

36
2 eje.

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



UTILIZACION DE LA TECNICA DE FIJACION DEL
COMPLEMENTO DIRECTA PARA LA DETERMINACION
DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE A
PARTIR DE EXUDADO TRAQUEAL Y BAZO DE AVES
INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

Laura Cobos Marin

Asesor: **M.V.Z. Aurora Velazquez Echagaray**

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





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.

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO DIRECTA
PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE
A PARTIR DE EXUDADO TRAQUEAL Y BAZO DE AVES INFECTADAS
EXPERIMENTALMENTE

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por
Laura Cobos Marín

Asesor:
MVZ Aurora Velázquez Echagaray

México D.F.

1994

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco especialmente al M.V.Z. Moisés Fraire, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Agradezco a mi asesora, Dra. Aurora Velázquez, por el apoyo y los conocimientos que me ha brindado.

Agradezco al doctor Angel Retana y la doctora Paty Noé, por la orientación que me dieron para realizar este trabajo.

Agradezco a los compañeros del laboratorio de serología, por su ayuda.

Agradezco a Lucía y Carlos, por el tiempo que invirtieron en este trabajo.

DEDICATORIAS:

A mis padres y mi hermano, por darme el apoyo y confianza que me han dado siempre.

A Toño, por ser mi compañero en todo momento.

A mi familia y amigos.

CONTENIDO:

RESUMEN:	1
INTRODUCCIÓN:	2
MATERIAL Y MÉTODO:	11
II. Elaboración de los antisueros:.....	11
III. Inoculación de las aves y obtención de las muestras: 12	12
IV. Preparación de los elementos para la prueba de fijación del complemento:.....	13
V. Realización de las pruebas de fijación del complemento, con las muestras obtenidas de las aves:.....	13
VI. Inoculación en embrión de pollo con los inóculos de bazo de animales infectados y testigos negativos:.....	14
RESULTADOS:	16
I. Obtención del virus de trabajo:.....	16
II. Elaboración de los antisueros:.....	16
III. Inoculación de las aves y obtención de las muestras: 17	17
IV. Preparación de los elementos para la prueba de fijación del complemento:.....	17
V. Realización de las pruebas de fijación del complemento, con las muestras obtenidas de las aves:.....	18
VI. Inoculación en embrión de pollo con los inóculos de bazo de animales infectados y testigos negativos:.....	19
DISCUSIÓN:	20
LITERATURA CITADA:	26
CUADROS:	31
CUADRO 1.....	31
Titulación del antisuero 1 y el virus.....	31
CUADRO 2.....	32
Titulación del antisuero 2 y el virus.....	32
CUADRO 3.....	33
Titulación del suero normal de conejo y el virus.....	33
PRUEBA DE F.C. CON LAS MUESTRAS DE EXUDADOS:.....	34
CUADRO 4.....	34
Muestras positivas:.....	34
CUADRO 5.....	35
Muestras negativas:.....	35
PRUEBA DE F.C. CON LAS MUESTRAS DE BAZOS:.....	36
CUADRO 6.....	36
Muestras positivas:.....	36
CUADRO 7.....	37
Muestras negativas:.....	37
CUADRO 8.....	38
Muestras de bazos y exudados negativas y positivas:.....	38

RESUMEN:

COBOS MARÍN LAURA Utilización de la técnica de fijación del complemento directa para la determinación de la presencia del virus de Newcastle a partir de exudado traqueal y bazo de aves infectadas experimentalmente. (Bajo la dirección de M.V.Z. Aurora Velázquez Echegaray).

El presente trabajo se realizó con el fin de establecer las bases para la posterior utilización de la técnica de fijación del complemento directa (FC), en el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle (ENC), mediante la determinación de la presencia del virus (VENC) en una parvada de animales, durante las primeras horas de infección y aún en ausencia de signos. Se elaboró un antisuero en conejo Nueva Zelanda, inoculado con VENC purificado por cromatografía y se tituló por las técnicas de IHA, VSN Y FC. Se usó un suero normal de conejo como control negativo. Se utilizaron veinte aves Rhode Island Red hembras, sin vacunar, de cuatro semanas de edad, de las cuales diez se infectaron con el VENC cepa Querétaro y se sacrificaron a los 4, 5, 6, 7 y 8 días postinfección, para obtener exudado traqueal y bazo en condiciones estériles; las diez aves restantes se usaron como testigo negativo de las pruebas y se obtuvieron las mismas muestras, de igual forma. Se utilizó una parte de las muestras de bazo para inocularlas en embrión de pollo (EP) y comprobar la presencia del VENC en las muestras positivas. Las veinte muestras de exudado, resultaron negativas a la prueba. De las diez muestras de bazo obtenidas de las aves infectadas, ocho resultaron positivas al enfrentarlas al antisuero elaborado y dos al enfrentarlas con el suero normal de conejo. De las diez muestras de bazo de las aves testigo, tres de ellas resultaron positivas al enfrentarlas con el antisuero elaborado y una resultó positiva al enfrentarlas con el suero normal de conejo. Los resultados muestran que la prueba no es muy confiable, ya que el antisuero elaborado no resultó ser ni sensible ni específico. Al trabajar la técnica de FC con el VENC se encontró la limitante de que éste produce hemólisis de los eritrocitos al encontrarse en altas concentraciones. Se concluye que la técnica de FC no fue adecuada para determinar la presencia del VENC en las muestras obtenidas.

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO
DIRECTA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS
DE NEWCASTLE A PARTIR DE EXUDADO TRAQUEAL Y BAZO DE AVES
INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE.

INTRODUCCIÓN:

A pesar de los esfuerzos sanitarios y de inmunizaciones encaminados a la disminución en la presentación de la enfermedad de Newcastle (ENC), siguen informándose casos de esta enfermedad en el país, produciendo grandes pérdidas económicas, tanto por su efecto directo, como por las enfermedades secundarias que pueda propiciar. Es por ello que resulta importante determinar la presencia de esta enfermedad en una granja, mediante un diagnóstico rápido y eficiente, que nos ayude a tomar las medidas para un control y prevención oportunos.²⁹

La ENC fue observada por primera vez en Java en 1926 y posteriormente descrita en Newcastle, Inglaterra. Actualmente se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo, en México es de reporte obligatorio, y sólo Sonora y Sinaloa se consideran libres y se tiene un buen control sanitario en esta zona.^{8, 14}

Es causada por un virus de la familia Paramixoviridae, género *Paramixovirus*, subtipo 1, del cual hay un sólo serotipo y distintas cepas. El virus de la enfermedad de

Newcastle (VENC) es envuelto, pleomórfico y mide entre 100 y 300 nm. Está constituido por una nucleocápside de geometría helicoidal, que contiene ARN negativo de cadena simple. La envoltura externa deriva de la membrana celular del huésped y está formada por proyecciones de glicoproteínas. Las proyecciones mayores corresponden a la neuraminidasa y a la hemaglutinina. Las pequeñas corresponden a un precursor de glicoproteínas que facilita la fusión celular.^{3, 5, 6, 7, 9}

La réplica viral se produce a nivel del citoplasma celular, en donde la cadena de ARN negativa, transcribe para 6 a 7 ARNm que codifican los distintos polipéptidos virales que son principalmente: HN (Hemaglutinina y neuraminidasa), M (Matriz protéica), NP (Proteína de la nucleocápside), F (proteína de fusión), L-P (Transcriptasa); se mencionan también: P (fosfoproteína) y SH (función desconocida). El ensamblaje se presenta a nivel de la superficie interna de la membrana celular, en donde se incorporan los distintos polipéptidos a la matriz proteica viral y se da la extrusión de los viriones envueltos en la porción de membrana celular modificada.^{2, 13, 14}

Las distintas cepas de VENC son morfológica, estructural y serológicamente indistinguibles, sin embargo por su virulencia en embrión de pollo se clasifican como:^{5, 9,}
13

Velogénicas: Son altamente patógenas y producen una enfermedad de curso agudo, con altas mortalidades (hasta un 100%); dentro de

éstas se encuentran las cepas Querétaro, Chimalhuacán, Milán y Herts'33. Se dividen en:

Viscerotrópicas: Afectan el tracto digestivo, con lesiones hemorrágicas.

Neurotrópicas: Afectan el tracto respiratorio y nervioso.

Mesogénicas: Producen signología respiratoria y en ocasiones nerviosa, con bajas mortalidades (25%). Pueden afectar al sistema reproductor. Las cepas Roakin y Mukteswar pertenecen a este grupo.

Lentogénicas o respiratorias: Se manifiestan con una infección respiratoria de moderada a subclínica. Dentro de éstas se encuentran la cepa Hitchner B1, La Sota y Clon 30, las cuales son utilizadas comúnmente para vacunación.

Entéricas asintomáticas: Producen una enfermedad entérica de tipo subclínico, como ejemplo se encuentran la cepa Ulster 2C, V4 y VG/Georgia.

Existe una relación entre las distintas cepas y el tiempo que tardan en producir la muerte en embrión de pollo

de nueve a once días de edad, al ser inoculadas por cavidad alantoidea: las velogénicas tardan menos de 60 horas en matar al embrión, las mesogénicas de 60 a 90, las lentogénicas más de 90 y las entéricas asintomáticas no lo matan.^{6, 16, 21, 23, 30}

El VENC en cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo, produce sincitios y corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos.^{2, 3, 4}

La ENC se transmite por vía aérea y oral, por secreciones nasales o excretas, mediante el contacto directo o aerosoles, por agua de bebida o alimento, portadores y por transmisión vertical. Sus vías de entrada naturales son la nasal, oral y ocular, con un período de incubación de 2 a 15 días, (4 a 6 en promedio).² La enfermedad afecta predominantemente a pollos y pavos de cualquier edad, su signología, morbilidad, mortalidad y lesiones suelen ser variables, dependiendo de la cepa, dosis de exposición, edad del animal, condiciones nutricionales, de salud y climatológicas. La patogenia del virus se inicia con una primera réplica viral a nivel del tracto respiratorio superior, en glándula de Harder o en mucosa intestinal, posteriormente llega a tonsilas cecales, por ser un virus linfotropo, así alcanza sistema circulatorio realizando una segunda réplica viral en endotelio vascular, bazo y timo, presentándose viremia, finalmente se distribuye en forma sistémica a distintos órganos como cerebro y aparato reproductor.^{2, 14, 16, 28, 30}

La ENC en aves jóvenes se presenta generalmente en forma aguda, pudiendo causar muerte súbita en ausencia de signos, mientras que en aves de mayor edad se manifiestan signos respiratorios como disnea, conjuntivitis, descarga nasal y ocular, digestivos (diarrea) y nerviosos como parálisis, movimientos en círculo, epistótonos y opistotónos entre otros, en la fase final de la enfermedad. En aves de postura se puede observar signología respiratoria inaparente y una fuerte y súbita caída en la producción de huevo con baja o nula mortalidad.^{2,6,16,30}

Las lesiones que provoca el VENC también son variables, observándose edema, hemorragias y focos de necrosis en proventrículo, ciego, intestino delgado y tonsilas cecales, así como congestión en tráquea y pulmones. Los ovarios se pueden encontrar flácidos y con lesiones degenerativas. La manifestación clínica y las lesiones llegan a verse alteradas por infecciones bacterianas secundarias, como en el caso de la presentación de aerosaculitis o exudados caseosos.^{2,4,6,11,16, 28, 30}

La enfermedad de Newcastle se diagnostica comúnmente en el campo, mediante la observación de signos y lesiones a la necropsia, sin embargo para confirmar el diagnóstico es necesario realizar el aislamiento viral en embrión de pollo, a partir de muestras de aves sospechosas, como secreciones oro-nasales o de cloaca obtenidas con isopos, o de órganos como: tráquea, pulmón, sacos aéreos, cerebro, bazo, hígado, intestino, corazón, riñones o médula ósea. Para confirmar el aislamiento se realizan pruebas de hemaglutinación del

líquido alantoideo, e inhibición de la hemaglutinación.^{2,4,6,16,21,30} Una vez que se confirmó el aislamiento se deben realizar pruebas que determinen la virulencia del virus, como son: la del tiempo medio para producir la muerte en embrión de pollo, o el índice de patogenicidad intracerebral o endovenoso en pollos, ya que debido a la amplia distribución del virus y a la vacunación con virus activo, es importante comprobar que la cepa aislada corresponda al virus de campo.^{2,21} La prueba de inmunofluorescencia directa puede utilizarse para demostrar la presencia del virus en tejidos de ave infectados.^{2, 30}

Para medir los niveles de anticuerpos en el suero de un animal se utilizan las pruebas de: E.L.I.S.A. (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), inhibición de la hemaglutinación, precipitación en agar y la virus suero neutralización; esta última proporciona resultados más confiables.^{2,6,16,21,22,26} En general las pruebas serológicas son una herramienta muy utilizada por los clínicos, tanto para monitoreos de rutina, como para confirmar posibles brotes de la enfermedad; sin embargo, estas pruebas deben emplearse con cautela, ya que si no se interpretan correctamente, pueden llevarnos a dar diagnósticos erróneos²².

Algunas de las pruebas mencionadas tienen desventajas por requerir de personal calificado y equipo especial, como en el caso de la inmunofluorescencia. Otras requieren la utilización de tejidos vivos, ya sea embrión de pollo o cultivos celulares, como la de virus suero neutralización. El

aislamiento en embrión de pollo requiere un mínimo de tres días para permitir que se realice la réplica viral.

Debido a lo anterior, podría resultar de gran utilidad el adaptar una técnica de diagnóstico que identificara la presencia del virus, en las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad, que proporcionara un resultado en unas cuantas horas y fuera factible de realizarse en laboratorios convencionales.

La prueba de fijación del complemento (FC) es muy sensible, (capaz de detectar cantidades menores de 1 ng, del antígeno o el anticuerpo)¹⁷ y nos permite llegar a un resultado en 2 horas aproximadamente^{17,23}. Esta técnica es comúnmente utilizada para la determinación de niveles de anticuerpos o el agente infeccioso, en mamíferos domésticos²³. En las aves, para la cuantificación de anticuerpos en el suero es necesario el uso de la prueba de fijación del complemento indirecta o la técnica de fijación del complemento directa modificada, debido a que el complemento utilizado es de mamífero y difícilmente se activa con anticuerpos de ave¹⁹. Sin embargo se puede intentar realizar la prueba de fijación del complemento directa si se trata de determinar la presencia del antígeno, y no la de los anticuerpos en el ave. Para ello sería necesario elaborar un antisuero en mamífero contra la enfermedad que se desea diagnosticar y enfrentarlo a muestras que se sospeche contienen el agente causal de dicha enfermedad. Existen algunos informes del uso de técnicas de fijación del complemento directa en aves, para la detección del virus de

bronquitis infecciosa a partir de líquido alantoideo obtenido por pases del virus en embrión de pollo¹⁵.

El complemento es un sistema de por lo menos veinte proteínas séricas, las cuales actúan mediante un mecanismo de reacción en cadena, que conlleva entre otros resultados a la lisis de membranas celulares.^{12,24,25,27} La prueba de fijación del complemento se fundamenta en la activación de éste por la vía clásica, en donde es necesaria la presencia de una unión antígeno-anticuerpo para iniciar la reacción.^{17,23,26} Para esta prueba se utilizan los siguientes elementos²³ :

- ♦ Complemento de cuye, el cual se utiliza por tener una gran actividad hemolítica, hacia los eritrocitos de ovino.
- ♦ Hemolisina, que son anticuerpos contra los glóbulos rojos de ovino.
- ♦ Glóbulos rojos de ovino lavados y preparados en una suspensión al 2%, adicionados con hemolisina.
- ♦ Solución amortiguadora (buffer) a un pH de 7.2, que contenga calcio y magnesio.

La prueba consta de dos fases: la primera es llamada fase invisible y la segunda, fase visible: en la invisible se trabaja con un primer sistema antígeno-anticuerpo, enfrentando el antígeno sospechoso (elemento desconocido), con el suero específico (elemento conocido) y el complemento;

en la fase visible, se agrega un segundo sistema antígeno-anticuerpo (sistema hemolítico), formado por glóbulos rojos de ovino y hemolisina, el cual nos permite visualizar si se produjo en la primera fase una reacción antígeno-anticuerpo. En caso de existir dicha reacción el complemento se unirá a ésta y no será capaz de unirse al segundo sistema antígeno-anticuerpo, observándose una sedimentación. De no existir una reacción antígeno anticuerpo en el primer sistema, el complemento quedará libre y será capaz de unirse al segundo sistema antígeno-anticuerpo, produciendo hemólisis. Así, una prueba positiva se manifestará por medio de sedimentación de los glóbulos rojos, mientras que en una prueba negativa se observará hemólisis.^{17,23,25}

HIPÓTESIS:

La técnica de fijación del complemento directa puede ser utilizada para la determinación de la presencia del virus de Newcastle en exudados traqueales y macerados de bazo obtenidos de animales infectados.

OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia del virus de Newcastle, con la técnica de fijación del complemento directa, usando un antisuero específico previamente elaborado en conejo y muestras de aves infectadas obtenidas a partir de macerados de bazo y exudados traqueales.

MATERIAL Y MÉTODO:

Se elaboró un antisuero contra la enfermedad de Newcastle, en conejo, y se infectaron aves sin vacunar, con el objeto de detectar la presencia del virus en bazo y exudado traqueal de estos animales. Esto se realizó en el departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la U.N.A.M.

Se inocularon, por cavidad alantoidea, treinta embriones de pollo con el virus de Newcastle cepa Querétaro, utilizando la técnica que describe Cuningham¹⁰.

Se inocularon, treinta embriones, con el virus de Newcastle cepa La Sota, el cual fue purificado por columna de cromatografía, por la técnica que describe Ahrens¹, para utilizarlo en la elaboración de los antisueros. Como antígeno en las pruebas de FC se utilizó el VENC sin purificar.

II. ELABORACIÓN DE LOS ANTISUEROS:

Se elaboraron dos antisueros, en conejos Nueva Zelanda, de 2 kg., mediante inoculaciones del virus purificado, cada 7 días, , por vía ocular, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal, con un volumen de 1 ml., como lo describe Huddson¹⁷. Los conejos respondieron a partir de la segunda

inoculación, uno de ellos se sacrificó a la cuarta semana y el otro se siguió inoculando hasta la sexta semana, en la que se sacrificó por exanguinación, con el animal anestesiado con ketamina, para obtener el suero y envasarlo en viales con 1 ml cada uno, para su posterior utilización.

Los antisueros obtenidos se titularon por las técnicas de IHA y VSN, como lo describe Hanson¹⁶.

Se obtuvo suero de un conejo, para utilizarlo como control de suero negativo y se tituló por la prueba de I.H.A.

III. INOCULACIÓN DE LAS AVES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS:

Se inocularon diez aves, sin vacunar, Rhode Island Red hembras, de cuatro semanas de edad, con el virus de Newcastle cepa Querétaro, con un título de 1:160 U.I.H.A. Y de $10^{8.49}$ D.L.E.P.50%, por vía ocular e intranasal y se sacrificaron a los 4, 5, 6, 7 y 8 días postinoculación. Se obtuvo exudado traqueal y bazo de las mismas en condiciones estériles; el primero se hizo con la ayuda de una pipeta Pasteur y un succionador de goma, realizando la técnica que describe Almeida¹, utilizando 1 ml de solución buffer. Los bazos se guardaron en congelación, para procesarlos como lo describe el *Manual de laboratorios de investigación y diagnóstico Veterinarios*²³.

Como testigo negativo se utilizaron diez aves, sin vacunar, Rhode Island Red hembras, de cuatro semanas. Se

obtuvieron y procesaron las muestras de igual forma que con las aves infectadas.

IV. PREPARACIÓN DE LOS ELEMENTOS PARA LA PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO:

Las pruebas de F.C. se hicieron en el laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales.

Para realizar las pruebas de F.C., fue necesario titular el complemento y hemolisina antes de utilizarlos, así como los antisueros elaborados y el antígeno (VENC). Dicha titulación se realizó conforme a lo descrito por el *Manual de laboratorios de investigación y diagnóstico veterinarios*²³. Las pruebas para la titulación de los antisueros y el antígeno se trabajaron en microplaca y la lectura se realizó con un lector de E.L.I.S.A. Dynatech MR700.

Se trabajó de la misma forma con un suero negativo de conejo.

V. REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO, CON LAS MUESTRAS OBTENIDAS DE LAS AVES:

Una vez determinado el título del antígeno y en antisuero a utilizar, se realizaron las pruebas cualitativas, con las muestras de exudado y bazo de las aves

infectadas y testigos negativos, como lo describe el *Manual de laboratorios de Investigación y diagnóstico Veterinarios*,²³ trabajando en microplaca. Las muestras se enfrentaron al antisuero y a un suero normal de conejo. La lectura se realizó en un lector de E.L.I.S.A.

Controles utilizados en las pruebas:

- ♦ Control de antígeno con complemento y sistema hemolítico para las muestras de exudado y bazo, tanto de los testigos negativos como de las aves infectadas.
- ♦ Control de antígeno y sistema hemolítico para las muestras de bazo y exudados de las aves infectadas y las negativas.
- ♦ Control del suero positivo con complemento y sistema hemolítico.
- ♦ Control del antígeno positivo con complemento y sistema hemolítico.
- ♦ Control del antígeno con sistema hemolítico.
- ♦ Control de complemento y sistema hemolítico.
- ♦ Control de sistema hemolítico.

VI. INOCULACIÓN EN EMERIÓN DE POLLO CON LOS INÓCULOS DE BAZO DE ANIMALES INFECTADOS Y TESTIGOS NEGATIVOS:

Se utilizaron las mismas muestras de trabajo, y se realizó la técnica como lo describe Hanson¹⁶, para detectar

la presencia del virus a partir de las muestras positivas y la ausencia de éste en los testigos negativos.

RESULTADOS:**I. OBTENCIÓN DEL VIRUS DE TRABAJO:**

El virus cosechado de la cepa Querétaro dio un título de 160 U.H.A. y de $10^{8.49}$ D.L.E.P. 50%/ml.

El virus cepa La Sota dio un título de 5260 U.H.A. y $10^{8.5}$ D.I.E.P. 50%/ml, después de purificarlo dio un título de 640 U.H.A.

II. ELABORACIÓN DE LOS ANTISUEROS:

El título del antisuero 1 fue de 640 U.I.H.A y 2.34 I.S.N.

El título del antisuero 2 fue de 1280 U.I.H.A y 2.73 I.S.N.

El suero normal de conejo fue negativo a la I.H.A.

Al determinar el título de anticuerpos, de los antisueros y el suero normal de conejo por la prueba de IHA se presentó hemólisis en las primeras diluciones del suero. Inactivando el suero a 56°C por 30 minutos se evitó la hemólisis.

III. INOCULACIÓN DE LAS AVES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS:

De las diez aves inoculadas con el virus de desafío únicamente seis presentaron signología, dentro de los días 4 y 8 postinfección. De éstas, tres tuvieron signos respiratorios únicamente (Nos. 1, 2 y 6), una respiratorios y digestivos (No. 7), otra únicamente digestivos (No. 10) y la otra respiratorios, digestivos y nerviosos (No. 5).

De las diez aves testigo negativo, ninguna presentó signos respiratorios, digestivos o nerviosos.

IV. PREPARACIÓN DE LOS ELEMENTOS PARA LA PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO:

En la titulación de los antisueros y el antígeno de trabajo los controles de virus sin complemento presentaron en las primeras diluciones hemólisis mayor del 50% (66, 63 y 61%). El resto de los controles trabajaron correctamente, tanto para los dos antisueros como para el suero normal de conejo. (Cuadros 1 y 2)

Para el antisuero 1, se observó hemólisis mayor del 80% en la primera y última dilución del virus (82 y 100%), así como en la dilución más alta del antisuero (de 95 a 100%). El título del antisuero se obtuvo en la dilución de 1/20, con la dilución 1/20 del virus (18%). (Cuadro 1)

Para el antisuero 2, también se observó hemólisis mayor del 80% en la primera y última dilución del virus (83 y 92 %), así como en la dilución más alta del antisuero (de 99 a 100 %). El título del antisuero se obtuvo en la dilución de 1/10, con la dilución 1/20 del virus (18%). (Cuadro 2)

El título del virus fue en ambos casos de 1/20 (18%).
(Cuadros 1 y 2)

El suero normal de conejo no fijó al complemento, ya que presentó hemólisis en todas las diluciones del virus. (de 96 a 100%) (Cuadro 3).

V. REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO, CON LAS MUESTRAS OBTENIDAS DE LAS AVES:

Todos los controles de las pruebas realizadas con las muestras obtenidas de las aves trabajaron correctamente.

Se presentó una hemólisis mayor del 70% (valores entre 77 y 100%), al enfrentar con el antisuero elaborado las diez muestras de exudados obtenidas de las aves testigo negativo y las diez muestras de las aves infectadas . Al enfrentarlas con el suero normal de conejo se produjo una hemólisis mayor del 60% (valores entre 61 y 95%). (Cuadros 4 y 5)

De las muestras de bazo obtenidas de las aves infectadas, ocho (Nos. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10) fijaron al complemento al enfrentarlas con el antisuero elaborado

(valores entre 0 y 22% de hemólisis) y dos fijaron al complemento (Nos. 1 y 10), al enfrentarlas con el suero normal de conejo (valores de 44 y 48% de hemólisis). (Cuadro 6)

De las diez muestras de bazo usadas como testigo negativo tres de ellas fueron positivas a la fijación del complemento (Nos. 5, 7, 10) al enfrentarlas con el antisuero elaborado (valores de 44, 3 y 37% de hemólisis , respectivamente), y una de ellas (No. 7) resultó positiva al enfrentarlas con el suero normal de conejo (40% de hemólisis). (Cuadro 7)

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas a las cuarenta muestras, al enfrentarlas al suero normal de conejo y el antisuero elaborado, por la técnica de fijación del complemento, nos dan un total de 14 pruebas positivas y 46 negativas. (Cuadro 8)

VI. INOCULACIÓN EN EMBRIÓN DE POLLO CON LOS INÓCULOS DE BAZO DE ANIMALES INFECTADOS Y TESTIGOS NEGATIVOS:

Se aisló el virus en ocho de las diez muestras obtenidas de las aves utilizadas como control positivo (Nos. 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10).(Cuadro 8)

En ninguna de las diez muestras obtenidas de las aves testigo negativas se aisló el virus. (Cuadro 8)

DISCUSIÓN:

Para la inoculación de los conejos al elaborar los antisueros se decidió utilizar virus purificado por columna de cromatografía, ya que sueros elaborados anteriormente con vacuna a virus activo, elaborada en embrión de pollo, resultaron inespecíficos y detectaban como positivos a bazos de ave negativos, además al ser enfrentados con líquido corio-alantoideo de embrión de pollo, dieron un resultado positivo por la prueba de fijación del complemento. Esto podría deberse a que al colectar el líquido alantoideo del embrión existe la posibilidad de arrastrar otros elementos, como restos de embrión o eritrocitos, los cuales pueden contener algunos determinantes antigénicos comunes a los presentes en el bazo de las aves adultas y al ser inoculados en el conejo provocan la producción de anticuerpos no deseados en nuestro suero.

Los antisueros elaborados inoculando a los conejos con virus purificado se enfrentaron a líquido corio alantoideo, y resultaron negativos, lo cual indica que eran más específicos.

Al infectar a las aves control positivo con el VENC, se esperaba que éstas presentaran signos más marcados y que algunas de ellas murieran en el desafío, esto probablemente no ocurrió, pues no se calculó la dosis infectante ni la dosis letal, para aves de esa edad. Sin embargo no se consideró que estos resultados afecten al experimento, pues en la tesis se trataba de determinar la presencia del virus

aún en aves que no manifestaran signos y dentro de nuestro lote se presentaron aves en estas condiciones.

En los resultados de la titulación del suero y el antígeno, se observó un fenómeno semejante al de zona, en donde tanto las diluciones más altas, como las más bajas presentan hemólisis; además en el control de antígeno con sistema hemolítico, también se presentó hemólisis, en las primeras diluciones. Lo anterior indica que un exceso de virus, aún cuando se enfrente con el antisuero específico, da como resultado una hemólisis. Cotral¹¹, Alexander² y Andrews⁶ mencionan una actividad hemolítica por parte del virus, que va en relación con la proteína de fusión del virus, además de la acción de una enzima neuraminidasa que por su capacidad de eluir glóbulos rojos puede producir su destrucción. La hemaglutinina viral también se relaciona con la fusión viral, por lo que todos los mecanismos podrían estar involucrados. Fenner¹⁴ y Avellaneda²⁹ no mencionan ninguna actividad hemolítica por parte del virus.

En los resultados obtenidos al titular los antisueros por la prueba de IHA, se observó hemólisis en los sueros sin inactivar; que contenían al complemento. Al trabajar la prueba con los sueros inactivados, en los cuales se destruyó al complemento, la hemólisis se eliminó; es posible pensar que el virus, al contener glicoproteínas en su envoltura, provoque la activación del complemento, por la vía alterna^{17, 25, 27} y produzca la lisis del eritrocito al encontrarse fusionado a su membrana. Para probar lo anterior se procedió a enfrentar al VENC con glóbulos rojos de ovino sin

hemolisina, con y sin complemento; además de sistema hemolítico, con y sin complemento y se midieron en el espectrofotómetro los grados de hemólisis en cada caso para comparar las diferencias; encontrándose que el virus con glóbulos rojos y complemento, produce mayor grado de hemólisis que el virus sin complemento o con el complemento inactivado, lo cual nos hace suponer que, con ayuda del complemento el virus produce más hemólisis, es decir que aparentemente activa la vía alterna del complemento. Podría evaluarse, con trabajos posteriores, la posibilidad de establecer una técnica que detecte al virus, si se logra demostrar su actividad hemolítica con ayuda del complemento.

Al titular los antisueros elaborados, con el VENC, por la técnica de fijación del complemento, se observó que el antisuero resultaba muy poco sensible, ya que únicamente era capaz de detectar cantidades muy altas de virus; ésto aunado a que en exceso de virus también se presenta hemólisis nos dificultó la realización de la prueba, ya que en el caso de nuestro virus control positivo, es posible establecer la dilución óptima para trabajar; sin embargo con las muestra de trabajo este factor no puede controlarse, ya que no podemos saber la cantidad de virus que tenga cada muestra, pudiendo contener una muy alta o muy baja cantidad del VENC, observándose en ambos casos una hemólisis final, que daría un falso negativo.

Para obtener un suero con mayor título de anticuerpos se podrían inocular a los conejos con algún adyuvante o

irritante que produzca una respuesta local inflamatoria, que aumente la respuesta inmune.¹⁸

Al trabajar con las muestras de exudados de las aves infectadas y los controles negativos, por la técnica de fijación del complemento, se presentó hemólisis en todas las muestras. Existe la posibilidad de que las muestras positivas tuvieran gran cantidad de virus, y que con ayuda del complemento se produjera hemólisis, dando un resultado falso negativo. También, pudo haber cantidades muy bajas de virus en las muestras, y al enfrentarlas a un antisuero muy poco sensible, no haber podido detectado. Otra posibilidad es que las muestras no tuvieran virus, ya sea por que no se obtuvo correctamente la muestra, o por que no se encontraba virus en los exudados. Dado que las aves fueron infectadas experimentalmente y en los bazos de éstas se detectó al virus, es difícil pensar que en ninguna muestra de exudado hubiera virus. Debieron de haberse inoculado las muestras de exudado en embrión de pollo para comprobar la presencia del virus.

Al comparar los resultados obtenidos con las muestras de bazos inoculados en embrión de pollo y los resultados de la prueba de fijación del complemento se encontró que no existe correlación entre las muestras positivas a la HA y las que resultaron positivas a la FC y se esperaba que los resultados fueran semejantes.

En las pruebas de FC realizadas con los bazos de las aves negativas y positivas, no se obtuvieron los resultados

esperados, ya que se encontró fijación del complemento en tres de las muestras negativas al trabajarlas con el antisuero elaborado. Además, al trabajar con el suero normal de conejo, en donde no se esperaba obtener una fijación del complemento en ninguna de las muestras, se encontró que dos de las muestras positivas y una de los testigos negativos dieron un resultado positivo. Ésto nos dice que los resultados no fueron exactos, debido a que el antisuero no era muy específico; además de que el suero normal de conejo presentó anticuerpos que provocaron la fijación del complemento con las muestras. Este problema podría atribuirse a la presencia de anticuerpos en el suero de los conejos utilizados para la elaboración de los antisueros y para la obtención del suero normal de conejo, contra algún agente común con las aves, que estuviera como contaminante en nuestras muestras (*Pasteurella s.p.p.*, *E. coli* o *Salmonella s.p.p.*). Para elaborar un antisuero más específico deberían usarse conejos S.P.F. que disminuyan la posibilidad de que haya anticuerpos que no correspondan al VENC.

Se observó que los falsos positivos se presentan únicamente en las muestras obtenidas de bazo, el cual además de ser un órgano linfoide, realiza funciones de filtrado de la sangre. Se piensa que tal vez no sea una muestra adecuada, ya que aún cuando el virus del Newcastle puede aislarse de este órgano, en el también puede encontrarse otro gran número de microorganismos. Para evaluar esta teoría se debería proceder a obtener distintos órganos, como cerebro, tráquea, pulmón, hígado, bazo, tonsilas cecales y bolsa de Fabrico, de aves negativas, con el fin de establecer aquel que fuera

selectivo a Newcastle y se encontrara libre de otros microorganismos. Se piensa que una muestra más adecuada podría ser el encéfalo.

Otra posible causa de los falsos positivos, es que las aves utilizadas como testigo negativo hubieran tenido contacto con el virus, a pesar de que para evitar este riesgo se mantuvieron en aislamiento desde la primera semana de edad hasta su sacrificio, fueron monitoreadas serológicamente por la prueba de I.H.A, y los embriones inoculados con la muestra obtenida del bazo de estas aves, dieron negativos a la prueba de hemaglutinación en placa.

CONCLUSIONES:

La técnica de FC directa no resultó adecuada para detectar la presencia del virus de la ENC, en las muestras obtenidas. El hecho de que el virus presente hemólisis dificulta la realización de la técnica de fijación del complemento directa; sin embargo una propuesta para posteriores trabajos sería el hacer más estudios sobre la posibilidad de que el VENC active la vía alterna del complemento, y el tratar de implementar nuevas técnicas para demostrar la presencia del mismo, gracias a su actividad hemolítica, en distintas muestras de aves infectadas.

LITERATURA CITADA:

- 1) Ahrens E.A.: Infección del tomate (*Lycopersicum esculentum*) por el virus del mosaico del tabaco.- aislamiento, purificación e identificación del virus. Tesis de licenciatura Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1975.
- 2) Alexander, D.J.: Newcastle Disease, In : Disease of Poultry. Ed by: Calnek.B.W., Barnes H.J., Beard. C.W, Reid. W. M., Yoder Jr. H. W., 496-519. Iowa State University Press., 9a ed, Ames Iowa, U.S.A. 1991.
- 3) Almeida,J.D., Atanasiu, P., Bradley, D.N., Gardner, P.S., Maynard, J., Schuurs, A.W., Voller, A. and Yolken, R.H.: Manual for rapid laboratory viral diagnosis, World Health Organization, U.K, 1979.
- 4) Andrews,C.:Viruses of Vertebrates., London Balliere Tindall and Cox., London, 1878.
- 5) Avellaneda G.y Villegas. P.: Control de Newcastle en pollos de engorde. Avicultura Profesional 11 (3): 118-122 (1994).
- 6) Biancifiori, F. and Fioroni, A.: An occurrence of Newcastle disease in pigeons: virological and serological studies on the isolates. Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis., 6 (3): 247-252 (1983).

7) Bishop D.H.L. and Compans R.W.: Nonsegmented Negative Strand Virus. Ed by Bishop D.H.L. and Compans R.W., Academic Press. Inc. Univ. of Alabama, Birmingham. U.S.A. 1984.

8) Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales Domésticos.: Boletín México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales Domésticos Nueva Epoca., 5 (12), Dic. 1993.

9) Comité de Enfermedades Exóticas de la Asociación de Sanidad Animal de los Estados Unidos: Enfermedades Exóticas de los Animales, su Prevención, Diagnóstico y Control. Comisión México - Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa ,Virginia, 1984.

10) Cuningham, Ch. H.: Virología Práctica. Acribia., 6a. ed, Zaragoza, 1971.

11) Cottral, G.E.: Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology. Ed by George E Cottral. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press., London, U.K. 1978.

12) Dierich, M.P. and Bitter-Suermann, D.: Complement research. Immunology Today 10: (8): S18-S21 (1989)

13) Fenner, F., McAuslan, B.R., Mims, C.A., Sambrook, J. and White, D.O.: The Biology of Animal Viruses. Academic Press, Inc., 2a. ed, New York, 1974.

- 14) Fenner, F.: Veterinary Virology, Academic Press., U.S.A., 1987.
- 15) Frances, M., Steele, M.S. and Luginbuhl, R.E.: Direct and indirect complement -fixiation test for infectious bronchitis virus. Am. J. Vet. Res., 25: 1249-1254 (1964).
- 16) Hanson, R.P.: Newcastle disease. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by: Hitchner, S.B., Domermuth, C.H., Purchase, H.G. and Williams, J.E., 2nd ed. The American Association of Avian Pathologists, Texas, 1980.
- 17) Hudson, L., Hay, F.C.: Practical Immunology, 3a. ed, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989.
- 18) Johnson, A.B., Eisen. H., and Fry. D.: An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. The American Association for Laboratory Animal Science., 41: 15-21 (1991)
- 19) Marquardt, W.W.: Avian complement fixation Avian diseases 17 : 236-250 (1973).
- 20) Oden'hal S., The Geographical Distribution of Animal Viral Diseases, Ed by: Tinsley, T.W., and Brown. F., Academic Press, University of Georgia, Georgia, 1983.
- 21) Office International Des Epizooties, : Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Reagents for Biological

Products for Lists A and B Diseases. Office International Des Epizooties, 1989.

22) Ortis, M. A., Castruita, C. J., y Morfin, P.R.: Análisis inmunológico de diferentes dosis y calendarios de vacunación contra la enfermedad de newcastle en pollo de engorda. Avirama Año 2 vol. 2: 20-26 (1992).

23) Red de Cooperación Técnica entre Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Veterinario: Manuales de Técnicas de Investigación y Diagnóstico Viroológico, Organización de las Naciones Unidas, Para la Agricultura y la Alimentación, Oficina Regional para América Latina y el Caribe, C et alhile, 1983.

24) Reid K. and Day. A.: Structure-function relationships of the complement components. Immunology Today 10: (8): 177-180 (1989).

25) Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.: Immunology. Mosby., 3a ed, London, 1993.

26) Saini, S.S, Sodhi, S.S, Maiti, N.K and Sharma, S.N.: Immune response of chicks to oral vaccination against newcastle disease and fowl pox. Comp. Immun. Microbiol infect. Dis 13 (1): 1-6 (1990).

27) Stites, D.P., Stobo, J.D., Wells, J.V., Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno., 6a. ed, México, D.F., 1988.

28) Subcommittee on Avian Diseases, Committee on Animal Health, Agricultural Board, National Research Council: Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying and Quantifying Avian Pathogens, National Academy of Sciences, 67 -98, Washington, D.C., 1971.

29) Tavera, C.S., Ceniceros, R.M., Urquiza, B.O., Quintana, L.J, Casaubon, H.T. y Valladares, C.J.: Reporte de los casos de diagnóstico remitidos al departamento de producción animal: aves, FMVZ, UNAM, en 1992. Memorias de la XVII Convención Nacional ANECA, México 1993, 315-321 Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A.C. México, 1993.

30) Whiteman, C.E. and Bicford, A.A.: Avian Disease Manual. Edited by: Barnes, H.J, Eckroade, B.J., Fletcher, O. J., Hitchner, S.B., Straufess, A.C., 49-63, The American Association of Avian Pathologists, Pensilvania, 1983.

CUADROS:

En los siguientes cuadros se muestran los resultados de la prueba de fijación del complemento, obtenidos con los antisueros y el suero normal de conejo, enfrentados al virus, expresados en porcentaje de hemólisis.

CUADRO I
TITULACIÓN DEL ANTISUERO I Y EL VIRUS

Dil. virus	Diluciones del antisuero				V.C	V
	1/10	1/20	1/40	1/80		
1/5	82	82	93	100	100	66
1/10	47	43	93	98	100	63
1/20	28	18	40	96	100	61
1/40	73	95	95	95	100	48
1/80	100	99	100	100	100	41
S.C	99	100	99	99		
S	12	12	10	10		

S.C.: Control de suero con complemento
S: Control de suero sin complemento
V.C.: Control de virus con complemento
V: Control de virus sin complemento

Valores menores al 50% de hemólisis se consideran como positivos.

CUADRO 2
TITULACIÓN DEL ANTISUERO 2 Y EL VIRUS

Dil. virus	Diluciones del antisuero				V.C.	V
	1/10	1/20	1/40	1/80		
1/5	83	91	93	99	100	66
1/10	57	91	100	100	100	63
1/20	18	60	89	100	100	61
1/40	65	89	93	99	100	48
1/80	92	92	97	100	100	41
S.C	100	100	100	100		
S	7	0	3	2		

S.C.: Control de suero con complemento
S: Control de suero sin complemento
V.C.: Control de virus con complemento
V: Control de virus sin complemento

Valores menores al 50% de hemólisis se consideran como positivos.

CUADRO 3

TITULACIÓN DEL SUERO NORMAL DE CONEJO Y EL VIRUS

Dil. virus	Diluciones del antisero				V.C.	V
	1/10	1/20	1/40	1/80		
1/5	99	98	96	100	100	66
1/10	100	97	98	98	100	63
1/20	100	99	100	99	100	61
1/40	99	100	100	100	100	48
1/80	100	100	100	100	100	41
S.C	100	100	100	100		
S	0	0	0	0		

S.C.: Control de suero con complemento

S: Control de suero sin complemento

V.C.: Control de virus con complemento

V: Control de virus sin complemento

Valores menores al 50% de hemólisis se consideran como positivos.

PRUEBA DE F.C. CON LAS MUESTRAS DE EXUDADOS:

En los siguientes cuadros se muestran los resultados de la prueba de fijación del complemento obtenidos con las muestras de las aves, expresados en porcentaje de hemólisis.

CUADRO 4

MUESTRAS POSITIVAS:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
S.P.	93	96	77	94	96	85	95	94	100	96		
S.N.	80	95	80	86	90	92	90	87	92	92	S.C.	S
M.C.	97	100	95	100	100	96	98	93	100	100	96	28
M	0	0	0	0	0	0	34	0	1	4	100	36

S.P.:	Suero positivo
S.N.:	Suero negativo
M.C.:	Control de la muestra con complemento
M:	Control de la muestra sin complemento
S.C.:	Control de suero con complemento
S:	Control de suero sin complemento

Valores menores al 50% de hemólisis se consideran como positivos.

CUADRO 5
MUESTRAS NEGATIVAS:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
S.P.	90	94	83	95	94	96	97	95	77	99		
S.N.	86	89	87	93	93	89	61	88	63	93	S.C.	S
M.C.	93	97	95	97	96	95	97	97	98	100	96	28
M	5	17	0	19	0	0	1	0	12	0	100	36

<p>S.P.: Suero positivo S.N.: Suero negativo M.C.: Control de la muestra con complemento M: Control de la muestra sin complemento S.C.: Control de suero con complemento S: Control de suero sin complemento</p>

Valores menores al 50% de hemólisis se consideran como positivos.

PRUEBA DE F.C. CON LAS MUESTRAS DE BAZOS:

CUADRO 6

MUESTRAS POSITIVAS:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
S.P.	11	19	17	73	22	0	9	79	18	0		
S.N.	44	80	78	81	84	78	75	84	72	48	S.C.	S
M.C.	82	72	80	81	87	80	80	83	80	75	96	10
M	11	0	15	0	25	0	11	0	0	0	80	0

<p>S.P.: Suero positivo S.N.: Suero negativo M.C.: Control de la muestra con complemento M: Control de la muestra sin complemento S.C.: Control de suero con complemento S: Control de suero sin complemento</p>

Valores menores al 50% de hemólisis se consideran como positivos.

CUADRO 7

MUESTRAS NEGATIVAS:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
S.P.	100	90	100	99	44	86	3	95	71	37		
S.N.	94	94	97	98	84	93	40	96	85	96	S.C.	S
M.C.	100	94	99	100	82	87	71	98	79	100	96	10
M	19	33	21	9	11	0	0	9	0	33	80	0

<p>S.P.: Suero positivo S.N.: Suero negativo M.C.: Control de la muestra con complemento M: Control de la muestra sin complemento S.C.: Control de suero con complemento S: Control de suero sin complemento</p>

Valores menores al 50% de hemólisis se consideran como positivos.

En el siguiente cuadro se muestran los resultados obtenidos con las muestras de los testigos negativos y de las aves infectadas, enfrentadas al antisuero específico y al suero normal de conejo, por la técnica de fijación del complemento, así como el aislamiento en embrión de pollo de las muestras obtenidas de los bazos.

CUADRO 8

MUESTRAS DE BAZOS Y EXUDADOS NEGATIVAS Y POSITIVAS:

Muestras Exudados	FC. Antisuero	F.C Suero Negativo	Muestras Bazos	FC. Antisuero	F.C Suero Negativo	Aislamiento
1+	-	-	1+	+	+	+
2+	-	-	2+	+	-	+
3+	-	-	3+	+	-	-
4+	-	-	4+	-	-	+
5+	-	-	5+	+	-	+
6+	-	-	6+	+	-	+
7+	-	-	7+	+	-	+
8+	-	-	8+	-	-	+
9+	-	-	9+	+	-	-
10+	-	-	10+	+	+	+
1-	-	-	1-	-	-	-
2-	-	-	2-	-	-	-
3-	-	-	3-	-	-	-
4-	-	-	4-	-	-	-
5-	-	-	5-	+	-	-
6-	-	-	6-	-	-	-
7-	-	-	7-	+	+	-
8-	-	-	8-	-	-	-
9-	-	-	9-	-	-	-
10-	-	-	10-	+	-	-