave horizontal para esterilización del material limpio.
- 19.- Area de colección para material caliente. (Ver diagrama 1).

DEPARTAMENTO PARA LA PREPARACION DE CRISTALERIA.



Mitchel H.J. 1967. Virological Procedures.

DIAGRAMA 1.

2.2 LAVADO DE MATERIAL

Material de vidrio nuevo:

- 1.- Desempacar el material y enjuagar perfectamente con agua corriente. No usar escobillón, detergentes o abrasivos.
- 2.- Enjuagar con agua destilada, escurrir y dejar secar a temperatura ambiente.
- 3.- Preparar para esterilizar (5,41).

Material sucio no contaminado:

- 1.- Enjuagar con agua corriente.
- 2.- Pasar a un recipiente que contenga hipoclorito de sodio comercial (cloralex), cubrir el material totalmente con esta solución y evitar que se formen burbujas en el interior. - Dejar el material en estas condiciones durante 24 horas. - Solución de hipoclorito de sodio 1:10 en agua.
- 3.- Sacar y enjuagar exhaustivamente con agua corriente. Escurrir y sumergir en un recipiente que contenga solución 1:66 de ácido clorhídrico (HCL), en agua. Observar las mismas precauciones que el punto anterior. Dejar durante las 24 horas.
- 4.- Sacar y enjuagar perfectamente con agua corriente. Tallar con escobillón y detergente no iónico (&X). Enjuagar exhaustivamente. Escurrir y sumergir en agua durante 5 minutos.

- 5.- Escurrir y secar en el horno. Preparar de acuerdo al material que se trate y esterilizar (5,41).

Material con líquidos o medios contaminados:

- 1.- Vaciar el líquido contaminado contenido en el material, en un recipiente metálico. Esterilizar ambos en autoclave a 20 libras de presión durante 30 minutos.
- 2.- Eliminar el líquido y proceder desde el punto 2 del caso anterior (material sucio no contaminado), para el lavado del material (5,41).

Tapones de hule nuevos:

- 1.- Sumergir los tapones en una solución de hidróxido de sodio - IN. Hervir durante 15 minutos.
- 2.- Enjuagar con agua corriente.
- 3.- Sumergir en una solución de HCL al 3% en agua. Hervir durante 5 minutos.
- 4.- Enjuagar con agua corriente y posteriormente con agua destilada.
- 5.- Escurrir y secar a temperatura ambiente.
- 6.- Meter los tapones en un frasco de vidrio, tapar sin apretar y esterilizar (5,41,50).

Tapones de hule y/o plástico usados:

- 1.- Lavar uno por uno con zacate corriente y detergente no iónico (7X).
- 2.- Enjuagar con agua corriente y posteriormente con agua destilada. Escurrir y dejar secar a temperatura ambiente.
- 3.- Meter los tapones en un frasco de vidrio, tapar, apretar y esterilizar (5,41).

2.3 ESTERILIZACION DE MATERIAL

La esterilización del material se lleva a cabo principalmente por dos métodos:

. Físicos:

-Calor húmedo (autoclave). En general 15 libras de presión, 120 °C durante 15 minutos. Este tipo de esterilización se utiliza para todo tipo de material (5,37,41).

-Calor seco (horno). En general 170 °C durante 45 minutos. Este tipo de esterilización se utiliza para material de vidrio (5,37,41).

-Radiaciones (37).

. Químico:

-Oxido de etileno (37).

LAVADO DE MATERIAL

- Detergentes; Stergene, 7X, microsolve, decon 25.

- Alcalis; jabón suave, trifosfato de sodio, carbonato de sodio y metasilicato de sodio (37).

U N I D A D 3

INOCULACION DE ANIMALES DE LABORATORIO
POR DIFERENTES VIAS

OBJETIVOS:

- . El alumno se adiestrará sobre el manejo adecuado de los animales comunmente utilizados en el laboratorio de virología.
- . El alumno utilizará la técnica de inoculación de virus más adecuada, para su propagación en los diferentes animales utilizados en el laboratorio de virología.

INTRODUCCION:

La inoculación de animales receptivos fue el primer procedimiento empleado para el cultivo de virus. Este método ha sido sustituido en parte por el cultivo en embrión de pollo o en medios hísticos, pero aún tiene la ventaja de que permite estudios olínicos, sistomatólógicos y epizootológicos de la enfermedad, (5,9,16,26,49,50,67). Fig. 3.1 A,B,C.

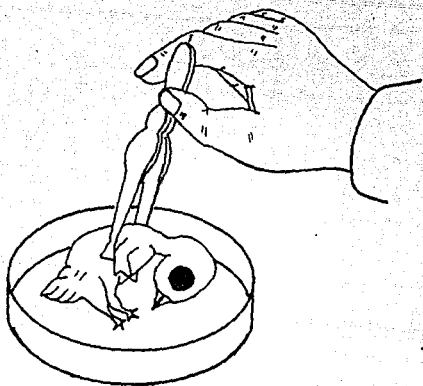


Fig. 3.1.A Cultivo en embrión de pollo.

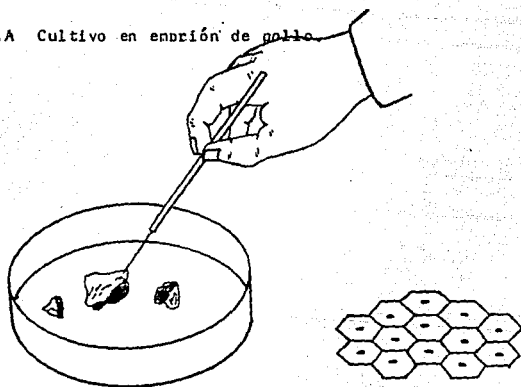


Fig. 3.1.B,C Preparación de medios hísticos.

En nuestros días la experimentación científica en sus aspectos básicos y aplicados ha aumentado la necesidad de utilizar animales para su realización. Esta experimentación muchas veces no sería posible realizarla en ausencia de los animales de laboratorio (5).

Los animales constituyen un excelente sistema para el aislamiento de algunos virus que no se multiplican ni en cultivos de células, ni en embriones de pollo, así como también para el estudio de la patogenicidad de las infecciones virales (5,12,26,37).

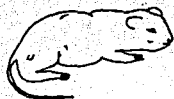
También proporcionan órganos y tejidos para la preparación de cultivos celulares, y es en los animales de laboratorio donde se preparan los sueros inmunes (5,26,45).

Factores que se toman en cuenta al utilizar animales de laboratorio:

Cuando se utilizan animales de laboratorio en el estudio de virus, es necesario considerar entre otros factores, los siguientes:

- ' + Edad. Fig. 3.2 A,B
- ' + Vía de inoculación. Fig. 3.2 C
- ' + Utilizar animales libres de patógenos específicos (SPF).
- ' + Evitar el uso de animales que hayan estado expuestos al virus por estudiar.

Fig. 3.2. Factores que se toman en cuenta al utilizar animales de laboratorio.



recién nacido

Fig. 3.2.A



21 días.

Fig. 3.2.B



Fig. 3.2.C. Vía de inoculación adecuada.



Ejemplo: Oxsackie, Arbovirus, Reovirus.

- ' + Considerar la posibilidad de una protección con anticuerpos maternos o de una incompetencia inmunológica.
- ' + Cuando se utilizan animales recién nacidos, se debe seleccionar la vía de inoculación de acuerdo al virus y al estudio planteado.
- ' + Determinar el número de animales, considerando el costo y alojamiento de los mismos, sin perder de vista que entre mayor sea el número de animales, los resultados serán de mayor exactitud estadística (5,45).

El huésped natural es sin duda, el ideal para propagar y estudiar a los virus pero esto no es práctico ni posible, cuando éste es el hombre o animales de gran talla (5,26).

Algunos de los inconvenientes del empleo de animales son:

- ' + Su elevado costo.
- ' + La limitación del espacio para jaulas y material. (Ver diagrama 2).
- ' + La infección cruzada entre los animales.
- ' + La posible infección humana.
- ' + Existencia de virus latentes y aberrantes, que pueden complicar la interpretación de la infección específica.
- ' + La inmunidad producida por infección natural inaparente anterior a la inoculación del virus que investigamos (5,9, - 26,45).

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO.

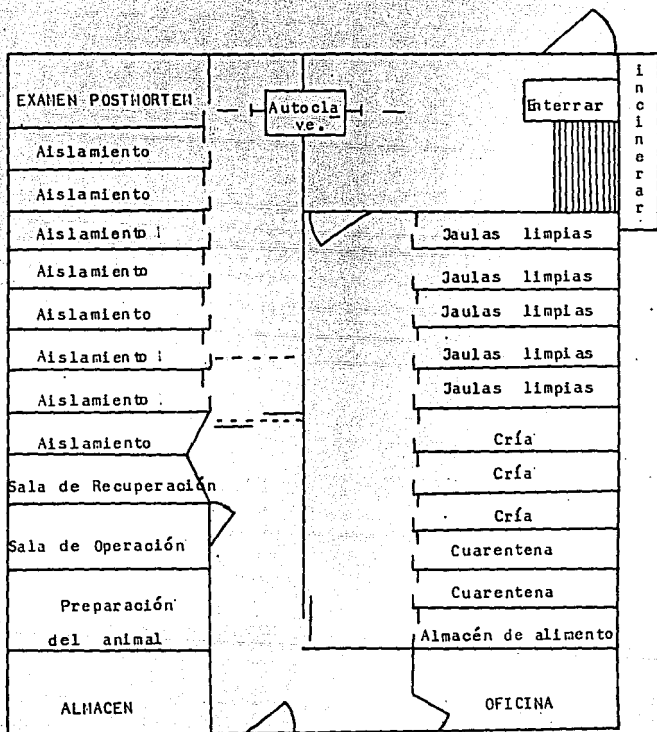


DIAGRAMA 2. (45).

Factores que ayudan a la elección del animal:

Caundo se va a elegir al animal, debe tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- ' + Edad.
- ' + Especie.
- ' + Genética.
- ' + Estado de nutrición.
- ' + Susceptibilidad.
- ' + Sexo.
- ' + Raza.
- ' + Estado inmune. (5,26,45).

Debe tratarse a los animales con humanidad y dignidad, se mantendrán en departamentos bien ventilados, cómodos, higiénicos y se alimentarán con raciones apropiadas (5,26). Asimismo, deben tomarse medidas adecuadas para los animales normales y los infectados, deberán estar bien aislados unos de otros (6,26).

3.1 VIAS DE INOCULACION

La vía de inoculación depende del virus estudiado y su posible histotropismo (5,9,26,45,52,53).

Las vías de inoculación más frecuentemente utilizadas son:

- ' + Intracerebral.
- ' + Intranasal.
- ' + Intramuscular.
- ' + Intravenosa.
- ' + Intraperitoneal.
- ' + Subcutánea (5,12,37,45).

3.2 ANIMALES DE LABORATORIO

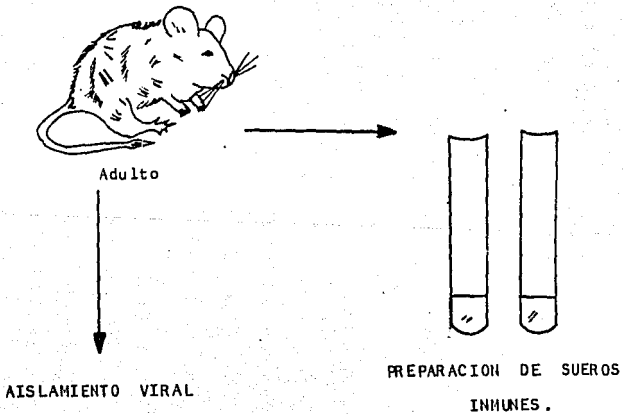
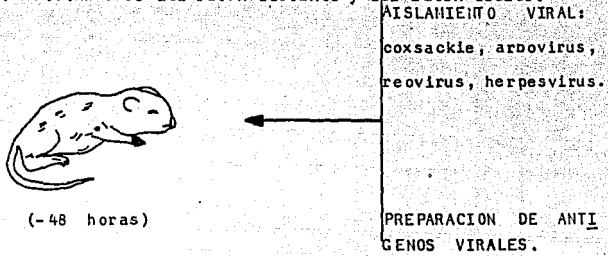
Los ratones son entre los animales de laboratorio, los más empleados para este fin. Las razas empleadas entre otras son: - los ratones blancos o albinos suizos (Blad C o CDI), los cuales son fáciles de criar en el bioterio debido a que tienen un periodo corto de gestación (21 días), las camadas son abundantes (8 - 12 ratones), y presentan un calor fértil al momento del parto, el cual si las hembras permanecen con el macho, este calor se puede aprovechar para volverla a cargar (37).

El ratón lactante (-48 horas de edad), proporciona el único medio para el aislamiento de muchos de los miembros del grupo - Coxsackie, herpesvirus, arbovirus y reovirus (5,26). Se utilizan también para la preparación de antígenos virales de Coxsackie y - aeovirus. Se inoculan por vía intracerebral 0.03 ml., intraperitoneal 0.2 ml., por vía intranasal 0.05 ml. y por vía intramuscular 0.03 ml. (5,26,45). Fig. 3.3.A

El ratón adulto se utiliza para aislamiento viral, preparación de sueros inmunes. Se inoculan por vía intracerebral 0.03ml, por vía intraperitoneal 0.2ml, por vía intranasal 0.05ml y por - vía intramuscular 0.03ml. (5,26,45). Fig. 3.3 A

Los cobayos se utilizan para aislamiento viral, obtención de suero, tejidos para cultivo de células, como fuente de complemento. Propagación de enfermedades neurotrópicas, Influenza, pneumo-

Fig. 3.3.A. Usos del ratón lactante y del ratón adulto.



nitis, enfermedades vesiculares de los animales domésticos y rickettsias (5,26). Por vía intracerebral se inoculan cobayos jóvenes con 0.05 ml, adultos con 0.1ml, por vía intraperitoneal 0.5ml y por vía intramuscular 0.1ml (5,26). Fig. 3.3 B.

OTROS ANIMALES DE LABORATORIO.

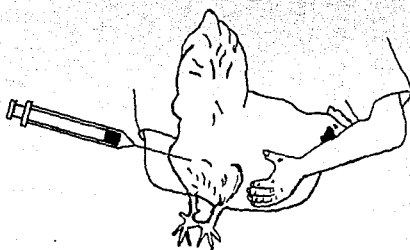
Aunque ratones y cobayos lactantes son los principales animales de laboratorio más comúnmente usados, también pueden ser empleados otros, entre estos los siguientes (5,12,26).

Aves. Los pollos se utilizan para inoculación de virus peculiares de la especie, los pollitos recién nacidos pueden emplearse para las encefalomielitides equinas. Suministrar glóbulos rojos para la reacción de hemaglutinación. Por vía intracerebral se inoculan con 0.05ml y pollos mayores con 0.1 ml (5,26).

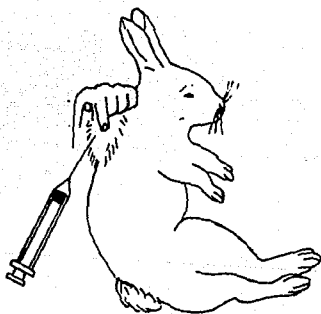
Aves mayores se utilizan fundamentalmente como fuente de eritrocitos para pruebas de hemaglutinación, obtención de suero y tejidos para cultivos celulares o preparación de sueros hiperinmunes. Por vía intracerebral se inoculan con 0.1 ml (5,26). Fig. 3.4 A

Conejos. Se utilizan para preparación de sueros hiperinmunes fundamentalmente, para el diagnóstico de: Pseudorrabia, Rabia y Viruela de mamíferos. Por vía intracerebral se inoculan con 0.25 ml, intravenosa 1-2ml., (5,26). Fig. 3.4 B

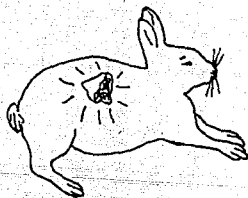
Fig. 3.4 OTROS ANIMALES DE LABORATORIO.



Vía intramuscular
Fig. 3.4.A



Vía subcutánea (Aujeszky).



Prurito 48-72 horas postinoculación.

Fig. 3.4.B

Hamster. Se utilizan para diagnóstico de enfermedades neurotrópicas. Proporcionan tejidos para cultivos celulares. Se inoculan intracerebralmente con 0.1 ml. Fig 3.5

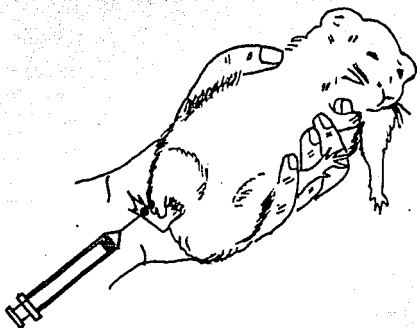
Monos. Se utilizan para preparación de cultivos primarios de riñón, pruebas de neurovirulencia (polivirus) y producción de algunas enfermedades específicas del hombre como: Sarampión, Poliomielitis, Hepatitis. Monos pequeños se inoculan por vía intracerebral con 0.5 ml., los grandes con 2.0 ml., (5,26)

3.3 OBSERVACIONES DESPUES DE LA INOCULACION

Después de la inoculación, diariamente deben examinarse los animales, para estudiar todo signo de infección y comprobar la duración del período de incubación. Para las enfermedades neurotrópicas es recomendable un período de 3-4 semanas y de 1 semana para las enfermedades neumotrópicas (26,49)

Los animales que mueran en el transcurso del período de observación, se examinarán; esto se hará con el resto al final del período de observación. En este momento deben recogerse muestras para pases ulteriores del virus o para realizar estudios histológicos. Antes de eliminar los cadáveres, todos deben esterilizarse (26,39,42).

Fig. 3.5 OTROS ANIMALES DE LABORATORIO



Vía intraplantar.

Existen dos desventajas principales en el empleo de animales de laboratorio para el aislamiento viral:

- Una es el riesgo de la infección en el laboratorio de otros animales y del hombre que los cuida.

- La otra consiste en el problema de interpretación de los hallazgos, puesto que existe siempre la posibilidad de que la enfermedad observada en el animal no sea resultado de la introducción de un virus, sino que se trate de la activación de una infección latente (9).

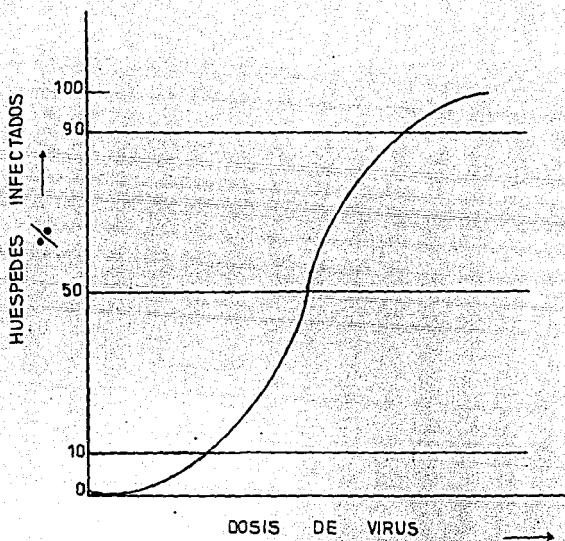
3.4 TITULACION

La titulación de los virus se mide determinando la capacidad de producir un efecto como, por ejemplo: muerte del animal, efecto citopático, hemoaglutinación, etc. (12).

Si vamos a tomar el efecto que el virus por vía intracerebral produzca en los animales (muerte), entonces el factor letal será el que estamos midiendo y determinaremos de esta manera lo que se denomina "Dosis Letal 50", (DL50%). De esta forma se pretende ser más exactos, ya que si con esta determinada dilución de virus encontramos que muere el 50% de los animales inoculados, ahí incluiremos aquellos muy sensibles a la infección, mientras que en el 50% de los sobrevivientes estarán aquellos animales muy resistentes a la infección y que hubieran resistido grandes cantidades de virus (12,45).

Algunas siglas más comúnmente usadas son:

- DI 50 - Dosis Infectante. Aplicable a sistemas, Unidad básica.
- DICT 50 - Dosis Infectante para Cultivo de Tejidos. Aplicable en cultivo de tejidos.
- DIE 50 - Dosis Infectante para Embriones. Aplicable en huevos.
- DL 50 - Dosis Letal. Aplicable en animales cuando la infección es seguida de muerte.
- DP 50 - Dosis Paralítica. Aplicable en animales cuando la infección es seguida solamente por parálisis (45).



CURVA DE RELACION DOSIS VIRUS-RESPUESTA.

La curva representa la sensibilidad al incremento de la dosis del virus, (50%).

METODO DE REDD AND HUENCH

Cálculo del título del virus

Diluón del virus inoculado	Nº de infectados inoculados	Nº de infectados	Nº de no infectados	Suma	Nº de infectados	PORCENTAJE DE INFECTADOS
10^{-2}	5/5	5	0	17	0	100
10^{-3}	5/5	5	0	12	0	100
10^{-4}	4/5	4	1	7	1	88

10^{-5}	2/5	2	3	3	4	43
10^{-6}	1/5	1	4	1	8	11
10^{-7}	0/5	0	5	0	13	10

El 50% de infectividad, esta en la dosis $10^{-4.8}$

$$\text{DISTANCIA PROPORCIONAL (DP)} = \frac{\text{Dosis mayor} - 50\%}{\text{Dosis mayor} - \text{dosis menor}} \quad \text{DP} = \frac{88 - 50}{88 - 43} = \frac{38}{45} = 0.8$$

(45,56)

3.5 TECNICAS DE INOCULACION EN ANIMALES DE LABORATORIO

Para la ejecución de algunas técnicas se recomienda previa tranquilización o anestesia de los animales, para facilitar el manejo (5,26,37). Fig. 3.6 A.B.

INTRACEREBRAL

- 1.- Anestésiar ligeramente al animal, (alcohol, éter, cloroformo).
- 2.- Sujetar la cabeza entre los dedos pulgar e índice y en posición ventral.
- 3.- Introducir la aguja en un punto medio entre el ojo y la oreja; atravesar el cráneo y depositar el inóculo.
- 4.- Sacar la aguja y desinfectar la zona.
- 5.- Eliminar a las 24 horas los animales que mueran por traumatismo (5,37) F.3.7 A, 3.8 B

INTRAMUSCULAR

- 1.- Desinfectar y depilar la zona elegida.
- 2.- Introducir la aguja perpendicularmente al cuerpo del animal con un movimiento rápido.
- 3.- Succionar con el émbolo para cerciorarse que no está en un vaso sanguíneo.
- 4.- Depositar el inóculo y retirar la aguja.
- 5.- Dar un masaje ligero en la zona de inoculación.
- 6.- Desinfectar la zona de inoculación (5) Fig. 3.7 C

HANEJO DEL ANIMAL ANTES DE LA INOCULACION.
(tranquilización).

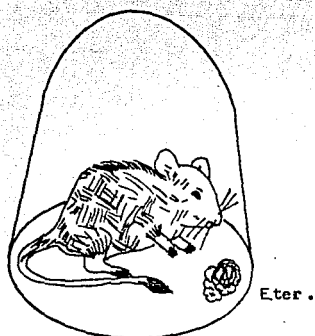


Fig. 3.6.A

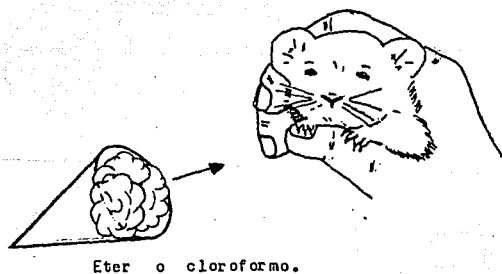
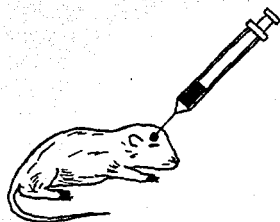


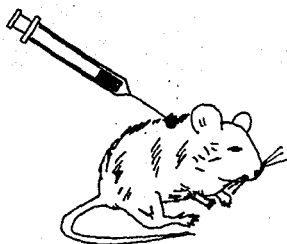
Fig. 3.6.B

Fig. 3.7 DIFERENTES VIAS DE INOCULACION.

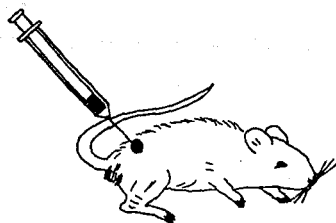


INTRACEREBRAL

Fig. 3.7.A



SUBCUTANEA



INTRAMUSCULAR

Fig. 3.7.C

INTRAPERITONEAL

- 1.- Anestesiarse ligeramente al animal, (alcohol, éter, cloroformo).
- 2.- Sujetar al animal en posición dorsal sobre la palma de la mano con los dedos, meñique, anular, índice y pulgar.
- 3.- Colocar al animal con la cabeza hacia abajo e inocular en la parte ventral, hacia un lado de la línea media.
- 4.- Retirar la aguja y desinfectar la zona (5,37). Fig. 3.8 A

OCULAR

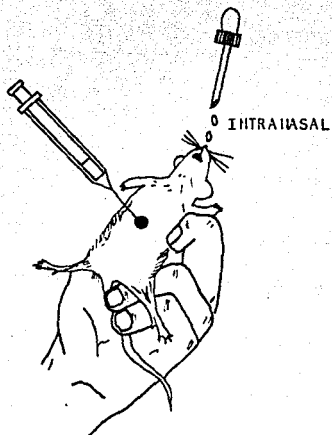
- 1.- Anestesiarse ligeramente al animal.
- 2.- Sujetar la cabeza del animal y mantener el ojo abierto del mismo.
- 3.- Depositar la gota del Inóculo sobre el ojo.
- 4.- Dejar absorber. (5)

NASAL

- 1.- Anestesia ligera.
- 2.- Sujetar al animal de manera que pueda facilitarse la ejecución de esta técnica.
- 3.- Dejar caer las gotas del Inóculo en el orificio nasal, ayudándose de una jeringa pequeña o de un gotero.
- 4.- Dejar absorber (5,37).

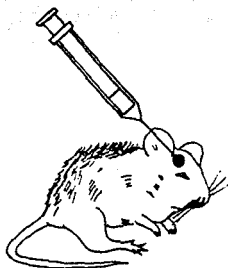
Nota: Esta inoculación puede ser peligrosa por la formación de aerosoles.

Fig. 3.8 DIFERENTES VIAS DE INOCULACION.



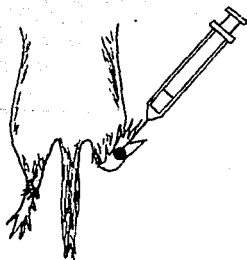
INTRAPERITONEAL

Fig. 3.8.A



INTRACEREBRAL

Fig. 3.8.B



INTRAPLANTAR

U N I D A D 4

INOCULACION DE EMBRIONES DE POLLO POR VARIAS RUTAS
CON DIFERENTES VIRUS AVIARIOS

OBJETIVOS:

- . El alumno aprenderá a elegir adecuadamente los huevos embrionados de acuerdo a sus necesidades en la propagación de virus - considerando la edad del embrión.
- . Familiarizar al alumno con las diferentes estructuras que constituyen al embrión de pollo.
- . Adiestrar al alumno en el manejo adecuado de las técnicas más comunes de inoculación de huevos embrionados de aves, así como en las técnicas para la cosecha de membranas y líquidos extra-embriónicos, con el fin de recuperar, identificar o titular - al virus inoculado.

INTRODUCCION:

Los virus son parásitos obligados, que para su estudio, antiguamente se hacía uso de los huéspedes naturales ó bien, de animales de laboratorio. Estudios sobre el cultivo de los virus ani-

males, mostraron que los embriones de pollo en desarrollo podían servir de medios de cultivo para muchos de ellos (1,12,21,44,49,50,58,65).

El embrión de pollo es una fuente de tejido vivo conveniente y fácilmente manipulable, que se utiliza en la propagación, titulación e identificación de virus, así como en la preparación de vacunas virales (1,5,21,26,41,44,49,50,58,65,66). Fig. 4.1 A,B,C.

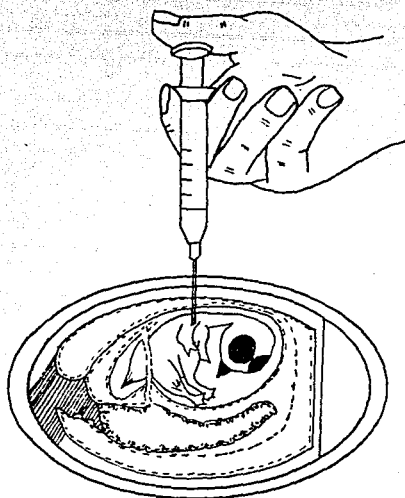


Fig. 4.1.A Propagación del virus.

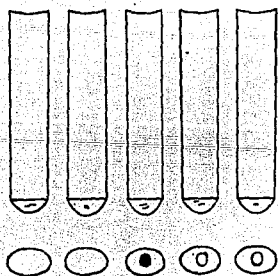


Fig. 4.1.B Titulación.

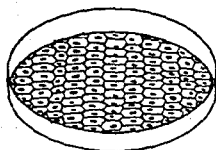


Fig. 4.1.C Fuente de tejido.

4.1 DESARROLLO DEL EMBRION

Para utilizar con éxito el cultivo de virus en embriones de aves, es necesario conocer su desarrollo, fisiología y anatomía - de los mismos (12,26).

El embrión comienza a desarrollarse bajo la forma de una membrana de células que recubre el polo superior de la yema (vitelo).

DIAS	ESTRUCTURAS
3o.	Aparece el alantoides.
4-5o.	Puede observarse el vitelo.
6o.	Líquido amniótico es aproximadamente 1 ml.
9o.	Pueden observarse movimientos de deglución.
10o.	Aumenta rápidamente el tamaño del embrión y parecen las plumas. El crión rodea casi totalmente todo el contenido del huevo y está en contacto inmediato con la membrana que tapiza interiormente la cáscara. (fárfara).
12-13o.	El líquido alantoideo se enturbia por la presencia - de uratos, está líquido, es alcalino durante los días 7-12, pero hacia el final de la incubación su pH <u>pue</u> de ser de 6.
13o.	Líquido amniótico 6-10 ml.
12-15o.	Se desarrolla el aparato respiratorio. A medida que aumenta el tamaño, disminuye el volumen de líquidos extraembrionarios. Fig. 4.2, 4.3.

El conión y el alantoides se fusionan formando la membrana - corioalantoidea (MCA), muy vascularizada, funciona como órgano - respiratorio del embrión.

En las primeras fases de desarrollo, los líquidos amniótico y alantoideo son en esencia, soluciones salinas fisiológicas, aproximadamente después del día 12, el contenido proteico y la viscosidad del líquido amniótico aumentan. La cavidad alantoidea recibe la excreción de los riñones.

A partir del día 12o., el material vitelino se deseca progresivamente y aumenta al mismo tiempo la fragilidad de la membrana, durante las últimas 24-48 horas de incubación, el saco vitelino queda incluido en la cavidad abdominal (26,41).

4.2 ANATOMIA Y FISILOGIA

El embrión tiene a partir del cordón umbilical, una serie de membranas que se distribuyen en el huevo. En primer lugar se encuentra rodeándolo el saco amniótico, el cual cubre al embrión y lo mantiene suspendido en el líquido amniótico, sirve como amortiguador para los movimientos bruscos del huevo, con el objeto de que el embrión no padezca traumatismos y al mismo tiempo pueda cambiar de posición.

Partiendo del mismo cordón umbilical, sale otra membrana que forma un saco y es la membrana corioalantoidea, ésta se adosa por su parte externa a la membrana del cascarón y por su parte interna contiene el líquido alantoideo, éste líquido suele ser más abundante que el amniótico. La membrana corioalantoidea se caracteriza por estar extremadamente vascularizada, actúa como

rión y como pulmón, absorbe oxígeno hacia el embrión y elimina CO_2 , actúa también como órgano excretor ya que las sustancias de deshecho del metabolismo nitrogenado y de cambios metabólicos en general, son eliminados a través de capilares de las membranas que se difunden hacia el líquido alantoideo.

Finalmente otra membrana que es el saco vitelino, se comunica con el embrión a través del cordón umbilical y contiene en el interior el vitelo, que es el alimento del que se nutre el embrión durante los 21 días que dura su incubación (12,26).

DESARROLLO DEL EMBRION

(0-10 DIAS)

- 1 Alantoides
- 2 Conexión saco-amniótica
- 3 Cavity amniótica
- 4 Lóbulo anterior del alantoides
- 5 Lóbulo posterior del alantoides
- 6 Senos terminales
- 7 Albumina

(55). Fig. 4.2

Fig. 4.2 Desarrollo del embrión de 0-10 días.

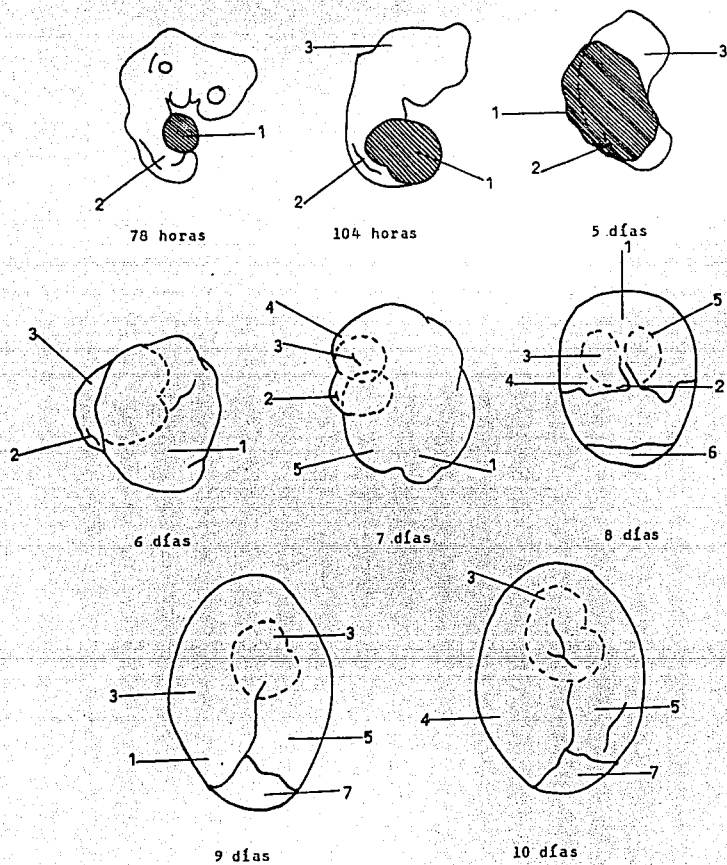
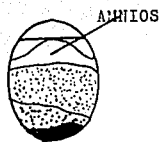
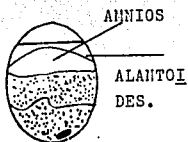


Fig. 4.3 DESARROLLO DEL EMBRION.

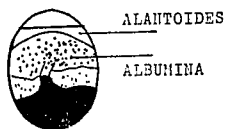
(11-18 DIAS)



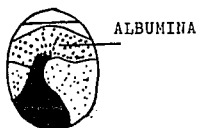
11 DIAS



12 DIAS



13 DIAS



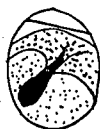
14 DIAS



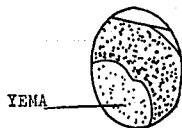
15 DIAS



16 DIAS



17 DIAS



18 DIAS

Ventajas del empleo de embriones de pollo

Se emplean embriones de pollo por las siguientes razones:

- Se pueden adquirir con facilidad.
- Son baratos.
- Tienen tamaño adecuado.
- Están relativamente exentos de infecciones latentes y de contaminaciones externas.
- No forman anticuerpos contra los virus inyectados (a excepción de algunos). (5,12,26,41,50).

Debe tenerse en cuenta la posible presencia de los virus de Bronquitis Infecciosa y de la Enfermedad de Newcastle, en los huevos puestos durante las fases activas de estas enfermedades. También pueden encontrarse algunos anticuerpos específicos contra estos virus en los huevos puestos por aves inmunes frente a ellos - (5,26).

Solamente deben emplearse huevos procedentes de aves vigorosas, libres de enfermedades (5,26,41,50). Es recomendable por lo tanto adquirir el huevo de incubadoras donde se lleve un control de calidad del huevo embionado (5). Fig 4.4.A

Algunos de los factores que influyen sobre el crecimiento de virus en embriones de pollo son:

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL CRECIMIENTO DE VIRUS

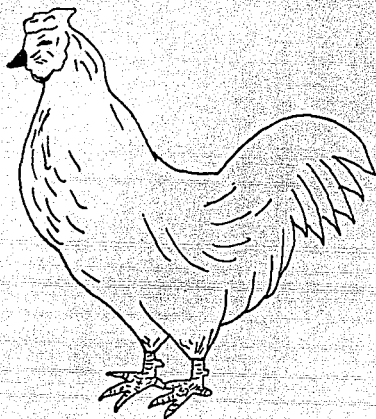


Fig. 4.4.A Embriones procedentes de aves vigorosas.

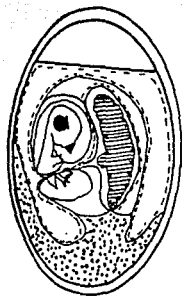


Fig. 4.4.B Edad del embrión.

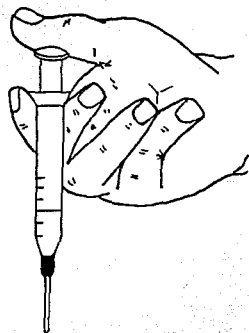


Fig. 4.4.C. Cantidad adecuada de inocular.

Fig. 4.4

- Edad del embrión. Fig. 4.4 B
- Vía de inoculación.
- Dilución y volumen del inóculo. Fig. 4.1 C
- Temperatura de incubación.
- Tiempo de incubación tras la inoculación.
- Estado fisiológico y de nutrición de las aves, especialmente en las que respecta a deficiencias vitamínicas y la de empleo de inhibidores enzimáticos e inactivadores.

Estos factores deben estudiarse cuidadosamente para cada virus, puesto que cada uno de ellos implica un problema diferente e independiente (26,41,50).

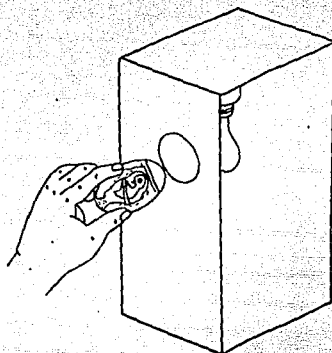
El embrión aviar es uno de los más valiosos y empleados para el cultivo de virus y rikettsias. Muchos virus se pueden adaptar al embrión aviar, pero otros no se desarrollan en el adecuadamente (26,28,50).

4.3 INOCULACION DEL EMBRION

La determinación de la viabilidad del embrión de pollo es fundamental en virología, por el requerimiento mismo del tejido vivo para la propagación de los virus (5,41). Fig. 4.5 B,C.

Cuando el embrión está muerto, presenta una consistencia acuosa en contraste con la consistencia viscosa característica del embrión sano (5).

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y EDAD DEL EMBRION DE POLLO



OVOSCOPIAR

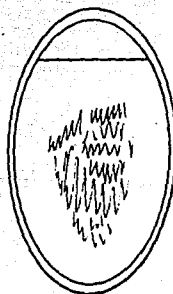
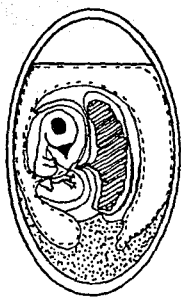


Fig. 4.5.B,C Determinar la viabilidad del embrión, haciendo uso del ovoscopio.

Es indispensable el dominio de las técnicas de inoculación - en el huevo embrionado, por la selectividad que presentan algunos virus por determinados tejidos. Un mismo tipo de virus puede inocularse por diferentes vías (5,26,41,50).

El reconocimiento de los tejidos sanos permitirá apreciar - los cambios macroscópicos que ocurren en estos, como consecuencia de la infección viral. Es importante también reconocer al ovocopio, la edad aproximada del embrión ya que ésta determina la - vía de inoculación (5,41).

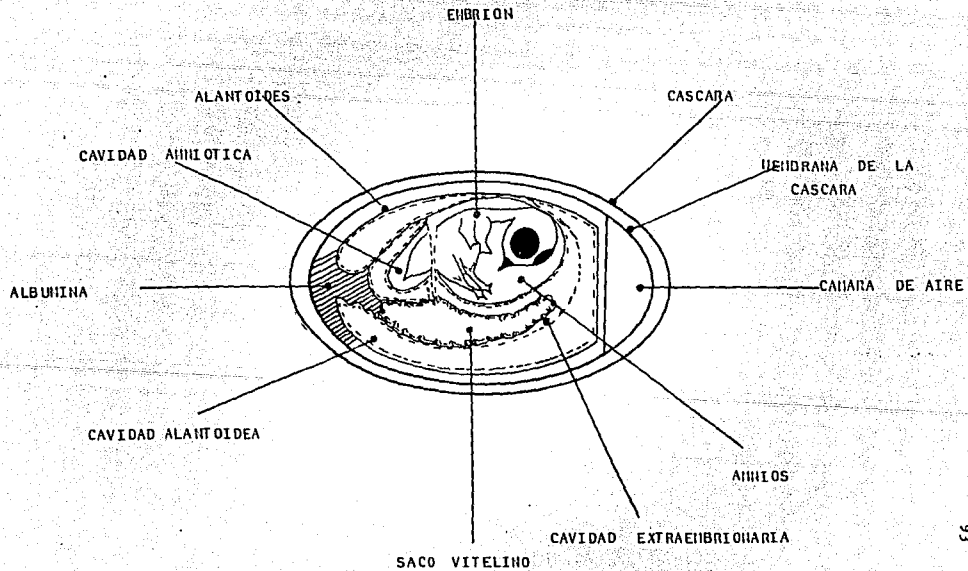
La sustitución arbitraria de la vía de inoculación y la edad del embrión pueden alterar los resultados esperados (5,41).

El huevo embrionado puede ser inoculado por diferentes rutas, esto depende del virus con que se está trabajando y su posible - afinidad tisular o predilección (histotropismo) (5,41,50).

La inoculación puede realizarse en las siguientes estructu- ras: Fig. 4.6

- . Membrana corioalantoidea.
- . Saco alantoideo.
- . Saco amniótico.
- . Saco vitelino.
- . En el propio embrión.

Fig. 4.6 ESTRUCTURAS DEL EMBRION



El huevo es reincubado, el embrión continúa su desarrollo y los virus se multiplican en células en desarrollo (5,12,15,26,27,39,41,49,50,52,53,65,66,67).

La incubación de huevos una vez inoculados requiere de uno a siete días, debiendo hacerse una observación diaria con el fin de detectar muertes u otros signos ocurridos (26,41,50).

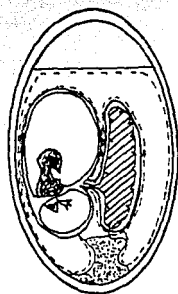
El crecimiento de un virus en el embrión puede comprobarse por varios métodos entre ellos los siguientes:

- a. Tomando muestras de líquidos extraembrionarios, membranas o del propio embrión, para realizar pruebas cuantitativas de infectividad.
- b. Investigando las lesiones.
- c. Mediante reacciones serológicas.
- d. Por medio de la reacción de hemoaglutinación.
- e. Estudiando las propiedades inmunógenas (26,41,50,52,53).

El embrión de pollo puede responder a la infección viral, dando lesiones observables a simple vista como: músculos diatróficos, distorsiones de los miembros o en el cuerpo del embrión, ptequias, vísceras hemorrágicas, enanismo, etc., y muerte del embrión (5).

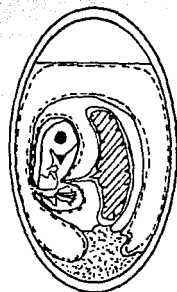
En las membranas extraembrionarias, también pueden observarse lesiones hemorrágicas, edema, lesiones localizadas y características, dependiendo esto del virus inoculado (5).

ALGUNOS EFECTOS PATOLOGICOS EN EL ENBRION DE POLLO



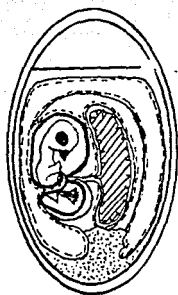
TORTUOSIDAD Y EMPEQUE
RECIMIENTO DEL ENBRION

Fig. 4.7.A



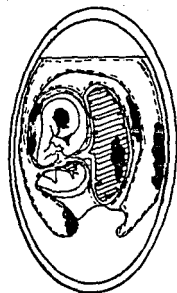
DISHINUCION DEL
FLUIDO AMNIOTICO

Fig. 4.7.B



ENGROSAMIENTO DE LA MCA.

Fig. 4.7.C



HENORRAGIAS EN LOS
TEJIDOS

Fig 4.7.D

El criterio primario para detectar la presencia del virus, es la muerte del embrión del huevo inoculado, en caso de no seguirse este criterio, deben buscarse ciertos cambios patológicos que pongan en evidencia la presencia de infección (26,41,50).

Los efectos patológicos que pueden observarse son los siguientes:

- . Tortuosidad y enpequeñecimiento del embrión. Fig 4.7.A
- . Congestión de epidermis.
- . Disminución del fluido amniótico. Fig. 4.7.B
- . Engrosamiento y edema de la membrana corioalantoidea (HCA). - Fig. 4.7.C
- . Engrosamiento y fibrosis de la membrana amniótica.
- . Hemorragias en los tejidos. Fig. 4.7.D
- . Desarrollo alterado de las plumas.
- . Lesiones vesiculosas (pocks), en la membrana corioalantoidea.
- . Depósitos de uratos en el estroma renal y del mesonefrón.
- . Cuerpos de inclusión.
- . Alteraciones microscópicas en los tejidos de los embriones infectados, muchas de las cuales son específicas y caracterizan - las infecciones por determinado virus (26,41,50).

Debido a que los cambios postmortem enmascaran a los ocurridos en los tejidos como respuesta al agente infeccioso, se debe proceder a realizar el examen de los embriones tan pronto mueren (26,50).

4.4 VIAS DE INOCULACION (usos)

CAVIDAD ALANTOIDEA:

Se utilizan embriones de 9-12 días, la cantidad de inóculo será de 0.1-0.2 ml.

Susceptibilidad del embrión: Plaga aviar, Enfermedad de Newcastle, Bronquitis Infecciosa, Parotiditis, Encefalitis del Este, Oeste y Venezuela.

Esta vía tiene la ventaja de la simplicidad de la inoculación y toma de muestra cuando se necesitan grandes cantidades de líquido virulentos, para realizar análisis químicos, producir vacunas o preparar antígenos para reacciones serológicas. (26,37,41,50).

CAVIDAD AMNIOTICA:

Se utilizan embriones de 7-15 días, la cantidad de inóculo será de 0.1-0.2 ml.

Susceptibilidad del embrión: Influenza, Sarampión, Encefalomielitis aviar.

Es sumamente adecuada para el aislamiento del virus de la influenza a partir de lavados faringeos (26,37,41,50).

MEMBRANA CORIOALANTOIDEA:

Se utilizan embriones de 10-12 días de edad, la cantidad de Inóculo será de 0.1-0.5 ml.

Susceptibilidad del embrión: especialmente para el aislamiento y cultivo de virus variólicos, de la laringo traqueitis aviar, Aujeszky, Virus B, Encefalitis de San Luis, Vaccinia, Viruela, - Fiebre del Valle de Rift, Co riomeningitis linfocítica, Herpes simplex.

Excelente para el estudio de alteraciones patológicas, cuerpos de inclusión, titulación de virus y de antisueros por la técnica de conteo de "pocks", y actividad quimioterapéutica (9,26, - 37,41,50).

SACO VITELINO:

Se utilizan embriones de 5-8 días de edad, la cantidad de Inóculo será de 0.2-1.0 ml.

Susceptibilidad del embrión: Virus ARBOR africanos, Fiebre botonosa, Tifo epidémico, Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Japonesa B, Louping ill, Fiebre Q, Rabia, Rickettsias, Fiebre manchada, Fiebre amarilla, Psitacosis, Linfogramuloma venéreo, - Neumonías.

Especialmente buena para el aislamiento y cultivo de los agentes del grupo Psitacosis-linfogramuloma-neumonitis y Rickettsias.

El material de saco vitelino es usado para preparación de -
antígenos y vacunas (26,37,41,50).

INTRAVENOSA:

Se utilizan embriones de 10-15 días de edad, la cantidad de
Inóculo será de 0.02-0.05 ml.

Esta vía tiene gran aplicación para el estudio experimental,
generalmente se emplea en estudios hematológicos (26,37,50).

INTRACEREBRAL:

Se utilizan embriones de 8-14 días de edad.

Susceptibilidad de embrión: Herpes simplex, Rabia.

Se utilizan en el estudio de alteraciones cerebrales conse-
cutivas a la infección (26,37,50).

Una vez inoculados por cualquiera de estas vías, se incuban
los embriones durante un lapso de 1-6 días, examinándose durante
este período al menos dos veces al día para detectar muertes -
(5,26,41).

4.5 TECNICAS DE INOCULACION

SACO ALANTOIDEO

1. Por transiluminación, seleccionar embriones de 10-11 días, - delimitar la cámara de aire, localizar al embrión y marcar - con una 'X' sobre la cámara de aire cerca de la base (más o me - nos a 5 mm.) y opuesto al embrión.
2. Desinfectar y perforar en el sitio de inoculación.
3. Insertar la aguja en el huevo (aproximadamente 2 cm.).
4. Depositar el inóculo (0.1 a 0.2 ml.).
5. Retirar la aguja y sellar la perforación (con parafina).
6. Incubar durante un período y a una temperatura adecuada al - virus inoculado.
7. Observar la viabilidad del embrión a las 16, 18 ó 24 horas de acuerdo al virus inoculado, para descartar embriones muertos por traumatismos. Nunca después de 24 horas.
8. Examinar los embriones a intervalos adecuados al virus inocu - lado, hasta el final del período de observación.
9. Las inoculaciones deberán recolectarse bajo estrictas condi - ciones de asepsia (5,41). Fig. 4.8 A

VIAS DE INOCULACION.

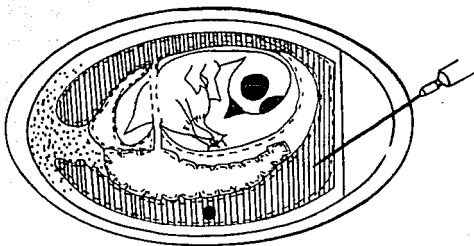


Fig.4.6.A INOCULACION EN

SACO ALANTOICO ..

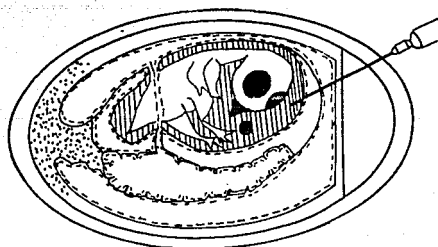


Fig. 4.6.B INOCULACION EN

SACO AMNIOTICO.

SACO AMNIÓTICO

1. Seleccionar por transiluminación, embriones de 10-11 días de edad, delimitar la cámara de aire, localizar al embrión y - marcar el punto de inoculación en el centro de la cámara de aire.
2. Desinfectar el sitio de inoculación y perforar.
3. Introducir la aguja calibre 26-28, hacia el embrión y entrar al saco amniótico empujándolo ligeramente. Depositar el Inóculo en la cavidad amniótica (0.1 a .2 ml.). Toda esta manipulación debe hacerse observando al embrión en el ovoscopio.
4. Retirar la aguja y sellar (con parafina).
5. Seguir los pasos 6, 7, 8.

Son incubados a 35-37°C, por 48-72 horas dependiendo del virus que se trate (5,37,41). Fig. 4.8-B

SACO VITELINO

1. Seleccionar embriones de 5-6 días de edad por transiluminación, marcar la cámara de aire y el punto de inoculación en el centro de ésta.
2. Desinfectar el punto de inoculación y perforar la cámara de - aire en este sitio.
3. Insertar la aguja perpendicularmente.
4. Depositar el inóculo en el saco vitelino (0.5 a 1.0 ml.).

5. Retirar la guja y sellar.
6. Seguir los pasos 6, 7, 8. (5,37,41). Fig. 4.9 A

MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

1. Seleccionar embriones de 11-13 días de incubación por transluminación. Marcar la cámara de aire y el sitio de inoculación sobre la MCA en el primer tercio del huevo sin considerar la cámara de aire.
2. Desinfectar la cámara de aire y perforar el sitio marcado.
3. Desinfectar y perforar únicamente la cámara de aire en el punto de inoculación y posteriormente romper la membrana de la cáscara con una aguja estéril calibre 26. ATENCION NO PERFORAR LA MCA.
4. Succionar con un bulbo a través de la perforación hecha en la cámara de aire artificial y observar al ovoscopio la formación de una cámara artificial sobre la MCA. Mantener el huevo en posición horizontal con el punto de inoculación hacia arriba.
5. Introducir ligeramente la aguja calibre 23, con el bisel hacia abajo y depositar el Inóculo sobre la MCA (0.1 a 0.2 ml.) Balancear suavemente el huevo para distribuir el Inóculo.
6. Sellar primero el punto de inoculación y después la perforación sobre la cámara de aire.

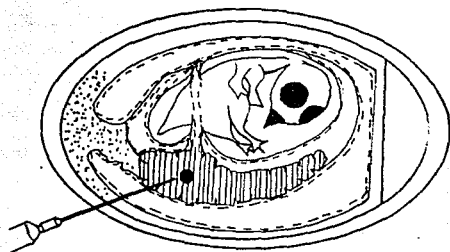


Fig. 4.9.A INOCULACION EN SACO VITELINO.

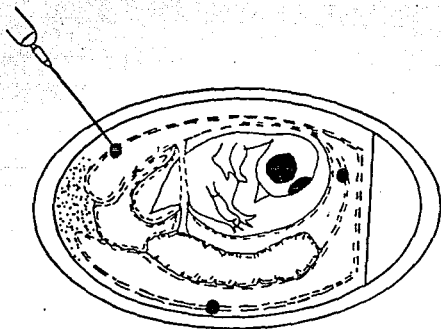


Fig. 4.9.B INOCULACION EN MEMBRANA.

CORIOALANTOIDEA.

7. Incubar en posición horizontal, con el punto de inoculación hacia arriba, durante un período y una temperatura adecuada al virus inoculado (5,37). Fig. 4.9 C

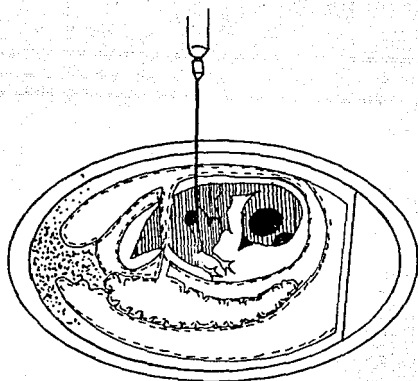


Fig. 9.10 INOCULACION EN EL PROPIO EMBRION.

4.6 COSECHA DE LIQUIDOS

La cosecha de materiales infectados del huevo embrionado - tiene como propósito principal, recuperar altas concentraciones - de los virus inoculados, para lo cual es muy importante la selección del huevo del cual se va a realizar la cosecha. Esta recuperación se puede efectuar a partir de:

Líquido alantoideo - virus hemoaglutinantes o para la producción de hemoaglutininas.

Saco vitelino - cultivo de clamidias y rickettsias.

Líquido amniótico - aislamiento de cepas de influenza.

Hembrana corioalantoidea - permite cuantificar aquellos grupos virales productores de lesiones localizadas (6,39,41).

La mayor producción de virus se obtiene de embriones moribundos y no de los embriones muertos (observar al ovoscopio). Los embriones moribundos se pueden guardar en el refrigerador hasta el momento de la cosecha general (41). Diagrama 3.

Debido a que los cambios postmortem enmascaran a los ocurridos en los tejidos como respuesta al agente infeccioso, se debe proceder a realizar el examen de los embriones tan pronto mueran (26,50).

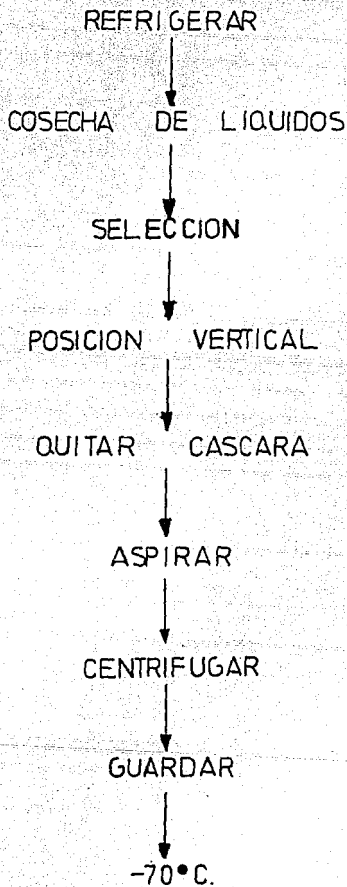


DIAGRAMA 3. Cosecha y conservación de líquidos.

Se recomienda el enfriamiento de los embriones por varias - horas o toda la noche, antes de colectar los fluidos extraembrionarios, con el fin de reducir las hemorragias en estos fluidos - (26,50).

4.7 TECNICAS DE COSECHA

LIQUIDO ALANTOIDEO

1. Seleccionar al ovoscopio los embriones vivos y delimitar la - cámara de aire, enfriarlos a 4 °C. durante 12 horas.
2. Colocar el huevo en la charola en posición vertical con el ex- tremo hacia arriba; desinfectar la cáscara que cubre la cámara de aire.
3. Quitar el casquete que cubre la cámara de aire y las membra- nas de la cáscara y corioalantoidea, que forman la base de la misma.
4. Aspirar el líquido alantoideo con una pipeta o con una jeringa con aguja calibre 18.
5. Mezclar los líquidos cosechados y centrifugar durante 10 minu- tos a 1500 rpm. Guardar el sobrenadante en volumen de 0,5 ml. a -70 °C hasta su utilización (5,41).

Para la cosecha de estos huevos, son refrigerados 4 a 6 horas para coagular la sangre en los vasos y evitar que escape a la

cavidad alantoidea durante la cosecha de los fluidos (37).

LIQUIDO AMNIOTICO.

1. Seguir los pasos 1, 2, 3.
2. Levantar ligeramente el saco amniótico con pinzas y aspirar el líquido con una jeringa con aguja calibre 26.
3. Guardar el líquido cosechado a -70°C en volumen de 0.5 ml. - hasta su utilización.

Para cosechar este líquido, los huevos son refrigerados a 4°C durante 48 horas (5,37,41)

SACO VITELINO

1. Seguir los pasos 1, 2, 3.
2. Depositar el contenido del huevo en una caja petri.
3. Separar el saco vitelino del vitelo.
4. Guardar las membranas a -70°C hasta su utilización.
5. El vitelo se deposita en recipientes pequeños si es necesario. (5,37,41).

MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

1. Seleccionar los embriones vivos al ovoscopio y desinfectar el extremo agudo del huevo.
2. Descartar en una caja de petri el contenido del huevo rompien

do la cáscara por el extremo agudo y evitar el desprendimiento de la HCA, con ayuda de las pinzas.

3. Separar con las pinzas la HCA adherida a la membrana de la cáscara.
4. Guardar las membranas a -70°C , hasta su utilización (5,41).

Nota: Si se está titulando un virus, lavar y extender las membranas en una caja de petri; contar las lesiones sobre un fondo oscuro para calcular el número de unidades formadoras de placas por mililitro, (UFP/ml.). Si se desea cosechar el virus, triturar las membranas y hacer una suspensión al 10% con PBS; centrifugar y guardar el sobrenadante en volúmenes de 0.5 ml. a -70°C hasta su utilización (5,41).

4.8 TITULACION

Las alteraciones patológicas y/o muerte de embrión, pueden servir de referencia para la identificación y titulación de un virus, si se controlan ciertas variables como: especie, edad del embrión y vía de inoculación, etc., se logra una mayor uniformidad en los resultados (5).

Los virus pueden titularse en el huevo embrionado, cuando matan al embrión (De 50%), o cuando dan lesiones circunscritas, -

placas en la membrana corioalantoidea (UFP/ml.), Unidades Formadoras de Placa, por mililitro (5).

La membrana corioalantoidea es un huésped útil para la formación de lesiones localizadas (placas). Los virus capaces de dar este tipo de lesiones se titulan en la membrana corioalantoidea y la concentración se expresa en UFP/ml. (5).

El virus de la Bronquitis Infecciosa es un excelente grupo viral para fines didácticos, ya que causa alteraciones en el embrión fácilmente observables, las cuales pueden ser utilizadas como evidencia de actividad viral (5).

Los signos típicos en un embrión de pollo inoculado con virus de la Bronquitis Infecciosa en cavidad alantoidea son:

- + Encoarvamiento, el cuello torcido, patas deformadas y comprimidas encima de la cabeza.
- + Enanismo.
- + Reducción del movimiento, disminución en el volumen del líquido amniótico, la membrana amniótica se observa fibrosa y adherida al embrión (5).

4.9 PROPAGACION DE VARIOS VIRUS EN EMBRIONES DE POLLO

ENFERMEDAD	EDAD (días)	ruta	T ^o	TIEMPO DE INCUBACION (días)	REACCIONES	MATERIAL RECOLECTADO
Bronquitis infecciosa.	5-6	SV	37°C	3-4	Muerte y anomalías.	Vitelo y S.V.
Bronquitis infecciosa.	9-11	SC	37°C	3-7	Muerte y anomalías.	Fluido alantoideo, SC.
Newcastle	9-11	SC	32°C	4	Muerte, HA.	Líquido alantoideo SC, HCA.
Viruela	10-13	HCA	37°C	3-5	Vesículas	HCA.
Larigo traqueitis	9-	SC	37°C	3	Muerte	Fluido alantoideo, HCA, embrión.
Larigo traqueitis	10-13	HCA	37°C	3	Vesículas	HCA.
Herpes simple	10-12	HCA	37°C	2-6	Vesículas	HCA.
Vaccinia	10-12	HCA	37°C	2-3	Muerte, vesículas.	HCA.
Variola	10-12	HCA	37°C	3	vesículas	HCA.

HA-hemoaglutinación

HCA-membrana corioalantoidea

SV-saco vitelino.

SC-saco corioalantoideo.

Referencia (56).

U N I D A D 5

PREPARACION DE CULTIVOS CELULARES
Y DE ORGANOS

OBJETIVOS:

- . El alumno se adiestrará en la preparación y manejo de cultivos celulares.
- . El estudiante reconocerá algunos de los diversos efectos citopáticos que pueden producir los virus en la células.
- . Se adiestrará en algunas técnicas utilizadas en la titulación de los virus.

INTRODUCCION:

Los virus necesitan de células vivas para su multiplicación, casi todos pueden crecer en cultivos de células, huevos embrionados y animales. Entre los sistemas más convenientes y eficaces para el cultivo de virus, es el cultivo celular, éste puede prepararse a partir de órganos y tejidos frescos (12,46). Afortunadamente la mayoría de los virus de importancia médica pueden ser aislados en cultivos celulares, en los cuales generalmente produ-

FUENTES DE CELULAS VIVAS PARA MULTIPLICACION VIRAL.

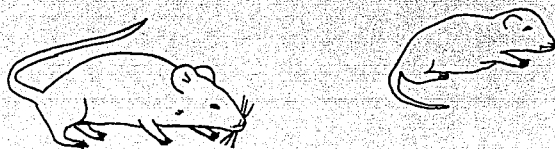


Fig. 5.1 ANIMALES DE LABORATORIO



Fig. 5.1 EMBRIONES DE POLLO

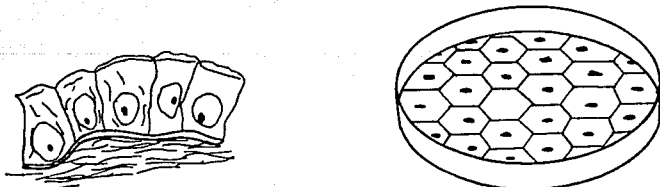


Fig. 5.1 CULTIVOS CELULARES.

cen cambios morfológicos más o menos característicos o muerte de las células infectadas (5). Fig. 5.1

La introducción de cultivos celulares significó un gran adelanto en la virología, gracias a estos se han logrado aislar virus por mucho tiempo desconocidos, se ha facilitado el estudio de aquellos que se conocían, se han podido preparar muchas de las vacunas que actualmente se utilizan y se ha estudiado la interacción que se establece entre los virus y las células huésped (5,9,12,16,18,46,58,59,67).

Los virus no los vemos por métodos usuales, ni forman colonias como las bacterias, rutinariamente los reconocemos por las enfermedades que producen en los animales de laboratorio o por la patología que producen en el huevo embrionado de gallina o en los cultivos de tejidos (12).

La metodología clásica del diagnóstico del laboratorio viral, consiste en el aislamiento del virus, su identificación serológica y la titulación de anticuerpos específicos en sueros pares del del paciente o antígenos virales en las lesiones (5).

En algunas ocasiones no existe correlación entre el grado de patogenicidad de un virus para un huésped dado y la capacidad del virus para multiplicarse en un cultivo de células procedentes de ese huésped (9,50).

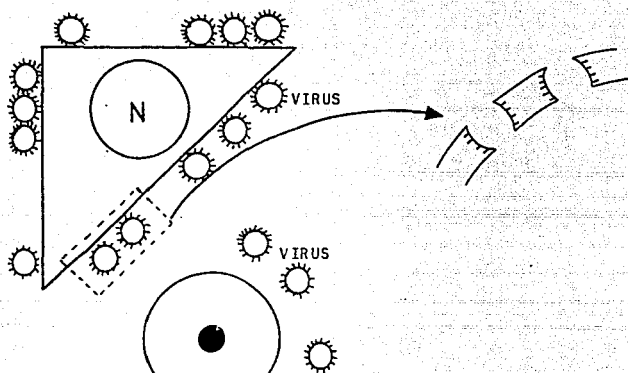
Los cultivos de tubos de ensaye, son preparados agregando - células suspendidas en 1-2 ml. de líquidos nutritivos que contie - nen soluciones salinas balanceadas y diversos factores de creci - miento generalmente: suero, glucosa, aminoácidos y vitaminas (me - dio eagle), (5,12,21,26,27,28,39,50).

5.1 EFECTOS DE LOS VIRUS EN LAS CELULAS

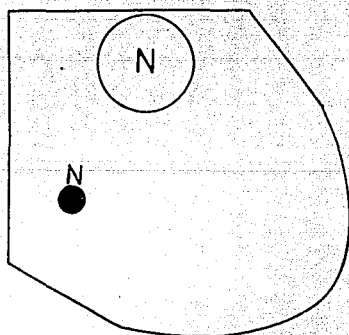
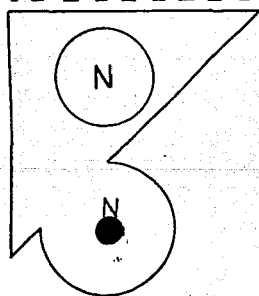
Algunos virus producen efectos citopáticos característicos - en los cultivos de tejidos, haciendo posible el establecimiento - de un diagnóstico presuntivo rápido cuando se conoce el síndrome - clínico (5,39). Este efecto citopático puede ser variable de - acuerdo con los virus inoculados y pueden ser clasificados de la - siguiente forma:(1,9,12,39,52,53).

- a) Los que producen efecto citopático (pienosis, cariolisis, ci - tollisis, cariorrexia, etc). Enterovirus, virus de la polio - mielitis.
- b) Productores de cuerpos de inclusión. Herpes simple, Rabia.
- c) Formadores de sicitios. Virus del sarampión, parainfluenza.
- d) Productores de cambios en los tejidos. Neoplasias, tumores.
- e) Hemoaglutinación viral.
- f) Interferencia viral.

FUSION CELULAR



INFECCION VIRAL

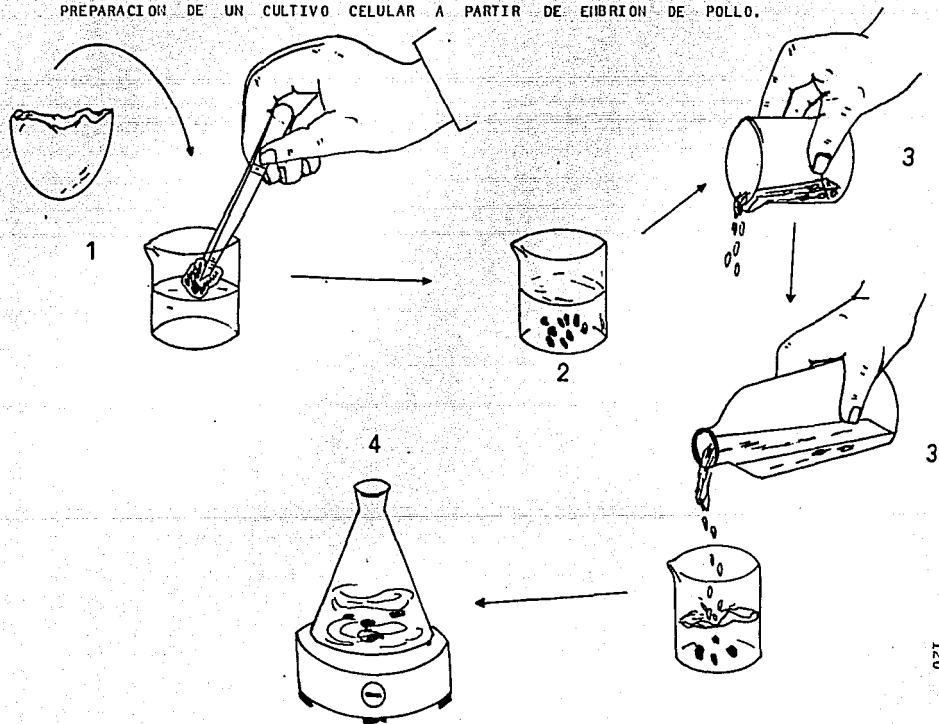


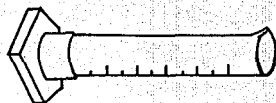
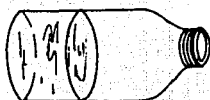
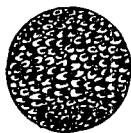
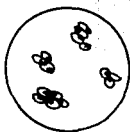
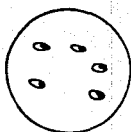
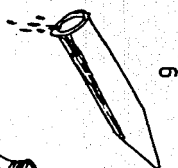
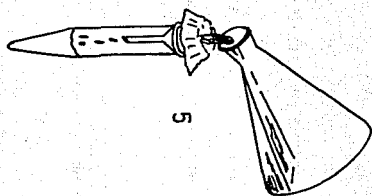
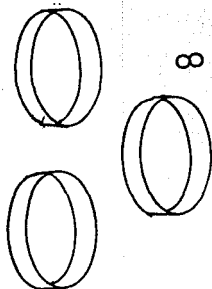
CELULA GIGANTE
(Sincitia).

PREPARACION DE UN CULTIVO CELULAR
A PARTIR DE ENBRION DE POLLO

- 1.- Coloque el emión de pollo en solución salina tamponada, (PBS).
- 2.- Corte el tejido en trozos de 1 mm. aproximadamente.
- 3.- Lave los fragmentos varias veces con nueva PBS.
- 4.- Mezcle los fragmentos con tripsina para romper los grupos de células, individualizándolas.
- 5.- Cuele los grupos de células a través de una gasa, recojiéndolos en un tubo de centrífuga. Añada suero y centrifuge.
- 6.- Tire el sobrenadante y resuspenda las células del sedimento en una cantidad medida de medio de cultivo.
Utilizando una cámara cuenta glóbulos, calcule el número de células por mililitro, de la suspensión obtenida.
- 7.- Transfiera las células a un frasco adecuado y diluya con suficiente medio para cultivo de tejido, para tener una concentración final de 10^6 células por mililitro.
- 8.- Siembre en cada caja de petri 5 ml. de suspensión de células e incube a 37°C .
- 9.- Exáminelas con el microscopio a intervalos diferentes de tiempo: 24, 48 y 72 horas.

PREPARACION DE UN CULTIVO CELULAR A PARTIR DE EMBRION DE POLLO.





5.2 METODOS PARA DETERMINAR EL CRECIMIENTO VIRAL

El crecimiento de un virus en cultivo de células puede determinarse por cualquiera de los siguientes métodos: (26,50).

- Muestras de virus en fase líquida o celular para determinaciones de infectividad.
- Estudios sobre metabolismo celular.
- Modo de acción del virus sobre anticuerpos y otras sustancias antivirales.
- Infecciones virales co-existentes.
- Pruebas serológicas: fijación de complemento, hemoaglutinación, hemoadsorción, sueroneutralización.
- Microscopía.
- Técnica usando anticuerpos fluorescentes.

En caso de que se observen efectos citopáticos no asociados con la síntesis de virus infecciosos, el fenómeno se denomina "Efecto Citotóxico" (50).

Los efectos citopáticos producidos por los virus, varían desde aquellos muy severos en los que hay destrucción total de las células o solamente picnosis de los núcleos (5,12,26,50,52,53). Si estas células que muestran efectos citopático se colorean por el método clásico de hematoxilina - eosina, se observa que la célula en general se vuelve picnótica, o sea que tanto el núcleo como el citoplasma presentan afinidad marcada por los colorantes (12).

Se ha comprobado que cultivos de tejidos humanos, obtenidos de abortos terapéuticos y de operaciones como la circunción proporcionan el desarrollo de virus que no pueden crecer en otros medios (HeLa), (31;39,49).

5.3 CLASIFICACION

Actualmente se utilizan tres tipos de cultivos (39,52,53).

Cultivo primario.

Cultivo de monoestratos

Cultivo secundario.

Cepa.

Línea.

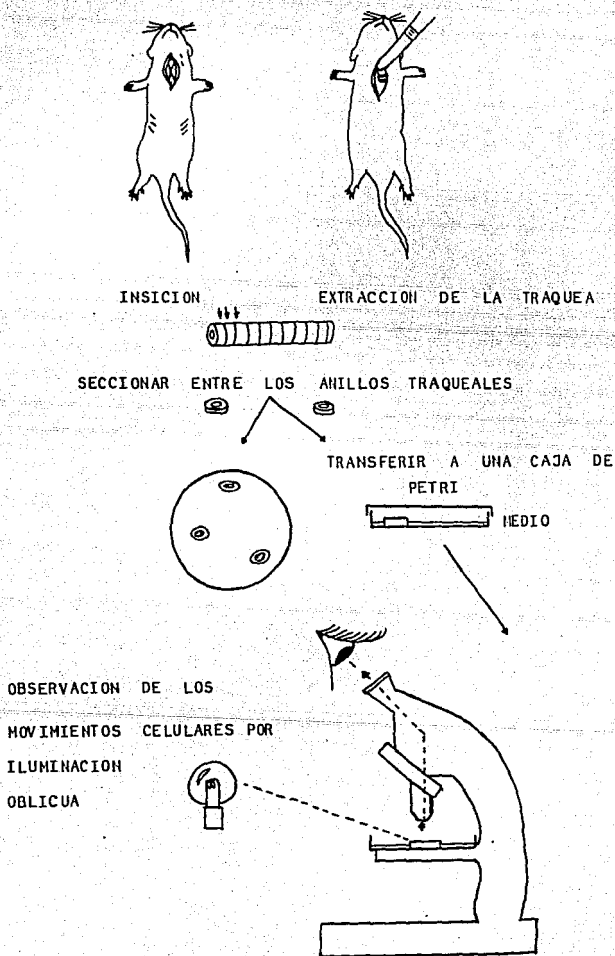
Cultivo de suspensión - estacionario

Cultivo de órganos. fig. 5.3

Los diferentes tipos de cultivos celulares pueden dividirse en dos grupos:

- Cultivo de células que crecen en un medio líquido u otro substrato utilizable en la forma de cultivo sumergido por agitación mecánica.
- Cultivo de células que crecen mantenidas dentro o sobre un tubo, frasco o caja de petri (37).

Fig. 5. PREPARACION DE CULTIVO DE ORGANIOS (Tráquea).



5.4 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo y reactivos son básicos para el desarrollo de los cultivos de tejidos y células. Los medios utilizados para el crecimiento celular se pueden agrupar en cuatro grandes grupos: (50).

- a) Medios esenciales para supervivencia inmediata de las células.
- b) Medios esenciales para supervivencia prolongada de las células.
- c) Medios esenciales para crecimiento celular indefinido.
- d) Medios esenciales para funciones especializadas.

Los componentes esenciales para la supervivencia inmediata de las células o tejidos controlan la presión osmótica y el pH, proporcionan una fuente de energía y ciertos iones orgánicos, los cuales se llenan con soluciones balanceadas de sales (26,37,50).

Las células sobreviven más tiempo en soluciones balanceadas conteniendo suero, éste puede ser sustituido por una mezcla sintética que contendrá: aminoácidos esenciales, oxígeno, vitaminas y proteínas séricas (50).

Existen otros medios que presentan una composición más compleja y que tienen que adaptarse a las células u órganos bajo investigación, en forma individual, ejemplo: la vitamina A es un componente esencial del medio empleado en el crecimiento de células epiteliales ciliadas (50).

Los medios para cultivo de células pueden agruparse también de la siguiente manera:

- 1.- Medios de composición química definida o sintética.
- 2.- Medios semi-sintéticos.
- 3.- Medios de composición química indefinida o naturales (50).

5.5 FUENTES DE TEJIDO PARA CULTIVO.

Derivan de dos fuentes fundamentalmente diferentes; embriones y tejidos adultos.

Los tejidos embrionarios son estériles, debiendo usarse técnicas asépticas para su manipulación, las células de estos tejidos tienden a crecer fácilmente migrando y produciendo mitosis - poco después de haber sido sembrados, pueden ser embriones de: pollo, ratón, humano principalmente (50).

El material adulto es tratado en forma especial para asegurar su esterilidad antes de sembrarlo (50). Los tejidos de tumores y de animales adultos, sus células tienden a crecer más rápida y fácilmente en los primeros días (50).

Otra diferencia entre tejidos embrionarios y adultos, estriba en que las células de los primeros son generalmente capaces de crecer en medios completamente heterólogos, en cambio los segundos, lo hacen en mejor forma en medios de origen homólogo(50).

5.6 PREPARACION DE CELULAS PARA CULTIVO

En la preparación de cultivos primarios de células se acostumbra liberar las células (5,26,46,50). Fig. 5.4

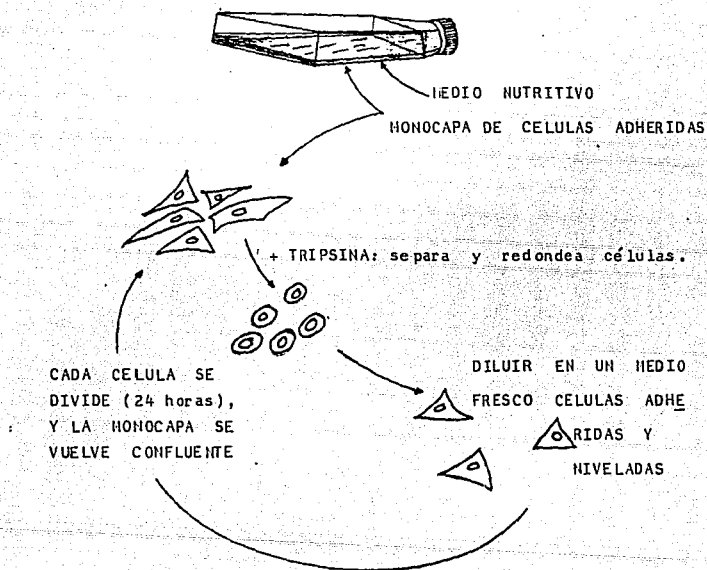
Las dos enzimas más usadas son: La pancreatina y la tripsina (26,27,31,46,50).

La técnica de preparación es sencilla, se procede en primer lugar al corte del tejido en pequeños fragmentos, estos son lavados varias veces con soluciones balanceadas para remover los eritrocitos y detritus celulares (26,27,31,39,46,50). Posteriormente se suspenden en una solución de tripsina y se dejan a temperatura de 37°C con agitación ocasional, las células son liberadas del tejido y quedan en suspensión. Se transfieren a un tubo de centrifuga, se decanta la solución de tripsina y se vuelve a centrifugar (1,12,26,31,39,56,50).

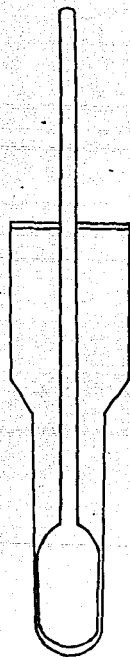
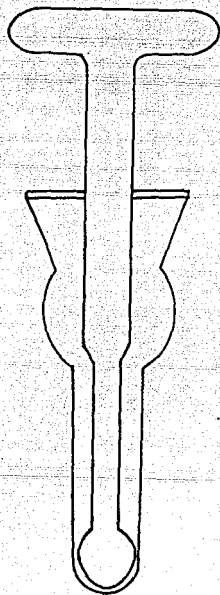
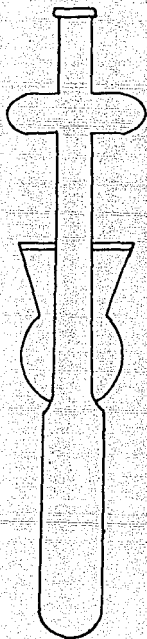
El proceso se repite varias veces, procediéndose luego al recuento celular. Se ajusta un determinado número de células por mililitro (1,12,26,50).

Después de extraer esta suspensión se coloca en un recipiente de vidrio o plástico de fondo plano junto con un medio líquido (Eagle), que contiene iones necesarios a concentraciones isoosmóticas, aminoácidos, vitaminas y suero animal. El bicarbonato suele emplearse como un tampón en equilibrio con el CO₂ del aire situado por encima del medio (5,26,27,50).

Fig. 5.4 CULTIVO CELULAR



TRITURADORES DE TEJIDOS



Cuando los cultivos presentan un hacinamiento excesivo, las células pueden desprenderse de la pared del recipiente mediante tripsina o un producto quelante EDTA, una fracción de éstas se utiliza para iniciar nuevos cultivos secundarios, lo cual se denomina, "Transferencia celular" (27).

5.7 PREPARACION DE CULTIVOS

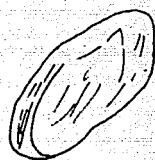
Los cultivos primarios son aquellos que se obtienen a partir de la disgregación enzimática o mecánica de embriones, órganos o tejidos (normales o tumorales), de humano o animales para producir una suspensión celular, la cual es llevada "In vitro" a condiciones que imitarán lo más posible sus condiciones de origen (5,25).
Fig. 5.5

En virología estos cultivos se utilizan para la obtención de clonas, cepas, o líneas celulares, o bien, directamente para el aislamiento y propagación de virus (5,27).

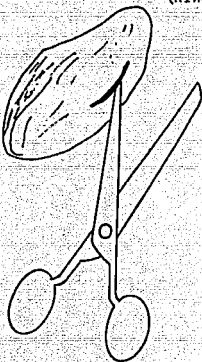
Las células se toman frescas de los animales y se colocan en el cultivo, la mayoría tienen un crecimiento muy limitado In vitro, 5 a 10 divisiones máximo, sin embargo soportan la réplica de un amplio número de virus (27). Estas células mantienen el número diploide de cromosomas. Los cultivos subsiguientes derivados de un cultivo primario o secundario reciben el nombre de Línea Celular Diploide y pueden crecer por 50 a 100 pases en serie, conservando casi todo su número de cromosomas original, para después crecer lentamente o morir (27,46,50,52,53).

Fig. 5.5 CULTIVO DE ORGANOS.

(Riñon)



Riñon rodeado de grasa.



Quitar la grasa



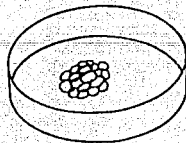
Riñon rodeado por su cápsula.



Quitar la cápsula.



Riñon libre de cápsula.



Cultivo de Riñon.

A veces las células diploides son transformadas y se propagan indefinidamente (Neoplasias), se les conoce como Líneas de células establecidas o continuas (46,50,52,53).

CULTIVOS SECUNDARIOS

Proviene de cultivos primarios, dando así origen a monoestratos (superficies uniformes que se han obtenido de células individuales (37).

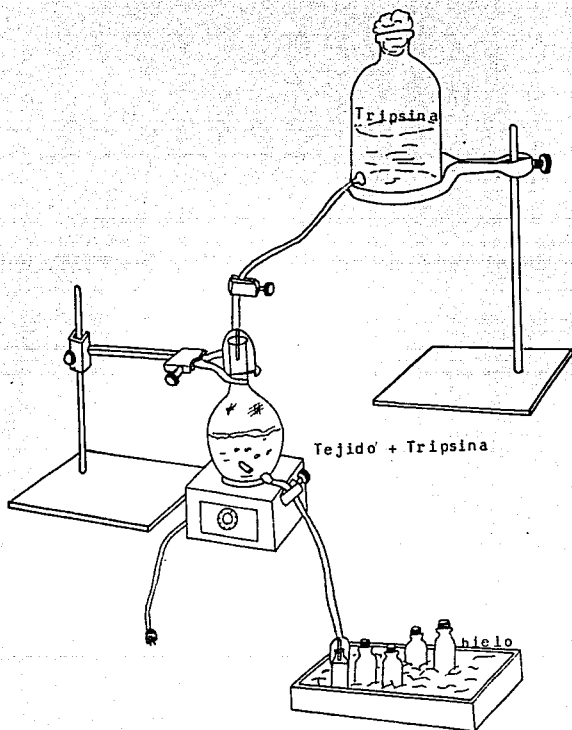
Las ventajas de los cultivos secundarios son: los monoestratos no se desintegran tan rápidamente como en los cultivos primarios y también por la facilidad de detectar cambios específicos causados por el virus, se pueden mantener en congelación por mucho tiempo(37).

CEPA

Las cepas son células de un solo tipo, capaces de sufrir cerca de 100 divisiones "In vitro", antes de morir. Conservan su número diploide de cromosomas todo el tiempo (28).

Las células pueden continuar luego la multiplicación a una tasa constante en muchas transferencias sucesivas y el cultivo primario se dice que ha originado una Cepa Celular denominada "Cepa Celular Diploide", cuyas células no presentan alteraciones morfológicas, ni de crecimiento (25,27).

METODO SEMIAUTOMATICO DE TRIPSINIZACION.



Cosecha celular.

LINEA

Son células de un solo tipo, capaces de propagarse "In vitro", para siempre. Se originan generalmente, de cánceres o por mutación ocurrida en células diploides (25,28).

Durante la multiplicación de una cepa celular, algunas células empiezan a alterarse, adquieren una morfología distinta, crecen más rápidamente en un inóculo menor (27,37). Existen líneas celulares originadas de distintos órganos y animales ya establecidos. El número de pasajes que se considera para establecer una línea es de 30-65 pasajes (37).

CULTIVO EN SUSPENSION

Los cultivos en suspensión se usan para algunos tipos de células, particularmente linfocitos, estas células permanecen suspendidas en el medio (28,46).

Este tipo de cultivos de células proliferan mientras están suspendidas en el medio de cultivo, las células se mantienen en movimiento para impedir que se sedimenten en el fondo del recipiente (37). Debido a que el incremento de células es de 4-5 veces, la suspensión original de células debe contener una concentración más alta de células que el que se usa para la preparación de cultivos de monoestrato (37).

La ventaja de este tipo de cultivo es que se puede obtener una mayor concentración de virus en un volumen pequeño de cultivo (37).

CULTIVO DE ORGANOS.

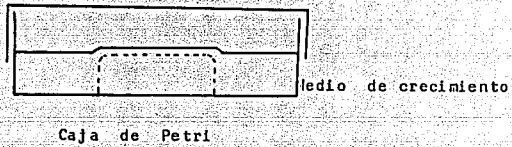
Consiste en trozos pequeños de órganos, estos fragmentos son puestos en un soporte de acero inoxidable conteniendo una caja de petri, se pone el medio de cultivo hasta que alcance el nivel del soporte y se incuba en una estufa de CO_2 al 5-10% (37). El tejido se lava con un medio estéril o con medio de conservación, se corta en pequeños fragmentos con tijeras y se tritura para hacer una pasta homogénea. Se añade diluyente en cantidades suficientes para concentraciones de 10-20%, esta suspensión puede centrifugarse a baja velocidad (no más de 2000 rpm.), durante 10 minutos para sedimentar los residuos celulares inoculos (39). Fig. 5.6

El crecimiento de este tipo de tejido es continuo, así que la identidad o la parcial diferenciación de las estructuras es mantenida con éxito. La proliferación excesiva de tejido es controlada ajustando los diluyentes del medio (37).

CRECIMIENTO DE LOS VIRUS EN CULTIVOS DE CELULAS

Lo que se ve, es el efecto del virus, ya sea enfermedad o muerte del animal ó bien la disgregación de las células en cultivo (cambios citopáticos, interferencia viral, producción de hemo

Fig. 5.6 Aparato para cultivo de órganos.



glutinación, etc.), o la presencia del virus será detectada mediante procedimientos serológicos (21,39,50).

La propagación de un virus "in vitro", exige en primer lugar que se cuente con un cultivo de células que soporten la actividad viral (50). Para propósitos de aislamiento y proliferación viral se debe considerar la posibilidad de que existan inhibidores virales en el suero, plasma y los extractos celulares. Los presentes en el suero pueden ser: anticuerpos, inhibidores específicos, estos últimos pueden también encontrarse en extractos celulares, (interferón). La forma en que actúa el interferón es haciendo que las células que se han puesto en contacto con él, se vuelvan más resistentes a la acción viral sin que inactive al virus directamente o produzca efecto tóxico alguno directamente sobre la célula (50).

5.8 TITULACION

Cuando un virus ha sido aislado, identificado y se ha producido un abasto de él, el siguiente paso es el conocer su potencia, para lo cual se determina la cantidad mínima necesaria de un virus para obtener una respuesta específica en un huésped, la cual suele ser todo o nada (5).

La determinación cuantitativa de la actividad viral se llama "Titulación" (5).

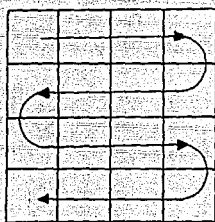
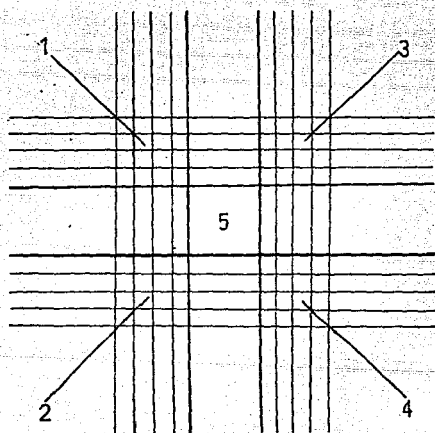
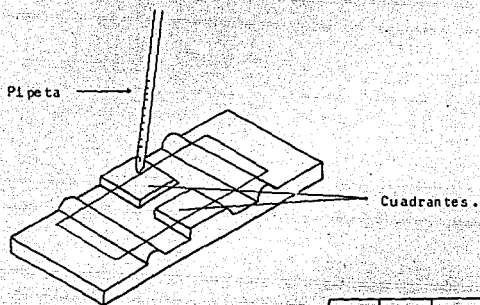
La multiplicación del virus nos da como resultado una ampliación de los efectos producidos por la mínima cantidad de virus llamada "Viricidad Infecciosa", la cual corresponde a un solo elemento, ya sea un virión o una molécula de ácido nucleico infeccioso (5).

Como se trabaja con animales vivos, ya sea animales, embriones de aves o incluso cultivos celulares y aún cuando en apariencia sean iguales en relación a su edad, peso, sexo, etc., su respuesta no es homogénea, ya sea que en una población existan tanto individuos resistentes, como susceptibles por lo que es necesario hacer determinaciones al 50%. El título de virus determinado de esta manera, corresponde a la dilución de dicho virus en la cual la mitad de los individuos o cultivos inoculados dan una respuesta positiva, si el sistema es utilizado en cultivos celulares, el título se expresa en "Dosis Infecciosas para Cultivo de Tejidos al 50% (DICT 50). (5,45), (Método de Reed and Huench).

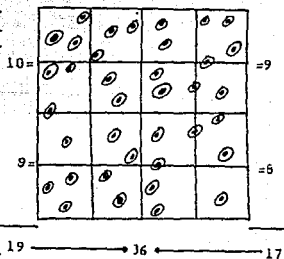
5.9 RECUENTO CELULAR

El recuento de células por mililitro se obtiene mediante el conteo del número total de células en los cuadros grandes del hemocitómetro y este número se divide entre el número de cuadros - contados a fin de sacar un promedio de células por cuadro (50). Este promedio se multiplica por un factor que es 10 000 y luego por 2 (factor de dilución), obteniéndose así el número de células por mililitro (50). Fig. 5.7

Fig. 5.7 RECUEITO CELULAR.



MODO DE CONTAR



Es importante llevar a cabo el recuento celular para asegurar así una concentración adecuada de las células al momento de la siembra, de manera que no haya un sobrecrecimiento de cultivo después de una incubación prolongada, dificultándose así las observaciones de los efectos de los virus sobre las células (50).

5.10 CONSERVACION

Para evitar en la medida de lo más posible la pérdida de las características deseables de las poblaciones celulares en cultivo y para prolongar la vida útil de éstas, se recurre a la preservación mediante la técnica de congelación y su posterior mantenimiento a bajas temperaturas, empleando para ello: nieve carbónica, nitrógeno líquido o congeladores mecánicos que permitan conservar a las células a temperaturas que oscilan entre -70°C y -196°C , con las que se abate toda actividad enzimática y con esto el metabolismo celular sin detrimento de la integridad morfo-fisiológica de las células. La expresión vital se recuperará al reestablecerse la temperatura óptima para la actividad enzimática, (aproximadamente 37°C .) (5).

La forma en que la población celular sea descongelada, es un importante paso que debe ser celosamente vigilado, puesto que el éxito de la recuperación de la viabilidad está directamente relacionado con la manera de evitar la formación de grandes cristales que atentan contra la integridad física de las células (5).

La metodología para congelar implica la adición de agentes -crio-protectores, de manera que estos deberán de ser renovados ya que a temperatura ambiente, lo mismo que a temperaturas metabólicas, son por lo general tóxicos para las células (5,25).

Los porcentajes de recuperación viable de las poblaciones - que han sido congeladas son en términos generales satisfactorios, sin embargo las células que no recuperan su actividad vital serán elementos que contribuyan a la alteración del medio, de manera - que éste deberá ser eliminado y restituido por un medio fresco en un tiempo que no excedera de 24 horas, con esto se podrán reducir los riesgos potenciales que pudieran conducir a la pérdida del ma - terial biológico(5).

CELULAS Y LOS VIRUS QUE CRECEN EN ELLAS

Hela: poliomielitis, newcastle, herpes simplex, sarampión, paperas, coxsackie, ECHO y adenovirus.

Detrit 6 : algunos virus ARBOR.

Intestino embrionario humano: algunos virus ARBOR.

Amnios humano: varicela, sarampión.

Fibroblastos de ratón: cepa L; herpes simplex.

Riñón de conejo: tipos de virus herpes y adenovirus.

Riñón canino: distemper canino, hepatitis canina.

Riñón de embrión ovino: V. fiebre aftosa, IBR.

Membrana corialantoidea de embrión de pollo: V. newcastle, Influenza, bronquitis infecciosa.

Pulmón de embrión de pollo: virus newcastle, influenza.

Riñón de embrión de pollo: bronquitis infecciosa de pollos.

Embrión de pollo: integro: herpes simple, enfermedad de newcastle, influenza.

LINEAS CELULARES MAS UTILIZADAS EN VIROLOGIA

LINEA CELULAR	ESPECIE DE ORIGEN	TEJIDO DE ORIGEN	MORFOLOGIA
Hela	Humano	Carcinoma de cervix	Epi.
Detrit-6	Humano	Médula ósea esternal	Epi.
Minnesota-EE	Humano	Epitelio esofágico	Epi.
L-132	Humano	Pulmón embrionario	Epi.
Intestino-407	Humano	Intestino embrionario	Epi.
Hígado chang	Humano	Hígado	Epi.
KB	Humano	Carcinoma oral	Epi.
Detrit-98	Humano	Médula ósea esternal	Epi.
AV ₃	Humano	Amnios	
Hep-2	Humano	Carcinoma de laringe	Epi.
WISH	Humano	Amnios	Epi.
J-III	Humano	Sangre periférica	Epi.
LLC-MK ₂	Hono	Riñón	Epi.
BS-C-1	Hono	Riñón	Epi.
HaK	Hamster sirio	Riñón	Epi.
BHK	Hamster sirio		
B14-faf-G ₃	Hamster chino	Riñón	Fib.
Don	Hamster chino	Células peritoneales	Fib.
CHO	Hamster chino	Pulmón	Fib.
L	Ratón	Tejido conectivo	Fib.
NCTC, clona 929	Ratón	Tejido conectivo	Fib.
NCTC, clona 2472	Ratón	Tejido conectivo	Fib.
CCRF S-180 II	Ratón	Sarcoma 180	Fib.
3T3	Ratón	Tejido conectivo	Fib.

Fib. tipo fibroblasto

Epi. tipo epitelial

+ Davis (27).

U N I D A D 6

HEMOAGLUTINACION E INHIBICION DE LA
HEMOAGLUTINACION

OBJETIVOS:

- Conocer el manejo de las técnicas de Hemoaglutinación e Inhibición de la aglutinación como un método sencillo y útil para el diagnóstico de ciertas enfermedades virales.
- Practicar el manejo de la técnica de la prueba de Hemoaglutinación e Inhibición de la Aglutinación. Interprete la titulación de un virus hemoaglutinante.
- Interpretar los resultados obtenidos en las reacciones de hemoaglutinación e inhibición de la aglutinación a partir de sueros de aves inmunes.

INTRODUCCION:

El fenómeno conocido como hemoaglutinación, fue descrito por primera vez en 1941 por Hirst, quien analizó el mecanismo de aglutinación por el virus de la Influenza (0,50,66).

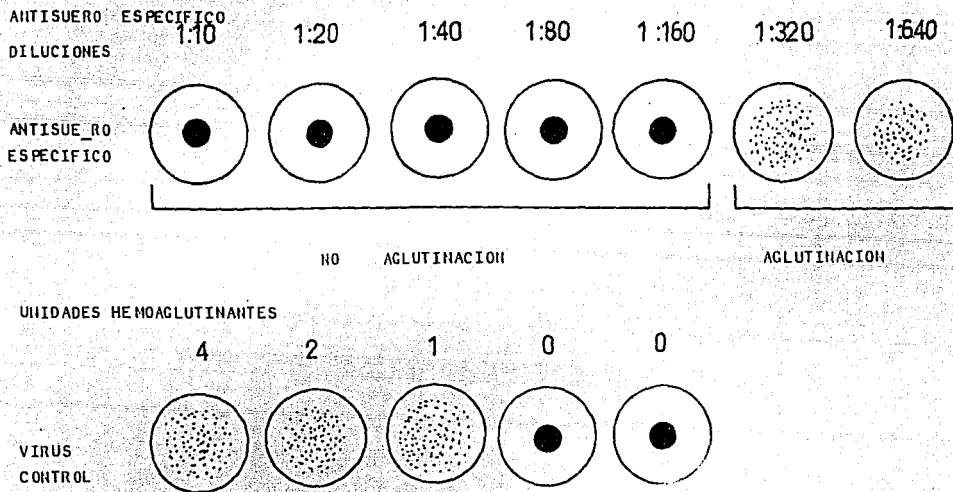


Fig. 6.1 En este ejemplo de inhibición de la aglutinación completa, la dilución 1: 160

Sirve para identificar el virus y el título de el antisuero.

La prueba se fundamenta en el fenómeno que demuestran varios virus y algunas bacterias (micoplasma), de unirse a receptores en los glóbulos rojos y causar hemoaglutinación. Este no es un fenómeno inmunológico, sino más bien representa una actividad enzimática por parte de microorganismos que permite su adherencia a las células (8). Fig. 6.1

Los anticuerpos específicos contra estos microorganismos pueden impedir que esta reacción enzimática se lleve a cabo, probablemente porque se unen a los sitios activos de la enzima o al sitio de producción de ésta en el microorganismo; a este fenómeno se le denomina Inhibición de la Aglutinación (0,27,64).

6.1 HEMOAGLUTINACION

FUNDAMENTO:

Es la propiedad que tienen ciertos virus de unirse simultáneamente a receptores específicos de los glóbulos rojos de diferentes especies animales (aves, mamíferos) e inclusive el hombre, estableciendo puentes entre ellos y si la concentración vírica es lo bastante elevada, se forman puentes múltiples que dan lugar a cúmulos de gran tamaño (5,20,27,37,39,41,44,46,50,52,53,56,65,67). Fig. 6.2

Existen varios criterios bien definidos que permiten clasificar a estos virus en grupos:(37)

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION 148
(H.A.)
fundamento

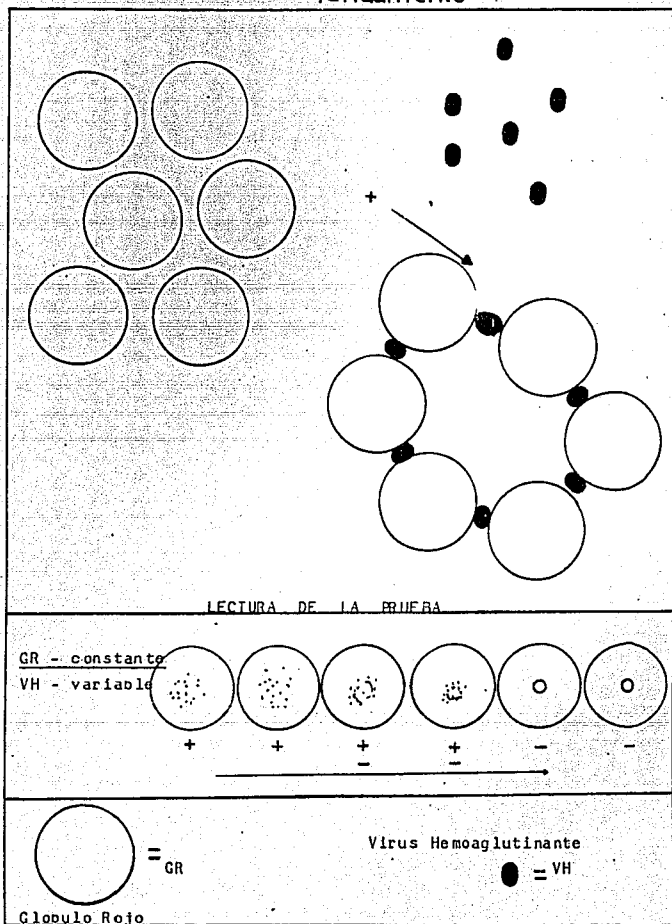


Fig. 6.2 Fundamento de la prueba de hemoaglutinación.

1. Aquellos en que la partícula vírica actúa como agente hemoaglutinante; estos virus poseen además una enzima (neuraminidasa) que destruye los receptores de los glóbulos rojos y provoca la reacción posterior a la hemoaglutinación o liberación de glóbulos rojos, con desaparición del fenómeno de hemoaglutinación.
2. Aquellos donde la partícula vírica también actúa como agente hemoaglutinante, pero los virus de este grupo, no poseen enzima que destruya a los receptores de los glóbulos rojos. Se incluyen en este grupo a los arbovirus, polivirus, virus ECHO, coxsackie y el virus de la meningitis del ratón.
3. Los miembros del tercer grupo, poseen una fracción soluble asociada a la hemoaglutinina, separable de la fracción vírica y que probablemente es una lipoproteína. Pertenecen a este grupo el virus vacunal de la viruela humana, el de la varicela humana (37).

6.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA HEMOAGLUTINACION VIRAL

1. Virus: a) No todos tienen la propiedad de aglutinar.
b) Número de pases.
2. Eritrocitos: a) Especie de donador. La especie animal de que son obtenidos los eritrocitos para estudio de hemoaglutinación es de extrema importancia. -

Algunos aglutinan eritrocitos de una amplia variedad de animales, otros de una sola especie.

b) Otros factores: edad, sexo, pérdida de su reactividad en el almacenaje a temperatura de refrigeración.

3. Medio ambiente: a) Temperatura: la cual está en función del virus, algunos aglutinan a 4°C , otros a 37°C y otros a cualquier temperatura, se usan generalmente, temperaturas de $20-25^{\circ}\text{C}$.

4. Concentración de algunos iones: sodio, potasio, etc. (5,20,41, 56).

Los glóbulos rojos utilizados pueden ser frescos desde recién obtenidos hasta una semana o bien, ser conservados en liofilización por más tiempo (5).

Los glóbulos rojos generalmente poseen muchos sitios receptores y si un virión se fija a dos glóbulos rojos simultáneamente, puede formarse una red de eritrocitos y viriones alternados formando un agregado; este fenómeno es llamado hemoaglutinación viral (20,27,41). La hemoaglutinación viral puede servir de prueba preliminar para identificar un virus; luego la inhibición de este fenómeno mediante un anticuerpo, puede constituir un método

para identificar un virus específico, o para medir niveles de anticuerpos en el suero (20,50,52,53,62,64,65,67). Puede calcularse la cantidad de virus existente en la preparación, observando la mayor dilución que produce aglutinación de una suspensión estandar de eritrocitos (5,65,67).

Algunos grupos virales que producen hemoaglutinación: paramixovirus, mixovirus, togavirus, virus de la influenza, plivirus, adenovirus, poxvirus, reovirus, coronavirus, enterovirus, rhabdovirus, alfavirus, flavivirus y bunyavirus (5,46,64).

6.3 HEMOAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA

Grupos como coronavirus, rhabdovirus y herpesvirus requieren de un tratamiento previo para liberar o exponer su hemoaglutinina así como al glóbulo rojo tratados con ácido tánico o bien cloruro de cromo, a esta reacción se le conoce con el nombre de "Hemoaglutinación Pasiva o Indirecta" y es de gran utilidad en el diagnóstico viral (5,47,62). La ventaja principal de esta técnica es su sensibilidad; es capaz de detectar muy pequeñas cantidades de anticuerpos (de 0.02 a 0.04 unidades gramo de proteína de anticuerpo), además de que se puede probar un gran número de suero al utilizar métodos de microtitulación (47,62).

En esta prueba se debe tener cuidado para controlar las reacciones inespecíficas, por lo cual es necesario utilizar los controles adecuados, estos se llevan a cabo titulando seriadamente - antisueros en diluciones al doble en presencia de una cantidad - constante de antígeno (47,62). La dilución más alta que provoque una clara aglutinación se considera como punto final de la reactividad y representa el título de anticuerpos presentes en el suero (62,65).

INTERPRETACION

La formación de agregados puede detectarse de varias maneras el método del patrón es el más simple, consiste en dejar la suspensión de los hematíes y los virus en reposo en un pequeño tubo de ensayo durante varias horas (2 horas a temperatura ambiente de pendiente del virus). Los eritrocitos no aglutinados reposan - por los lados del tubo o se asientan directamente hasta el fondo y forman un compacto botón circular con bordes lisis bien definidos. Los glóbulos aglutinados se pegan en el borde de la concavidad en el fondo del tubo o forman un borde desgarrado alrededor del botón de células no aglutinadas (27,44,50,58).

PROCEDIMIENTO

Prueba de hemoaglutinación con glóbulos rojos estandarizados y virus de la enfermedad de Newcastle.

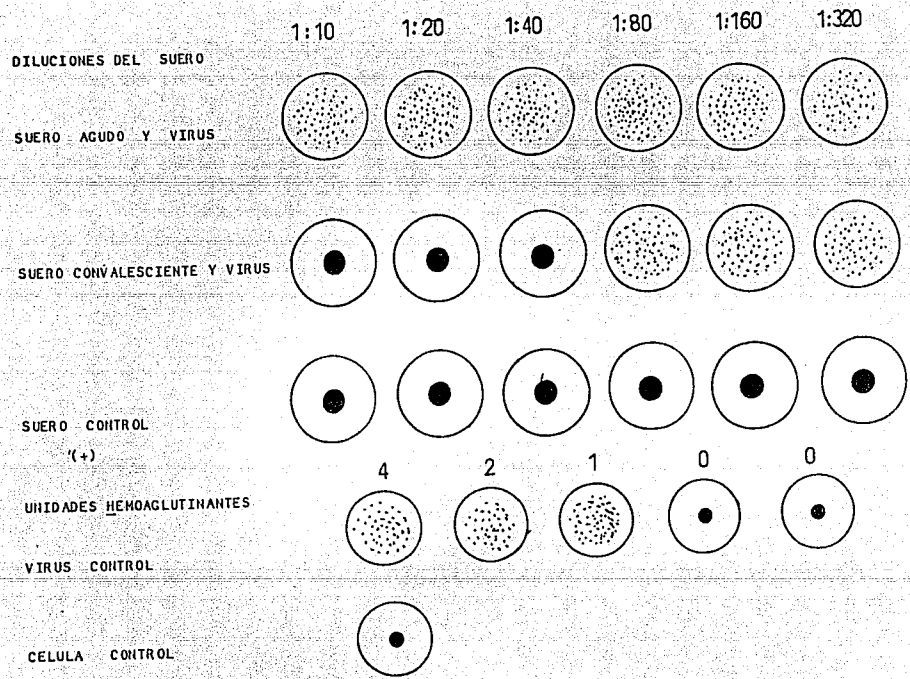


Fig. 6.3 Prueba de hemoaglutinación (procedimiento).

1. Se diluye el antígeno a una solución de 1:10 y se hacen diluciones dobles hasta llegar a una dilución 1:10240. Al final se deja una muestra testigo, nada más con diluyente.
2. A cada dilución se le agrega una cantidad de glóbulos rojos estandarizados y se incuban a 37°C, durante 45 minutos.
3. Se lee el título que alcanzó el antígeno (37). Fig. 6.3

6.4 INHIBICION DE LA AGLUTINACION

La propiedad que tienen ciertos virus de aglutinar glóbulos rojos (Hemoaglutinación) y la Inhibición de este fenómeno (Inhibición de la aglutinación), por los sueros inmunes, constituyen métodos de diagnóstico e investigación sencilla y útiles (37,41,44, 56,62).

FUNDAMENTO

La inhibición de la hemoaglutinación se basa en la unión del anticuerpo específico con la aglutinina del virión, lo cual interfiere en la unión hemoaglutinina viral y los receptores de la membrana de los glóbulos rojos. Este hecho permite identificar al virus y diagnosticar las virosis causadas por virus hemoaglutinantes (5,41,44,56). Fig. 6.4

Tomando en cuenta que para el establecimiento de un diagnóstico viral definitivo, se requiere de la obtención de los sueros

PRUBA DE INHIBICION DE LA HEMO- 155
 AGLUTINACION (I.H.A) fundamento.

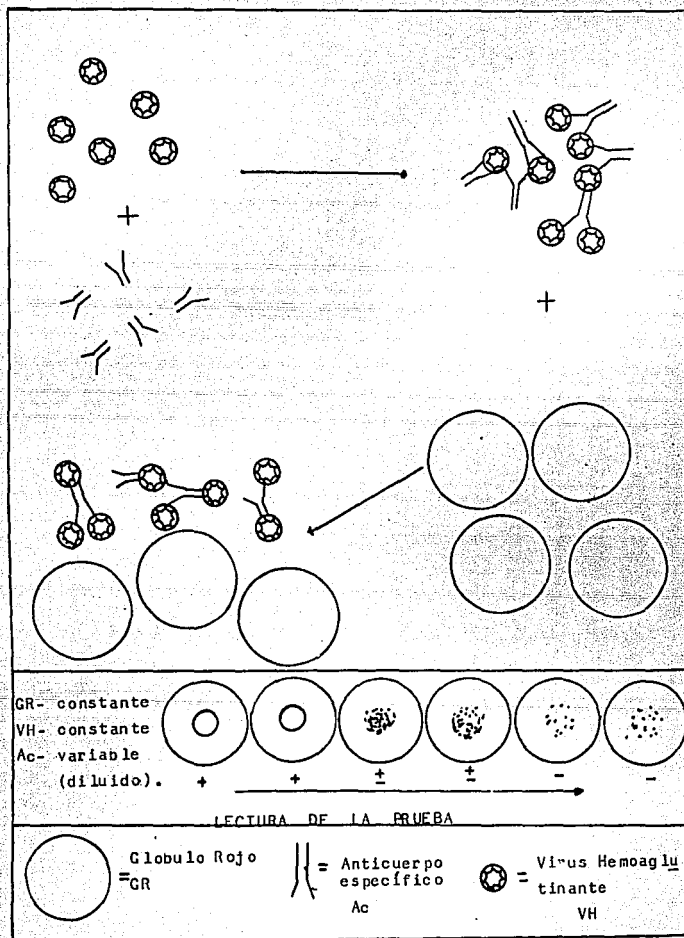


Fig. 6.4 Fundamento de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

durante la fase aguda (2-3 días después del comienzo de la enfermedad), como durante la fase de convalecencia (10 a 14 días después de iniciada la enfermedad), sueros pareados, a fin de poder establecer si hay una diferencia significativa en el título en ambos casos (5,39).

Así uno de los problemas prácticos de la prueba, es que los sueros de muchos pacientes contienen inhibidores no específicos - los cuales, a menos que sean renovados, pueden dar resultados falsos positivos y confunden la correcta identificación o el diagnóstico de un nuevo virus aislado (41,44,64).

Otra posible fuente de error son las diferentes sensibilidades de los glóbulos rojos de cada animal de la misma especie y de los mecanismos de reacción, así como, la lectura de los resultados (41).

Algunas enfermedades en las que puede demostrarse respuesta de anticuerpos mediante la prueba de inhibición de la Hemoaglutinación son: Influenza, Sarampión, Enfermedad de Newcastle, Viruela, Encefalitis viral de California, Encefalitis de San Luis, Encefalitis Equina del Oeste, Encefalitis Japonesa β , infecciones por Adenovirus, Reovirus (39).

INTERPRETACION

La última dilución del suero capaz de inhibir la hemoaglutinación, nos da el título del suero, que es una medida de la cantidad de anticuerpos que éste contiene (0).

Ha resultado útil en el diagnóstico de la Hepatitis (62).

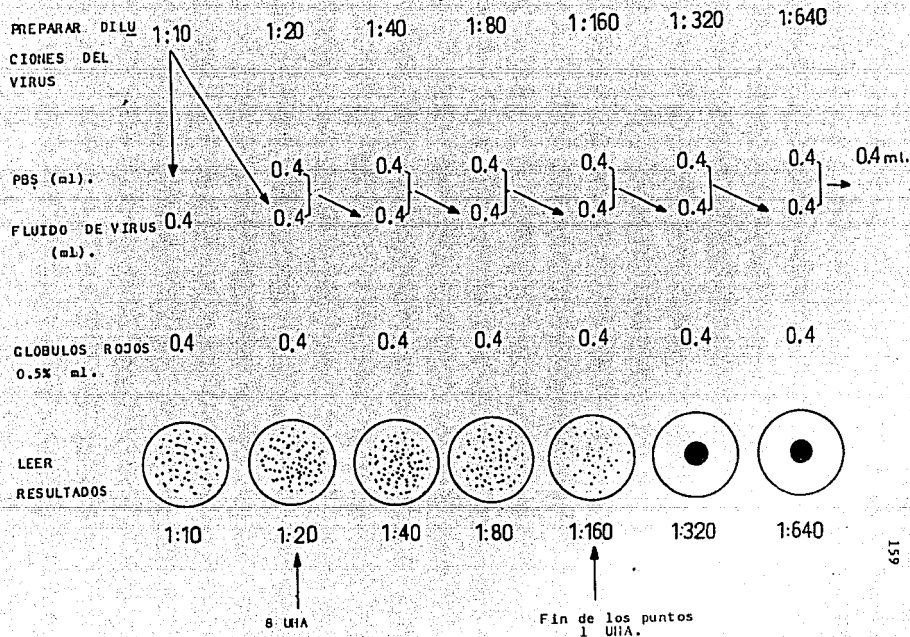
La aglutinación positiva está indicada por un revestimiento rojo granular y difuso en el fondo de la probeta o tubo. La falta de aglutinación está indicada por la formación de un botón rojo impactado en el fondo del tubo, que se desliza cuando se inclina el tubo (39,27,44,58).

PROCEDIMIENTO

1. Se hacen diluciones dobles en (PBS) de la muestra del suero - lavado, absorbido y descomplementado (Kaolin .25%), partiendo de una dilución de 1:10 hasta llegar a la dilución 1:10240, - dejando un testigo final.
2. Se agrega el antígeno previamente titulado y diluido en forma tal que la cantidad que se agrega contenga de 4 a 8 unidades hemoaglutinantes (UHA).
3. Se incuba de 12 a 18 horas a 4°C.
4. Se agregan los glóbulos rojos estandarizados y se incuba la mezcla a 37°C durante 15 minutos.

5. Se lee el título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación del suero, como recíproco de la dilución que inhibe el 50% de la actividad hemoaglutinante del antígeno (37). - Fig. 6.5

Fig. 6.5 Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (procedimiento).



U N I D A D 7

INMUNOFLORESCENCIA

OBJETIVOS

- Que el alumno pueda detectar la presencia de un antígeno viral en un cultivo, tejido o animal, así mismo tenga en cuenta los conceptos básicos indispensables para poder remitir y diagnosticar una enfermedad mediante la Prueba de Inmunofluorescencia.

INTRODUCCION

Los avances de la Inmunología y la Química fueron decisivos en el desarrollo de la técnica de Anticuerpos fluorescentes, por medio de uniones químicas estables (47).

Actualmente se emplea mucho para detectar secuencias de formación de antígenos, pero básicamente en estudios de replicación viral (47). Sin embargo los aspectos de diagnóstico de virología han sido los más espectaculares, detectando antígeno viral en material de pacientes o identificando virus aislados de los mismos o por demostración de anticuerpos específicos contra ciertos virus (47).

La importancia de la prueba de anticuerpos fluorescentes en

el diagnóstico de enfermedades contagiosas, es que el clínico pue da tomar la decisión o acción apropiada para prevenir la disemina ción del agente contagioso a poblaciones de animales susceptibles e inclusive al hombre (Rabia), (48).

La Inmunofluorescencia es esencialmente una técnica histoquímica o citoquímica para la identificación y localización de antígenos. El anticuerpo específico es conjugado con los componentes fluorescentes, resultando un trazador sensible con reactividad in munitaria alterada (37,62).

7.1 ALGUNAS APLICACIONES DE LA INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia ha logrado amplio uso en muchas áreas de la medicina clínica, ha sido de gran utilidad como instrumento sensible de diagnóstico (62).

- Identificación de linfocitos T y B en la sangre.
- Identificación de autoanticuerpos en el suero, ejemplo: anticuerpos antinucleares.
- Identificación de los componentes del complemento en los tejidos.
- Identificación rápida de microorganismos en los tejidos o en los cultivos.
- Identificación de cromosomas de patrones de bandas específicas.
- Identificación de antígenos específicos de tumores de tejidos con neoplasias.

- Identificación de los antígenos de transplante de diversos órganos.
- Localización de hormonas y enzimas.
- Estimación cuantitativa de proteínas séricas y de anticuerpos - (62).

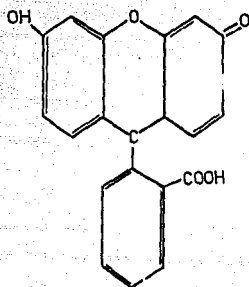
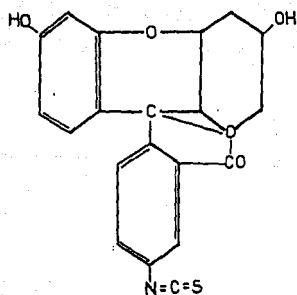
La inmunofluorescencia es una reacción del tipo unión antígeno-anticuerpo, (Ag-AC), y puede ser puesta en evidencia por la emisión de fluorescencia, si se utiliza en ella anticuerpos unidos a radicales orgánicos con propiedades fluorescentes. Se hace uso del microscopio de fluorescencia para visualizarla (25,37,39, 48,59,62).

Los colorantes más comunmente empleados son: Fig. 7.1

- . Derivados de la fluoresceína.
 - . Derivados de la rodamina.
 - . Cloruro de 5 sulfonil, 1-dimetil-amino afteno, (DANSO).
- (36,37,39,45,47,48,62,64).

Este método permite la detección de antígenos o combinaciones antígeno-anticuerpo, dentro de las células o dentro del tejido mismo (36,47,50,52,53,56,59,62).

Con antígenos fijados químicamente (células, tejidos, bacterias, hongos, etc.), la prueba de Inmunofluorescencia permite la determinación visual del sitio en que el anticuerpo se une al antígeno, determina el sitio exacto de unión del anticuerpo en las células (48).

Fig. 7.1 Colorantes utilizados en la Prueba de Inmunofluorescencia.**FLUORESCINA****ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA**

Es una prueba de gran especificidad, alta sensibilidad, fácil de realizarla y rápida, contando con el equipo es de relativo bajo costo (59).

Los virus pueden ser localizados mediante el uso de antígenos adecuadamente marcados en muestras patológicas, tejidos o cultivo de tejidos infectados, huevos embrionados y animales de laboratorio (38,41).

Los diversos métodos para usar anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes se aplican al diagnóstico de rutina y a la investigación sobre enfermedades virales (20,52,53,56).

PREPARACION DEL CONJUGADO

Aunque el suero completo puede usarse para la preparación del conjugado, se obtienen resultados más satisfactorios conjugando únicamente las gamaglobulinas. La fracción de globulinas puede separarse de otras proteínas del suero por saturación, precipitación con sulfato de amonio; fraccionación con etanol o por cromatografía con dietil amino celulosa (36,37,47,62).

La cantidad de colorante requerida para la conjugación, se calcula de acuerdo a la cantidad de globulinas en la solución (37,47,62).

El antisuero conjugado es añadido a las células o tejidos y se fija a los antígenos formando así un complejo inmunitario estable. Las proteínas no anticuerpo son eliminadas mediante lavado, la preparación resultante se observa en un microscopio fluorescente (62).

Los compuestos marcados con fluorocromo se conservan mejor en un lugar oscuro y congelados (62) (-20°C)

Actualmente se usan dos modificaciones de la prueba, son las siguientes: Fig. 7.2

+ Inmunofluorescencia directa.

+ Inmunofluorescencia indirecta.

(1,25,36,37,39,47,48,50,52,53,62,64).

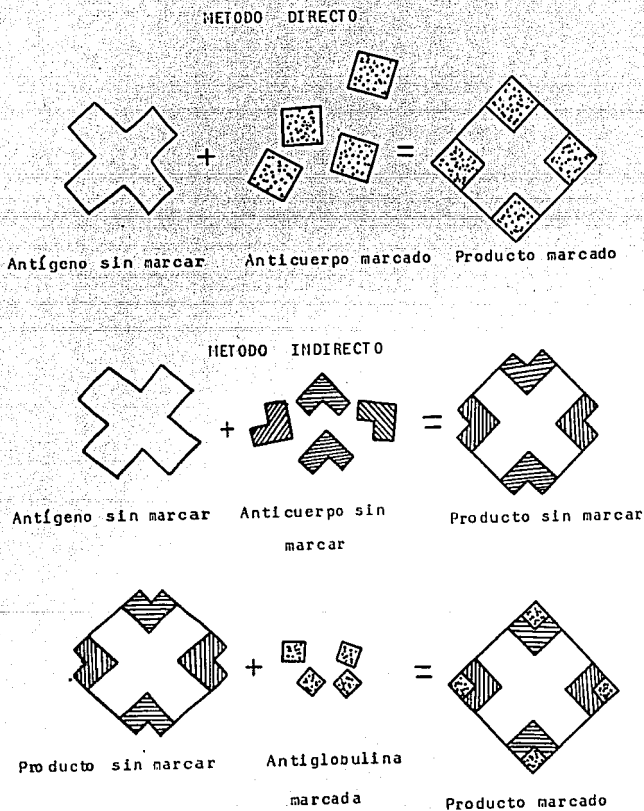
7.2 INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA

Fundamento:

Hace uso de moléculas de anticuerpos presentes en suero anti-vírico marcadas con colorante fluorescente, aplicadas directamente al antígeno (1,36,37,48,50,59,62,64).

La prueba directa es apropiada para identificar preparaciones de antígenos desconocidos (48,64), como virus de la rabia en tejidos cerebrales de animales infectados, rara vez se usa para identificar anticuerpos en suero de animales, si se usan preparaciones de antígenos conocidos (48).

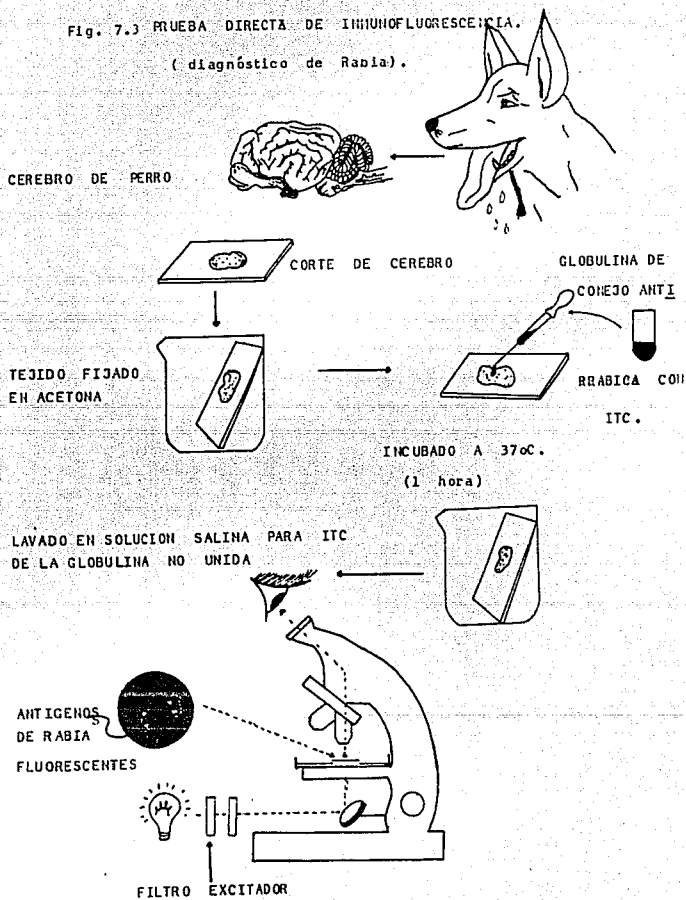
Fig. 7.2 Reacción de Inmunofluorescencia.



Técnica:

1. Pequeños fragmentos de tejido nervioso infectado son colocados en abatelenguas de madera.
2. Con un portaobjetos limpio se presiona sobre el abatelenguas y se hacen dos impresiones.
3. El exceso de tejido es revivido por presión sobre papel filtro.
4. Las laminillas son marcadas e identificadas.
5. Se fijan las impresiones durante 10 minutos en acetona fría.
6. Se circulan las impresiones con un lápiz-graso.
7. Una de las impresiones se colorea con una mezcla de conjugado y la otra con una mezcla de conjugado SNC (cerebro normal).
8. Se incuba en posición horizontal en una cámara húmeda a 37°C. durante 30 minutos.
9. Se lavan dos veces las laminillas con PBS, con ligera agitación durante 5 minutos.
10. Se enjuagan con agua bidestilada durante 1 minuto.
11. Se secan las laminillas en un secador eléctrico.
12. Se cubre con el elvanol y un cubreobjetos.
13. Se observan al microscopio (37). Fig. 7.3

Fig. 7.3 PRUEBA DIRECTA DE INMUNOFLORESCENCIA.
(diagnóstico de Rabia).



Los anticuerpos específicos depositados sobre los sitios del antígeno, aparecen con fluorescencia amarillo verdosa bajo la luz ultravioleta del microscopio (cuando se usa fluoresceína), (1,36, 37,39,45,47,48,52,53,56,59,64).

Ventajas:

La principal ventaja es que sólo se emplea un reactivo de - tinción (47,59). Una vez que el conjugado ha sido titulado y eva luado, las reacciones requieren un mínimo de controles para esta- blecer la especificidad (47)

Requiere menos pasos y controles que el método indirecto (47, 50).

Aplicaciones:

Es apropiada para identificar preparaciones de antígenos des conocidos como: Virus de la rabia en tejidos cerebrales de anima- les infectados (1,36,48,64).

Tiene importante aplicación en el diagnóstico del virus de - la Rabia. La vacuna utilizada para proteger a los seres humanos, mordidos por animales rabiosos produce a veces efectos colatera- les como parálisis, por lo que es preferible tener un diagnóstico positivo de la enfermedad en el animal, antes de que se inicie la vacunación. Mediante esta técnica puede hacerse un rápido y de-

finitivo diagnóstico de la presencia del virus en los casos en que estén ausentes los Corpúsculos de Negri, o se dude de su presencia, de lo contrario es necesario inocular ratones, los cuales se observarán por lo menos durante 3 semanas antes de que pueda emitirse un diagnóstico negativo (forma clásica de elaborar el diagnóstico), (36).

En reacciones comparativas se ha encontrado que este método es más seguro, rápido y preciso para el diagnóstico de la enfermedad, que la inoculación en ratones (36,47,50). Pueden efectuarse lecturas a la media hora después de haberse recibido la muestra, aunque normalmente tarda de 2-4 horas e incluso un poco más (47).

Se pueden examinar materiales recientes, frescos, congelados o glicerizados. Se pone al descubierto el cuerpo de Ammon, suele ser la mejor zona para observar el virus rábico en los animales rabiosos de la mayoría de las especies (47).

Se harán improntas de juegos dobles, en primer lugar del Cuerpo de Ammon, después de la corteza cerebral y finalmente del cerebelo (47).

Los cortes de tejido nervioso que pueden contener virus de la rabia se fijan en acetona, el procedimiento de fijación aumenta la permeabilidad de las células nerviosas, lo que permite la penetración de globulinas antirrábicas (48).

Después de la incubación de los tejidos con los anticuerpos de la rabia conjugados con fluoresceína, se lavan los portaobjetos para eliminar el anticuerpo fluorescente no unido. El anticuerpo de la rabia permanece unido al antígeno del virus de la rabia. Las células infectadas con virus contienen Cuerpos de Negri (inclusiones virales), las células no infectadas no presentan fluorescencia (48).

Antes de dar un resultado por negativo, se han de examinar por lo menos cuatro extensiones de glándulas salivales o del sistema nervioso central por cada muestra; dos de ellas se preparan a partir del hipocampo y otras dos a partir de una pasta preparada moliendo en un mortero tejidos procedentes de hipocampo, cerebelo y tallo cerebral (47).

Si las muestras han sido recibidas en solución salina glicerinada al 50% (conservador), es imprescindible lavar el tejido varias veces en agua corriente o en solución salina. La glicerina puede falsear la prueba, ya que se combina con la acetona y oculta la fluorescencia (47).

En todos los casos antes de examinar las improntas problema, se han de examinar las improntas testigo preparadas con material encefálico infectado conocido y teñido con el mismo conjugado que se utiliza en las preparaciones problema con el fin de cerciorarse que el microscopio funciona debidamente y la tinción está bien realizada (47).

Esta prueba también se utiliza para detectar virus rábico - cuando la persona o animal se encuentran vivos, tomando improntas de córnea (Prueba de Schnalder), o biopsias de piel del cuero ca belludo de la región de la nuca o lunares de la cara (47).

Es útil en el diagnóstico de algunos casos de viruela y ru deola, se emplea también en el diagnóstico del virus de la influen za y en infecciones del virus sincitial respiratorio. De especial importancia es su aplicación en el diagnóstico de enfermedades her péticas (1).

CONTR OLES

Estos establecen la especificidad inmunológica de la fluores cencia observada.

- Antígeno + conjugado heterólogo = no fluorescencia.
- Tejido normal + conjugado homólogo = no fluorescencia.
- Antígeno + suero homólogo = no fluorescencia.
- Antígeno heterólogo + conjugado específico homólogo = no fluores cencia (47).

7.3 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Es un método comúnmente empleado para la detección de anticuerpos en el suero o antígenos en los tejidos o cultivos de células, donde no pueden detectarse por otros procedimientos (36,37,39,48,50,52,53,59). En esta técnica se usa un tercer reactivo, generalmente una globulina y es el que únicamente se marca con el fluorocromo (1,36,39,47,48,50,52,53,59).

Fundamento:

En el método indirecto se deja que el suero sin marcar se combine con el antígeno y sobre esta mezcla de antígeno-anticuerpo, se agrega globulina anticuerpo conjugada, la cual es específica para cada especie animal del que procede el suero sin marcar y que se está probando (26,38). Todo este complejo se verá fluorescer cuando se examine en el microscopio de luz ultravioleta (1,39,45,47,50,56,64).

Ventajas:

Es más sensible que el método directo pero incrementa la posibilidad de reacciones inespecíficas (1,36,39,47,50,59).

Un suero antiglobulina conjugado puede usarse con una gran variedad de sueros y antígenos virales (37,47,48,50,64), esto permite la selección de suero de animales en busca de anticuerpos (37,48).

Aplicaciones:

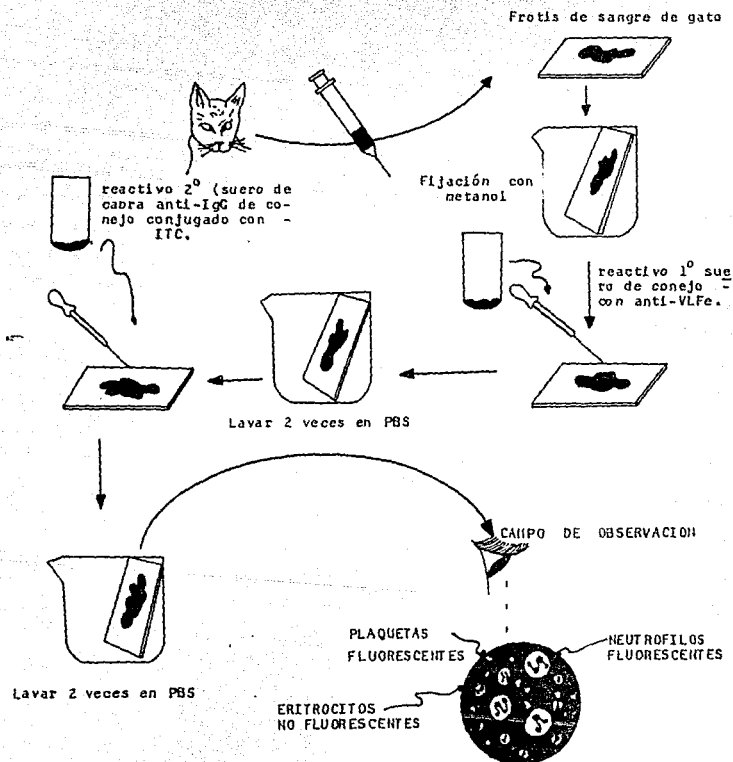
Puede utilizarse para los mismos fines que la reacción directa. Sin embargo, la complicación debido a la necesidad de usar un segundo paso de tinción en la identificación de gérmenes por este método, no siempre puede justificar sus ventajas. Puede utilizarse en el diagnóstico rápido de la Hepatitis Canina (36).

Desde el punto de investigación técnica se ha usado para estudiar el desarrollo progresivo del proceso de multiplicación viral, los cambios ocurridos en el ácido nucléico de las células infectadas, la relación de antígenos virales con los cuerpos de inclusión, así como también la patogénesis de la infección a nivel celular (47,50). Util en el diagnóstico del Virus de la Leucemia Felina (48,64). Fig 7.4

Controles:

- El conjugado antiglobulina no debe teñir tejidos normales e infectados.
- Si se emplean sueros heterólogos sin conjugar o sueros no inmunes despues de un suero antiglobulina conjugado, no debe aparecer fluorescencia específica.
- Adicionando un suero homólogo sin conjugar se produce la reacción antígeno-anticuerpo, si despues se adiciona un suero homólogo no debe aparecer fluorescencia (37).

Fig. 7.4 PRUEBA INDIRECTA DE INMUNOFLORESCENCIA.
(diagnóstico del Virus de la Leucemia Felina).



U N I D A D 8

DESINFECTANTES

OBJETIVOS

- El alumno conocerá el tipo de desinfectante útil para los programas de profilaxis y tratamiento de enfermedades causadas por virus.
- El alumno se familiarizará con los desinfectantes más comunmente usados en Virología.

INTRODUCCION

La desinfección es un conjunto de medidas dirigidas a eliminar o destruir a los agentes causantes de enfermedades y que se encuentran diseminados en el medio ambiente (3,4,27).

Los desinfectantes son de gran utilidad en Salud Pública, así como, en Sanidad Animal ya que ayudan a evitar la transmisión de enfermedades. En nuestro país se hizo notoria la importancia de la aplicación de desinfectantes en el brote de fiebre aftosa (1946-1954), en donde la desinfección de vehículos y objetos fue una práctica común y sin la cual el éxito de la campaña no hubiera sido posible (33).

Se entiende por desinfectante toda sustancia usada para destruir microorganismos, y por antiséptico una sustancia que no mata a los microorganismos, pero inhibe su crecimiento y multiplicación (3,12,19,32,33,34,39,43).

Los desinfectantes son utilizados para la desinfección de locales, utensilios, camas y otros objetos inanimados, esto es por su mayor potencia con respecto a los antisépticos los cuales, son utilizados en los tejidos de los animales para reprimir o impedir una infección (3,12,19,32,33,34,39,43).

No existe definición exacta entre las sustancias desinfectantes y antisépticas; un compuesto puede ser antiséptico en bajas concentraciones y desinfectante a una concentración más alta y provocar irritación en el tejido (32,33,43).

PROPIEDADES DESEABLES DE LOS DESINFECTANTES

- . Efecto letal rápido.
- . Espectro amplio.
- . Su letalidad no deberá disminuir ante la presencia de materia orgánica.
- . Estabilidad química, que no corrompa los instrumentos quirúrgicos, ni destruya otros materiales.
- . Bajo costo (32,33,34).

PROPIEDADES DESEABLES DE UN ANTISEPTICO

- * Amplio espectro y si es posible selectividad.
- * Actue en presencia de líquidos orgánicos.
- * Buen índice terapéutico y carezca de efectos secundarios indeseables.
- * No tenga olor desagradable.
- * No tóxico para los organismos superiores (3,32,33,34,43).

FACTORES QUE DETERMINAN LA EFECTIVIDAD DE LA DESINFECCION

- + La resistencia de los agentes biológicos contra los cuales se realiza la desinfección.
- + Propiedades microbicidas de los desinfectantes (especificidad).
- + Influencia del medio ambiente en que se realiza la desinfección.
- + Temperatura de la solución desinfectante.
- + Concentración del desinfectante.
- + Duración del contacto (4,33,43).

La efectividad de un medio de desinfección depende a menudo de la limpieza del material y de la presencia de materia orgánica que neutralizan rápidamente la acción de muchos agentes (19,27,32). Si se utilizan dos productos que se neutralizan mutuamente ejemplo: un ácido y un alcali, la desinfección será inefectiva (19).

NORMAS PARA LA UTILIZACION DE UNA SOLUCION DESINFECTANTE

- . Cantidad adecuada de solución por unidad de área.
- . Tiempo de exposición (mínimo 3-4 horas, ideal 24 horas).
- ... Método de aplicación de la solución.
- . Necesidad de limpieza previa a la aplicación del desinfectante (4,19,27,32,42,43). Fig. 8.1

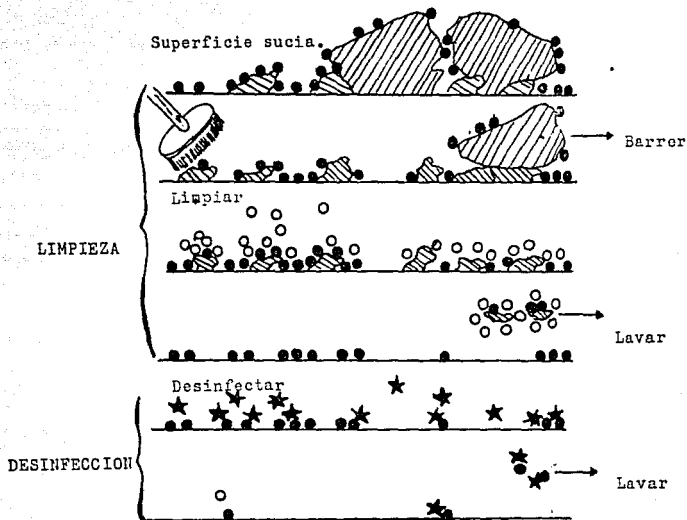
La acción microbiana de los desinfectantes está determinada por su concentración (a mayor concentración, mayor efectividad - pero también más irritantes), tiempo y temperatura por lo tanto, la valoración de su efecto puede ser compleja (19,32,39,50). A pesar de los muchos refinamientos de la técnica, la interpretación de los datos sobre desinfectantes desde el punto de vista de su aplicación en el campo, en muchos casos se deja al operador en la situación de aceptar sólo resultados negativos. Agentes que parecen eficaces en el laboratorio, fracasan en el campo (19,34).

8.1 TIPOS DE DESINFECCION

Desinfección corriente:

Es la que se realiza cuando existe un brote o enfermedad de los animales, con el fin de ir eliminando a los agentes a medida que estos sean expulsados del organismo de los animales. Se realiza al surgir la enfermedad infecciosa y después del aislamiento de cada animal enfermo, debe realizarse periódicamente hasta

SECUENCIA PARA EL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA
Y DESINFECCION.



○ Detergente
★ Desinfectante
● Microorganismos



Partículas de suciedad grandes.



Suciedad pegada a la superficie.

Fig. 8.1 Necesidad de limpieza previa a la aplicación del desinfectante.

la eliminación de la infección (4,32).

Deberá realizarse en:

- * Sitios donde se encuentra el animal enfermo: suelo, paredes, postes, bebedores, comederos, etc.
- * Los locales con sus instalaciones interiores donde se encontraba el animal enfermo o muerto. Fig. 8.2
- * Los aperos, instrumentos, forrajes que tuvieron contacto con los animales, incluyendo las ropas de trabajo personal.
- * Los corrales y callejones por donde paso el animal enfermo.
- * El equipo utilizado en la limpieza previa.

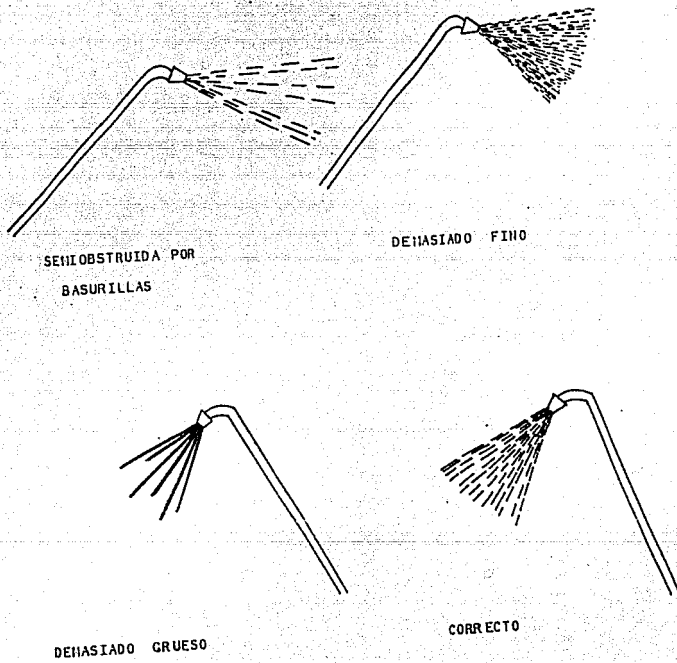
Esta desinfección se complementa con la utilización de prediluvios y rodiluvios en la entrada y salida de los locales y el predio (4).

Desinfección Profiláctica:

Es la que se realiza periódicamente en los locales donde se tiene ganado, tiene como objeto la prevención de la enfermedad.

Debe realizarse más a menudo si existen focos infecciosos de la enfermedad cercanos al predio (4,32,33). La desinfección profiláctica incluye también el uso de tapetes sanitarios y prediluvios, el motivo de estos es hacer pasar el calzado de las personas, las patas de los animales y las llantas de los vehículos en una solución desinfectante (33). Por lo general se realiza con sosa cáus-

Fig. 9.2 DIFERENTES TIPOS DE HAZ PARA ASPERSION.
(desinfección de locales)



o con los siguientes productos: (4).

PRODUCTO	CONCENTRACION
Solución caliente de sosa caústica.	2%
Solución caliente de carbonato de sodio anhidro.	5%
Solución de cal clorada.	2% de cloro activo.
Solución de hipoclorito de calcio o sodio.	2% de cloro activo.
Solución caliente de formaldehído.	1%
Solución recién preparada de cal a pagada.	10-20%

Desinfección Final:

Es la que se realiza después de eliminada la enfermedad y antes de dar por terminada una cuarentena para repoblar o liberar una área (4,32). Se realiza en tres fases:

- + Fase mecánica; limpieza y lavado de locales, cambio de la capa superior del suelo.
- + Fase física; incineración de cadáveres, estiércol y utensilios de poco valor, secado al sol de los utensilios.
- + Fase química; se realiza por medio de desinfectantes químicos, se tratarán todas las instalaciones, corrales, enfermería, estiércol, residuos y todo lo que estuvo en contacto con los animales

enfermos, dejando en lo posible un tiempo de exposición de 24 horas (4).

Los procedimientos de desinfección pueden variar de acuerdo a las circunstancias originadas por el tipo de enfermedad, ubicación del foco, especie animal afectada o susceptible, estructura e higiene de las instalaciones (4).

El efecto que los agentes físicos y químicos (desinfectantes), ejercen sobre los virus, pueden ser detectados mediante la medición de cualquiera de los siguientes cambios específicos:

- . Propiedades físicas y/o químicas del virus.
- . Propiedades antigénica e inmunogénicas.
- . Actividad serológica.
- . Pérdida de la infectividad (50).

FORMAS EN QUE LOS DESINFECTANTES ACTUAN SOBRE LAS CELULAS

- * Coagulación de la proteínas.
- * Ruptura de la membrana celular.
- * Remoción de los grupos sulfhidrilos libre.
- * Antagonismo químico.

TIPOS DE AGENTES DESINFECTANTES

Agentes físicos: calor, frío, radiaciones (rayos X, gama, ionizantes), desecación, filtración, etc. (3,4,12,27,33, 34,43,50).

Agentes químicos: Antisépticos y desinfectantes. Dentro de este grupo se encuentran todas aquellas sustancias utilizadas para prevenir la contaminación microbiana, disminuir la población o causarles muerte, ya sea aplicados sobre superficies de objetos inanimados o bien sobre tejidos (3,4,12,27,33,34,43,50).

8.2 DESINFECCION DE TIPO FISICO

Calor

El calor es el método de elección para la esterilización de todos los materiales a excepción de los que puedan ser dañados por él (4,27,34). Los virus y las células vegetativas de diversas bacterias son destruidas en pocos minutos a temperaturas de 50 a 70°C (17), debido a la desnaturalización de la proteína del virión, pierden también su capacidad infectante a 37°C a esta temperatura el grado de inactivación es menor (4,46,50).

En general los virus son termolábiles, pero algunos varían su termoestabilidad. Los virus con cápside provista de envoltura son más termoestables que los que carecen de la misma (46).

El uso de calor, aunque restringido en condiciones de campo, se utiliza en la destrucción por incineración de material contaminado o bien como vapor potencializando la actividad de los desinfectantes químicos (33).

Esterilización

Es el método por el cual se hace la destrucción completa de germen en los objetos inanimados, en tejidos vivos no puede establecerse. Puede ser de tipo físico, químico o ambos (3,32,33,34).

Cuando el calor se aplica con temperaturas menores a 100°C , tiene una acción limitada contra las formas más resistentes de microorganismos, pero los métodos que involucran temperaturas superiores a 100°C , están diseñadas para lograr una esterilización absoluta (12).

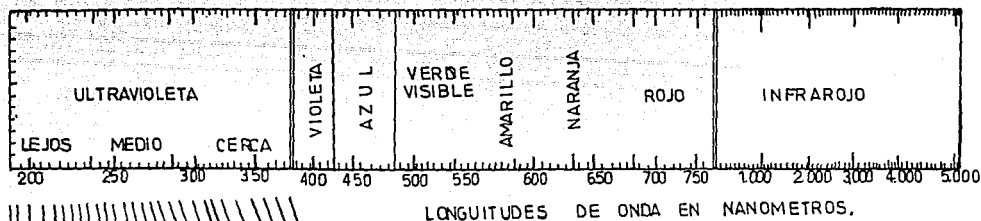
Radiaciones

La exposición a la luz ultravioleta inactiva la mayor parte de los virus, primeramente por daño al ácido nucleico, posteriormente induce la producción de radicales libres en agua, estos a su vez dañan a las proteínas y ácidos nucleicos (33,39,46).

Los virus son vulnerables a los rayos ultravioleta con longitud de onda menor de 3 000 U.A. (39) Fig. 8.3

Los rayos X, gama, partículas alfa y otras de alta energía son altamente efectivas en la inactivación de los virus, actúan sobre el genoma, su uso está reducido o nulo en condiciones de campo (33).

ACCION LETAL DE LA LUZ ULTRAVIOLETA.



ESPECTRO LUMINOSO.

Fig. 8.3 Rayos Ultravioleta.

6.3 DESINFECCION DE TIPO QUIMICO

Alcalis

La lejía o sosa caústica es uno de los desinfectantes más comunes y accesibles medios de desinfección, sobre todo a nivel rural. Debe poseer no menos de 95% de hidróxido de sodio, es eficaz para matar los virus de la Fiebre Aftosa y Cólera Porcino. Es muy tóxico, deteriora las superficies pintadas o barnizadas y los productos textiles, causa quemaduras en la piel y mucosas en contacto (4,7,32,43).

Es muy efectiva en soluciones calientes al 2% frente a los microorganismos de menor resistencia Grupo 1, y al 4% frente a los de mayor resistencia Grupo 2, se neutraliza con facilidad en presencia de materia orgánica (4,7,43).

El hidróxido de calcio actúa contra los virus del Grupo 1, su uso se recomienda como medida profiláctica particularmente en las porquerizas antes y después de la gestación y en las instalaciones de las granjas avícolas y cunícolas. Es muy irritante, se prepara con una parte de cal en cuatro de agua (4,32,43).

Halogenos

Cloro saneador de agua, amebicida y viricida (7,27,32,34,43). Yodo se utiliza al 2% como antiséptico y al 5% como desinfectante (32,43).

Aldehídos

Formaldehído tiene potente acción germicida, no se inactiva en presencia de materia orgánica (32,34,43).

Alcoholes

Etilico, isopropílico, metílico (27,32,39,43).

Agentes tensoactivos surfactantes

Aniónicos; jabones comunes.

Catiónicos: cuaternarios de amonio.

Amfiónicos: povidona (12,27,32,34,39,43).

Oxidantes

Permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno (32,34).

GRUPO 1

MICROORGANISMOS DE MENOR RESISTENCIA

Anemia Infecciosa Equina

Aujeszky

Bronquitis Infecciosa

Diarrea Viral Bovina

Encefalomielitis Equina

Exantema Coital

Gastroenteritis Transmisible del Cerdo

Influenza A, B, C.

Laringotraqueitis Aviar

Newcastle

Peste Bovina

Peste Brcina Africana

Peste Brcina Clásica

Rabia

Rinotraqueitis Infecciosa Bovina

Virus Sincitial Respiratorio

GRUPO 2

MICROORGANISMOS DE MAYOR RESISTENCIA

Diversos Adenovirus causantes de Hepatitis

Enfermedad de Gumboro

Enfermedad de Teschen

Enfermedad Vesicular del Cerdo

Estomatitis Vesicular
 Fiebre Aftosa
 Hepatitis Viral de los Pavos
 Lengua Azul
 Peste Equina Africana

GRUPOS DE DESINFECTANTES

Grupo A (Eter resistentes).

Fenol	5%
Hipoclorito de sodio	1200 ppm de cloro disponible
Hipoclorito de calcio	1200 ppm de cloro disponible

Este grupo de desinfectantes actua contra lo microorganismos del Grupo 2 (33).

Grupo B (Eter sensible).

Acido cresilico	4%
Ortofenifenato de sodio	2%

Este grupo de desinfectantes actua contra los microorganismos del Grupo 1 (33).

8.4 DESINFECTANTES USADOS EN LA EMERGENCIA DE ENFERMEDADES CURENTEIABLES

<u>DESINFECTANTE</u>	<u>CONCENTRACION</u>	<u>ENFERMEDADES</u>
Hipoclorito de calcio	1200 ppm de cloro disponible	Fiebre Aftosa, Diarrea Viral Bovina, Exantema Vesicular.
Hipoclorito de sodio	1 %	Fiebre Aftosa, Panleucopenia Felina, Peste Equina.
	1.5%	Enfermedad Vesicular del Cerdo, Pseudorabia, Peste Porcina - Africana, Porvovirus Porcino.
Derivado del ácido ascórbico (DF-100)	1 %	Peste Porcina Africana, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Viruela Aviar, Bronquitis Infecciosa, Enfermedad de Marek.
	10 %	Fiebre Aftosa, Enfermedad Vesicular del Cerdo, Peste Porcina Africana.
Carbonato de sodio	4 %	Fiebre Aftosa, Exantema Vesicular, Lengua Azul, Peste Bovina, Enfermedad de Teshen, - Encefalomiелitis Equina, Encefalomiелitis Bovina, Enfermedad Vesicular Porcina.
Hidróxido de sodio	2 %	Fiebre Aftosa, Exantema Vesicular, Enfermedad Vesicular del Cerdo, Peste Porcina Africana, Gastroenteritis Transmisible.
	5 %	Peste Porcina Africana.

Orto-Fenilfenol	1	%	Cólera Porcino, Peste Porcina Africana, Influenza Aviar.
	2	%	Enfermedad de Newcastle, Fiebre del Valle de Rift, Peste Bovina, Fiebre Efímera, Encefalitis Equinas, Viruela Ovina, Encefalomielitis Ovina, Laringotraqueitis Infecciosa Aviar.
Cresoles	4	%	Cólera Porcino, Erisipela Porcina.
Cloramina	5	%	Peste Porcina Africana.
Formaldehído	2	%	Cólera Porcino, Peste Porcina Africana, Enfermedad de Gumbo-ro, Reovirus Aviar, Enfermedad Vesicular del Cerdo, Fiebre Aftosa.

8.5 PROTECCION PERSONAL CONTRA EL EFECTO DE LOS DISTINTOS DESINFECTANTES POR UTILIZAR

Es necesario tener presente que prácticamente todas las sustancias utilizadas en la desinfección son tóxicas -en mayor o menor grado-, por ello las personas que trabajan con estas sustancias deben tomar medidas adecuadas que comprenden: utilización de guantes, botas y ropas especiales, en algunos casos máscaras anti gases. Debe tenerse presente al realizar la desinfección, que ésta sea a favor del aire, es decir el operador debe colocarse de manera que el aire corra de sus espaldas hacia el frente, para evitar que la fuerza del viento impulse hacia el operador las soluciones utilizadas.

Al terminar deben lavarse: las manos, la cara y las superficies del cuerpo que hayan estado en contacto o expuestas a dichas sustancias.

Es importante que siempre se tenga un botiquín junto al equipo de desinfección, el cual deberá tener siempre: ácido bórico, ácido fénico, pomadas o lociones contra quemaduras y otros productos usados en primeros auxilios. (4,7)

U N I D A D 9

PREPARACION Y UTILIZACION DE VACUNAS

OBJETIVOS:

- . Que el estudiante conozca las bases de preparación de las vacunas virales, la importancia del manejo, métodos de conservación y aplicación adecuados.
- . Podrá elegir la vacuna apropiada de acuerdo a sus necesidades.
- . Familiarizar al alumno con las vías de aplicación de las vacunas más comunmente usadas.

INTRODUCCION:

Uno de los principales objetivos de la Inmunología Práctica es la creación de un estado completo de protección contra los ataques de microorganismos productores de enfermedad, en un animal (36). La protección puede obtenerse mediante vacunación para despertar una inmunidad activa duradera o mediante la administración de un antisuero para dar una inmunidad pasiva temporal (10,36,42,48,62,64). De éstas se prefiere la vacunación para despertar una inmunidad activa muy duradera, no sólo tiene la ventaja intrínseca de ser un procedimiento profiláctico que puede apli

carse en el momento conveniente al ganado, sino que también es económica y lleva menos peligros de efectos colaterales (36).

El empleo de vacunas se basa en el hecho de que la enfermedad infecciosa induce la producción de inmunidad de tipo humoral o celular que sirve para curar la enfermedad, por otra parte deja células de memoria que reaccionan rápida y activamente ante un nuevo ataque por el mismo germen (54). La aplicación del germen muerto o atenuado programa al sistema inmune para la producción de estas células de memoria, sin necesidad de que se presente la enfermedad clínicamente aparente, o que si esto ocurre sea en una forma muy leve (54).

9.1 INMUNIDAD ACTIVA

El sistema de inducir en un animal la respuesta inmunitaria específica por inducción controlada de un inmunógeno al utilizar la dosis y vías apropiadas se denomina: "Inmunización Activa o Vacunación". A diferencia de la inmunidad pasiva, la inmunidad activamente inducida es de vida larga y de naturaleza anamnésica y comprende ambos mecanismos inmunes; el humoral y el celular (10,36,48,54,62,64).

La meta de cualquier procedimiento de vacunación es la prevención de la enfermedad, no su curación (36,42,48,54). La eficacia de una vacuna no se mide simplemente por la aparición de

anticuerpos séricos, sino por la observación de una mayor protección contra la enfermedad (10).

La vacunación no debe considerarse una panacea en el control de las enfermedades y debe ser suplementada con medidas sanitarias y de administración, encaminadas a prevenir la introducción y difusión de la infección (42).

Características que debe cumplir una vacuna ideal:

- * Debe carecer de efectos colaterales indeseables.
- * Ser parata.
- * Ser estable.
- * Debe poderse adaptar a la vacunación masiva.
- * En condiciones ideales debe ocasionar la misma respuesta inmune que la infección natural, de manera que se puedan realizar simultáneamente vacunación y erradicación.
- * Producir una respuesta inmune prolongada e intensa, tanto en el animal vacunado como en el feto que pueda estar portando.
- * Ser de fácil administración.
- * Debe proteger un porcentaje elevado de animales vacunados.
- * No debe ser afectada por la presencia de anticuerpos maternos.
- * Ser compatible con otras vacunas.
- * No debe difundirse entre otros animales si es una vacuna viva.
- * Ser segura(6,10,51).

Métodos de evaluación de una vacuna.

- . En el laboratorio: titulación de la vacuna.
- . Pruebas de seroneutralización.
- . Pruebas de desafío.
- . Pruebas de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación.
- . Resultados de su aplicación en el campo.
- . Por observación de una mayor protección contra la enfermedad.
- . Por tabulación de costos (6,10,51).

Así mismo es indispensable conocer la patogénesis de la enfermedad cuando se utilizan vacunas, ya que las infecciones pueden ser: localizadas o generalizadas (10).

9.2 Vías de administración.

La vía de administración puede constituir un factor importante de vacunación fructífera, en particular si se emplean inmunógenos que no se replican (62). La mayor parte de las vacunas se administran por vía parenteral, sin importar la vía natural de entrada del microorganismo, aunque existen importantes excepciones a esta regla (10,36,39,64).

La administración parenteral de vacunas de virus muertos - aún cuando estimula la producción de anticuerpos circulantes, -

hasta títulos satisfactorios, ha dado en ocasiones protección limitada debido a que la resistencia local no es inducida adecuadamente en la puerta natural de entrada o en el sitio primario de multiplicación por virus silvestre o de campo (39).

El método más sencillo y más ampliamente difundido para la aplicación de vacunas es la inyección subcutánea o intramuscular, es excelente cuando se trata de un número relativamente bajo de animales y de enfermedades para las cuales resulta importante la inmunidad general. En algunos casos la inmunidad general es menos importante que la inmunidad local y puede ser preferible aplicar la vacuna en el propio foco donde suele ocurrir la invasión - (39,47,64).

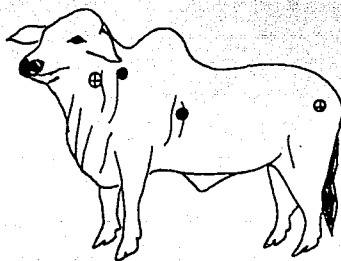
Las vías de administración más comúnmente utilizadas para la aplicación de vacunas son:

- * Intramuscular.
- * Subcutánea (10,36,39,64) Fig. 9.1.A,B, 9.2, 9.3.A,B.

Otras:

- * Oral.
- * Nasal (aerosoles).
- * Ocular (36,39). Fig. 9.1.B.

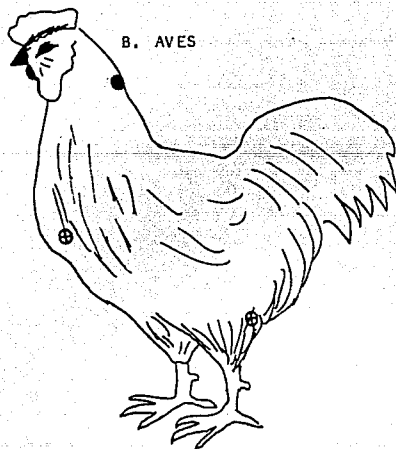
Fig. 9.1 VIAS DE APLICACION DE LAS VACUNAS



A. BOVINO

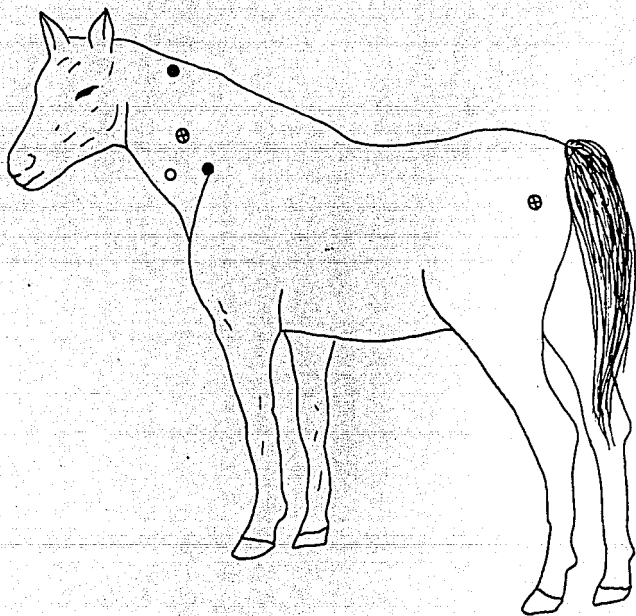
Ocular
Nasal
Oral

B. AVES



● Subcutánea
⊕ Intramuscular.

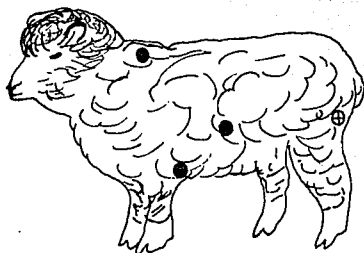
Fig. 2.2 VIAS DE APLICACION DE LAS VACUNAS



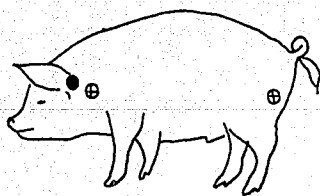
EQUINO

- Subcutánea.
- ⊕ Intramuscular.

Fig. 9.3 VIAS DE APLICACION DE LAS VACUNAS



A. OVINO



B. PORCINO

- Subcutánea.
- ⊕ Intramuscular.

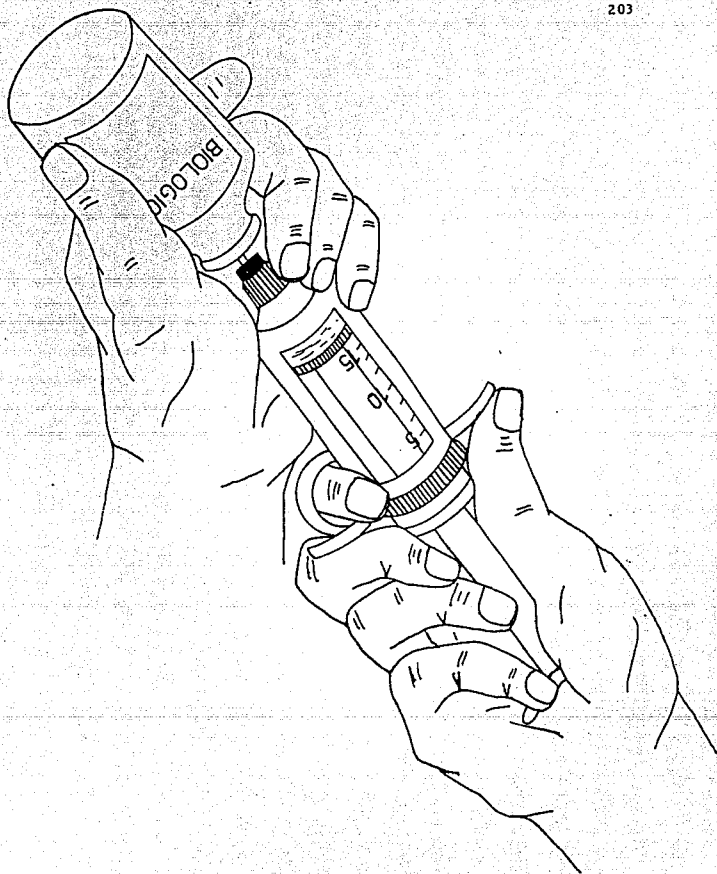


Fig. 9.4 COMO LLENAR UNA JERINGA

9.3 TIPOS DE VACUNAS

Las vacunas son un producto biológico constituido por microorganismos vivos, atenuados o muertos, o por productos derivados de estos, que inoculados a un huésped, estimulan en él un estado de inmunidad específica que le permite resistir a las infecciones que este microorganismo causa en forma natural (42,54).

Ventajas de las vacunas vivas:

- * Mayor respuesta inmunológica, más intensa y duradera.
- * Se requieren pocas inoculaciones (usualmente una).
- * No necesitan adyuvantes.
- * Disminuyen el riesgo de crear hipersensibilidad.
- * Actúan como la infección natural en relación a su efecto en la inmunidad.
- * Inducen la producción de anticuerpos y resistencia en la puerta de entrada.
- * Mayor eficacia en relación con las vacunas de virus muertos - (10,36,39,42,52,62,64).

Desventajas de las vacunas vivas:

- . Mayor virulencia, riesgo de reversión.
- . Riesgo de contener contaminantes imprevistos.
- . Deben almacenarse y manejarse con sumo cuidado, para que no vayan a perecer accidentalmente los virus.

- Posibilidad de una diseminación natural.
- Si se emplea una vacuna viva en un animal con mala salud, puede verdaderamente producir la enfermedad que se intentaba prevenir (10,36,39,42,52,64).

Las vacunas de virus vivos pueden causar enfermedad grave o mortal en un huésped con incompetencia inmunitaria. No deben ser administradas a enfermos que están recibiendo glucocorticoides, medicamentos alquilizantes, radiaciones u otro tipo de agentes inmunosupresores (54,62).

Por sus posibles efectos colaterales sobre el feto, no se administrarán vacunas vivas a hembras gestantes, a menos que haya un riesgo inmediato (no es muy recomendable), (62).

Ventajas de las vacunas muertas:

- * Poca probabilidad de causar enfermedad a consecuencia de virulencia residual o de reversión.
- * Bajo costo.
- * Fácil conservación.
- * Es poco probable que ocasionen efectos colaterales nocivos.
- * Gran estabilidad.
- * No se disemina.
- * Pueden administrarse con seguridad a huéspedes con alteraciones inmunológicas.
- * Pueden ser aplicadas en hembras gestantes (42,52,62,64).

Desventajas de las vacunas muertas:

- . Pueden no estimular una respuesta inmunitaria protectora adecuada.
- . Riesgo de producir hipersensibilidad.
- . Requieren de varias aplicaciones.
- . Relativamente corto período de inmunidad (10,42,52,62,67).

La inmunización activa eficaz, puede conseguirse sólo con vacunas ricas en contenido de antígenos específicos (42). Una vacuna nos protege contra la enfermedad hasta que haya sido administrada a la dosis debida a un individuo susceptible; es necesario tener un cuidado extremo en su preparación y fabricación para tener la certeza de que no existan virus vivos virulentos residuales en la vacuna (39).

9.4 INACTIVACION Y ATENUACION DE MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA ELABORACION DE LAS VACUNAS:

Si se requiere inactivar los gérmenes antes de utilizarlos para preparar vacunas, es conveniente que los microorganismos "muertos", tengan mayor similitud con los vivos, desde el punto de vista antigénico (64). Pueden ser inactivados parcial o completamente por agentes químicos o por radiaciones ultravioleta (67).

La inactivación completa de algunas vacunas las hace ineficaces como agentes inmunizantes (67).

La disminución de la virulencia de un microorganismo, hasta que ya no pueda producir enfermedad sin haber muerto todavía, recibe el nombre de "Atenuación" (36,52,64). Entre los métodos de atenuación más sencillos se encuentran el calentar los microorganismos hasta una temperatura un poco inferior a su temperatura letal o exponerlos a concentraciones de sustancias químicas inactivantes un poco menores a las mortales (36,64,67).

Los métodos de atenuación más utilizados consisten en adaptar a los microorganismos a condiciones anormales, hasta conseguir que pierdan su adaptación en el huésped habitual (36,42,52,64). El método de atenuación más utilizado actualmente, consiste en mantener a los microorganismos por tiempo prolongado en cultivo de tejidos, la mayor parte de vacunas antivirales que se utilizan en Medicina Veterinaria pertenecen a este tipo (42,52,64,67).

La inactivación de los virus se lleva a cabo usando sustancias químicas generalmente: formol, fenol, acetona, alcohol, óxido de etileno, B-propiolactona (36,42,64). Su eficiencia depende de la cantidad de antígeno presente, la mayoría de este tipo de vacunas son desarrolladas en embriones de pollo y son ricas en antígenos (42).

Adyuvantes

En Medicina Veterinaria, suelen añadirse adyuvantes a las vacunas muertas, con el fin de aumentar su poder inmunogénico de

las mismas (36,64). Algunas sustancias adyuvantes utilizadas son: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, agua en aceite, saponinas, aceites minerales (36,64).

Los factores que influyen en la eficacia de la vacunación son numerosos, algunos de estos se mencionan a continuación:

- * Tipo de cepa.
- * Tipo de vacuna: viva o "muerta".
- * Dosis adecuada.
- * Vía de inoculación.
- * Edad a la vacunación (6,42,48,54,62,64).

9.5 MANEJO DE LAS VACUNAS

Las sustancias producidas bajo licencia, están libre de contaminantes (42,64). Se debe tener cuidado de mantener dicho estado (42).

Los recipientes con dosis múltiples deben descartarse cuando se han usado en parte, a no ser que sean abiertas de una manera aséptica y almacenadas en refrigeración (42).

Cuando productos liofilizados son reconstituídos por el diluyente, deben usarse inmediatamente porque se deterioran con rapidez (6,42).

Las vacunas tienen fecha de caducidad variable, según el pro

ducto en particular. No deben usarse más allá de la fecha marcada, la cual se basa en el mantenimiento óptimo de la vacuna por ejemplo: temperatura de refrigeración adecuada (42).

Las vacunas pasadas de fecha o mal guardadas, han perdido parte de sus propiedades antigénicas y son ineficaces como agentes inmunizantes (42).

Al administrar por vía subcutánea o intramuscular, siempre hay que tirar del émbolo antes de empujarlo, para comprobar que no se inyectará en una vena, ya que disminuiría el efecto inmunizante y aumentaría el riesgo de reacciones indeseables (62).

Las enfermedades pueden ser transmitidas en las vacunaciones masivas cuando se usa la misma aguja, se recomienda un acopio abundante de agujas desechables (42).

Los productos biológicos, deben administrarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante (dosis, vía de administración, edad, etc), (6,42).

9.6 RECOMENDACIONES UTILES EN LA APLICACION DE LAS VACUNAS.

Cuando se usan virus vivos no modificados plenamente virulentos, debe recordarse que el animal vacunado puede convertirse en portador y dispersar virus durante períodos de tiempo variable esto significa que el ganado susceptible no debe tener contacto con vacunados, hasta que el período de eliminación haya pasado es to varía con cada virus (42).

No deben vacunarse animales enfermos o de dudoso estado de salud de ser así, esto debe anotarse en el certificado de vacunación o en los registros que se tengan del animal (57).

Se deben usar siempre jeringas y agujas desechables y estéri les. Nunca usar jeringas o agujas esterilizadas por medios quími cos para la aplicación de la vacuna (57).

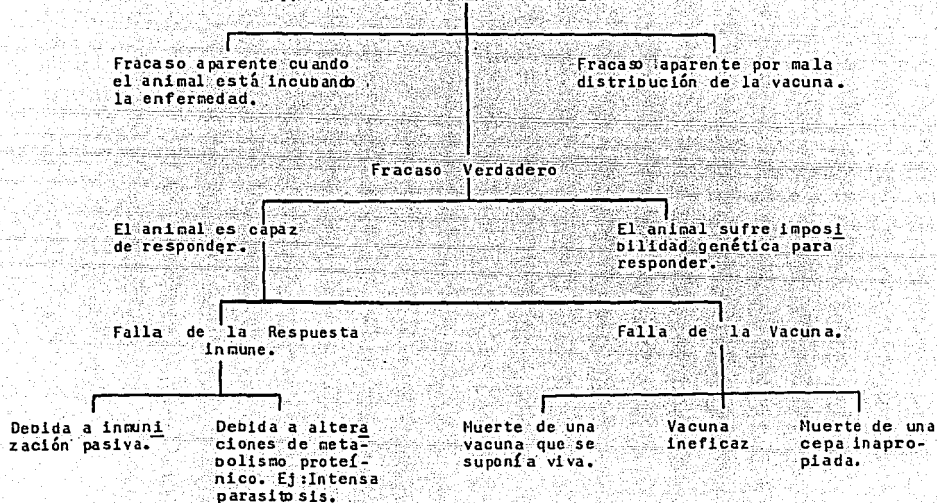
El área de aplicación no debe ser desinfectada con antisépti cos muy potentes, se recomienda el uso de antisépticos de acción moderada o ligera y permitir que se evapores completamente antes de aplicar la vacuna (57).

Antes de usar el producto es necesario verificar que el con tenido esté completo, que el frasco no haya sufrido desperfecto alguno y esté perfectamente sellado (57).

La vacuna se mantiene en refrigeración antes de ser usada, verificando que la temperatura se conserve siempre entre 2-4°C.

El producto es minuciosamente analizado en sus características físicas, químicas y biológicas antes de permitir su salida del laboratorio. Sin embargo es factible que sufra algún accidente durante el proceso de transporte, por ello se recomienda verificar las condiciones de la vacuna al momento de recibirla y aplicarla (57).

9.7 FRACASOS DE LA VACUNACION



Referencias: (36,42,47,51,54,64).

ANATOMIA DE UNA VACUNA

(vacuna de Newcastle emulsionada en aceite, virus muerto).

- 1) Control de calidad constante en cada lote, para verificar sus características como son: inactivación del virus vacunal, incuidad, potencia, titulación (método DL 50%).
- 2) Emulsión coloidal en fase acuosa dentro de una fase oleosa, - estabilizada para favorecer una mejor y más lenta absorción - del antígeno (virus muerto).
- 3) Tapón especial de hule tipo nitril, para evitar la degradación y corrosión del mismo.
- 4) Emulsión adecuadamente homogeneizada, compuesta por aceites - minerales de baja viscosidad, que evita taponamientos de jerin gas, facilitando y acelerando el rendimiento de los vacunadores y evita la postración de aves.
- 5) Envase de vidrio tipo neutro que impide la degradación y consecuentemente mantiene el poder inmunogénico de la vacuna.

VACUNAS AVIARES

VACUNA	CEPA	ORIGEN	TIPO DE VIRUS
Vacuna contra Bronquitis Infecciosa. (FARM).	Massachusetts Variante H.	Embrión de pollo. SPF.	Virus activo.
Vacuna contra Bronquitis Infecciosa (Pecuarios LAB.)	Suave liofilizada.	Embrión de pollo. SPF.	Virus Activo.
Vacuna contra Bronquitis Infecciosa. (Pecuarios).	Fuerte	Embrión de pollo. SPF.	Virus activo.
Encefalomielitid aviar. Intervet	Calnek 1143	Embrión de pollo. SPF.	Virus activo atenuado.
Gumboro Vac D-78 Intervet	Clonada D-78	Embrión de pollo SPF.	Virus activo.
Vacuna contra Enfermedad de Gumboro (FARM)	Lukert H. Lukert H. emulsionada en aceite.	Embrión de pollo SPF.	Virus activo. Virus inactivado.
Vacuna contra Marek. (FARM).	FC 126	Cultivo de tejidos en huevos SPF.	Virus vivo - herpes de pavo.
AVICASTLE Newcastle. (Lifsa)	La Sota	Embrión de pollo SPF.	Virus activo - modificado.
AVIFORT VN Newcastle (Aranda).		Embrión de pollo SPF.	Virus modificado.

Newvac Newcastle. Intervet.	Clone 30 IR	Embrión de pollo SPF	Virus activo.
Vacuna contra Newcastle. (Pfizer).	La sota emulsionada en aceite.	Embrión de pollo SPF.	Virus inactivado.
Vacuna contra Newcastle. (FARII).	La sota	Embrión de pollo SPF.	Virus inactivado.
Vacuna contra Newcastle. (Pfizer).	La sota	Embrión de pollo SPF.	Virus activo.
Vacuna contra Newcastle (Avi/Hex. S.A.)	La sota	Embrión de pollo SPF.	Virus vivo.
Vacuna CNT contra Newcastle. (Serva).	La sota	Embrión de pollo SPF.	Virus inactivado.
Vacuna contra Newcastle. (Pecuarios)	B-1	Embrión de pollo SPF.	Virus activo.
Vacuna contra Newcastle (Pecuarios)	La sota	Embrión de pollo SPF.	Virus activo.
Vacuna contra Newcastle (Pecuarios)	La sota inactivada en aceite.	Embrión de pollo	Virus inactivado.
Nodi-vac REO Reovirus Aviar (serva)	1733 y 2408	Embrión de pollo SPF.	Virus inactivado.
Vacuna contra Viruela Aviar (Pecuarios)	Suave	Embrión de pollo SPF.	Virus activo.

Vacuna contra Viruela aviar (Pecuarios).	Fuerte homólogo.	Embrión de - pollo SPF.	Virus activo.
--	------------------	-------------------------------	---------------

MIXTAS

Vacuna mixta Cori- New. Newcastle y Coriza. (Pecuarios).	La sota y Haemophilus paragallinarum	Embrión de - pollo.	Virus inactivo.
--	--	------------------------	-----------------

BOVINOS

Derrinunc Derriengue (Norden).	Cepa	Cultivo primario de origen porcino.	Virus activo modificado.
--------------------------------------	------	-------------------------------------	--------------------------

Derrivac Derriengue (Hoeschst).		Monoestrato de riñón de cerdo.	Virus activo atenuado
---------------------------------------	--	--------------------------------	-----------------------

Vacuna contra Derriengue (litton)	V-319 acatlán		Virus activo modificado.
---	------------------	--	--------------------------

Vacuna contra Derriengue (Anchor)	Roxane	Cultivo celular.	Virus activo modificado.
---	--------	------------------	--------------------------

Vacuna contra Derriengue (Bio-Zoo, S.A.)	SAD-Street Alabama Dufferin.	Cultivo de tejidos	Virus activo modificado.
--	------------------------------------	--------------------	--------------------------

Vacuna contra Derriengue (Sanfer).	Era	Cultivo de tejidos de origen porcino.	Virus inactivado modificado.
--	-----	---------------------------------------	------------------------------

Vacuna contra Derriengue (Pronative)	V-319 acatlán	Cultivo de tejidos.	Virus activo modificado.
--	------------------	---------------------	--------------------------

TSV-2H Rino traqueitis y parainfluenza (Norden).		Línea celular	Virus vivo modificado de RI y PI3.
---	--	---------------	------------------------------------

CANIHOS

Canivac PVC Parvovirus (Anchor)		Cultivo de - tejidos	Virus activo modificado.
Parvoid Parvovirus (Salsbury)	Sad Street Alabama Dufferin.		Virus inactivado.
Parvocan Parvovirus (Sanfer).	CPW-347	Línea celular de felino.	Virus inactivado.
Parvovac Parvovirus (Gortie)	Cepa L-87	Cultivo celu- lar	Virus vivo modi- ficado.
Parvovirus Canino. (Revetmex).		Cultivo celu- lar de origen canino.	Virus modificado.
Vacuna V.V. Parvovirus (Litton)	L-85	Cultivos celu- lares	Virus activo modificado.
Vanguar CPV Parvovirus (Norden)		Línea celular canina	Virus muerto.
Vanguard PV Parvovirus (Norden)		Línea celular canina	Virus vivo modificado.
Rab.vac Antirrábica (Salsbury)	SAD	Culvitos celu- lares de ori- gen felino.	Virus inactivado.
Vacuna contra la Rabia (PRONABIVE)	V-319 acatlán	Cultivo de tejidos	Virus activo modificado.
Rabicell Antirrábica (Andoci)	CVS	Cerebro de ratón lactante.	Virus inactivado.

Rabi-Jec Antirrábica (Anchor).	Roxane	Cultivo de tejidos.	Virus activo modificado.
Ravi-vac Antirrábica (Gortie)	CVS	Cultivo de tejido cerebral.	Virus inactivado.
Antirrábica (Sanfer)	Era	Cultivo de tejido de origen porcino.	Virus activo modificado.
Antirrábica (Hoechst).	Flury	Embrión de pollo.	Virus activo atenuado.
Radovac Antirrábica (Bio-Zoo)	SAD	Línea celular	Activo modificado con gentamicina.
NIXTA			
Vanguard DA ₂ LH Biquillo y Adenovirus. (Horden).		Línea celular	Virus atenuado.
Solo-Jec (Triple) (Anchor).	Era	Cultivo de tejidos	Virus activo modificado.

EQUINOS

Derriyac Derriengue (Hoechst)		Monocitrato de riñón de cerdo.	Virus activo modificado.
Vacuna contra Derriengue (Anchor)	Roxane	Cultivos celulares.	Virus activo modificado.

Derriengue II (Sanfer).	SAD	Cultivo de - tejidos	Virus activo modificado.
Vacuna contra Derriengue (PRONABIVE)	V-319 acatlán	Cultivo de - tejidos	Virus activo modificado.
Rhinomune Rinomeumonitis Viral Equina. (norden).		Línea de origen equino tipo 1 (EHV 1)	Virus modificado.
Vacuna contra Encefalitis Equina Venez <u>o</u> lana. (PRONABIVE)	TC-83	Cultivo de - tejidos.	Virus activo modificado.

OVINOS

Derriengue (Sanfer)	Era	Cultivo de - tejidos de - origen porcino.	Virus activo modificado.
Vacuna contra Derriengue (PRONABIVE)	V-319 acatlán	Cultivo de - tejidos.	Virus activo modificado.

PORCINOS

Nb vi-vac Aujesky II (Intervet)	Phylaxia	Cultivo de - tejidos.	Virus inactivado.
Pseudorrabia. (Salsbury)	Lo wa S 62		
Certigen Cólera porcina. (Sixtex).	Minnesota	Cultivo de - tejidos porcinos.	Virus activos modificado.

Certificación CERDAS GESTANTES Gélera porcino (Sintex)	Cepa china	Tejidos de - conejo	Virus activo modificado.
Porcivac Gélera porcino (Hoechst)	PAV-1	Cultivo de - tejidos de - origen porcino.	Virus activo modificado.
Vacuna Gélera porcino H. (Anchor)	Minnesota	Cultivo de te- jido de ori- gen porcino.	Virus activo modificado.
Vacuna CP-II Gélera por- cino. (Bio-Zoo)	Par-147	Cultivo de te- jidos de ori- gen porcino.	Virus activo modificado.
Vadimun H Gélera porcino (Iborden)	China	Tejido de - conejos.	Virus activo atenuado.
Vacuna GET H Gastroenteritis Transmisible (Bio-Zoo)	Ambico	Cultivo de - tejidos.	Virus vivo modificado con gestamicina.
Parvo-pro Parvo virus Porcino. (Salsbury)			
Vacuna contra Gélera porcino (PRONABIVE)	PAV-250	Cultivo de tejidos.	Virus activo modificado.

REFERENCIA: (11)

A P E N D I C E

A. REACTIVOS BASICOS

Penicilina G (sódica).

Preparar una solución conteniendo 100 000 UI/ml, usar al final una concentración de 100 UI/ml.

- 1) Disolver individualmente ampollitas de antibióticos en agua estéril desionizada.
- 2) Almacenar, congelar a aproximadamente -20°C .

Adicionar 1 ml. de solución a cada litro de medio, obteniendo así una concentración final de 100 UI/ml.

Estreptomycina (Sulfato).

Preparar una solución conteniendo 100 000 microgramos/ml. Usar una concentración final de 100 microgramos/ml.

- 1) Disolver individualmente cada ampollita de antibiótico en agua estéril desionizada. Almacenar, congelar a -20°C aproximadamente.
- 2) Adicionar 1 ml. de solución preparada a cada litro de medio, da una concentración final de 100 microgramos/ml.

Nycostatin (micostatin, Squibb).

Estos antibióticos son casi insolubles en agua. Este es preparado como una suspensión conteniendo 50 000 UI/ml y usar a una concentración final de 25 UI/ml.

- 1) Suspender individualmente las apolietas de antibiótico en agua estéril desionizada.
- 2) Almacenar en congelación -20 °C. aproximadamente.

Adicionar 0.5 ml. de la suspensión preparada a cada litro de medio da una concentración final de 25 UI/ml.

Solución de penicilina-estreptomina.

(Concentraciones finales de 100 000 UI/ml y 100 000 microgramos/ml., respectivamente).

Penicilina G (sal sódica)	1 000 000 UI/ml
Sulfato de esteptomina (Deshidratada)	1 gramo.
Agua destilada	10 ml.

Disolver los antibióticos por separado en 5ml. de agua destilada cada uno. Agitar hasta que se disuelvan por completo. Mezclar las soluciones en un frasco estéril.

Esterilizar por filtración. Colectar el filtrado en un frasco estéril. Envasar en volúmenes de 2ml. Sellar. Tomar una muestra para prueba de esterilidad. Se conserva a -20 °C.

Suero.

Colectar la sangre asépticamente y dejar coagular a temperatura ambiente.

Refrigerar la sangre a 4 °C.

Centrifugar a 3 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

Remover el sobrenadante del suero y esterilizar por filtración positiva.

Distribuir asépticamente en volúmenes de 20-100 ml.

Refrigerar a 56 °C por 30 minutos.

Almacenar en congelación a -20 °C. Descongelar y cerrar cada botella.

Rojo de fenol (0.5%).

Rojo de fenol	5 gramos
NaOH 0, 1 N	150 ml.
Agua desmineralizada estéril	850 ml.

Procedimiento:

- 1) Agregar 0. 1 N NaOH al rojo de fenol por gotas hasta disolver.
- 2) Agregar agua desmineralizada en volumen exacto.
- 3) Distribuir en volúmenes de 100 a 500 ml.
- 4) Esterilizar en autoclave a 15 libras por 15 minutos.
- 5) Cultivar 1-2 ml en caldo tioglicolato para prueba de esterilidad.
- 6) Almacenar en refrigerador bien cerrado.

Rojo de fenol (1%).

Rojo de fenol (soluble en alcohol)	1.0 gramo.
NaOH (1 N)	no + de 7.0 ml.
Agua desionizada	a dar un total de 100 ml.

- 1) Hacer la pintura en un mortero con NaOH 1N hasta que estén completamente disueltos.
- 2) Diluir con agua desionizada hasta un volumen de 100 ml.
- 3) Sterilizar en autoclave.
- 4) Almacenar a 4 °C.

Agua desmineralizada.

El agua desmineralizada se prepara pasando agua destilada por una unidad desmineralizadora, debiendo obtenerse una lectura de 1 ppm. (parte por millón), o menos en el dial que este aparato tiene para que pueda considerarse como satisfactoria, si la lectura es mayor de 1 ppm. se debe tomar como no satisfactoria. Puede esterilizarse por autoclave a 121 °C por 20 minutos cuando se tienen volúmenes de 1 litro o menos; en caso de volúmenes mayores, deberá aumentarse el tiempo de autoclavado a 30 minutos.

Solución buffer salina fosfatada.

Solución A.	1 litro	
Na CL		6.0 gramos
KCL		0.2 gramos
CaCl ₂ H ₂ O		0.132 gramos
Mg Cl ₂ · 6H ₂ O		0.1 gramo
Agua destilada		800 ml
Solución B.		
Na ₂ HPO ₄		1.15 gramos
KH ₂ PO ₄		0.2 gramos
Agua destilada		200 ml.

Procedimiento:

- 1) Disolver cada sal por separado en agua desmineralizada de acuerdo al orden de la lista.
- 2) Esterilizar en autoclave las soluciones por separado, 15 litros por 15 minutos.
- 3) Mezclar A y B cuando enfrien. Agitar, pH fina 7.0.
- 4) Distribuir en volúmenes de 500 a 1000 ml. en botellas estériles.
- 5) Cultivar 1 a 5 ml en caldo tioglicolato, para prueba de esterilidad.
- 6) Almacenar en refrigeración a 4 °C.

Solución buffer salina fosfatada con antibióticos.

Usada para suspender heces y especímenes postmortem.

Solución buffer salina fosfatada	1000 ml.
Penicilina	10 ml.
Estreptomina	10 ml.
Nystatin	5 ml.

- 1) Mezclar los reactivos asépticamente.
- 2) Almacenar a 4 °C. Antes de usarse, agitar bien y distribuir el Nystatin.

Solución salina de Hanks (concentrado 10X)

Solución A	1 litro.
Na Cl	80.0 gramos
KCl	4 gramos
Ca Cl ₂	1.4 gramos
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	2.0 gramos
Agua desionizada	Aprox. 450 ml.

Solución B	
Na ₂ HPO ₄	0.6 gramos
KH ₂ PO ₄	0.6 gramos
Glucosa	10 gramos
Agua desionizada	Aprox. 450 ml.

Solución C	
Rojo de fenol (1%)	16 ml.

Procedimiento:

- 1) Disolver los constituyentes en el orden enlistado.
- 2) Adicionar B en A.
- 3) Adicionar rojo de fenol en la mezcla de A y B.
- 4) Aforar a 1000 ml con agua desionizada.
- 5) Esterilizar por filtración, presión positiva.
- 6) Almacenar en refrigeración. 4 °C.

Bicarbonato de sodio.

	1.4%	4.4%
	1 litro	1 litro
NaHCO ₃	14.0 gramos	44.0 gramos
Agua desionizada	1000 ml	1000 ml.

- 1) Disolver el Na HCO₃ en agua.
- 2) Esterilizar por filtración presión positiva.
- 3) Distribuir asépticamente en volúmenes de 25 ml (1.4%), y 50 ml. (4.4%), respectivamente.
- 4) Almacenar a 4°C en botellas cerradas herméticamente.

Hidroxido de sodio (1 N).

NaOH		40.0 gramos
Agua destilada	aforar a	1 000 ml.

- 1) Pesar el NaOH y pasarlo rápidamente a un vaso de precipitado.
- 2) Colocar el vaso en baño de agua y agregar 500 ml de agua destilada. Agitar hasta que se disuelva por completo.
- 3) Aforar a 1 000 ml.
- 4) Distribuir en frascos limpios y secos, en volúmenes de acuerdo a las necesidades de trabajo. Tapar perfectamente.
- 5) Conservar a temperatura ambiente o a 4 °C. Descartar en caso de que se observe precipitado.

Tripsina 0.2%.

Tripsina (1:300)	2.0 gramos
PBS	1 000 ml.

- 1) Adicionar tripsina a PBS, agitar hasta disolver.
- 2) Cultivar 1 - 5ml. en caldo tioglicolato para prueba de esterilidad. Almacenar a 4 °C.

Tripsina (0.25%)

	1 litro
Tripsina (1:250).	2.5 gramos
Solución salina de Hanks	1 000 ml.
Penicilina	1 ml.
Estreptomicina	1 ml.

Procedimiento:

- 1) Adicionar la tripsina y los antibióticos a la solución salina.
- 2) Esterilizar por filtración presión positiva.
- 3) Distribuir asépticamente en volúmenes de 20 ml.
- 4) Almacenar en congelación -20°C . Cada botella es descongelada y cerrada.

Glutamina solución.

L - glutamina 12.0 gramos.

- 1) Disolver en 400 ml. de agua desionizada.
- 2) Distribuir asépticamente en volúmenes de 50 ml.
- 3) Almacenar en congelación. Aproximadamente a -20°C .

Medio de congelación.

Usado para almacenar células vivas en estado de congelación.

Eagle (concentrado 10X)	80 ml.
Agua desionizada	720 ml.
Glutamina solución	8 ml.
Na_2HCO_3	10 ml.
Suero de ternero	100 ml.
Glicerol (esterilizado por autoclave)	100 ml.
Penicilina	1 ml.
Estreptomicina	1 ml.

- 1) Adicionar cada uno de los reactivos en el orden enlistados, - tomando asépticas precauciones.
- 2) Distribuir en volúmenes de 100 ml.
- 3) Almacenar en botellas cerradas herméticamente a 4°C .

B. MEDIOS DE CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO

Medio Eagle (para mantenimiento de células Hep-2).

	1 litro
Agua (desmineralizada estéril)	790 ml.
Earles (concentrado 10X)	100 ml.
Rojo de fenol (0.5%)	4 ml.
Aminoácidos (concentrado 100X)	10 ml.
NaOH (1 N) ajustar pH 7.0	(5) ml.
Vitaminas (concentrado 100X)	10 ml.
Suero de ternero	50 ml.
Na HCO (7.5%)	29.6 ml.
Penicilina 200 000 UI/ml	1 ml.
Estreptomicina 500 000 microgramos /ml.	0.4 ml.
L-glutamina solución (2.9%)	10 ml.

Procedimiento:

- 1) Mezclar cada solución de acuerdo al orden enlistado.
- 2) Ph final 7.6 - 7.8.
- 3) Distribuir en volúmenes de 500 - 1000 ml.
- 4) Cultivar 1-5 ml. en caldo tloglicolato para prueba de esterilidad.
- 5) Almacenar al medio a 4°C.

Medio Eagle (para crecimiento de células Hep-2).

	1 litro
Agua desmineralizada	765 ml.
Earle (concentrado 10X)	100 ml.
Rojo fenol (.5%)	4 ml.
Aminoácidos (concentrado 100X)	10 ml.
NaOH (1 N) ajustar pH 7.0	(5) ml.
Vitaminas (100X concentrado)	10 ml.

Suero de ternero	100 ml.
Na HCO ₃ (7.5%)	4.5 ml.
Penicilina 200 000 UI/ml.	1 ml.
Estreptomina 500 000 microgramos/ml	0.4 ml.
L - glutamina solución (2.9%)	10 ml.

Procedimiento:

El mismo que el anterior.

Ph final 7.0 - 7.2

Eagle - suero de ternero medio de crecimiento.

	1 litro.
Earle (concentrado 10X)	100 ml.
Agua desionizada (estéril)	900 ml.
Solución de glutamina	10 ml.
Na HCO ₃ (4%)	12.5 ml.
Suero de ternero	100 ml.
Penicilina	1 ml.
Estreptomina	1 ml.
Nystatin	0.5 ml.

Procedimiento:

- 1) Adicionar cada ingrediente en el orden enlistado. Tomando asépticas precauciones.
- 2) Distribuir en volúmenes de 1 litro.
- 3) Almacenar en botellas cerradas herméticamente a 4 °C.
- 4) Ajustar antes de usar. Mezclar bien el medio y distribuir el Nystatin.

Eagle - Medio de mantenimiento / suero de ternero.

	1 litro.
Eagle (concentrado 10X)	100 ml.
Agua desionizada	900 ml.
Solución de glutamina	10 ml.
Na HCO ₃ (4%)	50 ml.
Suero de ternero	20 ml.
Penicilina	1 ml.
Estreptomicina	1 ml.
Nystatin	0.5 ml.

Procedimiento:

Igual que el anterior.

Solución salina balanceada de Hanks.

	1 litro.
Agua (desmineralizada, estéril)	889.0 ml.
Hanks (concentrado 10X)	100 ml.
Na HCO ₃ (7.5%)	7.0 ml.
Rojo de fenol (0.5%)	4.0 ml.
Penicilina 200 000 UI/ml.	1.0 ml.
Estreptomicina 500 000 microgramos/ml.	0.4 ml.

Procedimiento:

- 1) Combine cada solución en el orden enlistado. Ph final 7.0 - 7.2.
- 2) Mezclar bien y distribuir en volúmenes de 500 - 1000 ml.
- 3) Cultive 1-5 ml. en tioglicolato para prueba de esterilidad.
- 4) Almacenar el medio en refrigeración a 4 °C.

Earle (concentrado 10X)

Solución A	1 litro.
NaCl	66 gramos.
KCl	4 gramos.
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	2 gramos.
Na H ₂ PO ₄	1.25 gramos.
Glucosa	10 gramos.
Agua destilada	800 ml.
Solución B	
Ca Cl ₂	2 gramos
Agua destilada	200 ml.

Procedimiento:

- 1) Disolver cada sal en agua desmineralizada, en el orden enlistado.
- 2) Esterilizar cada solución por separado en autoclave a 15 libras por 15 minutos.
- 3) Mezclar la solución A y B cuando enfrien. Vertir y agitar el pH final 7 - 7.2.
- 4) Distribuir en volúmenes de 100 a 500 ml. en botellas estériles y tapar bien.
- 5) Cultiva 1 - 5 ml. en caldo tioglicolato, para prueba de esterilidad.
- 6) Almacenar el medio en refrigeración a 4 °C.

Earle. Medio de mantenimiento.

	1 litro.
Agua desmineralizada estéril	746 ml.
Earle (concentrado 10X)	100 ml.
Lactoalbumina hidrolizada (5%)	100 ml.
Suero de ternero (estéril)	20 ml.
Na HCO ₃ (7.5%)	4 ml.
Penicilina 200 000 UI/ml.	(1 ml.)
Estreptomicina 500 000 microgramos/ml	(0.4 ml.)

Procedimiento:

- 1) Mezclar las soluciones de acuerdo al orden enlistado.
pH 7.6 a 7.8.
- 2) Distribuir en volúmenes de 500 a 1000 ml.
- 3) Cultivar 1-5 ml. en caldo tioglicolato para prueba de esterilidad.
- 4) Almacenar el medio en refrigeración. 4 °C.

Earle especial.

	1 litro.
Agua (desmineralizada estéril)	867 ml.
Earle (concentrado (10X))	100 ml.
Suero de ternero (fetal, ultrafiltrado)	20 ml.
Na HCO ₃ (7.5%)	9 ml.
Rojo de fenol (0.5%)	4 ml.
Penicilina 200 000 UI/ml.	(1 ml.)
Estreptomicina 500 000 microgramos/ml.	(0.4 ml.)

Procedimiento:

- 1) Mezclar las soluciones de acuerdo al orden enlistado.
pH final 6.8 a 7.0.
- 2) Distribuir en volúmenes de 500 - 1000 ml.
- 3) Cultivar 1-5 ml. en caldo tioglicolato, para prueba de esterilidad.
- 4) Almacenar a 4 °C.

C. REACTIVOS PARA SEROLOGIA

Solución Alsever.

	1 litro.
Dextrosa	20.5 gramos
Citrato de sodio	8.0 gramos
Acido cítrico	0.55 gramos
NaCl	4.2 gramos
Agua desionizada	1000 ml.

Procedimiento:

- 1) Disolver los constituyentes en agua desionizada en el orden enlistado.
- 2) Distribuir en volúmenes de 100 ml.
- 3) Esterilizar por autoclave a 10 libras por 10 minutos.
- 4) Almacenar en refrigeración a 4 °C.

D. TINICIONES

Colorante de Sellers.

Demostración de inclusiones citoplasmáticas (Corpusculos de Negri), asociado con infecciones por virus rábico. In vivo.

Solución A

Azul de metileno	1.0 gramos
Alcohol metílico (libre de acetona)	100 ml.

Solución B

Fucsina básica	0.5 gramos
Alcohol metílico (libre de acetona)	50 ml.

Procedimiento:

- 1) Disolver las pinturas en alcohol metílico.
- 2) Adicionar 2 partes de solución A en una solución B. Mezclar.
- 3) Almacenar en botellas de 10 ml. cerradas herméticamente, en un cuarto oscuro a temperatura ambiente. No usar dentro de las primeras 24 horas. Descartar si se observa formación de precipitado.

E. REACTIVOS MISCELAÑEOS

Medio de transporte.

Usado para colección de especímenes clínicos. Aislamiento - viral.

Hanks salina	1000 ml.
Na HCO ₃ (1.4%)	25 ml.
Albumina de suero bovino (5%)	100 ml.
Penicilina	10 ml.
Estreptomicina	10 ml.
Nystatin	5 ml.

Procedimiento:

- 1) Adicionar los reactivos de cada solución, en el orden enlistado. Tomando asépticas precauciones.
- 2) Distribuir en volúmenes de 3-4 ml.
- 3) Almacenar en refrigeración a 4 °C, en botellas cerradas herméticamente.

Caldo tioglicolato.

Tioglicolato	29.5 gramos
Agua destilada	100 ml.

Procedimiento:

- 1) Colocar el tioglicolato en un matras Erlenmeyer de 100 ml. - limpio y seco.
- 2) Agregar 500 ml. de agua destilada. Calentar a ebullición hasta que el tioglicolato se disuelva por completo.
- 3) Aforar a 100 ml. con agua bidestilada. Distribuir en volúmenes de 10 ml.
- 4) Esterilizar a 120 °C por 15 minutos. Dejar enfriar y etiquetar.
- 5) Tomar muestra para prueba de esterilidad.
- 6) Almacenar en refrigeración a 4 °C.

Referencias: (5,26,38,45,50,25,47).

D I S C U S I O N .

El presente trabajo no pretende sustituir la amplia y excelente gama de información que existe en los Manuales de Técnicas utilizadas en Virología (aislamiento viral, diagnóstico o titulación de enfermedades virales, características de los virus, etc.).

Una de las metas más importante a cubrir en la elaboración de este Manual Ilustrado de Virología Veterinaria es, que los temas tratados en cada una de las unidades apoyen en gran medida - algunos puntos teóricos de los cuales la información existente - en los acervos, no es muy accesible para el estudiante como material de consulta.

Se pretende sirva de base para el desarrollo de las prácticas que se imparten de la materia de Virología Veterinaria. De esta manera se le da importancia a la realización de cada una de las prácticas como complemento de la información teórica lo cual ayuda al Médico Veterinario Zootecnista a orientar su diagnóstico.

Se da opción y libertad para modificar las técnicas elaboradas, de acuerdo a la capacidad del material (biológicos, reactivos, cristalería), existente en el Laboratorio de Virología de esta Facultad y a las necesidades de la materia de Virología Veterinaria. Teniendo también presentes las limitaciones que existen en cuanto a personal capacitado que asesore las prácticas.

Se incluyen temas de desinfección y profilaxis (desinfectantes y vacunas), ya que se considera necesario se tengan los conocimientos básicos de las formas de prevención y erradicación de las enfermedades virales. Debido a que en algunas ocasiones se le solicita al estudiante asesoría para la aplicación de vacunas y medidas para evitar la diseminación de una enfermedad.

Considerando de gran importancia que el H.V.Z. tenga conocimientos prácticos a nivel aplicativo se elaboró el presente Manual el cual lo ayudará a orientar su diagnóstico y posteriormente confirmarlo mediante el desarrollo de algunas técnicas como son: titulación de vacunas, aislamiento viral, cultivo de virus, titulación de sueros, etc.

Este manual no contiene toda la gama de información referente a estos dos temas: desinfección y vacunación, pero ayuda al alumno y al profesor a reflexionar sobre la importancia que tienen estos puntos en la vida diaria de un Médico Veterinario Zootecnista estudiante o profesionalista, los cuales resultan ser de importante trascendencia en el ejercicio de su profesión.

El apéndice sugerido se considera básico y suficiente para la realización de las prácticas de cada unidad.

Se citan las referencias utilizadas en la elaboración de este trabajo, si se desea profundizar algún tema o punto específico.

R E F E R E N C I A S

- 1.- Acton J.F., Kucera L.S. 1979. Fundamental of Medical Virology. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- 2.- Andrews D., Pereira H.C., Wildy P. 1978. Viruses of Vertebrates Fourthed. Ed. Baillere Tindal, London.
- 3.- Alexander H.A. 1986. Técnica Quirúrgica en Animales y Temas de Terapéutica Quirúrgica. Ed. Interamericana, México.
- 4.- Alvarez E., Astudillo V., Barragan A.I., et. al 1986. Cuarentena Animal. Volumen 3, (PTOASA). Ed.)P.S., O.H.S., B.I.D. Waschinton D.C.
- 5.- Aparicio O.C., Barrón R.L., Gené C.M., et. al. 1988. Manual de Virología. Ed. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, - I.P.N., México.
- 6.- Apuntes de Clínica de Aves. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Spi. U.N.A.M., México.
- 7.- Apuntes de Microbiología. Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán. spi. U.N.A.M., México.
- 8.- Apuntes de Virología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. spi. U.N.A.M., México.
- 9.- Baker F.J. 1979. Manual de Técnicas Bacteriológicas. Ed. - Acripia Zaragoza, España.
- 10.- Bellanti J.A. 1981. Inmunología II. Ed. Interamericana, México.
- 11.- Berenguer E.A., Sumano L.H., Ocampo C.L., Gutiérrez O.P., 1985. Prontuario de Especialidades Veterinarias. Ed. Centro Profesional de Publicaciones S.A., México.
- 12.- Bojalil J.L., Santoscay G.G., Rodriguez H., Sosa H.J., 1982. Microbiología Médica. Ed. Facultad de Medicina U.N.A.M., México.
- 13.- Blood D.D., Henderson J.A. Rodostis O.H. 1983. Medicina Veterinaria. Ed. Interamericana.
- 14.- Break H.R. 1972. Esterilización. Métodos y Control. Ed. El - Manual Moderno, México.
- 15.- Bryan A.H., Bryan C.A., Brian C.G. 1974. Bacteriología, Principios y Prácticas. Ed. C.E.C.S.A., México.
- 16.- Burdon K., Williams R.P. 1982. Microbiología. Ed. Publicaciones Culturales. México.
- 17.- Burnet F.M. 1975. Immunolgy. Reading from Scientific. American, Ed. Freeman an Company, U.S.A.
- 18.- Callis J.J., Dardiri A.H., Ferris D.H., et. al., 1982. Manual Ilustrado para el Reconocimiento y Diagnóstico de Ciertas Enfermedades de los animales. Ed. Comisión México-Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa.

- 19.- Capella D.A. 1970. Enfermedades Exóticas de los animales. - Ed. U.T.E.H.A., México.
- 20.- Carpenter p.l. 1982. Inmunología y Serología. Ed. La Prensa Médica Mexicana S.A., México.
- 21.- Carpenter P.L. 1984. Microbiología. Ed. Interamericana, - México.
- 22.- Carter G.R. 1973. Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology. Ed. Charles C. Tomas, Publisher Michigan.
- 23.- Correa G.P. 1981. Enfermedades Virales de los Animales Domésticos Monogástricos. Ed. F.H., México.
- 24.- Correa G.P. 1981. Enfermedades Virales de los Animales Domésticos Poligástricos. Ed. F.H., México.
- 25.- Cumming H. 1975. Virología Cultivo de Tejidos. Ed. El Manual Moderno S.A., México.
- 26.- Cunningham C.H. 1971. Virología Práctica. Ed. Acribia Zaragoza España.
- 27.- Davis D., Dulbeco R. 1984. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat Editores. España.
- 28.- Fenner F., White O.D. 1981. VIROLOGIA MEDICA. Ed. La Prensa Médica Mexicana, S.A., México.
- 29.- Fischer Scientific Company Catalog 77. 1976. Apparatus and Supplies for Industrial Clinical College and Government Laboratories. Ed. Apparatus Chemical, U.S.A.
- 30.- Flores C.E., Keilbach B.N., Lizarraga C.O. 1982. Manual de Necropsias. Ed. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M., México.
- 31.- Froisher, Fuerst R. 1984. Microbiología. Ed. Interamericana, México.
- 32.- Fuentes H.V., 1986. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Ed. Interamericana, México.
- 33.- Gay G.N. 1981. Desinfectantes Viricidas en Medicina Veterinaria Memorias. Ed. F.H.V.Z., México.
- 34.- Godman L.S., Gilma A. 1978. Bases Farmacológicas de la Terapéutica Ed. Interamericana, México.
- 35.- Gordon R.F. 1985. Enfermedades de las Aves., Ed. El Manual - Moderno. México.
- 36.- Herbert W.J. 1972. Inmunología Veterinaria. Ed. Acribia Zaragoza, España.
- 37.- Hernández E., Mar E., Galindo E. 1974. Manual de Virología. Ed. E.N.E.P. Cuautitlán, México.
- 38.- Hsiug G.D., Henderson J.R. 1964. Diagnostic Virology. Ed. - New Haven and London, Yale University prees.

- 39.- Jawetz E., Melnick J.L. 1983. Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno, México.
- 40.- Lennette E.H., Schmidt J.H. 1981. Diagnostic Procedures for Viral Rickettsias and Chlamydial Infections. Ed. Interdisciplinary Books and Periodicals for Professional and the Layman.
- 41.- Martínez S.J., Cruz J.G. 1980 Manual del Curso Práctico de Virología Médica y Diagnóstica. Facultad de Estudios Superiores. U.N.A.H., México.
- 42.- Merck. 1970. El Manual Merck de Veterinaria. Ed. Merck & C.O.I.N.C., E.U.A.
- 43.- Meyer J.L. 1982. Farmacología y Terapéutica Veterinarias. - Ed. U.T.E.H.A., México.
- 44.- Michael W.R. 1979. Rapid Diagnosis in Infectious Diseases. - Ed. CRC Press, INC. Florida.
- 45.- Mitchel H.J. 1967. Virological Procedures. Ed. Butterworths, London.
- 46.- Monhaty B.S., Dutta K.S. 1985. Virología Veterinaria. Ed. Interamericana, México.
- 47.- Morilla G.A., Bautista G.C. 1986. Inmunología Veterinaria. - Manual de Laboratorio. Ed. Diana, México.
- 48.- Olsen G.R., Krakowka, Olsen C.G. 1983. Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos. Ed. El Manual Moderno, - México.
- 49.- Pelcazar J., Chan E.S. 1981. Elementos de Microbiología. Ed. Mc Craw-Hill de México.
- 50.- Pelón W. 1964. Manual de Laboratorio para Virus y Rickettsias. Ed. Publicaciones de la Universidad de Costa Rica., San José.
- 51.- Rodríguez E. 1988. Fracasos de la vacunación. Comunicación personal. Laboratorios Norden, México.
- 52.- Roberts W.A., Carter G.R. 1981. Essentials of Veterinary Virology. Ed. Lucas Brother Publisher, U.S.A.
- 53.- Roberts W.A., Carter G.R. 1976. Outline of Veterinary Virology. Ed. Lucas Brother Publisher, U.S.A.
- 54.- Rojas M.W. 1983. Inmunología. Ed. Fondo Educativo Interamericano, México.
- 55.- Romanoff A.L. 1970. The Avian Embryo Structural and Functional Development. Ed. The Mac Millian Company, New York.
- 56.- Rovocho C.G., Buerke C.H. 1973. A Manual of Basical Virological Techniques. Ed. Prestice/Hal, INC. Englewood Cliffs, New York.
- 57.- Salsbury. 1984. Manejo de una vacuna. Ed. Laboratorios Salavury, México.

- 58.- Seeley W.H., Dermak V.J. 1972. Microbios en Acción. Ed. Blume, Madrid.
- 59.- Shuadel A.A., Pasini H.I., Cornaglia E. 1985. Manual de Técnicas para la Identificación de Agentes Infecciosos Asociados a Diarreas Neonatales Bovinas. Ed. CICV-INIA-Castelar, Argentina.
- 60.- Siström W.R. 1973. Vida Microbiana. Ed. C.E.C.S.A. México.
- 61.- Stephano H.A. 1986. Diagnóstico Diferencial entre Aujeszky y Síndrome del Ojo Azul. Síntesis porcina. Vol. 5 No. 2. Ed. Año 2000, México.
- 62.- Stites D.P., Stono J.D., Fudenberg H.H. 1985. Inmunología básica y clínica. Ed. El Manual Moderno, México.
- 63.- Thomas Company Arthur U. 1976. Scientific Apparatus and Reagents Scientific Apparatus for Academic. Ed. Industrial and Médico Biological, Philadelphia U.S.A.
- 64.- Tizard I.R., Folch F. R. 1986. Inmunología Veterinaria. Ed. Interamericana, México.
- 65.- Waterson A.P. 1962. Introducción a la Virología Animal. Ed. Acribia Zaragoza, España.
- 66.- Wistreich G.A. Lechtman M.D. 1976. Laboratory Exercises in Microbiology. Ed. Clenice Prees, U.S.A.
- 67.- Witton's. Gray Y.G. 1972. Microbiología. Ed. C.E.C.S.A., México.