

LABORATORIO:

RECONOCIMIENTO DE LOS ELEMENTOS DEL EMBRION DE POLLO Y SU EMPLEO EN VIROLOGIA.

Por: E. Ramírez (1)

El embrión de pollo es uno de los medios de cultivo más favorables para el aislamiento de algunos virus. Los huevos embrionados pueden ser inoculados por varias vías y su elección depende del virus que se quiera estudiar.

Comunmente se emplean embriones, por las siguientes razones:

- Están relativamente exentos de infecciones y contaminaciones.
- Son sensibles a la infección por muchos agentes virales.
- No forman anticuerpos contra la virus inyectados.
- Son baratos, se adquieren con facilidad y son de tamaño adecuado.

Algunas de las condiciones que influyen sobre el crecimiento de los virus en los embriones son:

- La vía de inoculación.
- La dilución y la cantidad del inóculo.
- La edad del embrión.
- La temperatura y el tiempo de incubación tras la inoculación.

En la práctica se utilizan para:

- Preparar vacunas (ej. fiebre amarilla, influenza). Las vacunas se logran después de atenuar el virus, esto se consigue haciendo pases seriados.
- Para el aislamiento de los virus con fines de diagnóstico. (ej. viruela herpes, influenza).

- Para hacer ensayos de nuevos agentes antivirales.

A. ALGUNAS NOCIONES SOBRE EMBRIOLOGIA AVIAR.

Para utilizar con éxito el cultivo de los embriones de pollo, se requiere reconocer el desarrollo y la fisiología de los mismos. El embrión empieza a desarrollarse bajo la forma de una membrana de células que recubre el polo superior de la yema. Durante los tres primeros días su apreciación es difícil, pero a los cuatro o cinco días de incubación, se puede observar fácilmente en ovoscopio. (ver fig. 2). Se reconoce que el embrión está vivo, porque a la transluminación se ven como una telaraña, las venitas que forman la membrana *corioalantoidea* y además se observa que se desplaza un punto negro intermitentemente (el ojo). Al morir el embrión, los vasos se desintegran y este yace fijo al polo superior del huevo.

A partir del noveno día, puede observarse a veces movimientos de deglución. Después del undécimo día el embrión aumenta de tamaño rápidamente y empiezan a aparecer las plumas. A medida que aumenta de tamaño, disminuye el volumen de los líquidos extraembrionarios. Durante la incubación hay una constante pérdida de agua por transpiración a través de la cáscara, por esta razón la incubadora se debe conservar con cierto grado de humedad.

También hay que tener en cuenta, de voltear los huevos mas o menos cada doce horas, ya que el embrión durante las dos primeras semanas carece de músculos para cambiar de posición por sí mismo. Para nacer tarde más o menos 21 días.

Para hacer la inoculación en el saco de la yema (viteo) son mas adecuados los embriones de siete días de

(1) Profesora, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

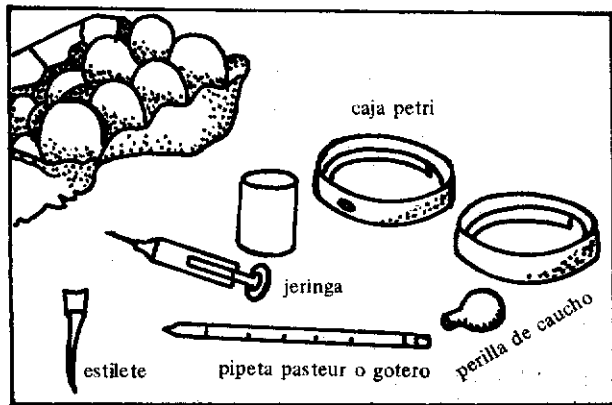


Fig. 1. Algunos implementos necesarios para la inoculación de los embriones de pollo.

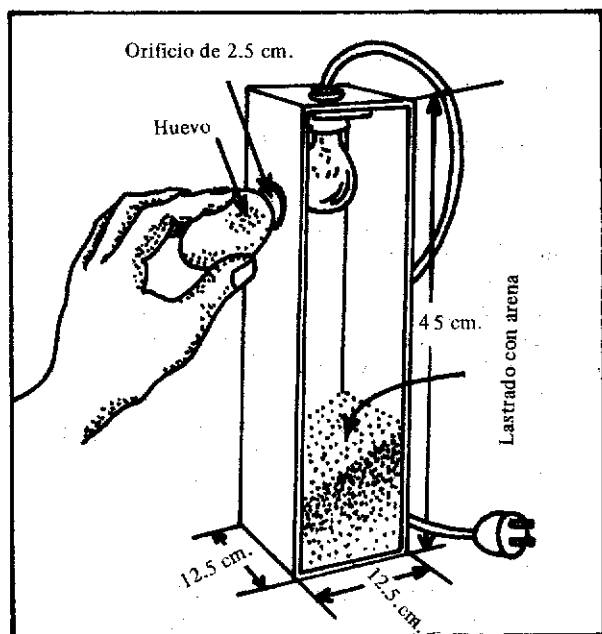


Fig. 2. Mirando el huevo a traluz con el ovoscopio. (se puede hacer con una caja de cartón grueso).

incubación. Esta inoculación se utiliza principalmente para el aislamiento de RICKETTSIAS, los embriones se deben cosechar a los 5 días después de inoculados y la temperatura a la cual se deben colocar es de 35°C. Se deben revisar al segundo día para descartar los embriones muertos (se consideran inespecíficas las muertes en este lapso de tiempo).

Para hacer las inoculaciones en las membranas corioalantoidea, se utilizan embriones de 9-12 días éstos son útiles para el aislamiento de los virus vesiculares: VIRUELA, VACUNA, además HERPES VIRUS. Se

incuban los huevos por espacio de 72 horas y a una temperatura de 35°C, una vez que los virus prenden en la membrana se pueden manifestar así:

El virus de la Viruela provoca lesiones pequeñas, redondeadas, casi siempre en forma de rosario (fig. 3).

El virus de la Vacuna, provoca lesiones grandes aplanadas con halo hemorrágico y necrótico (Fig. 3).

El virus del Herpes, presenta lesiones pequeñas, ovaladas (como una perla).

La inoculación en la cavidad amniótica, se utiliza principalmente para el aislamiento del virus de la INFLUENZA Y PAPERAS. Los embriones deben ser de 8-10 días de incubados, se incuban a 35°C y se cosechan a las 72 horas.

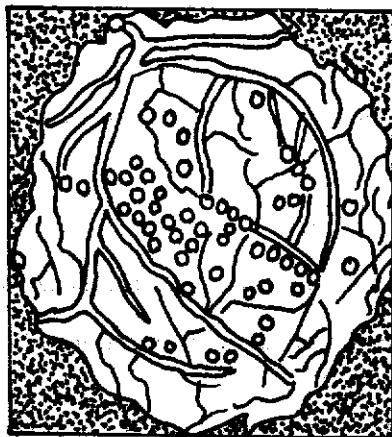


Fig. 3. Lesiones en membrana corioalantoidea provocadas por el virus de la viruela y vacuña, respectivamente.

B. TECNICAS DE INOCULACION

Materiales:

Ovoscopio

Huevos embrionados de 7-10 días.

Taladro eléctrico o en su defecto una aguja de disección o una aguja de inyectar estéril No. 18.

Lápiz marcador.

Azul de metileno al 0.5o/o.

Jeringas tipo tuberculina de 1 ml.

Peras de caucho.

Agujas de inyectar No. 21 o 22 de media y de una y media pulgadas.

Cinta pegante transparente

Bandejas plásticas

Tijeras

Métodos:

Cada alumno recibirá 3 embriones de 7 y 10 días respectivamente: En el primero practicará la inoculación en el saco de la yema, en el segundo, la inoculación en la membrana corioalantoidea y en el tercero, la inoculación en la cavidad amniótica.

A cada embrión se le delimitará con lápiz la cámara de aire y el sitio correspondiente a la proyección del embrión, esto

se verifica mediante transluminación. Antes de inocularlos se deben colocar los embriones con el polo mayor hacia arriba (donde está la cámara de aire). Para evitar que se rueden se sugiere hacer círculos con plastilina y colocarlos dentro de ellas.

1. INOCULACION EN EL SACO DE LA YEMA (Fig No. 4)

- Perfore la cáscara en el centro del polo mayor del huevo con taladro o con la aguja No. 18 estéril. (el orificio debe ser pequeño).
- Se llena una jeringa tipo tuberculina con 0.2 ml. de azul de metileno y se le coloca una aguja No. 21 de 1/2 pulgada.
- Por el orificio que abrimos se introduce totalmente la aguja y se depositan los 0.2 ml. La aguja se debe inclinar un poco por fuera de la vertical con el fin de esquivar el embrión.

2. INOCULACION EN LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA (Fig.5)

- Se marca un sitio no vascularizado en la cáscara cercano al límite de la cámara de aire.
- Se hace una pequeña perforación en el sitio marcado y otra más, en el centro del polo mayor de la cámara de aire.
- Coloque en el orificio de la cámara de aire, la pera de caucho y succione suavemente dos o tres veces, con el fin de que parte del aire pase al sitio donde vamos a hacer la inoculación.

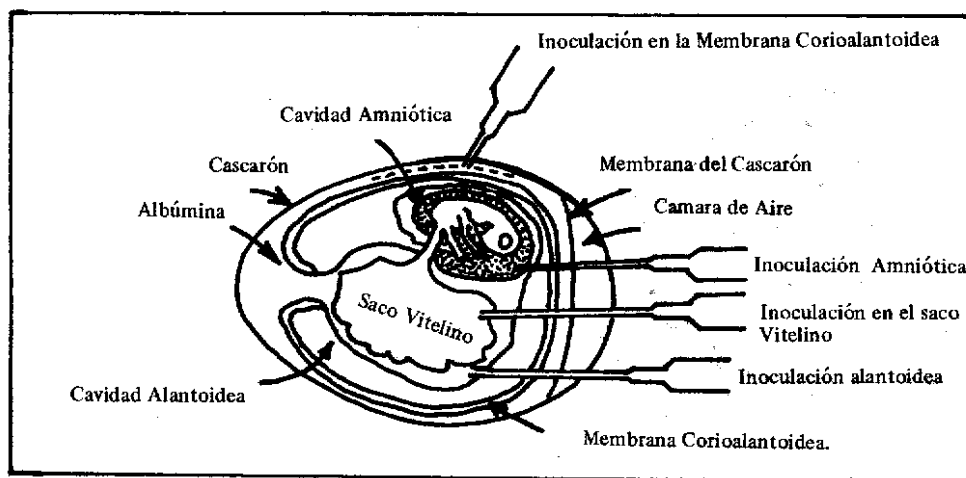


Fig. 4. Partes del embrión de pollo y las diferentes vías de inoculación.

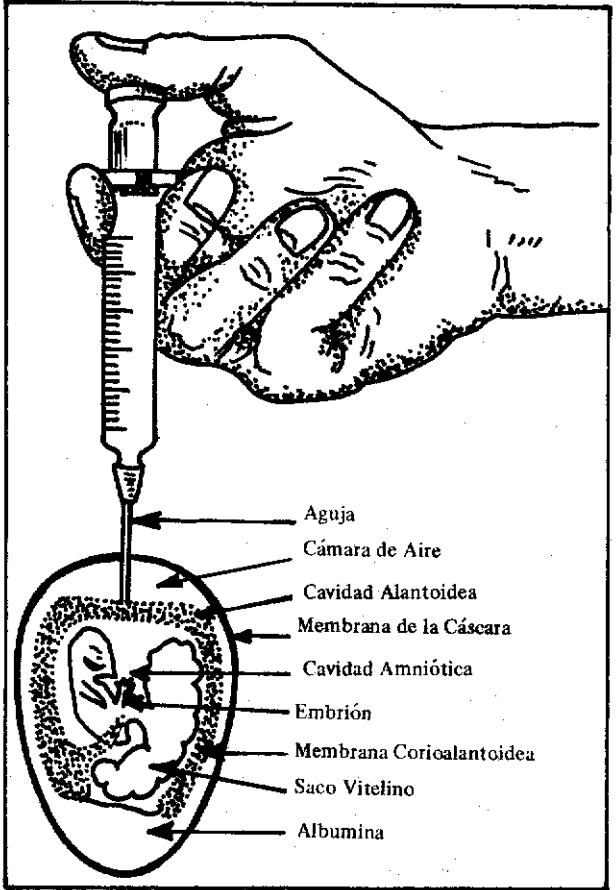
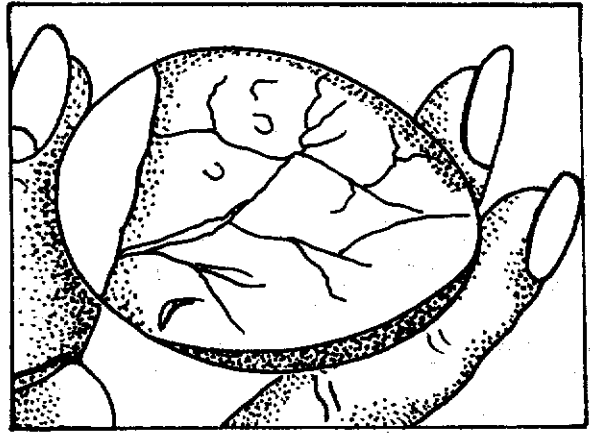
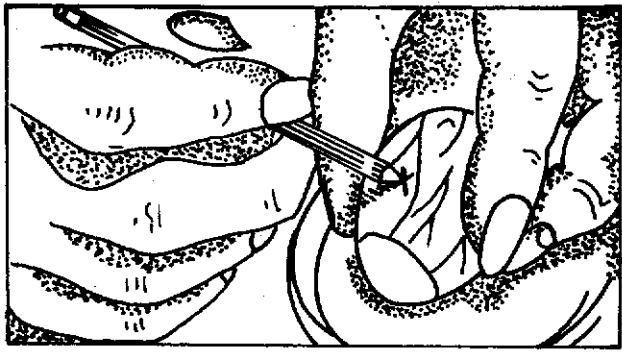


Fig. 5. Inoculación en la Membrana Corioalantoidea.

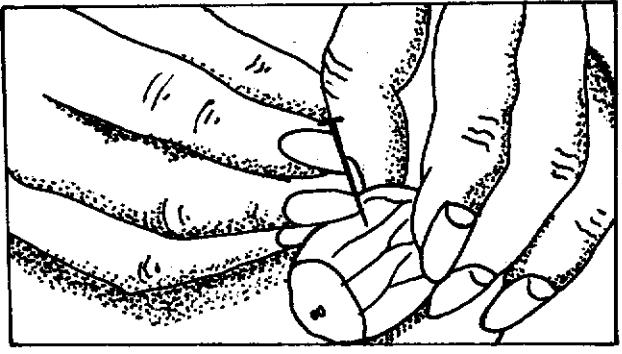
Pasos que siguen en la Inoculación Corioalantoidea.



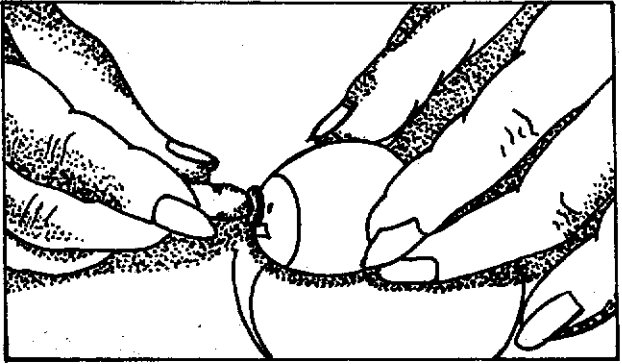
a) Demarque con un lápiz la Cámara de Aire.



b) Se marca un sitio avascular cercano a la cámara de aire.

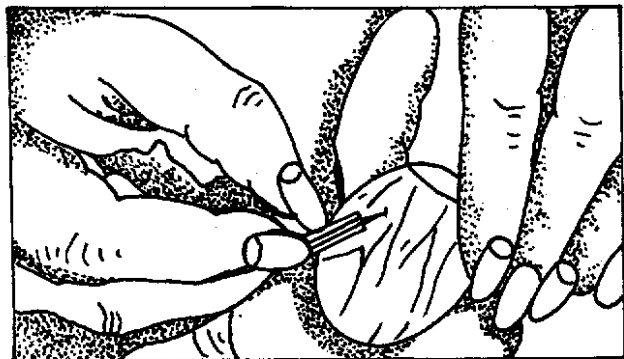


c) Se hace una pequeña perforación con una aguja No. 18 estéril en los sitios señalados.



d) Coloque en el orificio de la cámara de aire una pera de caucho y seccione suavemente.

d) Desinfecte con alcohol yodado, los sitios elegidos para hacer la inoculación.



e) Con una jeringa tipo tuberculina inyecte 0.2 ml. en el sitio avascular señalado.

e) Llene una jeringa tipo tuberculina con 0.2 ml. de azul de metileno e inyéctela en el sitio vascular señalado con anterioridad, para esta inoculación tenga cuidado de introducir solamente el bisel de la aguja.

3. INOCULACION EN CAVIDAD AMNIOTICA. (Fig 4)

a) En el ovoscopio determine la vitalidad del embrión y haga una señal sobre la cáscara en el sitio donde está situado el ojo, el cual se ve muy bien en forma de un punto negro).

b) Desinfecte la cámara de aire con alcohol yodoado y realice en ella una pequeña perforación con el taladro o con la aguja No. 18 estéril (el orificio debe quedar perpendicular a la señal del ojo).

c) Usando una jeringa tipo tuberculina de 1 ml. con una aguja No. 21 de 1 1/2 pulgadas, inocule la cantidad de 0.2 ml. de azul de metileno. Dicha inoculación se hace introduciendo la aguja por el orificio hecho en la cámara de aire hasta tocar el ojo del embrión, (se hace mirando al ovoscopio el huevo para poder observar cuando se toca el ojo) luego se procede a inocular el azul de metileno.

NOTA: Los sitios perforados se deben tapar con cinta pegante transparente antes de ponerlos en incubación, teniendo cuidado de que el orificio de la inoculación permanezca hacia arriba. Esto se tiene en cuenta

cuando se está trabajando con muestras que se presumen tienen virus.

4. PROCEDIMIENTO PARA ABRIR LOS EMBRIONES

a) Una vez hechas las inoculaciones, tome los embriones y márkelos respectivamente: I amniótica, I. corioalantoidea, I, saco de la yema.

b) Con unas tijeras estériles corte la cáscara al rededor de la cámara de aire de los huevos marcados: i=yema y i=amniótica. Luego con cuidado quite la membrana que se encuentra inmediatamente después.

c) En la inoculación en el saco de la yema, se observará inmediatamente que ésta se tiñe de azul.

d) En la *inoculación amniótica*, se toman una pinzas y se presiona hacia un lado, se deja salir el líquido y se saca el embrión suavemente. Si quedó bien inoculado se verá la cavidad amniótica teñida de azul claro.

e) *En la inoculación corioalantoidea*, se procede partiendo con las tijeritas el huevo por la mitad y se toma la mitad que tiene el orificio donde hicimos la inoculación. Si quedó bien hecha la inoculación, dicho sitio y parte de la membrana deben verse teñidas de azul.

NOTA: Antes de empezar la práctica de inoculación, el profesor debe tomar un embrión y empezar a abrirlo como demostración a los alumnos, para que puedan observar una por una sus diferentes partes.

Las bandejas plásticas se utilizan para descartar los embriones una vez abiertos.

PREGUNTAS:

1. Qué grupo de virus crecen principalmente en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo?
2. Cómo se recogen los virus que han crecido en huevos para la preparación de vacunas?
3. Por qué se deben utilizar embriones vivos para cultivar virus?

BIBLIOGRAFIA:

1. Cunningham, Ch. 1963. Virología Práctica. Ed. Acribia pgs. 35-50.
2. Jawetz, E. 1973. Manual de Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno, México. pags: 309-311.
3. Rivers T. and Hordfall, F. 1965. Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades por virus y Rickettsias. Ed. Interamericana S.A. 3a. Ed. pgs. 163-169, 1965.

