

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

UTILIZACION DE LA PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO PARA DETECTAR ANTICUERPOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK EN LA YEMA DE HUEVO DE LAS GALLINAS

T E S I S

Que para obtener el título de

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE

México, D. F.

1975



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**UTILIZACION DE LA PRUEBA DE FIJACION DEL
COMPLEMENTO PARA DETECTAR ANTICUERPOS
CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK EN LA
YEMA DE HUEVO DE LAS GALLINAS**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
p r e s e n t a
JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE

México, D. F.

Julio

1975

Con cariño y agradecimiento
a mis asesores técnicos

M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ E.

M.V.Z. JUAN GAY GUTIERREZ.

Al personal que labora en
el Departamento de Virolo
gía e Inmunología de la -
Facultad de Medicina Vete
rinaría y Zootecnia, muy-
especialmente a:

SR. MOISES FRAIRE C.

SRA. BEATRIZ B. DE UNZUETA.

SRA. MA. LUISA FRAIRE.

A mis padres

LIC. AGUSTIN MONTAÑO GARCIA

SRA. BLANCA YASUKO HIROSE DE MONTAÑO

A mis hermanos

Agustín Fumimaro

Luis

Raúl

A mis amigos

Lourdes Jiménez Perea;

Jorge de León Sánchez

Francisco de la Vega Villarreal

Rosario Anguiano Chavira

Salvador Romo García

Elohín Fuentes Zenón

A mi novia

Marcela Alcántara C.

I. INTRODUCCION

El sistema inmunológico de los animales recién nacidos, necesita desde unos cuantos días hasta 3 semanas aproximadamente, según la especie, para desarrollar su capacidad total y responder al estímulo antigénico, debido a que persiste un estado de incompetencia inmunológica fetal; este estado se halla asociado con la necesidad del individuo de producir tolerancia a sus propios antígenos (4, 10, 13).

Durante el periodo que sigue al nacimiento, los animales reciben un suplemento de inmunoglobulinas maternas que le confieren inmunidad pasiva y los mantiene protegidos hasta que tiene lugar la maduración inmunológica. Estas inmunoglobulinas pueden llegar al feto in utero, en ciertas especies, por transporte activo a través de la barrera placentaria y/u obtenerlas el animal recién nacido con el calostro (4, 10).

Los pollitos recién eclosionados también se hallan provistos con aportes de inmunoglobulinas maternas; una gran cantidad de éstas se encuentran presentes en la yema de los huevos recién puestos en forma de inmunoglobulinas G (IgG), sin embargo, las enzimas producidas por los embriones en desarrollo destruyen parte de ellas antes de que hayan sido absorbidas por el pollito.

No obstante, se hallan generalmente presentes anticuerpos maternos suficientes, tanto para proteger al pollito como para interferir con la vacunación de las aves a muy temprana edad (4, 10). No existe evidencia de transferencia desde la madre al hijo de factores de inmunidad celular - (10).

Durante los últimos 4 años se ha observado un aumento considerable de los casos de enfermedad de Marek en aves vacunadas, con un incremento en las pérdidas económicas debidas a este padecimiento (2, 14, 18).

Lo anterior hace suponer que, entre las múltiples causas posibles (18), la presencia de anticuerpos maternos en las aves jóvenes reduce los niveles de protección conferidos por la vacunación, lo que motivó la realización del presente trabajo con el propósito de detectar la presencia de dichos anticuerpos en yemas de huevos de animales vacunados.

En 1970, Graham y Burgoyne (8) detectaron anticuerpos en los pollitos de aves enfermas de Marek, utilizando las pruebas de anticuerpos fluorescentes y de precipitación en gel de agar, la última de las cuales tiene grandes inconvenientes, como el de presentar resultados irregulares, como lo demostraron Stone y Holly en 1971 (17).

No obstante, se hallan generalmente presentes anticuerpos maternos suficientes, tanto para proteger al pollito como para interferir con la vacunación de las aves a muy temprana edad (4, 10). No existe evidencia de transferencia desde la madre al hijo de factores de inmunidad celular (10).

Durante los últimos 4 años se ha observado un aumento considerable de los casos de enfermedad de Marek en aves vacunadas, con un incremento en las pérdidas económicas debidas a este padecimiento (2, 14, 18).

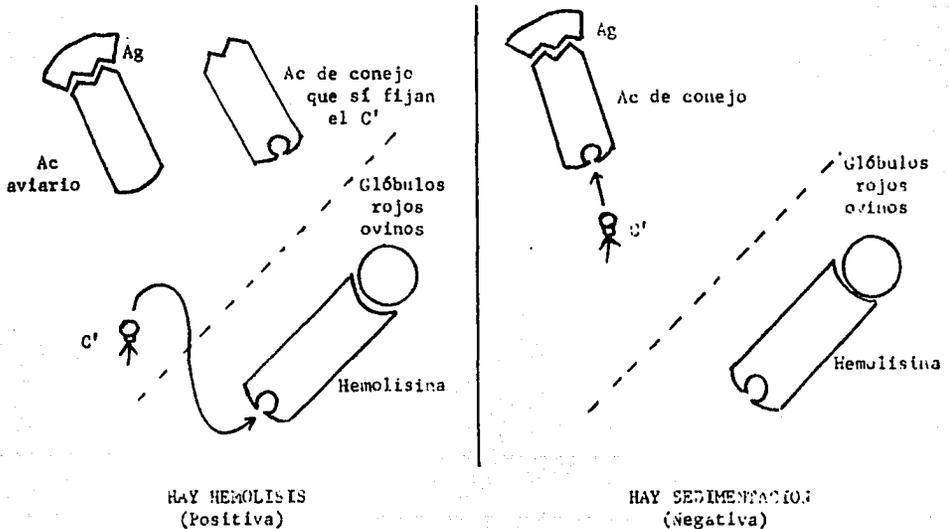
Lo anterior hace suponer que, entre las múltiples causas posibles (18), la presencia de anticuerpos maternos en las aves jóvenes reduce los niveles de protección conferidos por la vacunación, lo que motivó la realización del presente trabajo con el propósito de detectar la presencia de dichos anticuerpos en yemas de huevos de animales vacunados.

En 1970, Graham y Burgoyne (8) detectaron anticuerpos en los pollitos de aves enfermas de Marek, utilizando las pruebas de anticuerpos fluorescentes y de precipitación en gel de agar, la última de las cuales tiene grandes inconvenientes, como el de presentar resultados irregulares, como lo demostraron Stone y Holly en 1971 (17).

de conejo, no existe Ag libre con que puedan combinarse y por ello no se fija el C' y su presencia puede demostrarse después por la lisis del sistema hemolítico.

Cuando no existen los anticuerpos avia---rios, el Ag queda libre, por lo que cuando se añaden los anticuerpos de conejo, se combinan con este Ag y se fija el C'. Esto se demuestra al añadir el sistema hemolítico y sedimentar los glóbulos rojos óvinos.

ESQUEMA DE LA PRUEBA INDIRECTA DE FIJACION DEL
COMPLEMENTO*



* Adaptado de: FROBISHER, Martin. Microbiología. Salvat --

El aspecto de los tubos en la reacción in
directa ES TOTALMENTE OPUESTO AL QUE SE OBSERVA EN LA -
REACCION DIRECTA, es decir:

Aspecto del tubo	Prueba directa	Prueba indirecta
SEDIMENTACION	POSITIVA	NEGATIVA
HEMOLISIS	NEGATIVA	POSITIVA

II. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLOGICO

- Virus Herpes de pavo* (vacuna contra la enfermedad de Marek), conservado con nitrógeno líquido, que se utilizó para inocular conejos y obtener antisueros.
- Virus Herpes de pavo** (vacuna contra la enfermedad de Marek) liofilizado, que se utilizó como antígeno y para inocular gallinas y obtener sueros positivos de ave.
- 500 yemas de huevo, obtenidas de la Granja Avícola "Veracruz" y de granjas de aves reproductoras.
- Complemento, obtenido de sueros de cuyes del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Glóbulos rojos de ovino al 2% y al 4% en solución salina fisiológica.
- Hemolisina comercial (Bacto Anti-sheep Hemolysin Glycerinated. Difco Laboratories, Detroit, Mich.).

* Proporcionado por el Dr. Francisco Cobos Panadero (Laboratorios Salsbury, México, Méx.).

** Proporcionado por el Dr. Salvador Romero (Abbot de México, Tlaxcala, Méx.).

- Conejos de la raza Nueva Zelanda.
- Gallinas de la raza Leghorn.
- Sueros de aves vacunadas, obtenidos a los 20 días de edad, de la Granja Avícola "Veracruz".
- Sueros de aves, obtenidos a los 14, 16, 18, 20 y 22 días después de -- inoculadas con el virus Herpes de - pavo.
- Sueros de aves enfermas clínicamente de enfermedad de Marek.

METODOS

a) OBTENCION DEL COMPLEMENTO

Se sangraron 10 cuyes clínicamente sanos - y que no habían sido inoculados antes, se dejaron coagular las muestras de sangre en tubos de centrifuga durante una hora a temperatura de laboratorio y se clarificaron - por centrifugación a 2,000 rpm durante 15 minutos. Des---pués se obtuvieron los sueros por decantación, se mezclaron y se guardaron en alícuotas de 0.5 ml en frascos estériles de 5 ml, cerrados con retapa de aluminio. Posteriormente fueron congelados y guardados a -20°C y se utilizó un frasco solamente para titular el complemento de todo - el lote; mensualmente se comprobaba este título.

b) TITULACION DEL COMPLEMENTO Y DE-
LA HEMOLISINA

Para la titulación del C' y la hemolisina-
se siguió la técnica descrita por Kabat y Mayer (12).

c) OBTENCION DEL SUERO HIPERINMUNE-
DE CONEJO

Se utilizaron 4 conejos de la raza Nueva -
Zelanda, clínicamente sanos y que no habían sido previa--
mente inoculados.

Para la preparación del inóculo, se utili-
zó la suspensión original del virus Herpes de pavo conser-
vado con nitrógeno líquido (2 ml) diluída en 12 ml de so-
lución salina 0.85% estéril. El virus Herpes de pavo está
antigénicamente relacionado con el virus de la enfermedad
de Marek (19) y ambos pertenecen al mismo grupo (1).

El inóculo se aplicó a los animales en 4 -
ocasiones cada tercer día en una dosis de 3 ml por conejo
por vía subcutánea. A los 21 días de la última inocula--
ción se obtuvo el suero de los 4 conejos, se mezcló, se -
inactivó a 56°C durante 30 minutos y se tituló.

d) TITULACION DEL SUERO HIPERINMUNE
Y EL ANTIGENO

Se realizó en tubos de Wasserman, utilizan-
do la titulación en tablero de ajedrez descrita por Her-
bert (10), que consiste en titular un suero positivo va-
rias veces añadiendo una cantidad de antígeno diferente.-
La dilución del antígeno con la que se obtenga el mayor -

título se toma como patrón.

e) TRATAMIENTO DE LA YEMA

Se usó el método descrito por Schimittle y Millen en 1948 (15):

En un tubo de ensaye se colocan 1.5 ml de yema de huevo y se diluyen con 6 ml de solución salina -- 0.85%.

Se añaden 2 ml de dicloruro de etileno -- (1.2. dicloroetano) y 1 ml de éter sulfúrico o dietílico y se mezcla por inversión del tubo.

Se incuba durante 12 horas (toda la noche) a 37°C y se e centrifuga después a 1,000 rpm durante 10 minutos.

El dicloruro de etileno queda en la porción inferior del tubo; se remueve el sobrenadante con pipeta. Este fluido es 1:5 de la yema.

f) OBTENCION DE LOS SUEROS POSITIVOS DE AVE

Con el propósito de tener controles positivas de aves que sí poseyeran anticuerpos contra la enfermedad de Marek y poder evaluar los resultados de las pruebas, se obtuvieron sueros diferentes que fueron numerados del 1) al 7) de la siguiente manera:

1) Se sangraron 10 aves en la Granja Avícola "Veracruz" de 20 días de edad, que habían sido vacunadas con el virus Herpes de pavo conservado con nitrógeno-

líquido por un médico veterinario* que la realizó con el cuidado que especifican las instrucciones de la vacuna; - se obtuvieron los sueros y se guardaron en congelación.

2) Se inocularon 5 gallinas clínicamente sanas de la raza Leghorn, que estaban en postura, - con 50 dosis para cada una, del virus Herpes de pavo liofilizado, por vía subcutánea, cada tercer día. Se obtuvieron los sueros después de un total de 5 inoculaciones -- (250 dosis por ave), a los:

14 días de la última inoculación.

3) 16 días de la última inoculación.

4) 18 días de la última inoculación.

5) 20 días de la última inoculación.

6) 22 días de la última inoculación.

7) Se sangraron 7 aves clínicamente enfermas de Marek, de las que anteriormente se habían tomado - muestras de yemas de huevo, en la Granja Avícola "Veracruz".

g) DESARROLLO DE LA PRUEBA

La prueba se llevó a cabo en el Laboratorio de Serología del Departamento de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Se ensayó únicamente una dilución (1:5 de la yema) de cada muestra.

* ROMANO PADRO JUAN JOSE. Médico Veterinario Zootecnista de la Granja Avícola "Veracruz"

TECNICA DE HILLEMANN
(Modificación de Fraire*)

Yema 0.1 ml
Complemento 2 UH 0.1 ml
Antígeno 0.1 ml

INCUBAR A 4°C 18 HORAS

Suero hiperinmune
de conejo 0.1 ml

INCUBAR A 37°C 30 MINUTOS

Se centrifugan los tubos a 1,500 rpm durante 3 minutos y se leen en el espectrofotómetro.

CONTROLES POSITIVOS

- 1) Suero de conejo más antígeno más complemento.
- 2) 7 sueros de aves más antígeno, más complemento y suero de conejo, en dos diluciones cada suero: 1:2 y 1:4.

CONTROLES:

- 1) Sistema hemolítico más complemento.
- 2) Sistema hemolítico sin complemento.
- 3) Cada una de las yemas más complemento.
- 4) Cada una de las yemas sin complemento.

* FRAIRE CACHON MOISES. Departamento de Virología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

- 5) Antígeno más complemento.
- 6) Antígeno sin complemento.
- 7) Suero de conejo más complemento.
- 8) Suero de conejo sin complemento.
- 9) Sueros de aves más complemento.
- 10) Sueros de aves sin complemento.

III. RESULTADOS*

CUADRO No. 1

Total de yemas Dilución 1:5	Resultados	Controles de yemas más C'	Controles de yemas sin C'
500	0%	100%	0%

* Los resultados no se pudieron leer directamente del espectrofotómetro, debido a la turbidez del antígeno empleado, por lo que se dan las lecturas en porcentaje de hemólisis.

CUADRO No. 2

CONTROLES POSITIVOS
(de aves)

Suero No.	Dilución	Resultado	Control más	Control sin
			C'	C'
<u>1)</u>	1:2	25%	100%	0%
	1:4	25%	100%	0%
<u>2)</u>	1:2	50%	100%	0%
	1:4	75%	100%	0%
<u>3)</u>	1:2	75%	100%	0%
	1:4	50%	100%	0%
<u>4)</u>	1:2	25%	100%	0%
	1:4	75%	100%	0%
<u>5)</u>	1:2	50%	100%	0%
	1:4	50%	100%	0%
<u>6)</u>	1:2	50%	100%	0%
	1:4	0%	100%	0%
<u>7)</u>	1:2	75%	100%	0%
	1:4	50%	100%	0%

CONTROLES:

- 1) Sistema hemolítico más C': 100%
- 2) Sistema hemolítico sin C': 0%
- 3) Antígeno más complemento: 100%
- 4) Antígeno sin complemento: 0%
- 5) Suero de conejo más C': 100%
- 6) Suero de conejo sin C': 0%

CONTROL POSITIVO

- 1) Suero de conejo más antígeno más comple
mento: 0%

IV. DISCUSION

En este trabajo, con la prueba de fijación del complemento no se detectaron anticuerpos en ninguna - de las yemas estudiadas, incluyendo aquéllas provenientes de aves que enfermaron clínicamente de Marek; pero en los sueros de las aves recién vacunadas, de las inoculadas experimentalmente y de las aves clínicamente enfermas, sí - se alcanzaron niveles detectables, aunque inferiores a la mínima dilución a la que se pueden trabajar las yemas según la técnica de Schmittle y Millen, que es de 1:5. Esto crea la necesidad de estudiar otras técnicas que permitan trabajar las yemas sin diluir.

La prueba de fijación del complemento de-- mostró ser confiable para detectar anticuerpos contra la enfermedad de Marek; esto contrasta con las pruebas reali^zadas con la técnica de inmunodifusión en gel de agar, -- con la que se obtienen resultados muy irregulares, como - lo señalaron Stone y Holly en 1971 (17). Los resultados - obtenidos con la prueba de fijación del complemento y la técnica de anticuerpos fluorescentes realizada por Graham (8) no se pueden comparar debido a que el citado autor no trabajó con yemas de huevo.

El nivel tan bajo de anticuerpos en las ye^{mas} de las aves supuestamente vacunadas, hace pensar que no existen en cantidad suficiente para neutralizar el virus Herpes de pavo con que se vacuna contra la enfermedad

de Marek.

La respuesta inmunológica de tipo humoral en las aves fue muy baja en los controles positivos y fue descendiendo hasta alcanzar niveles no detectables a los 22 días después de la última inoculación, como se observa en el cuadro No. 2, lo cual hace pensar que la protección que brinda la vacuna es del tipo de inmunidad celular o por fenómenos de interferencia viral.

Hubo problemas en el manejo de la vacuna conservada con nitrógeno líquido para utilizarla como antígeno, ya que varuaba rápidamente su pH, lo que alteraba los resultados (12), y se prefirió utilizar en su lugar la vacuna liofilizada, que fue más fácil de transportar, manejar y conservar en congelación una vez restituida, por lo que es aconsejable que se utilice este tipo de vacunas para su uso como antígeno en el laboratorio al realizar trabajos de investigación semejantes al presente.

Dada la facilidad con que el virus de la vacuna contra la enfermedad de Marek conservado con nitrógeno líquido se alteraba en su antigenicidad en el laboratorio, es deseable que se realicen trabajos bajo condiciones de manejo comercial de la vacuna en las plantas de incubación, para determinar si existen dificultades en el mismo, que modifiquen la efectividad de la vacuna.

Se modificó la técnica de Schmittle y - Millen para tratar las yemas, debido a que después de cen- trifugar a 1,000 rpm queda una suspensión blanquecina que dada la delicadeza de la prueba (10, 12) interfería con - el resultado, por lo que se procedió a realizar una segun- da centrifugación, esta vez a 1,500 rpm, después de la - cual se eliminó gran parte de la suspensión. Esta modifi- cación no alteró el título de anticuerpos presentes, lo - que se comprobó realizando un estudio comparativo de los- títulos de seroneutralización en embrión de pollo y de an- ticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (HI) con un- virus conocido de Newcastle, antes y después de esta se- gunda centrifugación, siendo ambos títulos idénticos.

V. CONCLUSIONES

La cantidad de anticuerpos de inmunidad - pasiva presentes en el pollo, transmitidos a través de la yema de huevo, es tan escasa en los animales en estudio, - que no son suficientes para neutralizar el virus de la vacuna contra la enfermedad de Marek.

VI. BIBLIOGRAFIA

- (1) ANDREWES & PEREIRA, Viruses of Vertebrates. 3rd. Ed. - London, 1972.
- (2) ANTILLON RIONDA ARMANDO, Diferencias Macro y Microscópicas entre la Enfermedad de Marek y Leucosis Linfoide. Avicultura Técnica, Año XII.- 157:10-22.
- (3) BALL, R. F. and others, Resistance to Marek's Disease of Chicks from Immunized Breeders. Poultry-Sci. 50:1084-90. 1971.
- (4) BETTS A. O. & YORK C. J., Viral and Rickettsial Infections of Animals. Academic Press Inc., New-York, 1967.
- (5) CHUBB R. C. & CHURCHILL A. E., Effect of Maternal Anti body on Marek's Disease. Vet. Rec. 85:303-5 1969.
- (6) EIDSON C. S. & ANDERSON D. P., Optimum Age for Vaccinating Chickens against Marek's Disease. - - Poultry Sci. 50:1837-41, 1971.
- (7) ELEAZER T. H., HVT-Resistant Marek's Strains? No evidence thus for. Poultry Dig. 31:442-4, 1972
- (8) GRAHAM PURCHASE H. B. V.Sc., M.R.C.V.S., M.S., & BURGOYNE G. H. M.S., Immunofluorescence in the - - Study of Marek's Disease: Detection of Antibody. Am. Jour. of Vet. Res. of the A.V.M.A. Vol. 31, Jan. 1970, 1:117-123.

- (9) HAMDY F. & SEVOIAN M., Complement Fixation Reaction-
for the Diagnosis of Type II Avian - -
(Marek's) Leukosis. App. Micr. 20:356-61 -
1970.
- (10) HERBERT W. J., Inmunología Veterinaria. Ed. Acribia,
Zaragoza, España. 1972.
- (11) HOWE C. W., Vaccination, Success or Failure? Poultry-
Dig. 32:408-10, 1973.
- (12) KABAT E. A. & MAYER M.M., Experimental Immunochemis-
try, 2nd. Ed., Springfield: Thomas, 1961.
- (13) LOYD & QUINN, Immunological Concepts. The Iowa State
University Press. Ames, Iowa. 1968.
- (14) MERCK SHARP & DOME INTERNATIONAL., Deptavac-HVT (Mar-
ca Registrada de Merck and Co., para la va-
cuna contra la enfermedad de Marek, a base
de virus vivo herpes de pavo). "Vacuna con-
tra la Enfermedad de Marek". Boletín Técni-
co.
- (15) CHIMITTLE S. C. & MILLEN T. W., Detection of Hemma--
glutination Inhibition Antibodies in Unin-
cubated Eggs. Cornell Vet. 38:306. 1948.
- (16) SPENCER J. L. & ROBERTSON A., Influence of Maternal-
Antibody on Infection with Virulent or At-
tenuated Marek's Disease Herpesvirus. Am.-
J. Vet. Res. 33:393-400. 1972.

- (17) STONE H. A. & HOLLY ELIZABETH A., Reliability of the Agar-Gel Precipitin Test in Marek's Studies. Avian Diseases. Vol 15:4. 1971.
- (18) SWARBRICK OLAF., "Se Deben Ver en Perspectiva los -- Brote de Vacunación contra Marek". Avicultura Técnica, Año XII, 158:6-8.
- (19) WILTER R. L., NACERIAN K., PURCHASE H. G. & BURGOYNE G. H., Isolation from Turkeys of a Cell- - Associated Herpesvirus Antigenically Related to Marek's Disease Virus. Am. J. of Vet Res. of the A.V.M.A. Vol 31 March, 1970, -- 31:525-538.