

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

VALORACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE UNA AUTOVACUNA
ELABORADA A PARTIR DE POXVIRUS DE PALOMAS.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ALEJANDRA SÁNCHEZ QUINTERO

Asesores:

MVZ Laura Cobos Marín
MVZ Lucía E. Rangel Porta

México, D.F. 2008



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.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Justificación.....	5
Hipótesis.....	5
Objetivos generales.....	5
MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN.....	16
REFERENCIAS.....	19

Resumen

SÁNCHEZ QUINTERO ALEJANDRA. VALORACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE UNA AUTOVACUNA ELABORADA A PARTIR DE POXVIRUS DE PALOMAS (BAJO LA DIRECCIÓN DE: MVZ, LAURA COBOS MARÍN Y MVZ, LUCÍA E. RANGEL PORTA).

La viruela aviar es una enfermedad contagiosa causada por un avipoxvirus capaz de provocar las presentaciones clínicas: cutánea, diftérica o atípica, una morbilidad de 45% y una mortalidad de hasta 49%. La terapia en palomas no es posible y la prevención se realiza mediante la vacunación con una vacuna comercial homóloga, sin embargo, en México no se cuenta con ella. Por tal motivo, se elaboró una autovacuna a partir de costras de palomas con lesiones sugerentes a viruela. Se aisló el virus mediante la técnica de inoculación en membrana corioalantoidea (MCA) de embrión de pollo en tres pases y se confirmó que el virus utilizado correspondiera a un avipoxvirus mediante histopatología, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un análisis de restricción enzimática (REA). El virus fue adaptado a embrión de pollo mediante 6 pases en la MCA para atenuarlo y utilizarlo como vacuna homóloga con un título de $10^{4.37}$ dosis infectantes embrión de pollo (DIEP) al 50%/ml. Se vacunó un grupo de palomas mensajeras con el biológico a estudiar y otro con la vacuna heteróloga obteniendo en el primero el 100% de reacción a la vacuna, mientras que para el segundo el 55%. Para evaluar la respuesta inmune humoral se realizó una prueba de seroneutralización en la que solo se obtuvo un título neutralizante del suero 1/61.5 para el biológico en estudio. Además, los animales se desafiaron con una suspensión de poxvirus de paloma para evaluar la protección que confirieron ambos tipos de vacuna siendo del 100% la protección en el lote de la vacuna homóloga y nula en el lote heterólogo y el lote testigo, por lo que se sugiere que esta vacuna puede ser empleada en la prevención de la viruela aviar en palomas.

Introducción

El hombre ha tenido desde antaño un doble interés por las aves: por una parte, el estético o personal y por otra el utilitario. Por ello los que las palomas fueron usadas como portadoras de noticias en culturas antiguas como la griega, romana, china y persa; dando origen a la cría y el adiestramiento de estos animales para volver a su palomar desde puntos distantes (colombofilia), actividad que tuvo su auge como medio de comunicación durante la primera guerra mundial, cuando los diferentes ejércitos establecieron su uso con fines bélicos. En la época moderna, se les cría con fines utilitarios (para consumo), de exhibición y deportivos; cuya finalidad es recorrer un trayecto a la mayor velocidad posible. Actualmente, los países que practican este deporte son España, Holanda, China, Alemania, Bélgica, Polonia, Reino Unido, Países Bajos y en menor escala México y algunos países sudamericanos ^(1,2).

La viruela aviar también es conocida como epiteloma contagioso o difteria aviar; es causada por un avipoxvirus perteneciente a la familia poxviridae, subfamilia chordopoxvirinae y género avipoxvirus ^(3,4). La ocurrencia de esta infección se relaciona con la presencia de mosquitos (vectores responsables de la transmisión) ^(3,5). La morbilidad en aves jóvenes (menores de 1 año) puede llegar a 45% y en adultos (mayores a un año) hasta 25%; mientras que la mortalidad puede ser de 49% en jóvenes y de 7.5% en adultos ^(6,7). Al entrar a un organismo, el virus tiene un periodo de incubación de 4 a 20 días ^(3,6,8), para posteriormente desarrollar cualquiera de las presentaciones conocidas de la enfermedad (cutánea, diftérica y atípica) ⁽⁵⁾.

En la forma cutánea, la lesión comienza como una pequeña ampolla blanquecina que rápidamente aumenta de tamaño y se torna amarillenta; estas lesiones proliferan hasta juntarse para formar costras duras y cafés que persisten de 3 a 4 semanas. La lesión característica (proliferación hipertrófica del epitelio) aparece en párpados, base del pico,

patas, piernas y ocasionalmente en los oídos. En infecciones severas, los pichones también pueden presentar estas lesiones en el ombligo y la cloaca ^(5,8).

La forma diftérica se presenta en mucosas de pico, garganta, buche, ojo y tráquea, como masas amarillentas-grisáceas suaves y adheridas a tejido muerto que pueden llegar a obstruir la tráquea. En casos graves, el globo ocular puede ser reemplazado por una masa amarillenta caseosa ⁽⁸⁾.

En la viruela atípica, se presentan tumoraciones que aparecen como lesiones aisladas caracterizadas por la acumulación de melanina, localizadas predominantemente en el cuerpo o alas y que usualmente miden de 1 a 3 cm. Cuando estas lesiones llegan a ser removidas pueden sangrar de manera profusa y causar la muerte. Esta infección no se ha podido transmitir experimentalmente aunque la presencia del virus se ha demostrado mediante microscopía electrónica ^(5,8).

El diagnóstico de viruela se lleva a cabo por la observación de las lesiones características y la confirmación mediante un examen histológico, en el que se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (de Bollinger o Borrell); el aislamiento del virus en membrana corioalantoidea (MCA) de embriones de pollo, la replicación en líneas celulares aviares, la inmunofluorescencia, la fijación del complemento y la inmunodifusión en gel de agar ⁽³⁾.

Algunas técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de restricción enzimática (REA) han permitido establecer que el virus de pavo y el de pollo muestran el mismo patrón y que éste, es diferente al de la paloma ⁽⁹⁾. A pesar de esto, existen estudios donde el poxvirus de paloma afecta a otras especies y poxvirus de diferentes especies son capaces de afectar a las palomas ⁽¹⁰⁾.

El tratamiento curativo en palomas que padecen la forma típica no es posible, aunque se pueden administrar fármacos para prevenir complicaciones secundarias por infecciones

bacterianas, además de la aplicación diaria de tintura de merthiolate (1/1000) en las lesiones tempranas de piel ^(3,5). Por otra parte, las molestias ocasionadas por la infección oftálmica puede ser mitigada manteniendo el ojo abierto y dando un lavado diario con solución salina, después del cual deben ser agregadas varias gotas de aceite mineral, ya que si el ojo permanece cerrado y los párpados pegados, sería indicativo de la pérdida del ojo ⁽¹¹⁾.

Debido a lo anterior, la prevención de la viruela aviar en palomas se debe realizar mediante la vacunación con poxvirus homólogo atenuado, que puede administrarse de las 4 a las 6 semanas de vida, ya sea mediante el método del folículo de la pluma, que consiste en la aplicación de la vacuna con una pequeña brocha áspera en no más de cuatro o cinco folículos desplumados en la pierna o la pechuga, o bien, mediante la vía subcutánea, que consiste en aplicar la vacuna en el pliegue del ala, pierna o cuello con una aguja doble ^(3,5,6). La reacción local (ya sea engrosamiento, enrojecimiento, hinchazón o formación de costras) indica el éxito de la vacunación y aquellos animales que no presentan la reacción deben ser revacunados. Después de la aplicación de ciertas vacunas pueden formarse costras en 3 ó 4 semanas que comienzan a desaparecer tres semanas después. La inmunidad se logra en dos semanas y tiene una duración de 1 año ^(3,6). La potencia de la vacuna depende del número de partículas de poxvirus viables. Beaudette especificó que 80mg de MCA/4cm³ podrían utilizarse para inmunizar 100 aves, mientras que Winterfield y Hitchner (1965) sugieren un título de 10⁵/dosis infectantes en embrión de pollo (DIEP)/ml como dosis efectiva ^(3,12).

Justificación

En México no se cuenta con una vacuna comercial homóloga de viruela de paloma por lo que se usan las vacunas heterólogas (de gallina), las cuales, con la experiencia que se tiene en el palomar de la FMVZ de la UNAM, no brindan la protección deseada, ya que a pesar de la vacunación, cuando los animales entran en contacto con otras palomas durante las competencias, se presentan casos de la enfermedad; por lo que se sugiere que una vacuna homóloga elaborada a partir de poxvirus de palomas podría conferir protección.

Hipótesis

Una vacuna de virus activo elaborada a partir de poxvirus de paloma aplicada en pichones los protegerá de la infección del poxvirus de paloma.

Objetivo general

Evaluar la protección que genera una vacuna de virus activo de viruela de palomas, elaborada a partir de un poxvirus homólogo.

Objetivos particulares

1. Obtener muestras de costras a partir de palomas con lesiones sugerentes a viruela, con la finalidad de aislar el virus mediante la técnica de inoculación en MCA de embrión de pollo.
2. Confirmar que el virus utilizado corresponde a un avipoxvirus mediante un examen histopatológico, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un análisis de restricción enzimática (REA).
3. Adaptar el poxvirus de paloma al embrión de pollo mediante pases en la MCA, para atenuarlo y utilizarlo como vacuna homóloga.

4. Vacunar un grupo de palomas mensajeras con la vacuna homóloga y otro con una vacuna heteróloga para evaluar la respuesta inmune humoral mediante una prueba de virus suero neutralización.
5. Inocular a todos los animales con una suspensión de poxvirus de paloma como desafío para evaluar la protección que confiere la vacunación.

Material y métodos

1. Aislamiento viral

A partir de palomas que presentaban lesiones sugerentes a viruela se obtuvieron las costras y se conservaron en congelación hasta su procesamiento. Éstas se maceraron en seco y se les agregó un diluyente (solución salina tamponada) para lograr una concentración al 10% que posteriormente se centrifugó a 873.43g/10min. Al sobrenadante obtenido (suspensión viral) se le adicionaron antibióticos (penicilina/estreptomicina 10,000UI/10mg/ml) para eliminar contaminantes bacterianos, después se sembraron en medios bacteriológicos (agar triptosa y caldo tioglicolato 0.1ml) que se incubaron a 37°C por 48 horas y con ello se verificó la ausencia de contaminación bacteriana ^(11,13,14,15).

La suspensión viral obtenida se inoculó en MCA de embrión de pollo de 10 a 12 días (0.1ml), empleando el método de falsa cámara de aire. Una vez realizada la inoculación, los embriones fueron incubados durante 5 días a 37°C y se revisaron diariamente para verificar la mortalidad. Al quinto día los embriones se sacrificaron por enfriamiento (colocándolos en el congelador por 2 hrs.) para obtener las MCA, las cuales fueron observadas en busca de lesiones (engrosamiento de la membrana con pústulas blanquecinas) ^(3,5,10,11,12,18,19,20).

A partir de las MCA se prepararon inóculos, para ello, las membranas se maceraron en condiciones de esterilidad con ayuda de un mortero, arena y PBS. El macerado

fue centrifugado a 873.47g/10min. De este modo se obtuvo una segunda suspensión viral, a la que se le hizo una prueba de esterilidad bacteriana y se hicieron dos pases ciegos en MCA de embrión de pollo, hasta observar la presencia de lesiones al tercer pase.

2. Identificación

a) Histopatología:

Se tomó una pequeña porción de la MCA sospechosa de estar infectada con el virus y con presencia de lesiones y se mandó al departamento de patología de la FMVZ de la UNAM para la elaboración de una laminilla con tinción de hematoxilina y eosina.

b) Reacción en cadena de la polimerasa:

Para la extracción de ADN, se emplearon 25mg de MCA infectada con el virus aislado de paloma en 1ml de DNazol-Reagent (Invitrogen®) y según las instrucciones del fabricante, se homogenizó y se centrifugó a 10,000g con una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se pasó a otro tubo al que se le agregaron 0.5ml de etanol, se homogenizó durante 3 minutos y se centrifugó a 4,000g con una temperatura de 4°C durante 2 minutos. Al pellet de ADN visible en el fondo del tubo se le retiró el sobrenadante y se lavó con 1ml de etanol al 75%, pipeteando 6 veces y dejando reposar por 1 minuto. Después de quitar el sobrenadante, se realizó un segundo lavado de la misma manera; nuevamente se extrajo el sobrenadante y se dejó secar por 15 segundos. Por último, se disolvió el precipitado en 300µl de NaOH 8mM.

El ADN se cuantificó en el bioespectrofotómetro (Ependorf®) y se ajustó a 1µg para hacer la PCR con un volumen final de reacción de 25µl, que contenía 1.5 unidades de Taq polimerasa, 1.5mM de MgCl₂, 200µM de dntps, 1x de Reg10x, 12.5 pmol de cada iniciador descritos por Lüschoff, Hoffmann y Hafez⁽¹⁷⁾ (5'-

CAGCAGGTGCTAAACAACAA-3'; 5'-CGGTAGCTTAACGCCGAATA-3') y 18.55µl de H₂O. La reacción de la PCR se realizó en el termociclador Techne® con un primer ciclo de 2min a 94°C y 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 60°C, 1min a 72°C y 2min a 72°C. Los iniciadores amplifican una región de 578pb, dentro del gen 4b. Se tomaron 5µl de los productos de PCR para correrlos en un gel de agarosa al 1% a 85 volts por 1hr y se tiñó con bromuro de etidio durante 10 minutos. Por último, el gel se observó en el UV-Transiluminador (Benchtop®), donde se observó la banda correspondiente ^(9,16,17). Como testigo se empleó la vacuna heteróloga (de pollo), la muestra a evaluar corresponde a una MCA infectada con el virus vacunal homólogo (de paloma) y como marcador de peso molecular se usó KB plus (Invitrogen®).

c) Análisis de restricción enzimática:

Con cada uno de los productos resultantes de la PCR (de paloma y pollo) se procedió a llevar a cabo el análisis de restricción enzimática, según lo describen Lüschoff, Hoffmann y Hafez ⁽¹⁷⁾, mediante la enzima de restricción EcoRV de Invitrogen®, en un volumen total de 20µl donde se puso: 1µl de enzima (10unidades), 2µl de buffer (de la misma marca), 12µl de H₂O y 5µl de la muestra de PCR. Se incubó por una hora a 37°C y se tomaron 5µl de la muestra para proceder a correrlas en una electroforesis a 85 volts por 45minutos, en un gel de agarosa al 3% con TBE 1X como buffer de corrimiento y KB plus (Invitrogen®) como marcador de peso molecular. El gel se tiñó 15 minutos con bromuro de etidio y se observó en el transiluminador con luz ultravioleta ^(9,17). Como testigo se empleó el producto de PCR obtenido del DNA de viruela de pollo.

3. *Elaboración de la vacuna homóloga*

De las MCA que presentaron lesiones en el aislamiento se hizo una nueva suspensión viral, la cual fue inoculada en embriones de pollo de la misma manera descrita en el aislamiento en tres pases, hasta que se observó una lesión notoria se procedió a titular el virus por el método de Reed y Muench ^(18,21,22,23). Se consideró que el virus ya se había adaptado al embrión cuando se alcanzó un título mayor a 1×10^4 DIEP 50%/ml; y se inoculó en dos palomas para verificar que produjera una reacción local característica y por lo tanto pudiera ser empleado para la vacunación.

4. *Vacunación*

Para este procedimiento se utilizaron 60 pichones con edades de entre 13 y 17 semanas seleccionados aleatoriamente del palomar perteneciente al Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, fueron alojados en jaulas de 90cm de largo por 65cm de ancho y 40cm de alto, con 10 animales cada una, donde se dio agua fresca y alimento preparado a base de granos (maíz, sorgo, linaza, mijo y cártamo) *ad limitum* y se mantuvieron aisladas del resto de la población del palomar.

Posteriormente se hicieron 3 lotes, cada uno con 20 animales:

Lote testigo: los animales no se vacunaron y fueron puestos en aislamiento hasta el momento del desafío, ubicándolos en el animalario del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM, bajo las mismas condiciones del resto de los animales.

Lote de vacuna homóloga: los animales se vacunaron con la vacuna homóloga experimental de poxvirus de paloma. Usando el método de punción en el pliegue de la pierna en una dosis de 0.1ml y se observaron las lesiones post-vacunales durante tres semanas para estimar la eficiencia de la vacunación ^(3,5,6,11,13,18,19,24,25,26).

Lote de vacuna heteróloga: los animales fueron vacunados del mismo modo que el lote anterior con la vacuna heteróloga comercial de poxvirus de gallina.^a

5. *Seroneutralización*

Un día antes del desafío se obtuvo una muestra de sangre (400µl) de cada animal mediante el corte de uña⁽²⁷⁾, el suero se separó incubando la muestra a 37°C por 4hrs como mínimo. Las muestras de suero se congelaron hasta su utilización.

La seroneutralización se realizó utilizando virus de paloma constante (titulado a 100 DIEP 50%) y suero decreciente.

Para la prueba se hizo una mezcla de sueros por lote (de 20 animales), que se inactivaron durante 30 minutos a 56°C. Una vez inactivados se hicieron 8 diluciones dobles seriadas de suero iniciando en 1/5 donde se agregó 480µl de PBS y 120µl del suero, de esta dilución se pasaron 300µl para la dilución 1/10 más 300µl de PBS y así sucesivamente hasta completar las ocho diluciones. Cada dilución se incubó con 300µl del virus durante 30min a temperatura ambiente^(11,28,29). Posteriormente, la mezcla suero-virus se inoculó en la MCA de embriones de pollo como se describió en el apartado de aislamiento viral, utilizando 5 embriones por dilución para determinar el título por el método de Reed y Muench^(21,22).

6. *Desafío*

Tres semanas post-vacunación se hizo el desafío en los tres grupos experimentales utilizando poxvirus de paloma conservado en glicerol al 20% y con un título de $1 \times 10^{4.37}$ DIEP/ml. La inoculación fue realizada mediante una excoriación en la piel de la región ventral caudal a la quilla, utilizando una brocha de cerdas duras. La presencia de lesiones en los tres grupos se registró durante tres semanas después del

^a Vacuna comercial de viruela aviar marca Maver, elaborada con cultivo de poxvirus de gallina, con un título de no menos de 10^4 DIEP/ml según especificaciones del fabricante.

desafío. Se consideraron como protegidos aquellos animales que no presentaron lesiones ^(3,10,12,13,18,30).

Resultados

1. Aislamiento viral

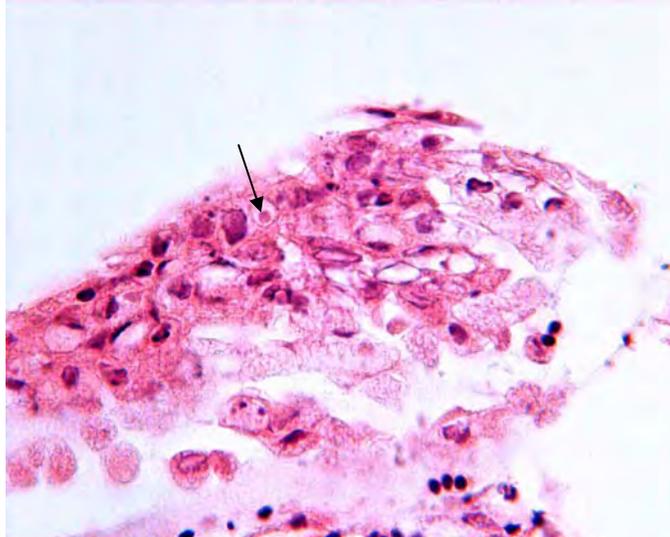
La suspensión viral obtenida a partir de las costras y a la cual le fueron adicionados antibióticos, resultó negativo en la prueba de contaminación bacteriana, por lo que se continuó con el procedimiento de aislamiento, para el cual se requirió hacer en total 3 pases del virus de viruela de paloma en embrión de pollo, después de los cuales se observó la presencia de pústulas blanquecinas, edema y engrosamiento, lesiones características en las membranas corioalantoideas.

2. Identificación viral

a) Histopatología:

En la laminilla de la MCA con tinción de hematoxilina y eosina se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Fig. 1).

Fig. 1: Membrana corioalantoidea de embrión de pollo infectada con poxvirus de paloma teñida con hematoxilina y eosina donde se observa un cuerpo de inclusión.



desafío. Se consideraron como protegidos aquellos animales que no presentaron lesiones ^(3,10,12,13,18,30).

Resultados

1. Aislamiento viral

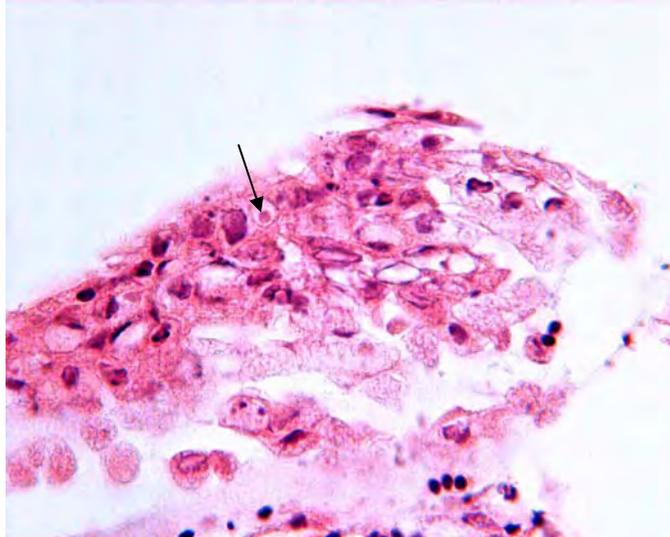
La suspensión viral obtenida a partir de las costras y a la cual le fueron adicionados antibióticos, resultó negativo en la prueba de contaminación bacteriana, por lo que se continuó con el procedimiento de aislamiento, para el cual se requirió hacer en total 3 pases del virus de viruela de paloma en embrión de pollo, después de los cuales se observó la presencia de pústulas blanquecinas, edema y engrosamiento, lesiones características en las membranas corioalantoideas.

2. Identificación viral

a) Histopatología:

En la laminilla de la MCA con tinción de hematoxilina y eosina se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Fig. 1).

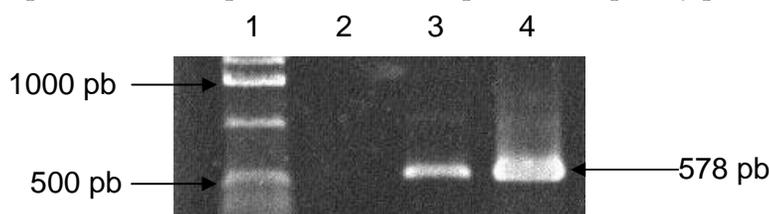
Fig. 1: Membrana corioalantoidea de embrión de pollo infectada con poxvirus de paloma teñida con hematoxilina y eosina donde se observa un cuerpo de inclusión.



b) Reacción en cadena de la polimerasa:

La identificación del virus aislado se llevó a cabo mediante la PCR usando los iniciadores que amplifican la región dentro del gen de la proteína 4b del virus de viruela aviar (Fig. 2) y se confirmó como avipoxvirus.

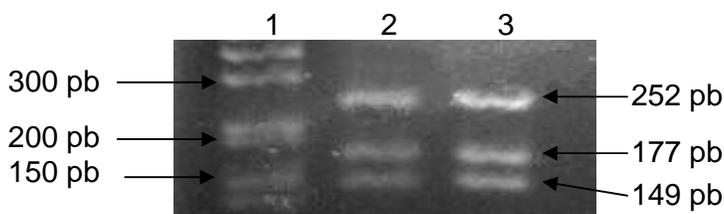
Fig. 2: Corrimiento electroforético de los productos de amplificación de una PCR en un gel de agarosa al 1% donde se muestran: en el carril 1 el marcador de peso molecular (KB plus), 2 el testigo negativo, 3 y 4 fragmentos de 578 pares bases amplificados correspondientes a los avipoxvirus de pollo y paloma respectivamente.



c) Análisis de restricción enzimática:

Los resultados del análisis de restricción enzimática con EcoRV (Fig 3) confirmaron que el virus aislado corresponde a un avipoxvirus al mostrar el mismo patrón de corte que el poxvirus de pollo y presentar tres bandas de 252, 177 y 149 pb.

Fig. 3: Corrimiento electroforético de los productos del REA utilizando la enzima EcoRV en un gel de agarosa al 3%, donde se observa en el número 1 el marcador de peso molecular (KB plus), 2 muestra de pollo y 3 muestra de paloma.



3. Elaboración de una vacuna homóloga

El título del virus obtenido después de 6 pases en embrión de pollo fue de $10^{4.37}$ dosis infectantes embrión de pollo (DIEP) al 50%/ml, el cual fue inoculado en el pliegue del ala de dos palomas para confirmar una reacción local correspondiente a la reacción vacunal (Cuadro 1).

Cuadro 1: Resultados de la titulación del virus de viruela de palomas adaptado a embrión de pollo, por el método de Reed y Muench inoculando 0.2ml/embrión.

Dilución del virus	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Respuestas +/Total de vivos	5/5	4/5	4/5	2/5	1/5	0/5
% Respuestas positivas	100	91.6	77.7	37.5	10	0
Distancia proporcional (DP)			0.68			
Título=103.68 DIEP50%/0.2ml ó 104.37DIEP50%/ml						

4. Vacunación

El cuadro 2 muestra la respuesta a la vacunación realizada con virus de paloma y con vacuna comercial, observando a los animales en un periodo de tres semanas.

Cuadro 2: Respuesta a la vacunación. Se consideró como positivos aquellos animales que presentaron reacción local (engrosamiento, enrojecimiento, hinchazón o formación de costra) en un periodo de tres semanas y como negativos aquellos que no presentaron ningún signo de reacción.

Lote	Vacunación				
	Animales	Positivos	Negativos	% positivo	% negativo
Vacuna Homóloga	20	20	0	100	0
Vacuna Heteróloga	20	11	9	55	45
Testigos	20	No fueron vacunados			

Al vacunar con la cepa de paloma al grupo homólogo, se observó en el 100% de los animales la reacción a la misma, con una duración de 10 días (Fig. 4), mientras que, en aquellas palomas vacunadas con la cepa de gallina (Fig. 5) sólo el 55% de éstas presentaron respuesta a la vacuna. Por otro lado, la lesión generada por la vacuna heteróloga fue de menor duración (6 días) y tamaño aparente.

Fig. 4: Costras que se formaron como reacción a la vacuna homóloga.



Fig. 5: Vesícula formada como reacción a la vacuna heteróloga.



5. Seroneutralización

Los sueros de los animales que recibieron la vacuna heteróloga y los del lote testigo resultaron negativos a la prueba de seroneutralización ya que todas las MCA de los embriones presentaron lesiones correspondientes a viruela (pústulas, edema y engrosamiento), mientras que en el caso de los sueros obtenidos de los animales que recibieron la vacuna homóloga 16 presentaron lesiones (Cuadro 3) y se obtuvo un título neutralizante del suero $1/61.5 (10^{-1.79})$ DIEP50% por el método de Reed y Muench.

Cuadro 3: Obtención del título neutralizante (TN) por el método de Reed y Muench.

Dilución del suero	1/5 (10 ^{-0.69})	1/10 (10 ⁻¹)	1/20 (10 ^{-1.3})	1/40 (10 ^{-1.6})	1/80 (10 ^{-1.9})	1/160 (10 ^{-2.2})	1/320 (10 ^{-2.5})	1/640 (10 ^{-2.8})
Respuestas+/ Total vivos	0/4	0/5	0/5	2/4	3/4	3/4	3/4	5/5
% Respuestas Positivas	0	0	0	28.5	62.5	80	91.6	100
Distancia proporcional (DP)				0.63				
Punto final al 50% de neutralización: 10^{1.79} ó 61.5								

6. Desafío

En el lote de la vacuna heteróloga y el lote testigo el 100% de los animales presentaron lesiones locales (vesículas, pústulas y costras) al ser desafiados con la cepa de paloma (Fig. 6), mientras que en el lote de vacuna homóloga ningún animal presentó lesión al ser desafiado con la cepa de paloma, estos resultados se pueden observar en el cuadro 4.

Cuadro 4: Resultados del los tres grupos al desafío con la cepa de paloma, así como el porcentaje al que corresponden.

Lote	Total de Animales	Desafío			
		Positivos	Negativos	%positivo	%negativo
Homólogos	20	0	20	0	100
Heterólogos	20	20	0	100	0
Testigos	20	20	0	100	0

Fig. 6: Pústulas formadas como reacción al desafío del lote heterólogo.



Discusión

Los resultados del presente estudio mostraron que el empleo de una vacuna homóloga de viruela de paloma elaborada a partir del virus presente en las costras de palomas enfermas, aislado y atenuado mediante pases en embrión de pollo, confiere una protección del 100%, mientras que una vacuna heteróloga no protege contra la cepa de paloma.

La reacción como respuesta a la vacuna que indica el éxito de la vacunación ⁽⁵⁾ fue de 55% para la vacuna heteróloga (virus de viruela de pollo) y de 100% a la vacuna homóloga. Los resultados concuerdan con lo que Tudor ⁽³⁾ presenta en su libro, indicando que la única vacuna efectiva contra poxvirus de paloma en dichas aves es una de la misma especie. En este estudio se apreciaron lesiones postvacunales que coinciden con las descritas por Tudor y se caracterizan por hinchazón, enrojecimiento, edema y costras en el sitio de vacunación. Dichas lesiones se presentaron a partir del día 9 en el caso de la vacuna homóloga y del día 5 en la vacuna heteróloga, ambas respuestas se encuentran dentro de los parámetros establecidos por autores como: Winterfield RW, Reed WM, Thacker HL ⁽¹⁸⁾ quienes describen una respuesta a la vacuna de poxvirus de paloma en pavos entre los días 7 y 10; los de Winterfield RW, Hitchner SB ⁽¹²⁾ quienes mencionan que la respuesta a la vacuna en pollos se da entre los 6 y 9 días y los de Tudor quien describe la respuesta a partir del quinto día posvacunación. En el caso de este estudio se considera que la respuesta a la vacuna heteróloga pudo ser más rápida debido a que posiblemente la cepa viral empleada estuviera menos adaptada al embrión de pollo que la vacuna homóloga (a la que se le dieron 6 pases en EP).

La información sobre las respuestas a la vacunación es variada, por un lado Gelenczei y Lasher ⁽¹⁰⁾ al inocular el poxvirus de paloma en pollos no obtuvieron respuesta alguna y

el mismo virus inoculado en palomas sí generó una reacción, mientras que Winterfield y Hitchner⁽¹²⁾ experimentaron con pollos y al vacunarlos con poxvirus de paloma a una concentración de 2.83 DIEP_{50%} obtuvieron 40% de respuesta a la vacunación, porcentaje similar a los resultados obtenidos con la vacuna heteróloga en este trabajo. Contrariamente, Winterfield y Reed⁽¹⁶⁾ vacunaron pollos con poxvirus de paloma y de pollo obteniendo un 100% de respuesta en ambos casos al igual que Winterfield, Reed y Thacker⁽¹⁵⁾. Esta evidencia muestra que la respuesta a la vacunación con poxvirus aviar varía y en general es mayor cuando se emplean virus homólogos a la especie afectada. Sin embargo, el prendido de la vacunación no siempre concuerda con el porcentaje de protección observado en los desafíos y pruebas de seroneutralización, posiblemente debido a que solo existe cierta antigenicidad cruzada entre los diferentes poxvirus aviáres.

En este estudio, el desafío mostró 100% de protección conferida por la vacuna homóloga, contrario a la nula protección lograda por la vacuna heteróloga, aún cuando el 55% de estos animales presentaron lesiones postvacunales sugerentes al prendido exitoso de la vacunación. Estos resultados concuerdan con observaciones previas donde se compara la protección con virus heterólogos: Winterfield y Hitchner⁽¹²⁾ al vacunar pollos con poxvirus de paloma y desafiados con poxvirus de pollo solamente observaron protección en el 40% de los animales. Igualmente Reed y Fatunambi⁽³⁰⁾ al vacunar pollos contra poxvirus de pollo y de paloma, encontraron que los animales eran susceptibles a otro tipo de avipoxvirus aislado de codorniz. Otros casos parecidos son el de las palomas que al ser inmunizadas con poxvirus de paloma no se protegen contra el poxvirus de canario⁽³⁾ y los experimentos de Winterfield y Reed⁽¹⁶⁾ con poxvirus de codornices, de psitácidos, de pollos y de palomas en pollos, donde no encontraron

relación inmunológica concreta entre los poxvirus de paloma y de pollo con los de codorniz y de psitácidos.

Sólo el lote de la vacuna homóloga presentó un título neutralizante, mientras que el lote que recibió la vacuna heteróloga no generó anticuerpos neutralizantes lo que podría explicar la falta de protección cruzada. En otras enfermedades virales, tanto en aves^(31,32) como en mamíferos^(33,34), se ha demostrado que los anticuerpos son indispensables para generar protección mediante la neutralización viral.

En este estudio, el título usado fue de $10^{4.37}$ DIEP_{50%}/ml lo que concuerda con lo recomendado por Winterfield y Hitchner, quienes sugieren que para poder lograr una inmunidad óptima se requiere un título de la vacuna no menor de $10^{4.17}$ DIEP_{50%}/ml.

Para lograr el título mencionado en este trabajo fueron necesarios 6 pases en embrión de pollo, lo que coincide con lo propuesto por Jarmin *et al* quienes mencionan un rango desde 5 hasta 30 pases en MCA de embrión de pollo.

La identificación viral mediante la histopatología, la PCR y el REA brindaron los resultados esperados al lograr amplificar por PCR un producto de 578pb, cuya digestión con la enzima de restricción *EcoRV* generó 3 fragmentos de 252pb, 177pb y 149pb.

Con el presente estudio se probó que la vacuna heteróloga (cepa de gallina) no generó respuesta de anticuerpos neutralizantes, ni protegió contra un desafío con poxvirus de paloma, aún cuando el 55% de los animales tuvieron una reacción postvacunal. Mientras que la vacuna homóloga elaborada a partir de membranas corioalantoideas de embrión de pollo inoculado con poxvirus de paloma y con un título de $10^{4.37}$ DIEP_{50%}/ml protegió al 100% de las palomas contra un poxvirus de paloma.

Referencias

1. Alcocer J.M. Colombofilia Técnica. 1ª ed. México: Anaya Editores, 1984.
2. Neather C. Las Palomas. Barcelona: Editorial Hispano Europea, 1992.
3. Tudor DC. Pigeon Health and Disease. Iowa: Iowa State University Press, 1991.
4. Samour J. Avian Medicine. China: Mosby, 2000.
5. Tully TN, Lawton PC, Dorrestein GM. Avian Medicine. London: Butterworth Heinemann, 2000.
6. Marlier D, Vindevogel H. Viral Infecciones in pigeons. Vet J 2006; 172: 40-51.
7. Das SK, Baksi S, Biswas BK, Das R. Epidemiological Studies on Pigeon Pox. Indian Vet J 2005; 82:689-690.
8. Altman RB, Clubb SL, Dorrestein M, Quesenberry K. Avian Medicine and Surgery. Philadelphia: Saunders, 1997.
9. Prukner-Radovic E, Lüscho D, Grozdanic IC, Tisljar M, Mazija H, Vrenesic D, et al. Isolation and Molecular Biological Investigations of Avian Poxviruses from Chickens, a Turkey, and a Pigeon in Croatia. Avian Dis 2006; 50:440-444.
10. Gelenczei EF, Lasher HN. Comparative Studies of Cell-Culture-Propagated Avian Pox Viruses in Chickens and Turkeys. Avian Dis 1968;12:142-150.
11. McFerran JB, McNulty MS. Virus Infection of Birds. Amsterdam: El Sevier Science Publishers BV,1993.

12. Winterfield RW, Hitchner SB. The Response of Chickens to Vaccination with Different Concentrations of Pigeon Pox and Fowl Pox Viruses. *Avian Dis* 1964;9:237-241.
13. Deoki N, Tripathy, Reed WM, Pox en Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. *Diseases of Poultry*. 11th ed. Iowa: Iowa State Press, 2003.
14. Weli SC, Okeke MI, Tryland M, Nilssen Ø, Traavik T. Characterization of Avipoxviruses From Wild Birds In Norway. *Can J Vet Res* 2004;68:140-145.
15. Harrigan KE, Barker IK, Studdert MJ. Poxvirus Infection in the White-Backed Magpie (*Gymnorhina hypoleuca*) And Pox-Like Conditions In Other Birds In Australia. *J Wildl Dis* 1975; 11:343-347.
16. Jarmin S, Manvell R, Gough RE, Laidlaw SM, Skinner MA. Avipoxvirus Phylogenetics: Identification of a PCR Length Polymorphism That Discriminates Between The Two Major Clades. *J Gen Virol* 2006;87:2191-2201.
17. Lüscho D, Hoffmann T, Hafez HM. Diferentation of avian poxvirus strains on the basis of nucleotide sequences of 4b gene fragment. *Avian Dis* 2004;48:453-462.
18. Winterfield RW, Reed WM, Thacker HL. Infection and Immunity With a Virus Isolate From Turkey. *Poult Sci* 1984;64:2076-2080.
19. Winterfield RW, Reed W. Avian Pox: Infection and Immunity Whith Quail, Psittacine, Fowl and Pigeon Pox Viruses. *Poult Sci* 1985; 64:65-70.

20. Morita C. Studies On Fowlpox Viruses I. Plaque Formation Of Fowlpox Virus On Chick Embryo Cell Culture. *Avian Dis* 1972; 17:87-92.
21. American Association of Avian Pathologist. Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 3rd ed. USA: Kendall/Hunt Publishing Company, 1989.
22. Mohanty SB, Dutta SK. *Virología Veterinaria*. México: Interamericana, 1988.
23. Fenner F, Bachmann PA, Gibbs PJ, Murphy FA, Studdert MJ, White DO. *Virología Veterinaria*. Zaragoza: Acribia, 1992.
24. Morilla AG. *Inmunología veterinaria*. México: Diana, 1989.
25. Ritchie B, Harrison GJ, Harrison LR. *Avian Medicine Principles And Application*. Florida: Wingers Publishing, 1994.
26. Ritchie B. *Avian Viruses (Function And Control)*. Florida: Wingers Publishing, 1995.
27. Coles BH. *Avian Medicine and Surgery*. 2nd ed. USA: Blackwell Science, 1997.
28. Murphy FA, Gibbs PJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary virology*. 3th ed. California: Academic Press, 1999.
29. Morita C. Studies On Fowlpox Viruses II. Plaque Neutralization Test. *Avian Dis* 1972; 17:93-98.
30. Reed WM, Fatunambi OO. Pathogenicity And Immunological Relationship Of Quail And Mynah Poxviruses To Fowl And Pigeon Poxviruses. *Avian Pathol* 1993;22:395-400.

31. Fynan E, Webster R, Fuller D, Haynes J, Santoro J, Robinson H. DNA Vaccines: Protective Immunizations by Parenteral, Mucosal and Gene-Gun Inoculations. *Proc Nat. Acad Sci* 1993,90:11478-11482.
32. Van Der Goot JA, Koch G, de Jong MC, Van Boven M. Quantification of the Effect of Vaccination on Transmission of Avian Influenza (H7N7) in Chickens. *PNAS* 2005, (102)50: 18141-18146.
33. Baldrige JR, Buchmeier MJ. Mechanism of Antibody-Mediated Protection Against Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection: Mother to Baby Transfer of Humoral Protection. *J Virol* 1992, 66:4252-4257.
34. Ciurea A, Klenerman P, Hunziker L, Horvath E, Senn BM, Ochsenbein AF, et al. Viral Persistence in Vivo Through Selection of Neutralizing Antibody-Escape Variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:2749-2754.