

Nº 25
261.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LA PRUEBA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA
COMO UNA ALTERNATIVA PARA LA
SEROTIPIFICACION DEL VIRUS DE LA
INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MIRIAM ALICIA BECERRIL FLORES



MEXICO, D. F.

MARZO DE 1992

**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.

CONTENIDO

Página

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	11
DISCUSION.....	13
LITERATURA CITADA.....	15
ANEXO.....	19

RESUMEN

BECERRIL FLORES MIRIAM ALICIA. LA PRUEBA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA COMO UNA ALTERNATIVA PARA LA SEROTIPIFICACION DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO. (BAJO LA DIRECCION DEL M.V.Z. ANGEL RETANA REYES Y M.V.Z. JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ).

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar el serotipo de cepas de virus vacunales y cepas de virus aislados en brotes de campo de la infección de la bolsa de Fabricio, mediante la prueba de inmunolectrotransferencia, se utilizaron aislamientos virales, obtenidos a partir de brotes de campo de IBF. confirmandose mediante las pruebas de histopatología, virus suero neutralización, inmunofluorescencia y precipitación en agar. Asi mismo se analizaron cepas vacunales como controles. Los diferentes virus trabajados se purificaron y corrieron por electroforesis e inmunolectrotransferencia. En cepas vacunales se detectó la presencia de dos bandas, las mismas que se observaron en 4 de 5 aislamientos de brotes de campo positivos a IBF, en uno de los cinco se observaron tres bandas a la prueba de inmunolectrotransferencia.

INTRODUCCION

La infección de la bolsa de Fabricio (IBF), también conocida como enfermedad bursal, bursitis infecciosa o enfermedad de Gumboro, es una enfermedad infecciosa, aguda y de rápida difusión causada por un birnavirus. La IBF puede encontrarse virtualmente en todas las áreas del mundo donde se practica la avicultura intensiva (9,10,17,18,27).

La IBF fue observada por primera vez en 1962 por Cosgrove en granjas avícolas cercanas a la población de Gumboro, Delaware, E.U.A. y se refiere a esta enfermedad como " Nefrosis aviar " (5,7,18). En México, Correa aisló un agente infeccioso con características similares a las del virus de IBF en 1965, y en 1969 reprodujo la enfermedad en aves susceptibles. En 1972 Lucio y col. confirmaron la presencia de la enfermedad en México al identificar anticuerpos contra el virus, encuesta que demostró que el 90% de las parvadas poseían anticuerpos neutralizantes contra el virus de la IBF (17).

En cuanto a la presentación de la IBF, su difusión es sumamente rápida (11,17,27) y la morbilidad y mortalidad depende de varios factores, medio ambiente que rodea a las aves, predisposición genética, siendo más susceptibles las aves de líneas ligeras que las aves de líneas pesadas (14), edad al momento de la infección y cepa de virus infectante (10).

Si las aves se infectan durante las dos primeras semanas de vida, la IBF cursa con un cuadro subclínico causando una severa inmunodepresión. Mientras más temprana sea la infección, la inmunodepresión sera más severa (10,17,18). La IBF ocasiona

disminución en la respuesta inmune de tipo humoral y celular (27,28) ya que el virus de IBF tiene como órgano blanco el tejido linfoide, afectando principalmente la bolsa de Fabricio, donde provoca lesiones con diversos grados de severidad (8) por lo cual las aves serán más susceptibles a sufrir otras enfermedades (virales, bacterianas, parasitarias, tóxicas, etc.), las reacciones postvacunales de Bronquitis Infecciosa, Enfermedad de Newcastle y Laringotraqueitis se tornan más severas, el pollo retrasa su desarrollo y disminuye la producción de huevo (6,10,17). La enfermedad en su presentación clínica ocurre en aves entre tres y quince semanas de edad (9). Sin embargo, se han encontrado reportes de aves que la han padecido a las 17 semanas de edad (14). Entre algunos signos clínicos las aves muestran depresión, temblores, pluma erizada y frecuentemente diarrea acuosa (9,10,19)

El agente causal es un birnavirus, el cual se caracteriza por ser un virus desnudo de forma icosaédrica y con un diámetro que varía de 55 a 65 nm (10). En relación a su composición química el virus de IBF posee doble cadena de ácido Ribonucleico y doble segmentación (3,11,12) contiene 7 u 8 proteínas en su cubierta externa, posee 92 capsómeros y exhibe formas filamentosas (3,7). En cuanto a sus características físicas, el virus es bastante resistente al medio ambiente y a los agentes fisicoquímicos. Resiste temperaturas de 56 ° C - por más de 90 minutos es igualmente resistente a la acción del éter, cloroformo y a los cambios de pH. El formol, los derivados del cloro y del yodo destruyen al virus (4,19).

Se han descrito dos serotipos del virus de IBF de los cuales, el serotipo uno afecta al pollo y no así el serotipo dos. Del serotipo uno se reportan diversos subtipos que difieren serológicamente de la cepa prototipo (serotipo uno) (9,12,17), sin embargo es importante tomar en cuenta a nivel de campo los informes de la presencia de "variantes" del virus y las cuales no se han reportado en México, por tanto el monitoreo periódico de la parvadas, el aislamiento viral y el uso de una prueba para la detección de estas posibles "variantes" del virus se vuelve necesario (9,14,22,24). Esto representa un problema desde el punto de vista clínico y de diagnóstico de laboratorio al no contar actualmente en México con una prueba que nos permita diferenciar entre un virus aislado de casos de campo y un virus vacunal.

Dentro de la metodología para la serotipificación de un virus se cuenta con la prueba de seroneutralización y la prueba de inmunolectrotransferencia (2).

La prueba de inmunolectrotransferencia se ha utilizado en la determinación de antígenos que son capaces de estimular la formación de anticuerpos específicos contra cada epítipo del antígeno viral. Esta prueba se basa en el principio de la separación de proteínas mediante el método de electroforesis en gel de acrilamida (22) posteriormente su transferencia a papel de nitrocelulosa, el cual es embebido en anticuerpos específicos contra los antígenos a estudiar (1,2,8,13,16,20,21,24), esta prueba permite el diagnóstico, caracterización genómica y comparación de aislamientos

individuales, por lo que constituye una técnica valiosa para estudios moleculares y epidemiológicos de infecciones (26,28)

individuales, por lo que constituye una técnica valiosa para estudios moleculares y epidemiológicos de infecciones (26,28)

HIPOTESIS:

Mediante la prueba de inmunolectrotransferencia se puede realizar la serotipificación de cepas de virus vacunales y cepas de virus de campo de la IBF.

OBJETIVO:

Determinación de los serotipos de cepas de virus vacunales y cepas de virus aislados en brotes de campo de IBF mediante la prueba de inmunolectrotransferencia.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizarón cinco muestras de virus de IBF cuyo serotipo era desconocido, procedentes de aislamientos de brotes de campo, las cuales fueron sometidas a las siguientes pruebas: histopatología, virus suero neutralización, inmunofluorescencia y precipitación en agar (10,15,29) resultando positivos los cinco aislamientos. Se utilizaron a las cepas vacunales Luckert, D-78, PBG-98 y 1284 de IBF como controles positivos y como control negativo se utilizó Buffer de muestra.

Todas las muestras se purificaron y procesaron para la extracción de la proteína y del ARN mediante el siguiente método:

- a. Resuspender en tubos Eppendorf 1 ml de muestra en buffer de muestra al 20 % agitándose con Vortex.
- b. Clarificar por centrifugación a 15,000 rpm durante 10 minutos.
- c. Del clarificado obtenido se tomó 1 ml agrgandole 1 ml de la siguiente solución: ClLi 1 M, SDS 2 % y EDTA pH. 7.8 20 mM, agitándose con Vortex.
- d. Incubar a 55°C durante 15 minutos.
- e. Agregar 2 ml de una mezcla de partes iguales de fenol-cloroformo, agitándose con Vortex.
- f. Incubar a 55°C durante 15 minutos.
- g. Centrifugar a 15,000 rpm durante 15 minutos.
- h. Transferir la fase acuosa superior a otro tubo evitando tocar la interfase.
- i. Para precipitar el ARN agregar 2 volúmenes de etanol frío.

j. Conservar durante 2 horas a -70°C .

k. Centrifugar enseguida durante 15 minutos a 15,000 rpm, en frío (4°C)

l. Retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur y para secar el sedimento se colocaron los tubos destapados al vacío.

m. Los sedimentos se resuspendieron en 90 ml de agua destilada y 10 ml de buffer de siembra.

n. Las muestras se colocaron en el gel de acrilamida con micropipeta.

Una vez procesadas las muestras se corrieron por electroforesis en gel de acrilamida siguiendo la técnica descrita por Laemmli (16) con las siguientes modificaciones:

1.- La concentración de acrilamida fue de 3 % para el gel de inserción, 7.5 % y 15 % para el gel de separación.

2.- El miliamperaje (ma). empleado fue de 30 y un tiempo de corrido de 18 a 20 horas.

Se corrieron dos geles de acrilamida simultáneamente uno de ellos se tiñó con la solución de Azul de Coomasiue y etanol, permaneciendo 24 horas en tinción, para posteriormente ser desteñido con la solución decolorante la cual consistió en metanol 40 %, ácido acético 10 % y agua desionizada 50 %. Con el otro gel se realizó la prueba de inmuno-electrotransferencia, este método consistió en transferir las proteínas del gel al papel de nitrocelulosa. Para lo cual se construyó un " sandwich " utilizando una placa de metal sobre la que se colocó una fibra sintética de nylon, posteriormente se depositó papel de nitrocelulosa y gel de acrilamida se puso sobre lo anterior una

fibra sintética de nylon y una placa de metal; Todo se mantuvo unido firmemente con la ayuda de ligas de hule. El "sandwich" se sumergió en un recipiente con la siguiente solución amortiguadora: 0.05 mM NaCl, 2 mM Na- EDTA y 10 mM Tris-HCl pH 7 para transferir las proteínas el "sandwich" se colocó en la cámara de electroforesis y se hizo pasar una corriente de 2 ma durante 2 horas teniendo cuidado de que el papel de nitrocelulosa quedara sobre el gel y del lado de ánodo. Una vez realizada la transferencia el papel de nitrocelulosa se embebe en una solución con antisuero contra IBF específico para cada cepa con una dilución 1/10, se incubó a 37°C durante 30 minutos, se lava el papel y se le agrega un conjugado antigamaglobulina de pollo para revelar las bandas de proteína. Los antisueros empleados fueron:

- a) Antisuero contra cepa Luckert.*
- b) Antisuero contra cepa D-78.*
- c) Antisuero contra cepa PBG-98.*

*Los antisueros y la antigamaglobulina de pollo fueron donados por la industria privada.

La lectura de las muestras de virus procesadas en la prueba de electroforesis e inmuno-electrotransferencia se realizó por comparación de aquellos antígenos presentes en las cepas control, frente a los antígenos detectados de los virus aislados de brotes de IBF de campo.

ESTA YESAS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

RESULTADOS

Las cepas de virus de IBF que se trabajaron, fueron aisladas en cultivo de tejidos y estas inoculadas a pollos de dos semanas de edad reaislandose el virus en cultivo de tejidos y confirmandose el diagnostico mediante las pruebas de virus suero neutralización, inmunofluorescencia, histopatología y precipitación en agar . Las muestras con las que se trabajo se identificaron como V1 (Virus vacunal cepa Luckert), V2 (Virus vacunal cepa D-78), V3 (Virus vacunal cepa PBG-98), V4 (Virus vacunal cepa 1284), C-(control negativo), CC1, CC2, CC3, CC4 y CC5 (aislamientos de virus de IBF de brotes de campo). Los aislamientos en la prueba de electroforesis en gel de acrilamida nos muestran que el ARN genómico del virus de IBF. presenta dos bandas, las cuales se observan en las cuatro cepas vacunales, una migración similar de bandas, se observó en cuatro de los cinco aislamientos de virus de campo (Cuadro 1)

El aislamiento identificado como CC4 proveniente de una parvada de gallinas Leghorn de 17 semanas de edad, sin historia de vacunación contra IBF. que presentaban un cuadro clinico de uratosis severa, titulos en la prueba de VSN mayores de 1:20480 y una hiperplasia de bolsa de Fabricio con exudado, al ser analizado en la prueba de electroforesis en gel de acrilamida se encontró que presentaba 3 bandas, las dos primeros siguieron un patrón de migración similar a las de las cepas vacunales, pero la tercer banda no se detecto en ninguno de los otros aislamientos.

Al realizar la prueba de inmunoelectrotransferencia con

los ántisueros específicos se encontró que esta cepa no correspondía a ninguno de los antiseros con los que se trabajo

DISCUSION

En el capítulo de Introducción se mencionó la importancia del impacto que tiene la IBF, así como la necesidad de contar con una prueba para realizar la serotipificación viral.

En cuanto a los resultados obtenidos las cepas vacunales y aisladas a partir de brotes de campo concuerdan con lo descrito por Jackwood (12), las bandas obtenidas mediante la prueba de electroforesis en gel de acrilamida pueden corresponder a proteínas de la nucleocápside capaces de inducir la producción de anticuerpos.

El aislamiento identificado como CC4, presentó tres bandas, las dos primeras con migración similar a las cepas vacunales la tercera banda que presentó este virus no se observa en la migración de bandas de los virus vacunales ni en los otros aislamientos. Lo que puede deberse a que este virus presenta modificaciones en cuanto a sus proteínas y péptidos que le dan características diferentes a las cepas vacunales y de los otros aislamientos realizados, o bien que la muestra se encontrara contaminada con otro virus que se replicara en bolsa de Fabricio como pudiera ser el virus de la Leucosis aviar y por tanto manifestar un patrón de migración diferente presentando una tercera banda en electroforesis en gel de acrilamida, pero hay que considerar que esta muestra fue tratada con antisueros específicos contra el virus de IBF en la prueba de inmunolectrotransferencia y se detecto una reacción positiva, al igual que se identifico en las pruebas de inmunofluorescencia, precipitación en agar, histopatología y

virus suero neutralización, así mismo se logró aislar el agente, a partir de animales inoculados con el virus, lo que nos permitió reconocer que el agente con el cual se trabajó es virus de IBF pero que presenta características especiales, ya que este virus es capaz de inducir una infección crónica y persiste en las aves entre las 16 y 18 semanas de edad, se debe recordar que la bolsa de Fabricio comienza su involución entre la 10 y 12 semana de edad, la historia clínica del brote de campo de IBF de donde se aisló este virus, identificado como CC4, nos presenta un cuadro clínico con lesiones a la necropsia sugestivas a IBF, títulos en la prueba de virus suero neutralización mayores de 1:20480 y la perrada no presentaba ningún antecedente de vacunación contra IBF

En este trabajo se observó que la prueba de inmunolectrotransferencia puede ser utilizada para determinar si los virus aislados a partir de brotes de campo corresponden a cepas vacunales o bien se trata de un virus de campo.

LITERATURA CITADA

- 1) Arriaga, D.C., Muñiz, E. Morilla, G.A. y Ortega, P.G.: Identificación por Inmunolectrotransferencia de antígenos reconocidos por sueros de cerdos infectados con *Trichinella spiralis*. Reun. de Inv. Pec. México, D.F., 1988. 34. SARH, México, D.F., (1988).
- 2) Atilano, D. y Montaraz, J.A.: Estudio comparativo de dos cepas de *Bordetella bronchiseptica* mediante un método sencillo de Inmunotransferencia. Reun. de Inv. Pec. México, D.F., 1988. 29. SARH, México, D.F. (1988).
- 3) Becht, H.: Infectious bursal disease virus. Curr. Top. Microbiol Immunol., 90: 107-121 (1980).
- 4) Bennejean, G.: Maladie de Gumboro: Etude des moyens de lutte en rapport avec les propriétés de l'agent causal. Bull. Off. Int. Epiz., 88:213-224 (1977).
- 5) Cosgrove, A.S.: An apparently new disease of chickens avian-nephrosis. Avian Dis., 6:385-389 (1962).
- 6) Dhillon, A.S. and Kibenge, F.S.B.: Ability of the live commercial Gumboro vaccines to protect against challenge by variant A and IM. Strains. 37th. West. Poultry Dis. Conf. Davis, California, E.U.A. 1988, West. Poultry Dis., EUA., (1988).
- 7) Dobos, P.: Peptide map comparison of the proteins of infectious bursal disease virus. J. Virol., 32:593-605 (1979).

- 8) Gomez, A.F.E.: Electroforesis comparativa de las proteínas del virus de la Enfermedad de Newcastle (Cepas Querétaro, Chimalhuacan, B1 y La Sota) en gel de poliacrilamida. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1986.
- 9) Grieve, D.: Cepas variantes de la Infección de la Bolsa de Fabricio. Pto. Vallarta, Jal. México. 1989, 54-57. ANECA., México, D.F. (1989).
- 10) Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M. and Yoder, H.W.: Diseases of Poultry. 8th. ed. Board for the American Association of Avian Pathologists, Iowa, USA., 1984.
- 11) Hudson, P.J., Mckern, N.M., Power, B.E. and Azad, A.A.: Genomic structure of the large RNA segment of Infectious Bursal Disease virus. Nucl. Acids. Res., 14:5001-5012 (1986).
- 12) Jackwood, D.J., Saif, Y.M. and Hughes, J.H.: Nucleic acid and structural proteins of Infectious Bursal Disease virus isolates belonging to serotypes I and II. Avian Dis., 28:990-1006 (1984).
- 13) Khosraviani, M., Nunoya, T. and Matsumoto, M.: Monoclonal Antibodies against Surface Antigens of Pasteurella multocida Strain P-1059. Avian Dis., 34:163-173 (1990).
- 14) Kouwenhoven, B.: Enfermedad de Gumboro: El punto de vista europeo. VII Sem. Int. de Pat. aviar, Athens, Georgia, E.U.A. 1990.297-305. Georgia, E.U.A. (1990).
- 15) Kumar, S., Sarma, G. y Bclair, W.: El papel de ELISA. Ind. Avicola., 30:57-58 (1986).
- 16) Laemml, U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the

- Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature., 227:680-685 (1970).
- 17) Lucio, D.E.: La Infección de la Bolsa de Fabricio. II. Jor. Med. Avícola. México 1991., 108-117. UNAM (1991).
- 18) Mosqueda, T.A. y Lucio, M.B.: Enfermedades Comunes de - las Aves Domésticas. I ed. UNAM. México 1985
- 19) Okoye, J.O.A. and Phil, M.: Infectious Bursal Disease - of chickens. Vet. bull., 54:425-436 (1984).
- 20) Renart, J., Reiser, J. and Stark, G.R.: Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:3116-3120 (1979).
- 21) Reudelhuber, T.L., Ball, D.J., Davis, A.H., and Garrard, W.T.: transferring DNA from electrophoretically resolved nucleosomes to diazobenzyloxymethyl cellulose: properties of nucleosomes along mouse satellite DNA. Nucl. Acids. Res., 10:1311-1325 (1982).
- 22) Rickwood, D. and Hames, B.D.: Gel electrophoresis of nucleic acids a practical approach. 1th ed. Irl Press. Oxford, 1982.
- 23) Rosenberger, J.K., Claud, S. and Metz, A.: Use of Infectious Bursal Disease Variants in broiler and broiler breeders. Zoo. Int. January:59-61 (1988).
- 24) Snabes, M.C. Boyd III, A.E. and Bryan, J.: Detection of Actin-binding Proteins in Human Platelets by 125 I-Actin Overlay of Polyacrylamide Gels. J. Cell. Biol., 90:809-812 (1981).
- 25) Snyder, D.B., Lane, D.P., et al: Differentiation of

Infectious Bursal Disease virus directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis. 32:535-539 (1989).

26) Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H. y Wells, J.V.: Inmunología básica y clínica. 5 ed. El manual moderno. México, D.F., (1985).

27) Thornton, D.P.: Control of Gumboro disease vaccines. Clin. Vet. 7:375-387 (1980).

28) Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. 2th ed. Interamericana, México, D.F., 1986.

29) Valdes, L.L.E., Lucio, M.A. y Antillon, R.A.: Estudio clinicopatológico y por Inmunofluorescencia. Vet. Méx. 2:5-10 (1971).

cuadro 1.

V1	V2	V3	V4	C-	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5
---	---	---	---		---	---	---	---	---
---	---	---	---		---	---	---	---	---

-.-.-.-.-									

RESULTADOS OBTENIDOS EN GEL DE ACRILAMIDA POR EL METODO DE ELECTROFORESIS.

V1=Virus vacunal, cepa Luckert.

V2=Virus vacunal, cepa D-78.

V3=Virus vacunal, cepa PBG-98.

V4=Virus vacunal, cepa 1284.

C-=Control negativo.

CC1,CC2,CC3,CC4 y CC5=Virus aislados a partir de brotes de campo.

-----=Bandas presentes en gel de acrilamida.

.-.-.-.=Linea de Boratos

- a) CAMARA DE ELECTROFORESIS.
- b) GEL DE ACRILAMIDA.
- c) TRANSFERENCIA A PAPEL DE NITROCELULOSA.
- d) PROCESO CON ANTISUEROS ESPECIFICOS CONTRA IBF.

