



MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE VIROLOGÍA





I. CONTENIDO	INDICE	Página
PRESENTACIÓN		3
II. ESTRUCTURA DEL MANUAL		
Antecedentes históricos		4
Propiedades generales de los virus		5
Diagnóstico virológico		6
Esterilización		6
Aislamiento de los virus		7
Identificación de los virus		8
Detección y cuantificación de anticuerpos		8
Material básico usado en el laboratorio		9
Bibliografía		10
III. PRÁCTICAS		
1. Bioseguridad en el laboratorio		12
2. Preparación de material a usar		14
3. Desinfección y esterilización		16
4. Preparación de medios de cultivo		18
5. Preparación de las diluciones del virus		21
6. Inoculación en el embrión de pollo		23
7. Titulación del virus por el método de Reed y Muench		27
8. Inoculación de un Paramixovirus virus aviar		28
9. Inoculación de un Coronavirus aviar		31
10. Inoculación de un Herpesvirus aviar		33
11. Cultivo celular		37
12. Formación de placas en cultivo celular primario		40
13. Congelación y descongelación de células		42
14. Preservación de los virus		44
15. Prueba de sueroneutralización		45
16. Diagnóstico del virus de la rabia		47
17. Inhibición de la hemoaglutinación		50
IV. ANEXOS		
Preparación de Reactivos		53
V. ACTUALIZACIÓN		55





I. Presentación

La enseñanza de la medicina veterinaria requiere del aprendizaje de las ciencias médicas, dentro de las cuales se encuentra la Virología, la cual proporciona al estudiante un panorama muy importante de lo que son las enfermedades de etiología viral que afectan a los animales domésticos.

En el programa curricular de la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia encontramos la Unidad de Aprendizaje de virología, la cual se cursa en el 4º semestre de la carrera y, esta unidad se desarrolla de forma teórico-práctica en la cual el 67% del curso es teórico y el 33% es práctico.

El manual de prácticas de virología se espera sirva de consulta para el docente para desarrollar las prácticas con virus en el laboratorio, de referencia y consulta a los discentes al realizar sus prácticas esperando una mejor aprovechamiento de los conocimientos adquiridos en esta unidad, así como establecer la programación y homología de las prácticas en la formación del futuro médico veterinario, para los discentes del cuarto semestre que cursan esta unidad de aprendizaje en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

En las prácticas de laboratorio se pretende enseñar al discente las medidas de bioseguridad, cultivo y cosecha de virus en embrión de pollo, así como pruebas serológicas para su diagnóstico cuando éste sea necesario.

Las enfermedades de origen viral representan un problema cuando afectan a los animales domésticos, lo que resulta en severas pérdidas económicas si no se diagnostican oportunamente, es importante que dentro de la formación de los futuros Médicos Veterinarios se adquiera información de los recursos que existen dentro del laboratorio para poder realizar un diagnóstico a partir del tipo y envío de muestras que se requieren para cada enfermedad.

Este manual provee una herramienta para los discentes, indica la manera de conducirse dentro del laboratorio cuando se está trabajando con virus, el tipo de material de laboratorio que se emplea para tal fin además de contar con información específica de cada tema de las prácticas a realizar.

También, este manual de prácticas comprende una lista de materiales, reactivos biológicos, sustancias y la metodología detallada para cada una de las prácticas básicas señaladas a realizar en el curso de Virología.

Dentro del cultivo y aislamiento de virus existen varias rutas o vías de inoculación en el embrión de pollo libre de patógenos específicos (SPF) que para fines didácticos se utilizarán de manera representativa los virus de la viruela aviar, bronquitis infecciosa aviar y el virus de la enfermedad del Newcastle; ya que cada uno de ellos requiere una vía de inoculación diferente para inducir las lesiones en las células específicas y cosecha de virus además de hacer algunas pruebas serológicas cuando sean requeridas.





II. Estructura del manual

Antecedentes históricos

El primer avance en la prevención de enfermedades producidas por virus se logró antes del descubrimiento de éstos. A principios del siglo XVIII, Lady Wortley Montagu, observó que las mujeres turcas inoculaban a sus hijos contra la viruela, los niños contraían una enfermedad leve y posteriormente quedaban inmunizados (Lechevalier and Solotorovsk, 1965). Años más tarde, Edward Jenner comenzó a inocular a los humanos con material procedente de las vesículas producidas por la viruela vacuna (viruela de la vaca); aunque él no comprendía la naturaleza de la viruela, en 1798 publicó el resultado de 28 vacunaciones satisfactorias, así, logró proteger con éxito a sus pacientes contra ésta enfermedad (Murphy *et al.*, 1999); posteriormente Louis Pasteur en 1880, trabajó con el virus de la Rabia aun sin saber que se trataba de un agente diferente a las bacterias (Waterson, 1968).

En el siglo XIX, los agentes nocivos solían asignarse a un solo grupo y se les denominaba virus (del latín virus: tóxico o veneno). En 1884, se desarrolló el filtro bacteriano de porcelana por Charles Chamberland, quien también inventó el autoclave (Murphy *et al.*, 1999). Tiempo después se comprobó que las bacterias también son una causa de infecciones, después se observó que era imposible probar la presencia de algunas enfermedades de carácter infeccioso y que el material obtenido de los tejidos afectados, previamente filtrado para eliminar bacterias, producía la infección característica cuando se inoculaba a un organismo susceptible (Larski, 1980), así, este sencillo experimento lo demostró Dimitri Ivanowski en 1892, quien filtró el jugo de las hojas de una planta de tabaco afectada por una enfermedad a través de un filtro Chamberland y observó que el filtrado producía la enfermedad en hojas de plantas sanas y él consideró al agente infeccioso como una bacteria muy pequeña (Joklick, 1980; Knipe *et al.*, 2001).

Siete años más tarde Martinus Beijerinck en 1899, confirmó las observaciones de Ivanowski, y se demostró que era posible inocular en serie al microorganismo y también que este agente infeccioso podía precipitarse y desecarse con alcohol sin que perdiera su infectividad, y debido a que el microorganismo se difundía en una placa de gel agar se pensó que se trataba de algún material soluble y lo llamó "contagium vivum fluidum". Tres años más tarde, Ivanowski trabajando bajo las condiciones que Beijerinck realizó sus experimentos y demostró que en gel de agar también se permitía la difusión de partículas de tinta china, por lo tanto no podía descartarse que el agente infeccioso fuera una partícula con naturaleza organizada (Larski, 1980; Aranda, 1988; Knipe *et al.*, 2001).

El primer microorganismo filtrable aislado en animales fue el de la fiebre aftosa descubierto por Friedrich Johannes Löffler y Paul Frosch en 1898 (Waterson, 1968; Joklick, 1980; Aranda, 1988; Knipe *et al.*, 2001). En 1901, Walter Reed y James Carroll aislaron el virus de la fiebre amarilla y en 1904, Borrel descubrió el virus de la viruela aviar. A medida que mejoraron las técnicas, se descubrieron nuevos virus del ser humano, animales y plantas. Frederick W. Twort en 1915 y Felix d'Herelle en 1917, cada quien por separado descubrieron el bacteriófago (Larski, 1980). Twort observó un fenómeno en el cual explicaba la presencia de un virus bacteriano o enzimas bacterianas con capacidad de lisar a las propias bacterias. d'Herelle quien observó el mismo fenómeno, expresó que si la causa era un virus y por la incapacidad de multiplicarse por sí sólo, excepto en células vivas, decidió llamarlo bacteriófago (devorador de bacterias) (Aranda, 1968).

El diagnóstico de los virus ha progresado dados los avances tecnológicos de los investigadores, así, con el invento del microscopio electrónico por Ernst Ruska y Max Knott en 1931, se obtuvo una contribución importante para ayudar a determinar la morfología de los virus. Con el descubrimiento de Ernest William Goodpasture y Alice Miles Woodruff que demostraron que los virus podían cultivarse en embrión de pollo, y John Franklin Enders demostró *in vitro* muerte celular al cultivarlas con el poliovirus, estudios que abrieron una nueva etapa en la investigación en las alteraciones virus-célula las cuales podían estudiarse fácilmente a nivel bioquímico (Merchant y Parker, 1980).





Elford, en 1933 inventó un método para graduar el tamaño del poro de las membranas del colodión, técnica que puede determinar de manera indirecta las dimensiones de la partícula viral, así Gustav Kausche, Edgar Pfankuch y Helmuth Ruska en 1939, fotografiaron el primer virus con técnicas para microscopía electrónica (Larski, 1980). En 1935 Wendell Meredith Stanley, purificó el virus del mosaico del tabaco y determinó su composición química de un solo ácido nucleico y proteína (Joklick, 1980).

En 1941, G. K. Hirts, descubrió que el virus de la influenza produce hemoaglutinación. J. F. Enders, Thomas Weller y Frederick Robbins en 1949, observaron que los virus se desarrollan *in vitro* en tejidos explantados, pero no muestran tropismo hacia los tejidos si estos permanecen en el organismo íntegro (Larski, 1980).

Desde 1950 a 1957 se generalizó el empleo del cultivo de tejidos para el estudio de los virus, y fueron Renato Dulbecco y Marquerite Vogt en 1952, quienes desarrollaron un método para cultivar células en monocapa o monoestrato, en presencia de un medio de cultivo sensible y adecuado para el crecimiento celular y favorecer la replicación de los virus, además de cubrir con agar los cultivos de células recién infectados e interrumpir la diseminación del virus para obtener la formación de placas separadas que son células destruidas por la progenie viral a partir de una sola partícula de virus (Larski, 1980).

La genética de los virus se inició con el aislamiento del ARN del virus del mosaico del tabaco, en 1956 por A. Gierer y G. Schramm por un lado y por Fraenkel-Conrat por el otro, descubrimiento que mostró que la información genética de los virus está codificada en el ácido nucleico, hallazgo que se había demostrado previamente por Alfred Hershey y Martha Chase en 1952 para el bacteriófago (Pelczar y col., 1987).

Es importante observar otros hallazgos que ocurren en 1940 y 1950 con el descubrimiento del virus de la diarrea viral bovina por P. Olafson, A.D. MacCallum, y F. H. Fox; en 1946, Pritchard, Guillespie, Baker en New York describen el agente y el comportamiento de la enfermedad; Bjorn Sigurdson en 1950, realiza sus primeras observaciones acerca del comportamiento de la enfermedad causada por el prion scrapie y sus primeros estudios de otra, el maedi-visna y dado su curso y comportamiento propone el concepto de enfermedades lentas en el ovino. Entre 1954 y 1957, Jonas Eduard Salk y Albert Bruce Sabin aíslan y desarrollan la primera vacuna contra la poliomielitis para uso humano a base de virus inactivado y virus activo modificado. En 1953, James Watson y Francis Crick descubren la estructura del ADN, a partir de aquí se funda la base molecular del código genético y entre 1961 y 1966 se descifra el código genético por Marshal W. Nirenberg, Severo Ochoa, Heinrich Matthei y Har Gobind Khorana, siendo la base para iniciar en el año de 1973 la tecnología del ADN recombinante. En el año de 1974, Meter C. Doherty y Rolf Martin Zinkernagel descubren de cómo la célula T del sistema inmune reconoce las células infectadas por virus y, por otro lado Georges Kohler y Cesar Milstein en 1975 desarrollan los primeros anticuerpos monoclonales los cuales son altamente específicos en el campo del diagnóstico de las enfermedades (Murphy *et al.*, 1999).

En 1978, se descubre el parvovirus canino por L. Carmichael; L. Pedersen en 1987 descubre el virus de la inmunodeficiencia felina; En el año de 1984, Luc Montagnier descubren el virus de la inmunodeficiencia humana HIV y por último, en 1986 un grupo de colaboradores médicos veterinarios británicos descubren el comportamiento de la enfermedad de encefalopatía esponjiforme bovina y Stanley Prusiner demuestra la estructura y la naturaleza del agente "prion" como causa de la enfermedad en los bovinos y del scrapie en ovinos y su semejanza como enfermedades de comportamiento lento, acreditándose al premio novel de Medicina en el año de 1997 (Murphy *et al.*, 1999).

Propiedades generales de los virus

Los virus son elementos genéticos que se puede replicar independientemente de los cromosomas de las células, pero no independientemente de ellas, deben alcanzar una célula como hospedador en la que puedan multiplicarse, y se caracterizan también por poseer un estado extracelular e intracelular (Madigan y col., 1999).





Los virus constituyen un grupo único de agentes infecciosos con característica diferente a otros microorganismos que reside en su organización simple y acelular, así como su forma de replicación. La partícula viral completa o virión, consta de una o más moléculas de ADN o ARN, rodeada por una cubierta de proteína y a veces por otras capas que pueden ser muy complejas y contener carbohidratos, lípidos y proteínas adicionales (Prescott y col., 1999).

Los virus poseen una fase extracelular y otra intracelular; en la fase extracelular de un virus este es una partícula submicroscópica, inerte metabólicamente y no realiza ninguna función biosintética y se denomina partícula víral o virión, estructura que penetra a la célula, ya dentro de la célula se inicia la fase intracelular y ocurre la replicación viral: se produce el genoma viral y se pasa de una célula a otra célula hospedadora, proceso que se denomina infección. Los genomas virales fundamentalmente codifican funciones que no tomar de sus hospedadores durante su replicación intracelular, pero existe gran dependencia de actividades metabólicas y estructurales de la célula hospedadora. Las células contienen ADN bicatenario y los virus pueden tener como material genético ARN o ADN que puede ser bicatenario o monocatenario, pero existe un tercer grupo que requiere tanto de ADN como de ARN en diferentes fases de su ciclo de replicación y en este grupo se incluye a los retrovirus (Madigan y col, 1999).

Diagnóstico virológico

Los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren de células vivas para su replicación, estas pueden ser de cultivos celulares, embrión de pollo o animales de laboratorio como el ratón, que son los más frecuentemente utilizados como sistemas huésped además de métodos que implican diferencias para cada espécimen viral para su aislamiento en el laboratorio (Specter and Lancz, 1986).

Un mejor fundamento en el diagnóstico viral es tener métodos rápidos que proporcionen una respuesta definitiva en 24 horas o durante el curso del estudio inicial en el animal. Estos métodos deben reunir los siguientes requisitos: ser rápidos, específicos, simples, sensibles y tener un bajo costo (Murphy et al., 1999).

Existen enfermedades que se pueden diagnosticar clínicamente, pero otras requieren la ayuda del laboratorio específico dedicado al estudio de enfermedades exóticas, de zoonosis, para declaración de zonas libres por infecciones específicas, para la detección oportuna de enfermedades transmitidas por inseminación artificial, transferencia de embriones y transfusiones sanguíneas, así como la realización de pruebas para programas de erradicación e investigaciones en la sanidad veterinaria (Fenner y col., 1992).

Las pruebas de diagnóstico específicas para una infección viral en un animal se demuestra por la presencia del virus y por la demostración de la presencia de anticuerpos específicos antivirales, pero los métodos de diagnóstico viral se llevan a cabo de tres maneras: aislamiento y caracterización del virus causal, la demostración directa de la partícula viral o sus proteínas vírales antigénicas, su ácido nucleico presente en los tejidos, secreciones o excreciones y la detección y cuantificación de anticuerpos (Fenner et al., 1974; Biberstein y Chung, 1990; Fenner y col., 1992).

El aislamiento viral es y sigue siendo la prueba de referencia frente a la cual se valoran los demás métodos, sin embargo, la demostración de viriones o de los componentes vírales puede suponer un método de diagnóstico específico más rápido y barato que el aislamiento de virus, especialmente cuando se requiere analizar un número elevado de muestras, y en el aspecto de programas de erradicación y obtención de certificados de zonas libres de una infección específica los más frecuentemente utilizados son los métodos serológicos o en pruebas inmunocitoquímicas más rápidas de detección de antígenos (Fenner y col., 1992).

Esterilización

La esterilización es un proceso mediante el cual todas las células vivas, esporas viables, virus y viroides se destruyen o eliminan de un medio físico. Entre los métodos físicos de esterilización más empleados se encuentran el calor seco, el calor húmedo, radiación ionizante y ultravioleta, en la actualidad se ha iniciado con el uso de agentes químicos como los gases (Merchant y Parker, 1980; Biberstein y Cheng, 1990).





La desinfección es la destrucción o eliminación de los microorganismos por medio de agentes químicos, sin embargo pueden permanecer esporas viables y otros microorganismos, los agentes más frecuentemente utilizados son los fenoles, alcoholes, halogenados, cuaternarios de amonio y aldehídos (Merchant y Parker, 1980; Pelczar y col., 1987).

La esterilización con vapor se realiza en el autoclave, a una temperatura de 121°C a 6.8 kg o 15 libras/pulgada cuadrada de presión durante un tiempo de 10-20 minutos, de esta forma se observa la destrucción de ácidos nucleicos, y desnaturalización de enzimas (Merchant y Parker, 1980; Madigan y col., 1999).

La esterilización por calor seco se realiza a una temperatura de 160 a 170°C durante 2-3 horas. La destrucción de microorganismos se lleva a cabo como consecuencia de la oxidación de los constituyentes celulares y por desnaturalización de proteínas. Las desventajas de este método son el tiempo en que se lleva a cabo, además de ser inapropiado para materiales termo sensibles como son el plástico y hule (Merchant y Parker, 1980; Pelczar y col., 1987; Madigan y col., 1999).

La radiación ionizante que procede de una fuente de cobalto 60, tiene una alta efectividad y se utilizada para esterilizar en frío antibióticos, suturas, hormonas y materiales de plástico. La radiación ultravioleta no atraviesa eficazmente el cristal o películas de suciedad, agua y otras sustancias, de modo que tiene mayor inconveniente y su usa principalmente para esterilizar aire de campanas de seguridad biológica (Pelczar y col., 1987; Prescott y col., 1999).

Gases como el óxido de etileno que se usa como agente esterilizante para materiales termo sensibles como el plástico, destruye a los microorganismos al combinarse con las proteínas celulares (Merchant y Parker, 1980; Pelczar col., 1987; Prescott y col., 1999).

Aislamiento de los virus

Se han desarrollado varias técnicas para el aislamiento de los virus y la fuente de donde se puede aislar los virus son las secreciones, excreciones, sangre y otros tejidos. Las muestras seleccionadas deben procesarse inmediatamente o se pueden congelar preferentemente a menos 70°C y para procesarlas es necesario preparar soluciones buffer (Joklick, 1980).

Antes de inocular la muestra en el sistema huésped seleccionado, ésta se filtra para eliminar a los microorganismos contaminantes a través de un filtro membrana con diámetro del poro de 45 µm, aunque pueden pasar algunos micoplasmas. Si se sospecha de una concentración muy baja de virus es preferible utilizar altas concentraciones de antibióticos que filtrar (Fenner y col, 1992).

Durante muchos años los virus se han cultivado mediante la inoculación de animales huésped apropiados o en embrión de pollo, recientemente los virus se aíslan en cultivos celulares animales en monocapa, la capa de células animales preparada especialmente en frascos de cristal o de plástico con superficie plana se añade el inóculo de virus y se da tiempo para que los virus se adsorban a las células, posteriormente se retira el excedente de inóculo y se pueden cubrir o no con una capa de agar para limitar la propagación del virión, de manera que las células adyacentes sean infectadas por los viriones recién producidos (Prescott y col, 1999).

Cultivos celulares

Un cultivo celular se obtiene induciendo el crecimiento de células provenientes de un órgano o tejido de un animal experimental, asépticamente se recolecta el tejido y se disocia en pequeños trozos y las células por tratamiento enzimático capaz de romper el cemento intercelular e inoculando la suspensión de células sobre la superficie lisa de una botella o en pozos de una microplaca o en una caja de Petri. Los medios de cultivo utilizados para los cultivos celulares son generalmente muy complejos que incluyen algunos aminoácidos y vitaminas, sales, glucosa y un sistema tampón de bicarbonato y para obtener un mejor crecimiento es





necesario añadir normalmente una pequeña cantidad de suero sanguíneo y también algunos antibióticos para evitar contaminaciones bacterianas (Merchant y Parker, 1980; Madigan y col., 1999).

Los cultivos celulares primarios homólogos provenientes de tejidos fetales representan posiblemente el sustrato más sensible para el aislamiento de una variedad muy amplia de virus. Las líneas celulares representan algunas ventajas y se dispone de líneas celulares de casi todas las especies excepto en aves (Fenner y col., 1992).

Cultivo en animales de laboratorio

Fueron el primer método de cultivo de los virus y durante años el único, actualmente juegan un papel menor en el diagnóstico de laboratorio, sin embargo se siguen utilizando ratones lactantes para el aislamiento de rhabdovirus como el virus de la rabia, flavivirus y togavirus (Merchant y Parker 1980).

Cultivo en embrión de pollo

Los embriones de pollo representan un método sensible para el aislamiento viral, son muy utilizados como fuente de cultivos primarios de fibroblastos, de células renales en monocapa, para el aislamiento de virus aviares (5) tienen la ventaja para propagar el virus para la inoculación en diversos hospedadores animales, esta técnica es importante para la identificación y diferenciación de virus desconocidos (Merchant y Parker, 1980).

Identificación de los virus

Inmunofluorescencia (IF)

Es el método más sencillo para identificar un aislamiento nuevo de virus mediante la tinción con anticuerpos fluorescentes, puede proporcionar un diagnóstico definitivo en aproximadamente una hora después de haber obtenido el primer signo citopático (Fenner y col., 1992).

La IF directa detecta la presencia directa del antígeno, los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína identifican al antígeno específico presente en la monocapa en cubreobjetos infectada, en improntas de tejido sospechoso de estar infectado, se incuba con el conjugado (antisuero teñido o marcado) y después se lava para eliminar el conjugado no unido al antígeno. Al observar a través del microscopio de fluorescencia de haz de luz ultravioleta, las partículas antigénicas unidas al anticuerpo se observan brillantes y fluorescentes (Tizar, 1996).

La prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes es utilizada para la detección de anticuerpos antivirales. La unión del antígeno es reconocida por fluoresceína conjugada a una anti inmunoglobulina (un segundo anticuerpo) (Murphy *et al.*, 1999).

Detección y cuantificación de anticuerpos antivirales

Inhibición de la hemoaglutinación (HI)

Ciertos virus pueden aglutinar eritrocitos de mamíferos y de ave, el fenómeno facilita la identificación de un virus desconocido, estos virus contienen hemoaglutinina en la cápside viral de naturaleza proteica, esta proteína generalmente se puede separar de la superficie de los virus con disolventes orgánicos (Carpenter, 1963; Biberstein y Cheng, 1990). Es posible utilizar la inhibición de la hemoaglutinación con virus pertenecientes a los paramyxovirus, orthomyxovirus, alphavirus, flavivirus y bunyavirus, algunos adenovirus, reovirus, parvovirus y coronavirus (Tizard, 1996). Los viriones de diversas familias se unen a los eritrocitos y causan hemoaglutinación. Si los virus reaccionan con los anticuerpos específicos antes de la adición de los eritrocitos, la hemoaglutinación resulta inhibida (Fenner y col., 1992). Una reacción de hemoaglutinación positiva se observa como un sedimento o botón de eritrocitos en el fondo del pozo de la microplaca de fondo redondo o de un tubo (Biberstein y Cheng, 1990).

ELISA (inmunoensayo unido a enzimas)





Se utiliza para detectar y cuantificar anticuerpos o antígenos. Por medio de la utilización de suero sanguíneo, los anticuerpos específicos presentes en éste se unen al antígeno adsorbido en una microplaca, después de un periodo de incubación y posteriormente un lavado se agrega una antiglobulina marcada con una enzima, este complejo se une a los anticuerpos, después de incubar y lavar se agrega el sustrato de la enzima correspondiente (Tizard, 1996). Los anticuerpos o antígenos marcados por una enzima se unen al antígeno o anticuerpo, según sea el caso, y el sustrato cambia de color (Fenner y col., 1992).

Neutralización del virus

La neutralización viral se hace incubando una dosis adecuada de virus con el suero problema que contenga o no anticuerpos neutralizantes (Rose y col., 1983). Con esta prueba se estima la capacidad que tiene el anticuerpo para neutralizar la actividad biológica del antígeno cuando se mezcla *in vitro* (Tizard, 1996). Los sueros deben ser en primer lugar inactivados por calentamiento a 56°C durante 30 minutos para eliminar inhibidores específicos de los virus. La mezcla de suero y virus se inoculan en monocapas apropiados o específicos y se incuban hasta que en los cultivos control inoculados con virus aparece efecto citopático. Los anticuerpos protegen a las células de la destrucción por la infectividad de los virus a través de la neutralización, es decir, el huésped no se infecta (Rose y col., 1983; Fenner y col., 1992); cuando no existe neutralización del virus se detecta efecto citopático (CPE), formación de placas e inhibición del metabolismo en los cultivos celulares (Specter and Lancz, 1986; Flint *et al.*, 2000).

Fijación del complemento (FC)

El complemento comprende una serie de proteínas séricas que se activan en secuencia mediante la reacción del antígeno con el anticuerpo específicos, en donde un anticuerpo es capaz de activar o fijar el complemento, la IgM es más eficiente que la IgG (Kaplan y Pesce, 1989), pero la fijación del complemento es útil para determinar la presencia de anticuerpos en un suero, empleando el antígeno adecuado o para identificar un virus desconocido, empleando un anticuerpo conocido (Merchant y Parker, 1980). La activación del sistema clásico del complemento por la unión de un anticuerpo con un antígeno produce la formación de sistemas de ataque de membrana capaces de romper las membranas celulares, si el anticuerpo se une a los eritrocitos utilizado como sistema indicador, estos se destruyen y como consecuencia la hemólisis (Tizard, 1996).

Detección directa del virus por microscopía electrónica (ME)

Se refiere a la visualización directa del virus involucrado. La morfología de algunos virus es suficiente característica para asignar correctamente su familia y el contexto particular del caso. Este método proporciona un diagnóstico definitivo (Larski, 1980; Murphy *et al.*, 1999). Además proporciona datos rápidos sobre un determinado aislamiento viral (Biberstein y Chung, 1990). El tamaño puede determinarse directamente en microfotografías electrónicas de preparaciones teñidas con ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo de cortes ultrafinos de células infectadas (Mohanty y Dutta, 1981).

Identificación del virus por microscopía inmunoelectrónica (MIE)

La inmunoelectromicroscopía facilita el descubrimiento de los virus en las células (Biberstein y Chung, 1990). La identificación definitiva de viriones puede realizarse por adición de anticuerpos específicos para el espécimen antes de depositar el virus, esta técnica detecta anticuerpos específicos apropiados que puede permitir diferencias más precisas (Fenner *et al.*, 1974; Murphy *et al.*, 1999).

Material básico usado en el laboratorio

Los materiales que se utilizan más frecuentemente para las prácticas son los siguientes:

De laboratorio

- Tubos de ensaye de 15x100 mm estériles con tapón de baquelita
- Pipetas de vidrio de 10.0, 5.0 y 1.0 ml estériles graduadas en décimas.
- Pipetas Pasteur
- Bombillas de seguridad





- Gradillas
- Mecheros Bunsen
- Ovoscopio
- Jeringas de tuberculina de 1.0 ml graduadas en decimos
- Micropipetas ajustables automáticas de 5-50; 50-200; 200-1000 μ l
- Multipipetas de 12 canales ajustables automáticas de 25 200 μ l
- Puntas de plástico con capacidad de 5-200 y 200-1000 μ l
- Botellas de plástico de 25 cm² y de 80 cm² Nunc
- Criotubos de 1.8 ml
- Termómetro de menos 10 a 70°C

Equipo de laboratorio

- Incubadora normal con temperatura de 37°C
- Incubadora con inyección de CO₂
- Campana de flujo laminar horizontal o vertical
- Centrífuga clínica
- Refrigerador
- Congelador a -20°C y a -70°C
- Agitador magnético
- Autoclave

Material biológico

- Cepas virales aviares:
 - Virus de la Enfermedad del Newcastle
 - Virus de la Bronquitis infecciosa aviar
 - Virus de la Viruela aviar
 - Virus de la Laringotraqueítis infecciosa aviar
- Embrión de pollo SPF de 9-11 días de edad
- Cultivos celulares primarios (fibroblastos de embrión de pollo)

Equipo de bioseguridad

- Bata
- Careta
- Goggles
- Cubre bocas
- Cubre pelo
- Guantes de látex

Medios de cultivo, reactivos y sustancias de laboratorio

- Medio de cultivo MEM (Minimal Essential Medium)
- Triptosa fosfato broth (TPB)
- Solución buferada fosfatada (PBS)
- Solución de Alsever
- Tripsina-versene
- Tripan azul al 1%
- Alcohol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 2%

Bibliografía

Aranda, A.A.1988. En la frontera de la vida: Los virus. Fondo de Cultura Económica, México.
Biberstein, L.E. y Chung, Z.E. 1990. Tratado de Microbiología Veterinaria. Acribia, España.





- Carpenter, L.P.1963. Inmunología y Serología. La Prensa Medica Mexicana, México.
- Fenner, F., McAuslan, R.B., Mims, A.C., Sambrook, J. and White, O.D.1974. The biology of animal viruses. 2nd ed., Academic Press, USA.
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. and White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
- Flint S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R. and Skalka, A.M. 2000. Principles of Virology. Am. Soc. Microbiol. ASM Press, Washington, D.C. USA.
- Joklick, K.W.1980. Principles of Animal Virology. Appleton-Century-Crofts, USA.
- Kaplan, A.L. y Pesce, J.A. 1989. Química clínica. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. and Straus, S.E.: 2001. Fundamental Virology. Fourth edition. Lippincott Williams and Wilkins. Pa. USA.
- Larski, Z. 1980. Virología para veterinarios. 2^a ed. La prensa médica mexicana, México.
- Lechevalier, H.A. and Solotorovsk, M. 1965. Three centuries of Microbiology. McGraw- Hill, New York. USA.
- Madigan, T.M., Martinko, M.J. y Parker, J. 1999. Biología de los microorganismos. 8^a ed. Prentice Hall, España.
- Merchant, I.A. y Parcker, R.A. 1980. Bacteriología y Virología para Veterinarios. 3^a ed., Acribia, España.
- Mohanty, B.S. y Dutta, K.S. 1981. Virología Veterinaria. Ed. Interamericana, México.
- Murphy, A.F., Gibbs, J.E.P., Horzinek, C.M. and Studdert, J.M. 199. Veterinary Virology. 13 ed., Academic Press, USA.
- Pelczar, M.J., Reid, R.D. y Chan, E.C.S. 1987. Microbiología. 2^a ed. McGraw- Hill, México.
- Prescott, M.L., Harley, P.J. y Klein, A.D. 1999. Microbiología. 4^a ed. McGraw-Hill Interamericana, España.
- Rose, R.N., Milgrom, F. y van Oss, J.C. 1983. Principios de Inmunología. CECSA, México.
- Specter, S. and Lancz, J.G. 1986. Clinical Virology Manual. Elsevier, USA.
- Tizar, R.I. 1996. Inmunología Veterinaria. 5^a ed. McGraw-Hill Interamericana, México.
- Waterson, P.A. 1968. Introducción a la Virología Animal. Acribia, España.





III. PRÁCTICAS

PRÁCTICA No. 1

Bioseguridad en el laboratorio de Virología

Introducción

En el laboratorio al trabajar y manejar los virus se deben extremar medidas de bioseguridad con el fin de evitar riesgos de contaminación al humano y hacia el mismo material biológico que en ese momento se este manipulando por el técnico, ciertos procedimientos son peligrosos debido a la generación de aerosoles los cuales son una fuente de contaminación interna y hacia el exterior, por otro lado favorecen la obtención de un diagnóstico erróneo, presencia de infecciones en el personal de laboratorio, difusión de enfermedades por la liberación de residuos biológicos y el riesgo de diseminación a unidades animales adyacentes, sin olvidar que pueden originar infecciones de tipo zoonosis, como resultado de la manipulación de agentes infecciosos o por contacto con animales infectados, sus tejidos o excretas.

Por tal motivo existe una clasificación de agentes infecciosos en base al riesgo que representan para la salud humana y se aplica a los laboratorios de acuerdo a la capacidad para manejarlos con seguridad. Los grupos de riesgo son cuatro e indican los niveles de contención, así, el Grupo I considerado de bajo riesgo individual, Grupo II, de riesgo individual moderado, el Grupo III, de riesgo individual alto y comunitario bajo y el Grupo IV de elevado riesgo individual y comunitario.

Objetivo

Conocer las medidas básicas para evitar accidentes e infección por virus en el laboratorio.

Los principios básicos de control, comportamiento y de bioseguridad en el laboratorio son los siguientes:

Medidas primarias: implican el uso de técnicas encaminadas al control de los microorganismos para impedir una auto contaminación e impedir la difusión de aerosoles, estas se pueden mencionar como:

- Estar a tiempo al inicio de la práctica y con bata puesta al entrar y al finalizar esta.
 - No introducir alimentos y bebidas al laboratorio, no mascar chicle, ni llevarse objetos a la boca (goma, lápiz, bolígrafo). Debe evitarse el uso de cosméticos, aretes y anillos.
 - Prohibir la entrada a personas ajenas al laboratorio.
 - Utilizar bata limpia, abotonada, guantes, gorro, cubre boca y goggles en casos particulares.
 - Usar la bombilla de seguridad y evitar la formación de aerosoles al realizar las diluciones. No succionar con la pipeta en la boca.
 - Desinfectar la mesa de trabajo antes y después de realizar las técnicas, usar estos para materiales de desecho y en derrame de material contaminado.
 - Depositar el material desecho en bolsas de plástico.
- b) Medidas secundarias: tienen como finalidad seguir protegiendo al operador:
- El equipo de protección de laboratorio debe quitarse al salir y no llevar estos o usarlos a otras áreas.
 - Las manos deben lavarse después de la manipulación de material infeccioso.
 - Deben cubrirse heridas o raspaduras con apósitos impermeables.
- c) Medidas terciarias: Todas aquella con el fin de evitar la diseminación del microorganismo y como consecuencia infecciones a otras áreas y a la comunidad.

El uso de cabinas de seguridad biológica de flujo laminar, tipo horizontal y tipo vertical, equipadas con filtros HEPA (High efficiency particulate air) para retener partículas suspendidas en el aire, eliminan el 99.97% de





las partículas mayores de 0.3 μm , generan de esta forma una cortina horizontal de aire filtrado para proteger de contaminantes cuando se revisan tejidos o realizar medios de cultivo y así mismo al técnico.

Para reducir la carga microbiana en determinado equipo de laboratorio se utiliza el método de esterilización mediante el uso de radiaciones electromagnéticas como la radiación ultravioleta (UV), rayos X, rayos gama y radiación ionizante, producen efectos mutagénicos sobre las bacterias, aunque la efectividad de las radiaciones ultravioleta es muy baja.

Preguntas para discusión

1. ¿Cuál es la importancia de realizar la esterilización del área de laboratorio?
2. ¿Cuál es el mecanismo de acción de las radiaciones electromagnéticas sobre los microorganismos?
3. ¿Por qué la esterilización con radiación ultravioleta no es tan eficaz?
4. ¿Qué ventajas ofrece la campana de flujo laminar al trabajar con microorganismos?

Bibliografía

- Buxton A, and Frazer, G. 1977. Animal Microbiology. Vol 1,2. Blackwell Scientific Publication, UK.
- Collins, H.C. y Díen, M.P. 1989. Métodos microbiológicos. Acribia, España.
- Cottral, E.G. 1978. Manual de métodos de estandarización en microbiología veterinaria. La Prensa Médica Mexicana, México.
- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, S.H. y Wood, B.R. 1978. Tratado de microbiología. 2ª ed., Salvat, México.
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
- Fleming, O.D., Richardson, H.J. y Vesley, D. 1995. Laboratory safety: Principles and practices. 2nd ed., American Society Microbiology. USA.
- Madigan, T.M., Martinko, M.J. y Parker, J. 1999. Biología de los microorganismos. 8ª ed., Prentice Hall, España.
- Prescott, M.L., Harley, P.J. y Klein, A.D. 1999. Microbiología. 4ª ed., McGraw-Hill Interamericana, España.





PRACTICA No. 2

Preparación de material empleado en el laboratorio de Virología

Introducción

Para poder realizar un trabajo se debe de contar con el material apropiado y en condiciones de esterilidad, éste depende de la técnica a desarrollar, se debe emplear material de vidrio con ciertas especificaciones de calidad, de la marca Pyrex o Kimax. no tóxico para las células, neutro y de pared recta, características importantes en el cultivo de tejidos, para guardar soluciones de trabajo se recomiendan frascos con tapón de rosca para mantener la esterilidad. Actualmente, se usa con más frecuencia el material de plástico, pero es desechable y con el tiempo se incrementa el costo, sin embargo, el material de cristal inicialmente puede resultar costoso pero tiene como ventaja que es reusable y puede ser esterilizado, y como consecuencia una inversión más redituable.

Objetivo

Conocer el tipo de material útil en el laboratorio, limpieza, desinfección y esterilización para su uso en técnicas virológicas.

Material

El material básico y de uso más frecuente en el laboratorio de virología para desarrollar las prácticas comprende equipo de laboratorio, cristalería, soluciones y reactivos biológicos.

Incubadora normal a 37 °C	Tubos de ensaye de 15x100 estériles
Incubadora con CO ₂	Tubos de polipropileno con tapón capacidad 10.0 –15.0 ml
Campana de flujo laminar horizontal y vertical	Pipetas de vidrio de 10.0, 5.0 y 1.0 ml
Centrífuga clínica de 5,000 r.p.m.	Pipetas de seguridad biológica de 5.0 y 10.0 ml de capacidad
Centrífuga refrigerada de 10,000 r.p.m.	Matraces de diferente capacidad
Refrigerador de 2 a 8 °C	Vasos de precipitado
Congelador de menos 70 °C	Probetas de diferente capacidad
Congelador de menos 20 °C	Micropipeta automática de volumen variable de 5-50; 40-200; 200-1000 µl
Agitador magnético	Multipipetas de 12 canales automáticas de 5-25 y de 50-100 µl
Agitador Vortex	Puntas para micropipeta de 5-200 y 200-1000 µl
Autoclave	Botellas de plástico de 25 cm ² y de 75 cm ²
Microscópio óptico	Microplacas de fondo plano con tapa estéril
Microscópio de epifluorescencia	Críotubos con capacidad de 2.0 ml ó 1.5 ml
Cilindro de gas carbónico medicinal	Termómetro
Baño María	Tijeras, pinzas, barras magnéticas
Barras magnéticas	Bombillas de seguridad
	Ovoscopio
	Mechero
	Jeringas de tuberculina de 1.0 ml graduada en 1/10
	Gradillas para tubos





Preparación del material para esterilizar

Es importante mencionar que como material nuevo de cristalería y que no se ha utilizado, se debe tratar de la siguiente manera:

Técnica

1. Sumergir en agua desionizada.
2. Dejar escurrir para su secado a temperatura de 30-35°C
3. Una vez seco, cubrir el orificio del material con papel aluminio.
4. Esterilizar por autoclave a 120°C durante 15 minutos a 15 libras de presión por pulgada cuadrada, o por calor seco a 250°C durante noventa minutos.

El material contaminado también se deberá tratar en las siguientes soluciones, Es importante mencionar que el material no debe ser tallado ni cepillado para no dañar ni rayar el material:

Técnica

1. Sumergir en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 24 horas.
2. Posteriormente, enjuagar de forma abundante con agua de la llave cinco veces.
3. Sumergir en una solución de extrán al 2% (jabón neutro), para retirar restos de proteína Adherida a la pared del vidrio, durante 24 horas.
4. Enseguida se enjuaga nuevamente en agua corriente por cinco veces.
5. Sumergir en una solución de ácido clorhídrico al 2% por 24 horas.
6. Sumergir en agua de la llave cinco veces y finalmente enjuagar con agua destilada. Dejar escurrir y secar a 37 °C. La envoltura del mismo es de forma apropiada con papel aluminio y para someter al autoclave o mediante calor seco para su esterilización.

La esterilización de líquidos se debe realizar mediante filtración con membranas de acetato de celulosa con tamaño del poro de 0.22 µm.

Observaciones. Es recomendable no utilizar material esterilizado en un tiempo mayor de 15 días con el fin de optimizar los procesos de calidad en el laboratorio.

Preguntas para discusión

1. ¿Cuáles son las precauciones que se deben tomar en cuenta al lavar el material?
2. ¿Qué condiciones de calidad y esterilidad debe cumplir el material empleado en el laboratorio de Virología y en qué casos específicos?

Bibliografía

Cunnigham, H.C. 1971. Virología práctica. Acribia, España.
Madigan, T.M., Martinko, M.J. y Parker, J. 1999. Biología de los microorganismos. 8ª ed., Prentice Hall, España.





PRÁCTICA No. 3

Desinfección y esterilización

Introducción

La limpieza del material antes de realizar la esterilización es prioritaria para obtener una completa eliminación de agentes patógenos, en otras palabras, es remover completamente todo el material orgánico acumulado. Una buena práctica de limpieza logra remover hasta el 99% de microorganismos de un objeto sucio.

La *esterilización* comprende medios físicos y químicos para eliminar la totalidad de microorganismos viables en el material a utilizar. La *desinfección* se refiere a la utilización de agentes químicos germicidas con la finalidad de destruir la infectividad de los agentes. La antisepsia se refiere a la aplicación tópica de agentes químicos sobre un organismo para inhibir agentes patógenos o destruirlos.

Con los medios físicos se inhibe el crecimiento bacteriano mediante el uso de calor, filtración y radiación. El calor es uno de los métodos físicos más empleados en la esterilización. Cuando la temperatura se eleva a 50-70 °C se producen efectos letales sobre las bacterias, hongos y la mayoría de los virus, mientras que las esporas se destruyen a 100 °C. Para realizar una buena esterilización se emplea el calor húmedo (autoclave) y el calor seco (horno). El mecanismo por el que actúa la esterilización por calor se basa en la desnaturalización de proteínas.

La esterilización por calor húmedo se realiza en el autoclave, donde se produce vapor saturado, ya que al inicio se expulsa el aire que se encuentra dentro de la cámara del autoclave, de esta forma se alcanza una presión de 120 lb ó 6.8 kg de presión con una temperatura de 121 °C, y para destruir todas las endoesporas se toma un tiempo de 10 a 15 minutos.

En la esterilización por calor seco, el material se coloca en un horno a temperatura de 160 a 170 °C durante 2-3 horas, así, la destrucción de los microorganismos se produce por la oxidación de los constituyentes celulares y la desnaturalización de las proteínas. Tiene como ventaja el no corroer el material de metal y su principal desventaja es el tiempo, además de resultar inapropiada para materiales de goma y plástico.

El control microbiano se puede realizar también por agentes químicos, pero generalmente se utilizan para la desinfección y la antisepsia, su mecanismo de acción es por medio de la disolución de los lípidos de la membrana celular o afectando las proteínas. Dentro de estos agentes tenemos las siguientes sustancias: fenoles, alcoholes, halógenos, metales pesados (arsénico, plata, mercurio, zinc y cobre), aldehídos y cuaternarios de amonio. Los gases esterilizantes cobran cada día más auge ya que han tenido grandes ventajas por su acción microbicida y esporicida, además de poder utilizarse con materiales de plástico que en este caso se emplea el gas óxido de etileno, el tiempo necesario para su efectividad dependerá de la concentración y la temperatura, este puede ser de 5 a 8 hrs. a 38 °C y de 3 a 4 hrs a 54 °C.

Otra forma de realizar una disminución de la carga microbiana es el empleo de agentes químicos, a lo que se denomina fumigación la cual se puede realizar en espacios más o menos cerrados y se utilizan sustancias desinfectantes que actúan por contacto.

Objetivo Conocer los métodos más importantes en desinfección y esterilización, empleados en el laboratorio de Virología.

Preguntas para discusión

¿Cuál es la importancia de la limpieza dentro de la esterilización?





Mencione las diferencias entre esterilización, desinfección y antisepsia.
¿Por qué no todos los agentes químicos son esterilizantes?

Bibliografía

- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, S.H. y Wood, B.R. 1978. Tratado de microbiología. 2ª ed., Salvat, México.
- Madigan, T.M., Martinko, M.J. y Parker, J. 1999. Biología de los microorganismos. 8ª ed., Prentice Hall, España.
- Prescott, M.L., Harley, P.J. y Klein, A.D. 1999. Microbiología. 4ª ed., McGraw-Hill Interamericana, España.
- Rusell, D.A., Hugo, B.W. and Ayliffe, J.G.A. 1982. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Blackwell Scientific Publications, Great Britain.
- Winkler, K.J. 1987. Control sanitario de poblaciones animales. 2ª ed, Mc Graw-Hill, México.





PRÁCTICA No. 4

Preparación de medios de cultivo

Introducción

Se han desarrollado medios de cultivo definidos para lograr el crecimiento celular y uno de los medios más reconocido fue el desarrollado por Eagle conocido como medio mínimo esencial (MEM), que es una solución isotónica tamponada con un pH 7.4 a la que se le añade glucosa, vitaminas, aminoácidos y suero sanguíneo para lograr un óptimo crecimiento celular, además de contener antibióticos que inhiban el crecimiento de bacterias y hongos. Los medios definidos de cultivo tienen varias ventajas para el aislamiento de virus, también se utiliza suero fetal bovino al 5-10%. Una vez formada la monocapa se retira el medio de crecimiento, se inocular el virus y se añade el medio de mantenimiento con o sin suero.

Los medios de cultivo proporcionan todos los nutrientes para la célula. Además de la temperatura óptima para los virus que es de 37 °C, pueden cultivarse en recipientes herméticamente cerrados o no, pero con presencia de CO₂ al 5% para esta última opción.

Algunos requisitos de los constituyentes de un medio de cultivo:

- La glucosa actúa como fuente de energía y carbono a la célula para realizar sus procesos biosintéticos y de trabajo mecánico como la migración, división celular y transporte de sustancias dentro de ella.
- Los aminoácidos como fuente de proteínas, dentro de los más importantes son la metionina y la cistina.
- Suero de origen fetal de bovino o de ternera, de equino o cabra; este, permitirá la adherencia de las células a la superficie de la botella y principalmente cuando se realiza un cultivo primario.
- El uso de antibióticos como la penicilina G 100 U/ml, estreptomycinas 100 µg/ml, permiten inhibir la contaminación bacteriana y contra los mohos se utiliza la fungizona (anfotericina B) a 2.5 a 5.0 µg/ml o el micostatin de 20 a 25 µg/ml.
- Las vitaminas del complejo B interviene en los trabajos de metabolismo celular. Otros reactivos como el bicarbonato de sodio para mantener la presión osmótica en conjunto con los demás compuestos que integran el medio de cultivo. El rojo de fenol al 0.1% únicamente como indicador de cambios de pH.
- La temperatura óptima de 37 a 38 °C en presencia de una atmósfera de CO₂ del 5 al 10%, ayudan a mantener la presión osmótica. Los iones de calcio, fósforo y magnesio compuestos que actúan como activadores de enzimas.
- La concentración iónica es importante y debe ser de un pH 6.7 a 7.8, pero el ideal para un cultivo es de pH 7.2.

Prueba de esterilidad del medio de cultivo

Con el objeto de controlar la calidad del medio de cultivo se emplea el medio bacteriológico de thioglicolato y caldo de tripticaseína soya, para detectar el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias facultativas se aplica como prueba de esterilidad para productos biológicos y antibióticos, durante 14 días a una temperatura de incubación del medio a 37 °C y a temperatura de laboratorio.

Objetivo Conocer las características de los diferentes medios de cultivo, soluciones y reactivos utilizados para el cultivo celular.

Material

Campana de flujo laminar	Tubos de ensaye	Medio MEM
--------------------------	-----------------	-----------





horizontal		
Estufa bacteriológica	Pipetas de 1.0 ml	Suero fetal bovino
Refrigerador		Bicarbonato de sodio
Termómetro ambiental de 0-50 °C		Caldo tripticaseína de soya
		Medio tioglicolato 1N HCl
		Antibióticos: penicilina, estreptomicina, anfotericina B
		Recipiente con desinfectante

Técnica

1. En Campana de flujo laminar horizontal, se desinfecta el área de trabajo con alcohol al 70%.
2. Pesar y reconstituir el medio de cultivo, filtrar con membrana de 0.22 µm y agregar la cantidad requerida de suero fetal de bovino al medio.
3. Agregar el bicarbonato de sodio gota a gota hasta obtener un color rojo y mover suavemente, no llegar al púrpura y en caso de manifestarse este, bajar el pH gota a gota con una solución 1N de HCl.
4. Realizar la prueba de esterilidad, usar el medio de tioglicolato y caldo de tripticaseína soya, inocular 0.5 ml de medio de cultivo a cada uno de los medios bacteriológicos. Identificar con su nombre, fecha, el medio utilizado e incubar a 37 °C durante 2 semanas. Los tubos contaminados deberán desecharse por autoclave y deberá realizarse el medio nuevamente.
5. En caso de que el medio resulte estéril, etiquetar el medio MEM, su nombre, número de lote, fecha y colocarlo en el refrigerador.
6. Etiquetar el bicarbonato y otros reactivos con su nombre y guardar en el refrigerador.
7. Depositar las pipetas en desinfectante hipoclorito de sodio al 2% y desinfectar la superficie de trabajo.

Filtración de los medios de cultivo

La filtración es un método de esterilización por reducir la carga bacteriana y se utiliza para esterilizar medios de cultivo que contienen proteína o suero, productos farmacéuticos, antibióticos, aceites y otras sustancias. Recientemente se usan los filtros de membrana, con un poro de hasta 0.22 µm fabricados en acetato de celulosa, nitrato de celulosa, policarbonato, fluoruro de polivinilo u otros materiales sintéticos. Las membranas se sujetan a soportes especiales y están precedidos por prefiltros elaborados a partir de fibra de vidrio, para eliminar partículas de mayor tamaño.

Material

Bomba de vacío peristáltica de presión positiva

Filtro metálico millipore	Prefiltro de papel millipore	Medio de cultivo MEM
	Filtro membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm	PBS
	Filtro membrana de acetato de celulosa de 0.22 µm	

Técnica

Pasar la solución a través del filtro con presión positiva y recolectar el filtrado en recipientes estériles e identificar.

Observaciones





Cuando se trabaje con medios y soluciones, se examinarán los tubos bacteriológicos inoculados para observar la ausencia de posible contaminación.

Etiquetar materiales.

Siempre colocar las soluciones que pueden mantenerse a temperatura ambiente y regresar los frascos del medio de cultivo celular al refrigerador cuando se realice un trabajo o estudio.

En algunos casos se recomienda mantener algunas soluciones o el medio de cultivo a 37 °C en baño maría antes de procesar un cultivo celular y deberá usarse el medio tan pronto como sea posible ya que algunos componentes del medio son muy lábiles aún a temperatura ambiente.

Preguntas para discusión

1. ¿Cuál es la finalidad de agregar antibióticos a los medios de cultivo?
2. ¿Para qué se realiza la prueba de tioglicolato y tripticaseína soya?
3. ¿De qué manera se lleva a cabo la esterilización de los medios y por qué?

Bibliografía

- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, S.H. y Wood, B.R. 1978. Tratado de microbiología. 2ª ed., Salvat, México.
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
- Flint, J.S., Enquist, W.L., Krug, M.R., Racaniello, R.V. and Skalka, M.A. 2000. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control. American Society for Microbiology, USA.
- Cottral, E. G. 1978. Manual de métodos de estandarización en Microbiología Veterinaria. La Prensa Médica Mexicana, México.
- Jawetz, E., Melnick, J. y Adalberg, A.E. 2001. Microbiología Médica. 17ª ed., El Manual Moderno, México.
- Prescott, M.L., Harley, P.J. y Klein, A.D. 1999. Microbiología. 4ª ed., McGraw-Hill Interamericana, España.
- Willmer, N.E. 1965. Cell and tissues in culture: methods, biology y physiology. Vol. 1, Academic Press, Great Britain.





PRÁCTICA No. 5

Preparación de las diluciones del virus

Introducción

Para el estudio de los virus existen dos formas de cuantificarlos, la forma cualitativa y la cuantitativa. La cualitativa se lleva a cabo mediante la demostración de lesiones específicas en el huésped e indica si la muestra es o no positiva a la presencia del virus. La forma cuantitativa nos define por medio de diluciones del virus e indica la cantidad presente de éste en la muestra.

El método de diluciones más utilizado es el denominado diluciones decuples, dobles o logarítmicas, en el cual interviene un soluto y el diluyente. El diluyente más usado es la solución a base de triptosa fosfato broth (TPB), que es rico en energía, pero también se pueden usar el NaCl al 0.85%; solución salina a base de fosfatos (PBS); el caldo tripticaseína, también proporciona energía u otra solución apropiada para los virus.

Objetivo

Conocer las diferentes formas de diluir un virus para su cuantificación y su aplicación en el sistema huésped.

Material

Mechero Bunsen	10 tubos de ensaye con tapón de rosca estériles de 10.0 ml	Diluyente TPB 50.0 ml
	1 pipeta de 5.0 ml 10 pipetas de 1.0 ml	Virus 1.0 ml congelado a menos 70 °C
	Gradilla para tubos	Hipoclorito de sodio al 2%
	Bombilla de seguridad	
	Marcador	

Técnica

En esta práctica, el alumno practicará el manejo y dominio del material para medir cantidades relativamente pequeñas de los reactivos y bajo condiciones de esterilidad en la mesa de trabajo.

1. En una gradilla y con la serie de 10 tubos, se identificarán con la dilución correspondiente de 10^{-1} , 10^{-2} y así sucesivamente hasta 10^{-10} .
2. Con la pipeta de 5.0 ml, distribuir 4.5 ml de diluyente TPB a cada tubo.
3. Con la bombilla de seguridad y una pipeta de 1.0 de ml, agregar 0.5 ml de virus en el tubo número 1 que corresponde a la dilución 10^{-1} . Depositar la pipeta usada en la solución desinfectante.
4. Con otra pipeta estéril de 1.0 ml, diluir el virus con el diluyente mezclando unas cinco veces, sin hacer espuma y resbalando el líquido por la pared del tubo. Cuidar de no originar aerosoles dentro o fuera del tubo y pasar 0.5 ml de la dilución al segundo tubo, pero sin tocar el diluyente.
5. Con pipeta nueva, mezclar bien los reactivos del segundo tubo y pasar al tercer tubo 0.5 ml al tubo número 3, y así sucesivamente hasta el tubo número 10.
6. Es importante mencionar que todo el material utilizado y que entre en contacto con virus en la realización de cada práctica, sea depositado en el recipiente con desinfectante.

Ejercicio:





TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DILUCIÓN	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
DILUENTE (ml)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
VIRUS (suspensión viral)	0.5									

Preguntas para discusión

1. ¿Cuál es la importancia de saber preparar las diluciones?
2. ¿Qué efectos tendría una dilución mal realizada en la obtención de los resultados?
3. ¿Cómo se interpreta o demuestra que el virus en ésta práctica se ha diluido?

Bibliografía

Cottral, E.G. 1978. Manual de métodos de estandarización en Microbiología Veterinaria. La Prensa Médica Mexicana, México.
Cunnigham, H.C. 1971. Virología práctica. 3ª ed., Acribia, España.
Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
Mohanty, B.S. y Dutta, K.S. 1981. Virología Veterinaria. Interamericana, México.





PRÁCTICA No. 6

Inoculación en el embrión de pollo

Introducción

Con la necesidad de replicar algunos virus en particular, se han desarrollado técnicas de inoculación en el embrión de pollo de cinco a once días de edad, útiles para el diagnóstico, aislamiento, propagación y caracterización de los virus, así como para la producción de vacunas virales. Esto se logra gracias a las características propias del embrión y de sus tejidos que proporcionan un medio favorable para el cultivo de diferentes virus.

Libre de patógenos específicos (SPF specific pathogenic free), es un término aplicado a la granja productora de huevo SPF, significa que está libre de enfermedades y que ha sido negativa durante mucho tiempo, probada con procedimientos técnicos reconocidos de laboratorio y métodos clínicos, ya que muchos agentes infectantes pueden transmitirse a través del huevo. Una granja SPF debe ser negativa por serología a patógenos como *Mycoplasma*, *Salmonella*, enfermedad del Newcastle, Bronquitis infecciosa aviar, Laringotraqueitis aviar, enfermedad de Marek, infección de la Bolsa de Fabricio, Viruela aviar, Influenza aviar, Adenovirus aviar, entre otras. Dada esta condición, el embrión de pollo que procede de estas granjas es altamente recomendable para los trabajos en virología.

Para obtener óptimos resultados en el aislamiento y propagación de los virus, se deben considerar los siguientes aspectos: Vía de inoculación, edad del embrión la cual depende del virus que se va a inocular, temperatura de incubación, tiempo de incubación, volumen y dilución del inóculo, ya que al ser mayor el volumen a inocular podrá causar mayor mortalidad.

Dentro de las características que se deben tomar en cuenta en la replicación del virus en el embrión, permiten la identificación del agente mediante las lesiones producidas por lo que representa un importante valor diagnóstico, dentro de estas, las más importantes pueden ser: la presencia de hemorragias, congestión, enrollamiento, enanismo, presencia de pústulas, engrosamiento, fibrosis y edema de la membrana amniótica y de la membrana corioalantoidea, disminución del líquido amniótico, desarrollo anormal de las plumas, depósito de uratos en el estroma renal y presencia de cuerpos de inclusión.

Es importante demostrar la capacidad hemoaglutinante del líquido amniótico y alantoideo para diferenciar lesiones producidas por bacterias u otros agentes infecciosos.

Objetivo

Conocer las técnicas de inoculación en el embrión de pollo más usuales para el cultivo de algunos virus.

Material

Se usará el esquema del embrión de pollo como material didáctico para indicar y explicar las diferentes técnicas, dado que *in vivo* es difícil la demostración.

Técnica

Vías de inoculación del huevo

La cámara de aire permite el intercambio gaseoso y se distribuye dentro del huevo por la membrana corioalantoidea que está altamente vascularizada, sirve como órgano respiratorio y está situada en forma adyacente al cascarón. Durante el desarrollo de esta membrana, se forma la cavidad alantoidea y contiene el líquido alantoideo en aproximadamente 5- 10 ml. El embrión está rodeado por la membrana amniótica formando el saco amniótico con 1- 2 ml de líquido amniótico, el embrión está ligado al saco vitelino el cual se localiza aproximadamente en el centro del huevo y proporciona los nutrientes necesarios para su desarrollo.





En el siguiente cuadro encontramos virus se cultivan frecuentemente en el embrión de pollo.

Vía de inoculación	Edad del embrión	Virus	Signos de crecimiento
Cavidad alantoidea	9 a 11 días	Virus de la influenza aviar Virus de la enfermedad del Newcastle Virus de la bronquitis infecciosa aviar	Hemoaglutinación Muerte del embrión, atrofia, enanismo, hemorragias.
Membrana corioalantoidea		Virus de la viruela aviar Virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar	Pústulas
Saco vitelino	5 a 7 días	Virus de la encefalomiелitis aviar	Muerte

En la figura 3, se puede observar claramente las diferentes rutas de inoculación de virus en el embrión de pollo las cuales se describen a continuación.

Cavidad alantoidea

Es una ruta más importante y frecuentemente usada debido a su simplicidad en la inoculación del virus. Se emplean embriones de 9-11 días de edad y normalmente se inocular 0.1 ml de suspensión viral.

Técnica

- Inicialmente se realiza la observación del embrión en cuarto oscuro y se marca el límite de la cámara de aire y el sitio de inoculación, se perfora el cascarón en el sitio marcado y se inocular mediante una jeringa de 1.0 ml graduada en décimas y con aguja calibre 25G x 16 mm, ésta se introduce de forma recta y aproximadamente las primeras dos terceras partes de la longitud de la aguja con el fin de depositar el virus en la cavidad.
- El orificio se sella con pegamento blanco y se incuba el embrión a 37 °C en presencia de humedad y durante el tiempo de estudio.

Saco vitelino

Se realizan los procedimientos básicos de ovoscopia e identificación de estructuras, para esta vía se emplean embriones de cinco a siete días de edad, generalmente se inocular 0.1 ml del virus bajo estudio por cada embrión con un jeringa de 1.0 ml graduada en décimas, con aguja calibre 25Gx 16 mm. Observar figura 3.

Técnica

- Se realiza una perforación en la parte superior de la cámara de aire y con una jeringa de tuberculina graduada en décimas y con aguja del número 25G x 16 mm, se introduce en toda su longitud para depositar el inóculo.
- Inoculado el huevo, se sella y se incuba a 37 °C con presencia de humedad y tiempo necesarios para la replicación del virus.



Membrana corioalantoidea

Se emplean embriones de 9 a 11 días de edad y se inoculan con 0.1 ml de la dilución del virus. Es una vía apropiada para el aislamiento de virus de la viruela, virus de la Laringotraqueitis aviar, virus de la enfermedad de Aujeszky, entre otros que producen pústulas visibles. Ver figura 3.

Técnica

- En cuarto oscuro, con ayuda del ovoscopio y el perforador de huevo, se realiza un orificio fino en la cámara de aire, así mismo de forma cuidadosa en la cara lateral del huevo, pero sin lesionar la membrana corioalantoidea. Con ayuda de una cánula y la boca, ejercer presión negativa en el orificio localizado en la cámara de aire, lo suficiente para realizar una falsa cámara en la parte lateral del huevo o hasta que aparezca esta. Una vez realizada la cámara falsa a todos los embriones, estos se colocan de manera horizontal en relación a su eje longitudinal y sobre la charola de plástico o de cartón que los acompaña.
- Se Inocula con 0.1 ml de virus bajo estudio por embrión.
- Sellar el orificio con pegamento blanco y guardar en la incubadora a 37 °C en presencia de humedad y durante el tiempo requerido para facilitar la replicación viral.

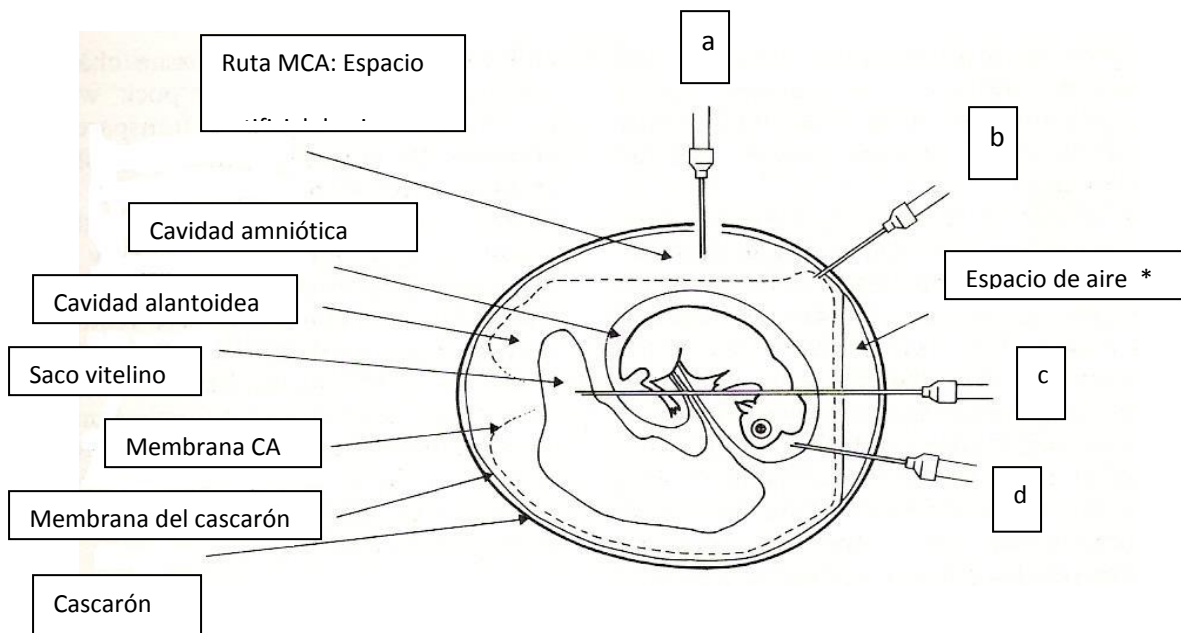


Figura 3. Esquema que muestra el desarrollo del embrión de pollo y las rutas más utilizadas para ser inoculado con virus: a) inoculación por membrana corioalantoidea MCA; b) inoculación por cavidad alantoidea CA; c) inoculación por saco vitelino SV ; d) inoculación en cavidad amniótica de uso poco frecuente. * Ausente en el huevo embrionado al preparar MCA. (Fuente: Animal Microbiology. Vol. 2. 1977. A. Buxton and G. Frazer. Blackwell Sci. Pub. LTD, UK.

La inoculación de un virus en huevo embrionado puede presentarse la muerte embrionaria, por lo que se debe ovoscopiar a las 24 horas posterior a la inoculación, La muerte ocurrida dentro de las primeras horas, estas se considerarán por traumatismo y las muertes ocurridas posterior a este periodo, serán atribuidas al virus y se colocarán a 4 °C para su posterior estudio del líquido, observación del embrión y sus estructuras.



Preguntas para discusión

1. ¿Cuáles son los aspectos a considerar para obtener óptimos resultados en el aislamiento y la propagación del virus en el embrión de pollo?
2. ¿Cuáles son las vías de inoculación más utilizadas y por qué?
3. ¿Menciona algunas de las lesiones que pueden estar presentes en el embrión, como resultado de la replicación viral?

Bibliografía

- Biberstein, L.E. y Chung, Z.E. 1990. Tratado de Microbiología Veterinaria. Acribia, España.
- Cottral, E.G. 1978. Manual de métodos estandarizados en Microbiología Veterinaria
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
- Jawetz, E., Melnick J. y Adalberg A.E. 2001. Microbiología Médica. 17ª ed., El Manual Moderno, México.
- Knipe, M.D. and Howley M.P. 2001. Fundamental Virology. 4ª ed., Lippincott Williams y Wilkins, United States of America.
- Maramosh, K. and Koprowsky, H. 1967. Methods in Virology. Vol. 1, Academic Press, United States of America.
- Merchant, I.A. y Parcker, R.A. 1980. Bacteriología y Virología Veterinarios. 3ª ed., Acribia, España.
- Valenzuela, P.A. 2000. Bioseguridad en huevos. Vol. II, No. 45, Nov-Dic. Acontecer Avícola, México.





PRÁCTICA No. 7

Titulación de virus por medio del método de Reed y Muench

Introducción

Los análisis biológicos de punto terminal 50 dependen de la medición de la muerte del animal, infección o efectos citopáticos en el cultivo de tejido, a través de una serie de diluciones. Para valorar la infectividad viral, se inoculan diluciones (decuples) del virus almacenado en un sistema de prueba (embrión de pollo, cultivos celulares, animales). Se cuantifica la infectividad de acuerdo a la observación de lesiones en el sistema huésped, en cultivos celulares efectos citopáticos expresándose como Dosis Infectante Cultivos de Tejidos TCID₅₀, en embrión de pollo Dosis Infectante Embrión DIE₅₀, o la muerte de animales experimentales Dosis Letal DL₅₀. El título se expresa como 50% de las dosis infectante, que es el recíproco de la dilución del virus que produce el efecto en el 50% de las células o animales inoculados.

Ejemplo: Registro de los datos al inocular cinco embriones por dilución:

No. de embriones inoculados	Dilución del virus	Resultados de la inoculación		Valor acumulado		Proporción infectada	Porcentaje infectado
		No. de infectados	No. de no infectados	Infectados	no infectados		
5	10 ⁻¹	5	0	16	0	16/16	100
5	10 ⁻²	5	0	11	0	11/11	100
5	10 ⁻³	4	1	6	1	6/7	85
5	10 ⁻⁴	2	3	2	4	2/6	33
5	10 ⁻⁵	0	5	0	9	0/9	0

La distancia proporcional entre las dosis 10⁻³ y 10⁻⁴ es donde se encuentra el punto terminal de infectividad del 50% de la población, ya que en la dilución 10⁻³ se observa al 85% de embriones afectados y en 10⁻⁴ el 33%, obteniéndose de la siguiente forma:

$$DIE_{50} = \frac{\% \text{ de infección por encima del } 50\% - 50\%}{\% \text{ de infección por encima del } 50\% - \% \text{ de infección por debajo del } 50\%}$$

$$\frac{85 - 50}{85 - 33} = \frac{25}{52} = 0.48$$

Esto es corregido multiplicando por el factor de dilución (log 10)
 = 0.48 x 1 = 0.48

= Dilución por encima del 50% infectado + la distancia proporcional corregida
 = 3.0 + 0.48 = 3.48

El título del virus es

$$DIE_{50} = 10^{3.48} DIE_{50}/0.1 \text{ ml. Si la dosis inoculada fue } 0.1 \text{ ml, el título de la suspensión viral será: } 10 \times 10^{3.48}$$

$$DIE_{50}/\text{ml} = 10^{4.48} DIE_{50}/\text{ml}$$

Bibliografía

Buxton, A. and Freaser, G. 1977. Animal Microbiology. Vol. 2, Blackwell, England.
 Mohanty, B.S. y Dutta, K.S. .1981. Virología Veterinaria. Interamericana, México.





- Reed, J.L. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. Vol. 27 (3): 493-497.
- Flint, J.S., Enquist W.L., Krug M.R., Racaniello R.V. and Skalka M.A. 2000. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control. Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Fourth Edition. Philadelphia, Pa. USA.





PRÁCTICA No. 8

Inoculación de un paramixovirus aviar

Introducción

Este virus, forma parte de la familia *Paramixoviridae*, los cuales son pleomórficos a esféricos, su envoltura contienen tres proteínas, dos son glicoproteínas, la hemaglutinina y la neuraminidasa, la otra proteína F es la responsable de la fusión celular, la tercera proteína M, no es glicosilada y forma parte de la capa interna de la envoltura.

Ataca principalmente a las aves de corral, en el humano puede causar ocasionalmente conjuntivitis o una enfermedad febril tipo influenza.

Para estudios epizootológicos y la gestión de programas de control de las cepas del virus de la enfermedad del Newcastle, se han dividido en cuatro grupos o patotipos, cada uno produce un cuadro característico de la enfermedad.

La enfermedad del Newcastle velogénico viscerotrópico, se describió en 1927 y se denominó ocasionalmente como enfermedad de Newcastle Asiática. Así mismo, la enfermedad del Newcastle velogénico neurotrópico, se describió en 1942 e inicialmente se denominó enfermedad del Newcastle Americana, la enfermedad del Newcastle mesogénica, originalmente se describió en 1946 y algunas de estas cepas se utilizaron como vacunas en aves.

La otra forma de enfermedad del Newcastle lentogénica se describe en 1948 y estas cepas se utilizan para la vacunación masiva en las aves jóvenes.

Para distinguir los cuatro patotipos se emplean los siguientes criterios: a) determinar el tiempo mínimo de la muerte del embrión de pollo por dosis letal; b) Patogenicidad en pollos de ocho semanas de edad; c) Formación de placas en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo; d) Patogenicidad por inoculación intracerebral en el embrión de pollo; e) Rangos de elusión viral; f) Termoestabilidad de la hemoaglutinación y g) Aglutinación de eritrocitos de mamífero.

El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante el aislamiento del virus a partir del bazo, cerebro o pulmón, por inoculación vía cavidad alantoidea en huevo embrionado libre de patógenos específicos (SPF) de 10 días de edad, en los cuales se alcanza un título viral elevado. Una característica para distinguir a los cuatro patotipos al replicarse el virus en el embrión de pollo, es que al inocular por vía corioalantoidea en embrión de 10 días de edad, los patotipos velogénico y mesogénico causan mortalidad embrionaria entre las 48 y 72 horas y las cepas lentogénicas la producen entre las 88 y 128 horas postinoculación respectivamente.

Objetivo

Demostrar la presencia del virus en líquido alantoideo mediante la prueba de hemoaglutinación.

Material

El siguiente material se recomienda para cada equipo o mesa de trabajo.

Bioseguridad: Bata,	Mechero Bunsen	Vial con 1.0 ml de virus de la Enfermedad del Newcastle
Cubre boca, cofia, guantes para cirujano y goggles	6 tubos Pirex con tapón de rosca estériles	TPB 35.0 ml
Una Incubadora a 37 °C (por grupo)	7 Pipetas de vidrio de 1.0 ml y una pipeta de 5.0 ml estériles	





Un ovoscopio (por grupo)	Una jeringa de 1.0 ml graduada en décimas, calibre 25Gx16mm	30 embriones de pollo SPF de 9-11 días de edad
Un perforador de huevo (por grupo)	Un frasco con torundas de algodón con alcohol al 70%	Recipiente con hipoclorito de sodio al 2%, 1.0 ml
	Lápiz marcador, pegamento blanco.	

Técnica

1. Ovoscopiar el huevo, marcar el límite de la cámara de aire y el sitio de inoculación.

Dilución del virus

2. Identificar con lápiz los tubos con las diluciones a utilizar: 10^{-1} a 10^{-6} . Distribuir 4.5 ml de TPB en cada tubo en presencia de mechero Bunsen.
3. Con pipeta de 1.0 ml, depositar 0.5 ml de virus en el primer tubo y depositarla en el recipiente con desinfectante.
4. Con otra pipeta estéril, diluir el virus cinco veces y pasar al segundo tubo 0.5 ml de virus a través de la pared del tubo. Es importante no hacer espuma ni aerosoles dentro y fuera del tubo. Descartar la pipeta en el desinfectante.
5. Repetir este proceso del segundo tubo y así sucesivamente hasta el tubo número seis. Descartar el 0.5 ml de virus sobrante de la última dilución en el desinfectante.

Inoculación del virus

6. Desinfectar el sitio de inoculación con torunda en alcohol al 70% y realizar un pequeño orificio en el cascarón con el perforador de huevo.
7. Con la jeringa y aguja calibre 25G x 16 mm, inocular a un grupo de seis embriones por dilución, con 0.1ml de virus diluido por embrión por la vía cavidad alantoidea, iniciando con la dilución mayor a la menor.
8. Sellar con pegamento blanco el punto de inoculación.
9. Incubar el embrión inoculado durante 72 horas a 37 °C en presencia de alta humedad relativa.
10. Ovoscopiar a las 24 horas post inoculación y registrar las muertes, pero descartar las ocurridas dentro de las primeras 24 horas.

Continuación de la práctica:

Preparación de glóbulos rojos de ave

Estos se preparan un día antes del término de incubación del embrión.

Material

Centrífuga	Jeringa de 10.0 ml con aguja	PBS pH 7.2
Balanza de dos platos	Pipetas Pasteur	Anticoagulante Alsever pH 7.2
Refrigerador	Pipetas de 5.0 ml	Pollo de 2 semanas de edad
	Bombillas de seguridad	Torundas con alcohol al 70%
	Tubos de ensaye de 13 x 100 mm estériles	





Técnica de hemoaglutinación

1. Sangrar un ave de 4 semanas de edad por punción cardíaca, usar proporcionalmente una parte de anticoagulante y una de sangre.
2. Centrifugar la sangre a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos y decantar el sobrenadante. Se agrega PBS en proporción de 3:1 volumen de sangre, con una pipeta, mezclar suavemente y centrifugar, este paso se repite dos veces más.
3. Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 10% en PBS y guardar en refrigeración a 4 °C.
4. Transcurrido el periodo de incubación, con tijeras romper la parte del cascarón que forma la cámara de aire de todo el embrión inoculado.
5. En una placa de vidrio, cuadrículada de 2x2 cm depositar aproximadamente 0.03 ml de glóbulos rojos y 0.03 ml de líquido alantoideo de cada embrión.
6. Mezclar circularmente durante 30 a 60 segundos para observar la presencia de aglutinación de los eritrocitos.
7. Anotar los resultados obtenidos en la prueba.
8. Anotar los resultados y calcular el título de virus por el método de Reed y Muench.

Interpretación

En una reacción positiva se observa la formación de grumos por la aglutinación de eritrocitos (hemoaglutinación).

Todo material utilizado se deberá mantener en hipoclorito durante 24 horas y posteriormente se deberá esterilizar en autoclave. El embrión se envía a incineración posteriormente.

Preguntas para discusión

1. ¿Cuáles son las características más importantes de las cepas de la Enfermedad de Newcastle, y por qué han recibido esa denominación?
2. ¿Cómo se calcula el título viral para la enfermedad de Newcastle?
3. Con fundamento teórico ¿Qué significa hemoaglutinación?
4. Realiza un esquema de la prueba
5. Realiza el cálculo de resultados mediante la escala de Reed y Muench.

Bibliografía

- Calnek, W.B., Barnes J.H., Beard W.C., Mc Douglas R.L. y Saif M.Y. 1997. Diseases of poultry. 10a ed., Iowa State University Press, USA.
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
- Mosqueda, T.A. y Lucio, M.B. 1985. Enfermedades comunes de las aves domésticas. Universidad Nacional Autónoma de México, México.





PRÁCTICA No. 9

Inoculación de un coronavirus aviar

Introducción

Pertenece a la familia *Coronaviridae* y se replica en el citoplasma donde se acumulan en vesículas lisas. Los nuevos virus comienzan a observarse 3-4 horas después de la infección, alcanzando una producción máxima por célula en 12 horas a 37 °C, durante su replicación, existen constantemente errores en el copiado por lo tanto origina variación en su patogenicidad y antigenicidad lo que le permite estar de forma prevalente en las aves, este fenómeno se observa con frecuencia cuando se vacuna en forma masiva a las aves con virus vivo.

Es una enfermedad altamente transmisible y de diseminación rápida entre las aves susceptibles, a las 36 horas alcanza una morbilidad del 100%, el virus causa tres aspectos patológicos importantes, en aves jóvenes causa infecciones respiratorias que se complican con agentes bacterianos secundarios, en gallinas adultas la baja de postura así como una baja de la calidad interna y externa del huevo y en aves jóvenes como en adultas problemas renales.

El lugar primario de replicación es la tráquea y posteriormente en los pulmones, riñones, en los ovarios y en el tejido linfóide.

El virus de bronquitis infecciosa crece en el embrión de pollo de 9-11 días de edad, puede observarse el 90% de sobre vivencia hasta el día 19 posterior a la inoculación en donde se ha encontrado enanismo de los embriones y enroscamiento de los mismos a lo que se ha denominado forma de balón.

Objetivo

Reconocer las lesiones producidas por el virus como resultado de su replicación en el embrión.

Material

Para cada equipo de trabajo

Bioseguridad: bata, cubreboca, cofia, guantes para cirujano, goggles	Mechero Bunsen	Vial con 1.0 ml de virus de la Bronquitis infecciosa aviar
Una Incubadora a 37°C (por grupo)	6 tubos Pirex con tapón de rosca estériles	TPB 35.0 ml
	7 Pipetas de vidrio de 1.0 ml y una pipeta de 5.0 ml estériles	30 embriones de pollo SPF de 9-11 días de edad
Un ovoscopio (por grupo)	Una jeringa de 1.0 ml graduada en décimas, calibre 25Gx16mm	Recipiente con hipoclorito de sodio al 2%, 1 L.
Un perforador de huevo (por grupo)	Un frasco con torundas de algodón con alcohol al 70%	
Termómetro ambiental de 0-50 °C (por grupo)	Lápiz marcador, pegamento blanco.	

Técnica

1. Ovoscopiar el huevo, marcar el límite de la cámara de aire y el sitio de inoculación.





Dilución del virus

2. Identificar con lápiz tubos con las diluciones a utilizar: 10^{-1} a 10^{-6} . Distribuir 4.5 ml de TPB en cada tubo en presencia de mechero Bunsen.
3. Con pipeta de 1.0 ml, depositar 0.5 ml de virus en el primer tubo y depositarla en el recipiente con desinfectante.
4. Con otra pipeta estéril, diluir el virus cinco veces y pasar al segundo tubo 0.5 ml de virus a través de la pared del tubo. Es importante no hacer espuma ni aerosoles dentro y fuera del tubo. Descartar la pipeta en el desinfectante.
5. Repetir este proceso del segundo tubo y así sucesivamente hasta el tubo número seis. Descartar el 0.5 ml de virus sobrante de la última dilución en el desinfectante.
6. Desinfectar el sitio de inoculación con torunda en alcohol al 70% y realizar un pequeño orificio en el cascarón con el perforador de huevo.

Inoculación

7. Con la jeringa y aguja calibre 25G x 16 mm, inocular a un grupo de seis embriones por dilución, con 0.2ml de virus diluido por embrión por la vía cavidad alantoidea, iniciando con la dilución mayor a la menor.
8. Sellar con pegamento blanco el punto de inoculación.
9. Incubar el embrión inoculado durante 7 días a 37°C en presencia de alta humedad relativa.
10. Ovoscopiar a las 24 horas post inoculación y registrar las muertes, pero descartar las muertes ocurridas dentro de las primeras 24 horas.
11. Finalizado el periodo de incubación, retirar el embrión de la incubadora y abrir el huevo con tijeras y pinzas de disección.
12. Extraer al embrión suavemente, iniciar con el grupo control hasta la dilución menor, depositarlo sobre una placa de vidrio con el objeto de observar los cambios morfológicos del embrión.
13. Anotar los resultados y calcular el título del virus por el método de Reed y Muench.

Todo material utilizado se deberá mantener en hipoclorito durante 24 horas y posteriormente se deberá esterilizar en autoclave. El embrión se envía a incineración posteriormente

Preguntas para discusión

1. Menciona los efectos del virus sobre el embrión.
2. Comentar la DIE_{50} obtenida del virus.
3. Realice un esquema de la prueba.
4. ¿De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba describa cuales son las posibles causas de no tener resultados homogéneos?

Bibliografía

- Calnek, W.B., Barnes J.H., Beard W.C., Mc Douglas R.L. y Saif M.Y. 1997. Diseases of poultry. 10a ed., Iowa State University Press, USA.
- Escorcia, M. 2000. La persistencia viral de bronquitis infecciosa y su importancia de generación de variantes antigénicas. Memorias. Enfermedades respiratorias aviares, Cancún, Quintana Roo. México.
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
- Marrufo, V.D., Lucio, D.E. y González E.E. 2000. Bronquitis Infecciosa: Nuevas alternativas de Control. Tecnología Avícola, No. 148.





PRÁCTICA No. 10

Inoculación de un herpesvirus aviar

Introducción

La viruela aviar es una enfermedad viral común de las aves domésticas causada por un *poxvirus* que contiene ADN, produce lesiones cutáneas en las partes carentes de plumas que se observan como nódulos blancos y amarillentos que al evolucionar se convierten en costras de color café oscuro, como lesiones fibrinonecroticas y proliferativas de tipo diftérico en la mucosa oral y respiratoria. Es un virus que se transmite a través de vectores artrópodos, se presenta en cualquier edad de las aves.

El aislamiento del virus se realiza en embrión de pollo o en cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo a partir de lesiones cutáneas o diftéricas vía membrana corioalantoidea MCA en donde se replica y origina placas o pústulas blanco amarillentas compactas y proliferativas en seis a siete días de inoculado el virus y pueden ser locales o difusas, engrosamiento y edema de la membrana, y en ocasiones la muerte embrionaria. Estas placas también se presentan al inocular el virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar. En el examen histopatológico de la membrana se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.

Objetivo

Demostrar y reconocer la replicación del virus, mediante la observación de lesiones producidas por el virus.

Material

Para cada equipo de trabajo:

Bioseguridad: Bata, cubre boca, cofia, guantes para cirujano y goggles	Un mechero Bunsen	Vial con 1 ml de virus de la Viruela aviar
Una Incubadora a 37°C (por grupo)	6 tubos Pirex con tapón de rosca estériles	TPB 35 ml
Un ovoscopio (por grupo)	7 Pipetas de vidrio de 1.0 ml y una pipeta de 5.0 ml estériles	30 embriones de pollo SPF de 9-11 días de edad
Un perforador de huevo (por grupo)	Una jeringa de 1.0 ml graduada en décimas, calibre 25Gx16mm	Recipiente con hipoclorito de sodio al 2%, 1.0 L.
Termómetro ambiental de 0 a 50°C (por grupo)	Un frasco con torundas de algodón con alcohol al 70%	
	Lápiz marcador, pegamento blanco.	
	Dos cánulas de hule latex,	

Técnica

1. Ovoscopiar el huevo, marcar el límite de la cámara de aire y el sitio de inoculación.

Dilución del virus

2. Identificar con lápiz tubos con las diluciones a utilizar: 10^{-1} a 10^{-6} . Distribuir 4.5 ml de TPB en cada tubo en presencia de mechero Bunsen.
3. Con pipeta de 1.0 ml, depositar 0.5 ml de virus en el primer tubo y depositarla en el recipiente con desinfectante.





4. Con otra pipeta estéril, diluir el virus cinco veces y pasar al segundo tubo 0.5 ml de virus a través de la pared del tubo. Es importante no hacer espuma ni aerosoles dentro y fuera del tubo. Descartar la pipeta en el desinfectante.
5. Repetir este proceso del segundo tubo y así sucesivamente hasta el tubo número seis. Descartar el 0.5 ml de virus sobrante de la última dilución en el desinfectante.

Técnica de realización de la cámara falsa

6. Se recomienda, pero no es necesario mantener un grupo control de seis embriones sin inocular para observar las diferencias entre estos y los embriones inoculados.
7. En cuarto oscuro, por ovoscopia revisar el embrión viable, identificarlos con la dilución correspondiente y con lápiz marcar un sitio en la superficie de la cámara de aire y otra señal en el lado lateral o parte media del huevo.
8. Desinfectar los dos sitios marcados con algodón en alcohol al 70%.
9. Con ayuda del ovoscopio y el perforador de huevo, realizar un pequeño orificio en la cámara de aire, así mismo y de forma cuidadosa en la cara lateral del huevo sin producir lesión en la membrana corioalantoidea.
10. Con ayuda de una cánula, ejercer presión negativa con la boca en el orificio localizado en la cámara de aire, lo suficiente hasta que aparezca la presencia de una falsa cámara en la parte lateral del huevo o sea en el segundo orificio. Una vez realizada la cámara falsa a todos los embriones, estos se colocan de manera horizontal en relación a su eje longitudinal y sobre la charola de plástico.

Inoculación

11. Inocular el virus con una aguja para tuberculina graduada en décimas calibre 25G x 16 mm a una serie de seis embriones por dilución, iniciar con la dilución mayor a la menor con 0.2 ml de virus por la vía membrana corioalantoidea.
12. Sellar los dos orificios con pegamento blanco y guardar la incubadora a 37 °C en presencia de humedad elevada durante siete días para facilitar la replicación del virus.
13. Posterior al periodo de incubación, retirar el embrión de la incubadora y abrir este con tijeras y pinzas de disección.
14. Extraer al embrión suavemente y recolectar la membrana corioalantoidea, esta se examinará para detectar la formación de pústulas.
15. Anotar los resultados para calcular el título del virus por el método de Reed y Muench.

Observaciones

La presencia de una o más pústulas en el embrión inoculado se interpreta como positivo al virus de la viruela aviar.

Todo material utilizado se deberá mantener en hipoclorito durante 24 horas y posteriormente se deberá esterilizar en autoclave y enviar el embrión a su incineración.

Preguntas para discusión

1. ¿Cuáles son las características de la enfermedad?
2. Realiza un esquema de la práctica.
3. ¿Cuál fue el título de la suspensión viral calculado por el método de Reed y Muench?.
4. Interprete sus resultados obtenidos.





Bibliografía

- Calnek, W.B., Barnes J.H., Beard, W.C., Mc Douglas, R.L. y Saif M.Y. 1997. Diseases of poultry. 10a ed., Iowa State University Press, USA.
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
- Mosqueda, T. y Lucio, M.B. 1985. Enfermedades comunes de las aves domésticas. Universidad Nacional Autónoma de México, México.





PRÁCTICA No. 11

Cultivo celular

Introducción

Los virus como parásitos intracelulares obligados en el laboratorio se han cultivado en sistemas celulares, embrión de pollo y en animales de laboratorio. Los cultivos celulares tienen gran importancia en la virología diagnóstica, en la investigación, inmunología, ingeniería de proteínas como el interferón para su aplicación médica, entre otras.

El cultivo de los tejidos se desarrolló a partir del siglo XIX, primeramente se mantuvieron células de embrión de pollo en solución salina durante varios días *in vitro* y en esta forma se establecieron las bases para la realización de cultivos celulares, determinar los requerimientos nutritivos, posteriormente se usaron los antibióticos para prevenir la contaminación bacteriana y en etapa más reciente se estableció la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales.

Por cultivo celular se entiende el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Un cultivo celular supone una disgregación celular por medios enzimáticos o mecánicos y el producto o suspensión celular, esta se puede cultivar como monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivos permite su propagación, aumentando notablemente su masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones.

Los tres tipos de cultivo celulares son: el *cultivo primario*, se obtiene directamente del tejido original, y a partir de este, los que se pueden subcultivar se conocen como cultivos secundarios, dentro de ellos se encuentran las líneas celulares *diploides* y las *establecidas*, en este último tipo se puede citar dos líneas que derivan de un proceso carcinogénico como HeLa del carcinoma de cervix humano y la HEp-2 de carcinoma laríngeo humano, pero no todas derivan de un proceso carcinogénico, como las células PK-15 de riñón de cerdo, MDBK de riñón de bovino, MDCK de riñón de perro, BHK de riñón de hamster. Un cultivo establecido puede cultivarse indefinidamente y puede conservarse en nitrógeno líquido.

Objetivo

Demostrar el crecimiento celular *in vitro* de fibroblastos de embrión de pollo.

Material

Bioseguridad: Bata, cubre boca, cofia, guantes estériles de cirujano	Microplaca de fondo plano estéril, botellas de vidrio o plástico de 25 cm ²	Embrión de pollo SPF de 9-11 días de edad
Incubadora de huevo a 37°C	Matraz de tripsinización	Medio MEM
Campana de flujo laminar horizontal	Cámara de Neubauer	Tripsina-versene
Incubadora de inyección de CO ₂	Tubos con tapón de rosca	Suero fetal bovino
Microscopio de luz normal	Embudos de vidrio con gasa	Cloruro de potasio
Microscopio de luz invertida	Pinzas de disección, Tijeras rectas y curvas	Carbonato de sodio
Tanque de CO ₂	Vasos de precipitado, Tubos de centrifuga	Gentamicina, Penicilina estreptomycinina
Regulador de presión para el CO ₂	Filtros de 22 micras	Hipoclorito de sodio: 2% 1 L.
Multipipeta automática	Pipetas Pirex	





Filtro prensa millipore	Probetas Pirex	
Centrífuga clínica	Cubreobjetos Jeringas de tuberculina	

Técnica

1. En cuarto oscuro, ovoscopiar cinco embriones de 9 a 11 días de edad.
2. Todo el trabajo se realiza en campana de flujo laminar horizontal y con material estéril.
3. Desinfectar el huevo con una torunda de algodón con alcohol al 70%.
4. Remover con tijeras el cascaron en la región al borde de la cámara de aire.
5. Con pinzas de disección, retirar el embrión y colocarlo en una caja de Petri.
6. Con tijeras, eliminar la cabeza, extremidades y las vísceras.
7. Enjuaga los embriones con PBS a 37°C y descartar el sobrenadante. Repite dos veces este paso.
8. Transferir los embriones a otra caja de Petri, y triturar con tijeras el cuerpo del embrión hasta disgregarlo.
9. Transferir el tejido macerado al matraz de tripsinización y agrega PBS, cantidad suficiente para ser lavado.
10. Agita suavemente y deja reposar aproximadamente cinco minutos. Decantar el sobrenadante y repite este paso por segunda vez hasta obtener claridad del PBS.
11. Por cada embrión utilizado, agregar aproximadamente 10 a 20 ml de tripsina- verseno a 37°C y una barra magnética.
12. Mantener en agitación suave y constante en una agitador magnético aproximadamente de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente de laboratorio.
13. Posteriormente, filtrar el sobrenadante a través de un embudo con doble gasa.
14. Agregar al sobrenadante suero de ternera o fetal bovino en un 10% en relación al volumen obtenido.
15. Distribuir el volumen obtenido en tuyos de ensayo estériles y centrifugar el sobrenadante a 1,500 rpm durante 10 minutos.
16. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en proporción 1:10 con medio MEM más suero fetal de bovino al 5 o al 10%.
17. Disgregar las células con pipeta y bombilla de seguridad suavemente.

Conteo celular

Objetivo

Realizar el conteo de células y posteriormente el sembrado.

Técnica

1. A partir de la suspensión original, realizar una dilución 1:10 ó mayor si es necesario (hasta tres diluciones), con medio de cultivo MEM.
2. Agregar 1.0 ml de colorante tripan azul 0.5% a cada dilución.
3. Mezclar y llenar la cámara de Neubauer con la suspensión celular de la dilución seleccionada para el conteo celular.
4. Al microscopio de luz normal, contar individualmente las células presentes en las cuatro esquinas de la cámara. Los grumos son contados como una célula y no se cuentan las células de color azul.
5. Cálculos:

$$\frac{\# \text{ total de células}}{4} = \# \text{ de células} \times \text{la dilución,} \times \text{la dilución del colorante,} \times \text{factor dilución de la cámara}$$

= Numero de células por ml





Siembra

6. El número de 800,000 a 1,000,000 de células/ml es el recomendable para procesos de cultivo celular. Así, se deberá ajustar la cantidad de células en ml para la suspensión celular requerida o sea el volumen total final suspendidas en medio de cultivo MEM más 5 a 10% de suero fetal de bovino o de ternera y la concentración de gentamicina.
7. Una vez estandarizada la suspensión celular, sembrar 0.2 ml en cada pozo de una microplaca de fondo plano, y 12.0 ml en un frasco estéril de vidrio o plástico de fondo plano.
8. Incubar a 37°C en atmósfera de CO₂ al 10% con abundante humedad.

Interpretación

La confluencia de crecimiento del monoestrato se observará a las 24 horas bajo microscopio de luz invertida.

Preguntas para discusión

1. Define un cultivo celular.
2. Menciona la importancia de realizar cultivos celulares en medicina veterinaria.
3. ¿Qué es la tripsinización?
4. ¿Mencione que es un cultivo celular primario y cuáles son las ventajas que tiene?
5. ¿Para qué nos sirve realizar un conteo celular?
6. Realice el ejercicio de conteo celular de acuerdo a la técnica descrita.

Bibliografía

- Alberts, B., Bray, D., Lewis J., Raff M. y Roberts K. 1996. Biología molecular de la célula. 3ª ed., Omega, España
- Davidson, I. y Henry, B.J. 1978. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6ª ed. Salvat, España.
- Fenner, F., McAuslan, R.B., Mims, A.C., Sambrook, J. y White, O.D. 1974. The biology of animal viruses. 2nd ed., Academic Press, USA.
- Flint, J.S., Enquist, W.L., Krug M.R., Racaniello, R.V. and Skalka M.A. 2000. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control. American Society for Microbiology, USA.
- Prescott, M.L., Harley, P.J. y Klein, A.D. 1999. Microbiología. 4ª ed., McGraw-Hill Interamericana, España.
- Reigosa, A.M. y Rodríguez N.A. 1999. Historia de los cultivos celulares. www.ciencia-hoy.retina.ar





PRÁCTICA No. 12

Formación de placas en cultivo celular primario

Introducción

Para realizar el conteo de partículas virales existen dos mecanismos: los físicos como la microscopia electrónica, hemoaglutinación, inmunoensayo unido a enzimas (ELISA), radio inmunoensayo (RIA), entre otros y el método biológico, así, la replicación del virus en las células puede ser identificada de diversas formas: a) el desarrollo de efecto citopático, es decir la alteración morfológica de la célula, el cual es inducido por el virus y consiste en lisis celular o necrosis, la formación de inclusiones o de células gigantes y la vacuolización citoplasmática. b) La identificación de proteínas desarrolladas por el virus como la hemaglutinina, c) el fenómeno de interferencia por un virus no citopatógeno para inhibir la replicación e inducción del efecto citopático al agregar un segundo virus y d) la transformación celular por un virus oncogénico, acompañada ordinariamente por la pérdida de inhibición por contacto y el agrupamiento de células en focos separado.

El efectos citopático pueden ser identificado en cultivos no fijados y no teñidos con baja iluminación del microscopio, pero la fijación de la monocapa ayuda a tener mayor detalle en el diagnóstico y de esta forma se pueden observar cuerpos de inclusión o células gigantes.

Los cuerpos de inclusión formados durante la replicación viral tienen afinidad por los colorantes ácidos y pueden encontrarse en el citoplasma de las células nerviosas, denominados cuerpos de Negri, para el diagnóstico de la rabia; en el núcleo como el virus de la laringotraqueitis, o en ambos como el virus del sarampión.

El análisis más ampliamente utilizado para el virus infectante es la demostración de formación de placas al inocular monocapas con diluciones adecuadas del virus.

Objetivo

Identificar el efecto citopático dada la replicación del virus de la enfermedad de Gumboro mediante la formación de placas.

Material

Bioseguridad: Bata, cubre boca, cofia, guantes de cirujano estériles	Microplaca de cuatro pozos estéril	Embrión de pollo SPF de 9-11 días de edad
Campana de flujo laminar horizontal	Matraz de tripsinización, Probetas	Suspensión de fibroblastos en medio MEM, Medio MEM
Incubadora de huevo a 37°C	Vasos de precipitado	Suero de bovino
Microscopio de luz normal	Tubos de vidrio con tapón de rosca 15x125 mm	TPB
	Pipetas de 1.0 a 10.0 ml	Gentamicina
	Tijeras rectas	SSB (pH 7.2)
	Bombilla de seguridad	Vacuna comercial
		Carboximetil celulosa
		Metanol al 20%
		Hipolorito de sodio al 2%
		Cristal violeta al 1%





		Alcohol al 70%
--	--	----------------

Técnica

1. Ya preparada una suspensión de fibroblastos de embrión de pollo con la concentración celular indicada por cada ml en medio de cultivo MEM, como se señaló anteriormente,
2. Distribuir 2.0 ml de suspensión celular en microplacas de cuatro posos con tapa.
3. Incubar las placas a 37°C en presencia de atmósfera de CO₂ durante 72 horas y en alta humedad.
4. Reconstituir el virus y diluirlo por dilución decimal.
5. Retirar el medio de cultivo de los pozos e Inocular el virus diluido con 0.5 ml por pozo, utilizar dos pozos por dilución.
6. Esperar 60 minutos a 37 cultivo suplementando con 1% de suero y con 1.5% de carboximethyl celulosa,
7. Incubar a 37°C, en presencia de CO₂ y humedad abundante nuevamente.
8. A las 48 o 72 horas post inoculación, observar el monoestrato celular para detectar la formación de placas bajo el microscopio de luz invertida.
9. Lavar la monocapa con solución salina buferada PBS de forma suave y eliminar el sobrenadante.
10. Fijar la monocapa con 1% de cristal violeta en 20% de metanol por 5 minutos para observar al microscopio invertido o de luz normal el número de placas formadas por dilución viral.
11. Calcular el título del virus por el Método de Reed y Muench e interpretar los resultados bajo la expresión en unidades formadoras de placas UFP en cultivo celular; DICT₅₀/ml.

Preguntas para discusión

1. ¿Cuáles son las principales lesiones encontradas en cultivo de fibroblastos en la replicación viral?
2. Calcula la Dosis Infectante Cultivo de Tejidos₅₀ mediante el método de Reed y Muench.

Bibliografía

- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. *Virología Veterinaria*. Acribia, España.
- Flint, J.S., Enquist, W.L., Krug, M.R., Racaniello, R.V. and Skalka, M.A. 2000. *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control*. American Society for Microbiology, USA.
- Jawetz, E., Melnick, J. y Adalberg, A.E. 2001. *Microbiología Médica*. 17ª ed., El Manual Moderno, México.





PRÁCTICA No. 13

Congelación y descongelación de células

Introducción

Las líneas celulares tienden a sufrir continuamente cambios al ser cultivadas repetidamente y esto puede ser un inconveniente al trabajar de forma experimental, por lo tanto se practica la congelación, esto ayuda a mantener sus características constantes. Los agentes que se usan para este método son la glicerina o dimetilsulfoxido (DMSO), crioprotectores o aditivos para que las células puedan sobrevivir. Generalmente se usan criotubos para congelar las células y pueden ser mantenidos en nitrógeno líquido a menos 196 °C durante varios años sin que las características celulares se alteren, así al ser descongeladas, éstas pueden seguirse cultivando.

Se recomienda conservar muestras de células en alícuotas con el fin de minimizar la acumulación de cambios genéticos en las líneas continuas, esto evitara el cambio y la transformación de líneas finitas y la pérdida accidental de una línea por muerte o contaminación.

La suspensión celular con alta concentración, debe congelarse lentamente (1°C/min), cuando las células alcanzan una temperatura inferior a menos 50°C previamente almacenadas, se transfieren rápidamente a nitrógeno líquido y sin deterioro celular apreciable. El almacén de células a menos 80°C es posible, aunque se detecta deterioro de las células a las pocas semanas o meses post congelación.

La descongelación de las células se realiza rápidamente en agua a 37-40°C (baño María), diluyendo la suspensión y eliminando el agente preservante con la máxima rapidez.

Objetivo

Conocer el método de congelación de células más usado.

Material

Bioseguridad: Bata, cubre boca, cofia, guantes estériles	Micropipeta de 5-50, 50-200 y 200-1000 µl	Medio MEM
Campana de Flujo laminar horizontal	Puntas de Plástico de 5-200 y 200-1000 µl	Suero Fetal de Bovino
Tanque de nitrógeno líquido	Crioviales 1.5 ml	Suspensión Celular
Centrífuga clínica	Lápiz marcador	Dimetilsulfoxido DMSO
		Tripsina- versene

Técnica

1. Cultivo celular de 24 horas de edad, confluyente.
2. Tripsinizar el monoestrato y agregar medio de cultivo más suero fetal de bovino.
3. Centrífuga las células durante 3 minutos a 1,000 r.p.m. para eliminar la tripsina.
4. Descartar el sobrenadante, tener cuidado de no extraer el paquete celular.
5. Resuspender las células en 5.0 ml de medio MEM más suero fetal bovino al 20%.
6. Guardar en refrigeración durante una hora. en la parte más fría y lentamente se
7. Agrega DMSO al 7% y homogeneizar las células, así, la suspensión celular debe tener aproximadamente una concentración celular de 10^5 a 10^6 células por ml.
8. Distribuir 1.2 ml de células por criotubo y cerrar fuerte.
9. Identificar el tipo de célula y la fecha en los criotubos e introducir estos en una caja pequeña de poliuretano con pared de 1 cm de grueso.





10. Congelar directamente a menos 70°C. Bajo esta condición, progresivamente la temperatura baja gradualmente de grado en grado por minuto).
11. Posteriormente se pasan y conservan en nitrógeno líquido a menos 196°C

Técnica de descongelación

1. Retirar del tanque de nitrógeno líquido un criotubo con células y colocar rápidamente el criotubo a baño de María de 38 a 40°C.
2. Resuspender suavemente en 1.0 ml de medio MEM con suero fetal de bovino al 10%.
3. Centrifugar las células a 700 r.p.m. durante 3 a 5 minutos.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Preparar 15 ml de medio MEM más suero fetal de bovino al 10% y resuspender el paquete celular en 1.0 ml de medio. Homogeneizar y pasarlo a 1.0 ml de medio = 2.0 ml, homogeneizar y agregar 2.0 ml de medio = 4.0 ml, de aquí con 4.0 ml de medio = 8.0 ml y de aquí agregar el resto del medio 7.0 ml de medio = 15.0 ml y depositarlo en una botella de 25 cm² con tapón de rosca estéril.
6. Incubar las células a 37°C en presencia de CO₂ y en presencia de alta humedad.
7. Revisar las células diariamente y continuar con los subcultivos según las necesidades del investigador.

Preguntas para discusión

1. Menciona la importancia de realizar la congelación de líneas celulares.
2. ¿Qué función tiene la glicerina y el DMSO en la congelación de células?
3. ¿Cuál es la razón de este método de reconstitución celular?

Bibliografía

- Cottral, E.G. 1978. Manual de métodos estandarizados en Microbiología Veterinaria
Cunnigham, H.C. 1971. Virología práctica. Acribia, España.
Reigosa, A.M. y Rodríguez N.A. 1999. Historia de los cultivos celulares. www.ciencia-hoy.retina.ar





PRÁCTICA No. 14

Preservación de los virus

Introducción

Los virus como parásitos obligados intracelulares no pueden cultivarse fuera de una célula, para su cultivo en el laboratorio se usa el cultivo celular, el embrión de pollo y los animales de laboratorio.

Para su conservación se conocen dos métodos: 1) por congelación y 2) mediante la liofilización. La mayoría de los virus resiste la congelación entre menos 10 y menos 20°C, pero conforme se disminuye esta, su preservación es mejor y por mucho más tiempo de menos 80°C o hasta menos 196°C.

El uso de la glicerina o de dimetilsulfoxido al 5% funcionan como crioprotectores para conservar células infectadas con virus y estos puedan sobrevivir. Se distribuyen en criotubos que se sellan y congelan en nitrógeno líquido durante varios años sin que sus características se alteren, al ser descongeladas las células se multiplican, los virus se pueden seguir replicando y permanecer activos.

Conservación mediante liofilización

Es la deshidratación por sublimación es decir la desecación del virus congelado al alto vacío. Es una forma de preservarlos durante largo tiempo, sin pérdida apreciable de su actividad. Durante la sublimación, el vapor de agua del medio de cultivo como conservador del virus, se recoge a través de un condensador refrigerado, o absorbido por medio de una sustancia desecante. La muestra cerrada debe liofilizarse al alto vacío. Éste método tiene la ventaja de permitir guardar y conservar en refrigeración (2-8°C) la muestra liofilizada y no a más baja temperatura.

Objetivo

Conocer los métodos de conservación de los virus

Material y método

Se utilizará como apoyo didáctico el uso de un video con las técnicas mencionadas, dicho material está en proceso.

Bibliografía

- Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff, M. y Roberts, K. 1996. Biología molecular de la célula. 3a ed., Omega, España.
- Cottral, E.G. 1978. Manual de métodos estandarizados en Microbiología Veterinaria.
- Cunnigham, H.C. 1971. Virología práctica. Acribia, España.
- Kucera, S.L. and Myrvik, N.Q. 1985. Fundamentals of medical virology. 2nd ed., Lea and Febiger, USA.
- Reigosa, A.M. y Rodríguez, N.A. 1999. Historia de los cultivos de los tejidos. Ciencia Hoy. Vol. 9, N° 52 mayo-junio. Argentina.





PRÁCTICA No. 15

Prueba de sueroneutralización

Introducción

La neutralización mide el título de anticuerpos neutralizantes específicos contra un virus específico, o determina la afinidad de diferentes virus para un suero normalizado como la caracterización de virus mutantes, por lo tanto, la neutralización viral consiste en el descenso del título infectante de una preparación viral posterior a la exposición a anticuerpos.

Tiene por objeto identificar el virus, el anticuerpo, medir esta concentración y determinar la relación antigénica. La mayor parte de las pruebas de neutralización se realizan en microplacas de fondo plano, estériles, desechables y atóxicas, la mezcla virus y antisuero pueden añadirse sobre las monocapas para observar la neutralización del mismo. La prueba puede realizarse en dos formas:

Método Alfa. Se usa un virus más suero diluido de forma constante en un volumen igual de soluciones ante diluciones decuples del virus. Este método identifica el virus.

Método Beta. Utiliza un anticuerpo más virus diluido de forma constante, generalmente con 100 a 200 unidades, ante un volumen igual de diluciones dobles del anticuerpo. Este método mide el título de anticuerpos.

La dosis letal 50% de un grupo de pozos, se calcula según el método de Reed y Muench, y el título se expresa como el índice de neutralización del anticuerpo.

Objetivo

Determinar el índice neutralizante del suero ante el virus de la Enfermedad de Gumboro al utilizar la dosis infectante cultivo de tejidos $DICT_{50}$.

Material

Bioseguridad: Bata, cubre boca, cofia, goggles	Microplacas de fondo plano estériles	Virus de la Enfermedad de Gumboro con 100-200 $DICT_{50}/0.2$ ml
Campana de flujo laminar horizontal	Bombillas de seguridad	Medio MEM
Microscopio invertido con luz normal	Probetas	Suero Fetal Bovino
Incubadora de CO_2	Pipetas	Suspensión de cultivo celular en concentración de 800,000 a 10.000,000 células/ml
	Vaso de precipitado	Sulfato de Gentamicina
	Tubos de vidrio con tapón de rosca estériles	Alcohol al 70%
		Hipoclorito de Sodio al 2%





Técnica del método beta

1. Suspensión celular en medio MEM a la concentración indicada con suero de equino del 5 al 10% y sulfato de gentamicina 100 mg/ml.
2. Suspensión viral conteniendo 100 a 200 DICT/0.2 ml. Calcular el volumen de virus para el número de sueros.
3. Con una multipipeta de ocho canales depositar 50 µl de suspensión viral a cada pozo de las filas A a la H y de las columnas 1 a 11.
4. Con micropipeta y una punta para cada suero, distribuir 50 µl de cada suero en el pozo 1 de la fila A a la D.
 6. Con la multipipeta de ocho canales, los sueros de las filas A a la D, diluir desde el pozo 1 hasta el pozo número 10. Entre los pozos mezclar cinco veces la mezcla suero y virus, pasar 50 µl, descartar finalmente del pozo 10, 50 µl en el desinfectante.
 7. Incubar las placas a 37°C durante 30 a 45 minutos.
 8. Agregar 200 µl de suspensión celular ya preparada desde el pozo 1 al 12, filas A a la H.
 9. Cubrir la placa con su tapa e incubar de 37 a 38 °C durante 5 a 7 días en una atmósfera de CO₂ en presencia de humedad alta.
 10. Observar la placa diariamente al microscopio invertido. Registrar diariamente la temperatura y el porcentaje de CO₂ de la incubadora.
 11. Realizar la lectura de la prueba al microscopio para observar la presencia del efecto citopático.
 12. NOTA: Para verificar el título viral, depositar en cada pozo en una serie de 10 por cada dilución de las que se realizaron para obtener la dilución de trabajo del virus 50 µl de suspensión viral más 200 µl de suspensión de células.
 13. Los pozos de la columna número 11 será el control del suero más células y los de la columna número 12 el control del suero positivo más virus.
 14. Calcular el índice de neutralización del suero mediante el Método de Reed y Muench.

Interpretación

El título del suero se considera como la más alta dilución de este que es capaz de neutralizar la actividad viral, que es detectada por el efecto citopático.

El título se expresa como la dilución más alta capaz de neutralizar 100 a 200 DICT₅₀/0.2 ml.

Preguntas para discusión

1. ¿En que consiste la neutralización viral?
2. ¿Cuántos métodos existen para realizar la neutralización de un virus y en que consisten?
3. ¿Cómo se interpretan los resultados obtenidos en una prueba de suero neutralización?
4. De acuerdo a la práctica realizada cuales fueron los datos obtenidos y realice su interpretación de los mismos.

Bibliografía

- Buxton, A. and Freaser, G. 1977. Animal Microbiology. Vol. 2, Blackwell, England.
- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, S.H. y Wood, B.R. 1978. Tratado de microbiología. 2ª ed., Salvat, México.
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.





PRÁCTICA No. 16

Diagnóstico del virus de la rabia

Introducción

La inmunofluorescencia (IF), es una de las técnicas más rápidas, sensibles y específicas. El fundamento de la prueba es la combinación de proteínas “anticuerpos” presentes en un antisuero unidos o teñidos con colorantes fluorescentes para formar “conjugados” (anticuerpos fluorescentes), estos muestran e identifican el antígeno, bien en los cultivos celulares infectados en caso de que el virus no sea citopático, en improntas y en cortes de tejidos de animales infectados.

Existe la IF directa e indirecta. La directa es de mayor precisión y rapidez, permite efectuar las lecturas a la media hora de haber recibido las muestras. La indirecta es útil para la detección inicial de anticuerpos en muestras de suero y es altamente sensible. En este manual se describirá la IF directa por ser la más práctica.

Para el diagnóstico, la técnica de anticuerpos fluorescentes utiliza material fresco, congelado o glicerinado, un buen microscopio de epifluorescencia, conjugado de buena calidad, personal capacitado y con amplia experiencia para minimizar errores en el diagnóstico.

La técnica se basa en el principio de una reacción inmunológica antígeno- anticuerpo específico, el conjugado entra en contacto con el antígeno y la fluorescencia específica emite un haz de luz que se observa al microscopio de epifluorescencia, el conjugado aparece de un color verde limón brillante sobre un campo de fondo negro y esto indica que el antígeno específico está presente. El exceso de conjugado y proteína extraña se elimina de la preparación por el lavado.

El fluorocromo más utilizado es el isotiocianato de fluoresceína, por su alta emisión de fluoresceína al microscopio y además forma un enlace estable con la proteína. La preparación de las muestras para esta técnica se lleva de tal manera en que se debe preservar la estructura morfológica del tejido para localizar el antígeno.

Objetivo

Conocer el método de diagnóstico por IF directa para el diagnóstico de la rabia en encéfalo de canino.

Material

Bioseguridad: Bata, guantes, cubreboca, goggles	Portaobjetos Cubreobjetos	Encéfalo de perro como fuente de virus
Microscopio de Epifluorescencia con Transformador y Regulador	Lápiz marcador de cera	Conjugado antirrábico
Incubadora bacteriológica a 37 °C	Vasos de Coplin	Suspensión de CVS
Refrigerador a 4°C		Suspensión normal de cerebro
Congelador a menos 20°C		Acetona





Incinerador		Glicerina
		Solución salina amortiguada de fosfatos glicerizada
		Solución salina amortiguada fosfatada PBS

Técnica

En esta práctica y por bioseguridad, el material biológico de improntas de tejido cerebral control positivo, control negativo al virus de la rabia y el conjugado, serán obtenidos del Centro de Diagnóstico, Instituto de Salud en el estado de México; y la práctica se desarrollará en el Centro de Investigación y Estudios en Salud Animal (CIESA).

1. Se realizan dos improntas sobre cubreobjetos del cerebro problema, de control positivo y control negativo.
2. Fijar en un vaso de Coplin con acetona fría y dejar en el congelador durante 20 minutos.
3. Agregar aproximadamente 30 µl de conjugado fluorescente específico antirrábico a una impronta de muestra problema, positiva y negativa.
4. Colocar en una caja de color negro.
5. Incubar las laminillas por 45 minutos a 37 °C.
6. Retirar las laminillas y lavar las muestras en PBS.
7. Dejar secar al aire.
8. Observar al microscopio de fluorescencia e interpretar los resultados obtenidos.

Lectura e interpretación de resultados

- Impronta control positiva: Se observa una fluorescencia brillante específica de color verde limón, de diferente tamaño, desde una arenilla hasta el tamaño de un corpúsculo de Negri.
- Impronta problema: En caso de resultar positiva, es similar a la impronta control positiva.
- Impronta testigo negativa: No se observa fluorescencia específica.

Preguntas para discusión

1. ¿En que consiste la prueba de inmunofluorescencia?
2. ¿Por medio de esta prueba que se detecta en la muestra teñida?
3. ¿Cuál es la muestra que se debe tomar de un animal cuando se sospecha de rabia?
4. ¿Mediante IF, en la impronta que estructuras deben de ser observables para considerarla positiva?

Bibliografía

- Biberstein, L.E. y Chung, Z.E. 1990. Tratado de Microbiología Veterinaria. Acribia, España.
Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
Kaplan, M.M. y Koprowsky, H. 1976. La Rabia. Técnicas de Laboratorio. Tercera edición. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
Mohanty, B.S. y Dutta, K.S. 1981. Virología Veterinaria. Interamericana, México.





Tizard, I. 2000. Veterinary Immunology, an introduction. Sixth ed., W. D. Saunders Company, United States of America.





PRÁCTICA No. 17

Inhibición de la hemoaglutinación

Introducción

La hemoaglutinación viral es un fenómeno descrito por primera vez por Hirst en 1941, al mezclar líquidos amnióticos y alantoideos infectados con virus de influenza más eritrocitos de embrión de pollo, estos se aglutinaban. Ahora se conoce que diferentes virus poseen proteínas codificadas en su cubierta externa las cuales tienen la capacidad para unirse a receptores complementarios de la membrana externa de los eritrocitos.

Los glóbulos rojos cuentan con diversos receptores y si un virión se fija simultáneamente puede formarse una red de eritrocitos y viriones alternados, y forman la aglutinación. Algunos de estos virus son los paramyxovirus como el de la enfermedad del Newcastle, los orthomyxovirus del virus de la Influenza y algunos adenovirus como el virus del síndrome de la baja de la postura, entre otros.

La hemaglutinina es una glicoproteína que se encuentra en la superficie del virión, se une a los eritrocitos que presente receptores complementarios para ese virus, la neuraminidasa es una enzima que destruye los receptores glicoprotéicos de la superficie de los eritrocitos, lo que permite la elusión de los virus.

La reacción de inhibición de la hemoaglutinación es un método que ayuda a determinar la presencia de anticuerpos específicos en el suero de individuos enfermos o convalecientes, y mediante diluciones se puede determinar la cantidad relativa de anticuerpos.

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación se realiza de dos formas mediante el método alfa y el método beta. El *método alfa* mantiene la cantidad constante de virus que se agrega a cada tubo o pozo, mientras el suero problema se diluye de manera seriada. El *método beta* consiste en agregar una cantidad estandarizada de suero a cada tubo o pozo, en donde se hacen diluciones seriadas de una suspensión de virus cuya actividad hemaglutinante es conocida. Ambos métodos estiman los niveles de anticuerpos presentes en un individuo.

Objetivo

Determinar el título de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad del Newcastle mediante la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (IH).

Material

Bioseguridad: bata, guantes	Micropipetas de 5-50; 50-200; 200-1000 μ l	Ave de 4 semanas de edad como fuente de eritrocitos
Refrigerador de 2 a 8°C	Multipipeta de 12 canales de 50 μ l	Suspensión de eritrocitos
Centrifuga	Microplacas de fondo en U	Alsever pH 7.2
Autoclave	Matraz Pyrex de 100 ml	virus de la Enfermedad del Newcastle inactivado "Hemo aglutinina".
Balanza de dos platos	Puntas para micropipetas	Sol. Fosafatada buferada PBS Torundas de algodón con alcohol al 70%
	Vasos de precipitado Pipetas de 10 ml	
	Jeringas de plástico con aguja	Hipoclorito de sodio al 2%





	de 10 ml	
	Tubos de ensaye de 13x100 mm	

Obtención de glóbulos rojos

1. Medir en una jeringa anticoagulante Alsever 3 ml.
2. Obtener por punción cardiaca 3 ml de sangre.
3. Mezclar bien y pasar a un tubo de ensaye y centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos con la finalidad de separar el paquete celular.
4. Decantar el sobrenadante y agregar al tubo tres partes de PBS por una parte del paquete de glóbulos rojos.
5. Centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos y decantar el sobrenadante, repetir dos veces más este paso.
6. Realizar una suspensión de glóbulos rojos al 0.5%; agregar 99.5 ml de PBS más 0.5 ml de glóbulos rojos.

NOTA: Al mezclar los glóbulos rojos se debe realizar con cuidado para evitar una posible hemólisis.

Titulación del Antígeno

La titulación del antígeno es un paso previo para obtener las unidades hemoaglutinantes (UHa) del virus de la enfermedad del Newcastle. Se realizan diluciones dobles desde 1:2.

La identificación de la microplaca se realiza así:

Columnas 1-12

Filas de la letra A a la H

- a) Depositar 50 μ l de PBS en los pozos del 1-12, letra A y B.
- b) Depositar en el pozo número 1, letras A y B, 50 μ l de antígeno.
- c) Con una multipipeta de ocho canales, diluir la mezcla cinco veces y pasar 50 μ l al pozo número 2, repetir el proceso y de aquí al tres y así sucesivamente hasta la columna 12. Descartar finalmente 50 μ l en el desinfectante.
- d) Agregar 50 μ l de glóbulos rojos al 0.75% a todos los pozos.
- e) Coloca en la fila C el control de glóbulos rojos: 50 μ l de PBS y 50 μ l de glóbulos rojos por pozo.
- f) Mover ligeramente e incuba la microplaca a temperatura de laboratorio de 30-45 minutos.

Lectura:

El título hemoaglutinante se expresa como el recíproco de la dilución más alta que muestra una completa actividad hemoaglutinante.

Por ejemplo, si en la prueba se presenta una hemoaglutinación completa en la dilución 1:512 pero no en la dilución 1:1024, la suspensión tendrá un título hemoaglutinante en la dilución 1:512., significa que en esta dilución existe una unidad hemoaglutinante por lo tanto una dilución 1:51 de esa misma suspensión contendrá 10 UHa en el mismo volumen, el número necesario de unidades para utilizar en la prueba.

Interpretación

La completa sedimentación o formación de botón de glóbulos rojos en el fondo del pozo es negativo a la hemoaglutinación y la observación de la formación de una red en el fondo del pozo es positiva a la hemoaglutinación.

Inhibición de la hemoaglutinación HI (método beta)

Técnica

1. Diluir el antígeno en PBS conteniendo 10 UHa por cada 50 μ l





2. Depositar 50 µl del antígeno diluido a los pozos del 1 al 11 de todas las filas
3. Agregar 50 µl de cada uno de los sueros problema en los pozos número 1 de cada fila.
4. Realizar las diluciones, iniciar con el pozo número 1, mezclar cinco veces y pasa al pozo número 2 y así sucesivamente hasta el pozo número 11, descartar finalmente 50 µl.
5. Incubar la microplaca a temperatura de laboratorio durante 30 minutos.
6. Agregar 50 µl de glóbulos rojos al 0.5% a todos los pozos
7. Los pozos de la columna número 12 contendrán 50 µl de PBS y 50 µl de glóbulos rojos.
8. Mover ligeramente la placa e incubar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos.

Lectura e interpretación

Una reacción positiva de IH en las filas de los pozos de los sueros problema será la formación de un botón de glóbulos rojos desde las diluciones menores (glóbulos rojos no aglutinados; sedimentados). Los pozos negativos a IH se observan como una capa difusa de eritrocitos aglutinados.

El título del suero será la dilución recíproca más alta que inhibe la hemoaglutinación. Por lo tanto el título se expresa como la dilución recíproca o la potencia del logaritmo base 2 de la mayor dilución capaz de inhibir 10 UHa. Por ejemplo en la dilución 1:32 Log 2 es donde se observa completa aglutinación, pero no en la dilución 1:64.

Preguntas para discusión

1. Menciona la diferencia que existe entre los métodos alfa y beta
2. ¿Como se interpreta una reacción de inhibición de la hemoaglutinación?
3. ¿Cómo se define una unidad hemoaglutinante?
4. ¿Que es la elusión de los virus?
5. ¿Que factores pueden afectar el resultado de la prueba dando falsos positivos?
6. Realice un esquema de la prueba e interprete los resultados obtenidos
7. Menciona algunos de los virus que tienen la capacidad de hemoaglutinar
8. ¿Qué factores influyen en la obtención del título de la hemoaglutinación?
9. ¿Cuáles son los factores intervienen para que una prueba de falsa positiva?
10. Realiza el análisis de los resultados de la práctica

Bibliografía

- Buxton, A. and Fraser, G. 1977. Animal Microbiology. Volume 2. Blackwell Scientific Publications. LippincottCompany of Canada LTD, Toronto.
- Carpenter, L.P. 1982. Inmunología y serología. 2° ed., La prensa médica mexicana, México.
- Cottral, E.G. 1978. Manual de métodos estandarizados en Microbiología Veterinaria
- Fenner, F., Bachmann, A.P., Gibbs, J.E.P., Murphy, A.F., Studdert, J.M. y White, O.D. 1992. Virología Veterinaria. Acribia, España.
- Jawetz, E., Melnick, J. y Adalberg, A.E. 2001. Microbiología Médica. 17ª ed., El Manual Moderno, México.
- Knipe, M.D. y Howley, M.P. 2001. Fundamental Virology. 4ª ed., Lippincott Williams y Wilkins, USA.
- Merchant, I.A. y Parcker, R.A. 1980. Bacteriología y Virología Veterinarios. 3ª ed., Acribia, España.
- Tizard, I. 2000. Veterinary Immunology, an introduction. Sixth ed., W. D. Saunders Company, USA.





IV. ANEXOS

SOLUCIONES Y REACTIVOS

La preparación debe seguirse en el orden siguiente:

Solución salina fosfatada buferada PBS

Fosfato de sodio dibásico	1.6 g
Fosfato monopotásico	0.510 g
Cloruro de sodio	7.300 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.1- 7.3

Filtrar a través de papel filtro
Esterilizar por autoclave a 121 °C durante 30 minutos
Guardar a temperatura ambiente

ALSEVER

Glucosa	2.05 g
Citrato trisódico	0.8 g
Acido cítrico	0.05 g
Cloruro de sodio	7.300 g
Agua destilada	100 ml
pH	6.1

Esterilizar por filtración de 22 µm o a 110 °C durante 20 minutos
Guardar a 4° C y usarlo en proporción 1:1.

TRIPSINA – VERSENE

Tripsina	0.5 g
Versene	0.2 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de sodio dibásico	2.16 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.1- 7.3

Esterilizar por filtro millipore de 22 µm.
Distribuir en frascos de 100 ml y 50 ml
Revisar pruebas de esterilidad con medio de tioglicolato.
Refrigerar a 4 °C o congelar a menos de 20 °C por 6 meses.

BICARBONATO DE SODIO

Bicarbonato de sodio	0.88 g
Rojo de fenol	50 ml
Agua destilada	950 ml





Disolver por calentamiento y esterilizar por autoclave a 115 °C durante 20 minutos. Mantener a refrigeración a 4 °C.

TRIPTOSA FOSFATO BROTH (TPB)

TPB	1.475 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos en autoclave.
Guardar en refrigeración de 4- 8 °C.

TRIPAN AZUL AL 1%

Tripan azul	1g
PBS estéril	100 ml

Disolver.
Guardar a temperatura ambiente.

ALCOHOL

Etanol	70 ml
Agua destilada	30 ml

Mezclar y colocar torundas de algodón. Guardar en un frasco de boca ancha.

HIPOCLORITO DE SODIO AL 2% NaClO (Desinfectante)

Hipoclorito de sodio (cloralex)	2 ml
Agua corriente	98 ml

Guardar a temperatura ambiente

Medio de cultivo MEM deshidratado *
Medio de Hank's *

***Laboratorios Sigma-Aldrich, USA.**

Bibliografía

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: Manual of Veterinary Investigation Laboratory Techniques. Part 8 Virology. RVG 9. 1978.
Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: Manual of Veterinary Investigation Laboratory Techniques. Reference Book 389, Volume 1, 1991.





VI. ACTUALIZACIÓN

Manual de Lineamientos del Laboratorio de Prácticas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México; 25 de febrero de 2013.

Segunda Edición:

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTEENIA

Director:
Dr. En C. Mauro victoria Mora

Elaboró:
M en C. Lemuel León Lara

Revisó:

