

Distribución del virus "A" de influenza en el huevo fértil de pollo

Por F. C. PENNIMPEDE y A. S. PARODI

En un trabajo anterior hemos estudiado⁽¹⁾ conjuntamente con otros puntos, la distribución del virus A de influenza en el huevo fértil de pollo, y notamos que en el embrión se produce, a las 96 horas de inoculado, un aumento en el título del virus, que, aunque no significativo, era suficientemente constante como para llamar nuestra atención. Decidimos por eso estudiar si ese aumento era debido al desarrollo en esos días de un órgano determinado, dando con esto mayores posibilidades de reproducción al virus.

Dado el neumotropismo del virus era lógico pensar que coincidiera con un mayor desarrollo de los bronquios en esa fecha del crecimiento.

Hicimos, para dilucidar este punto, cuatro tipos de experimentos:

En el primero repetimos el ya publicado, pero calculamos el monto total de virus. En el segundo se determinó el título de virus en distintas partes del embrión en un (pool) de 8 embriones. El siguiente describe el título de virus en distintas partes del embrión, pero tomados éstos individualmente, y el último es idéntico al anterior, pero se varió la dosis de virus inoculada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus. Fue utilizada una cepa de influenza A, aislada en el país⁽²⁾, llamada cepa 7.

Huevos. De gallina Leghorn blanca incubados 11 días a 38°C y luego de inoculados, a 37°C. Éstos fueron inoculados en la cavidad alantoidea con 0.1 ml. de virus.

Extracción de materiales del huevo. Se realizó desde las 24 a las 144 hrs. de inoculados, con 24 horas de intervalo. En el Experimento 1, las membranas corialantoideas fueron secadas exhaustivamente con papel de filtro, las demás fueron únicamente escurridas y lavadas en solución fisiológica. Se extrajo, también, líquido alantoideo con la técnica habitual. Una vez extraído el embrión, y lavado en solución fisiológica tres veces, se procedió a extraer,

mediante pinzas y tijeras, la tráquea, pulmones, corazón, cerebro, hígado y trozos del músculo del muslo. Cada uno de estos elementos fué lavado en solución fisiológica, pesado en una balanza al miligramo, y luego de triturado en un mortero, suspendido en caldo con 20 % de suero animal de caballo. Las suspensiones se centrifugaron 10 minutos a 1.500 r. p. m., y con el sobrenadante se efectuaron diluciones decuplicadas que fueron inyectadas por vía intranasal a ratones.

Ratones. Albinos, de la cepa criada en el Instituto, previamente anestesiados con éter, a razón de 0.05 ml. a cada uno de cuatro ratones por dilución. Se prolongó la observación durante 10 días, registrándose diariamente las bajas; al final de este plazo se sacrificaron todos los ratones, y se verificó la presencia de lesiones típicas. Los títulos fueron calculados por el 50 % de mortalidad según Reed y Muench.⁽³⁾

EXPERIMENTO 1

Huevos escogidos según se describió anteriormente⁽⁴⁾ fueron inoculados con dilución de virus 10^{-3} en la cavidad alantoidea. Cada 24 horas se retiraron de la incubadora grupos de 8 huevos vivos, a los que se les extrajo líquido alantoideo, membrana corioalantoidea (agotada totalmente de su líquido sobre el papel de filtro) y el embrión, estos dos últimos elementos, luego de lavados en solución fisiológica y pesados, fueron triturados en caldo suero, la suspensión centrifugada, realizadas diluciones decuplicadas, e inoculadas en ratones.

Se realizaron 7 experimentos de este tipo, las que se detallan en el Cuadro N° 1.

EXPERIMENTO 2

Fué realizado con el propósito de conocer la distribución del virus en los distintos órganos del embrión y su posible tropismo para determinados tejidos. Se inocularon huevos con dilución de virus de 10^{-6} (Cuadro 2).

EXPERIMENTO 3

Se procedió como en el caso anterior, pero se trabajó con un solo embrión en vez de hacerlo con grupos (pools) de ocho; se agregó la titulación de la membrana corioalantoidea y líquido alantoideo.

En los Cuadros 2 y 3 se detallan los resultados obtenidos, los que muestran la gran variación en la distribución del virus en

CUADRO 1

Horas	N.º de casos	EMBRION						M. C. A.						LIQUIDO ALANTOIDEO					
		Gramos	Dms**	Log. Título	Dms**	Log. DLM*	Dms**	Gramos	Dms**	Log. Título	Dms**	Log. DLM*	Dms**	Mls.	Dms**	Log. Título	Dms**	Log. DLM	Dms**
24	7	4,60	0,69	3,64	0,47	5,41	0,71	0,46	0,20	5,04	1,13	5,77	1,32	4,12	0,73	5,60	0,48	7,50	0,55
48	7	5,97	0,33	3,37	0,81	5,31	0,69	0,37	0,06	4,50	0,67	5,35	0,69	5,92	0,75	5,90	0,51	7,96	0,53
72	7	7,28	0,64	3,39	0,97	5,56	0,99	0,54	0,21	3,95	0,77	4,98	0,81	7,44	1,21	5,09	1,02	7,26	1,02
96	7	9,85	0,92	3,91	0,71	6,20	0,68	0,41	0,08	3,43	0,65	4,47	0,52	7,16	1,00	5,20	0,66	7,35	0,66
120	2	11,77	1,18	3,72	0,76	6,08	0,77	0,32	0,03	3,36	0,41	4,15	0,49	5,82	1,14	4,74	0,33	6,73	0,26
144	2	13,11	1,25	3,52	0,42	5,93	0,39	0,32	0,05	2,77	0,31	3,70	0,69	5,57	1,53	4,01	0,51	5,95	0,53

* Dosis mortales mínimas 50 %.

** Desviación media simple.

CUADRO 2

TÍTULOS DE LOS "POOLS" DE DISTINTOS ÓRGANOS DE EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS
CON DILUCIÓN DE VIRUS 10^{-6}
(Titulación en ratones)

HORAS	N.º de "pools"	LOGARITMOS DE LOS TÍTULOS					
		Tráquea	Pulmones	Corazón	Cerebro	Hígado	Músculos
24	1	2,25	3,50	2,53	<1,00	2,21	2,00
48	2	3,41 ± 0,59	1,58 ± 0,58	1,43 ± 0,23	2,08 ± 0,58	1,89 ± 0,36	2,66 ± 0,00
72	1	1,00	2,25	1,00	<1,00	1,25	<1,00
96	1	1,50	1,66	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
120	1	3,00	3,50	<1,00	1,00	<1,00	2,00
144	1	3,00	3,25	<1,00	1,74	<1,00	1,76

CUADRO 3

TÍTULOS DE LOS ÓRGANOS DE LOS EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS CON DILUCIÓN DE VIRUS DE 10^{-6}
(Titulación en ratones)

HORAS	N.º de exp.	MEDIA DE LOS LOGARITMOS DE LOS TÍTULOS EN:															
		M. C. A.	L. alant.	Dms.	Tráquea	Dms.	Pulmón.	Dms.	Corazón	Dms.	Cerebro	Dms.	Hígado	Dms.	Músculo	Dms.	
24	4	—	6,75**	0,00	3,63	0,81	2,50	0,37	1,70	0,40	1,85	0,53	1,54	0,59	3,06	0,81	
48	4	5,75*	6,72	0,35	3,55	0,73	2,00	0,37	2,27	0,37	2,47	1,15	2,01	0,26	2,43	0,43	
72	4	5,50*	6,17	0,66	3,00	0,62	2,29	0,74	1,70	0,80	2,61	0,81	1,67	0,21	2,51	0,38	
96	4	6,50*	5,37	0,77	3,54	0,61	2,81	0,56	2,37	0,19	1,42	0,47	2,44	0,64	2,31	0,31	
120	3	—	5,55	0,57	2,79	0,59	2,13	0,81	1,60	0,93	1,45	0,37	1,30	0,27	1,51	0,40	

* Una muerta.

** Dos muertas.

CUADRO 4

TÍTULOS DE LOS ÓRGANOS DE LOS EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS CON DILUCIÓN DE VIRUS DE 10^{-3}
(Titulación en ratones)

HORAS	N.º de exp.	LOGARITMO DE LOS TÍTULOS EN:							
		M. C. A.	L. Aln.	Tráquea	Pulmones	Corazón	Cerebro	Hígado	Músculo
24	1	6,75	6,00	3,50	2,75	3,00	3,00	2,00	3,00
48	1	5,25	6,00	<2,00	3,00	2,00	<1,00	2,25	2,00
72	1	6,25	6,00	3,75	2,25	2,25	1,50	2,00	3,50
96	1	6,00	5,50	2,00	1,25	<1,00	1,00	1,50	2,25
120	1	3,50	4,25	4,00	>4,50	2,75	2,75	2,75	1,25

cada uno de los órganos considerados y las desviaciones producidas en el título en cada una de las experiencias realizadas.

EXPERIMENTO 4

Difiere del experimento 3 en que la inoculación de los huevos fué realizada con una dilución de virus de 10^{-3} . Esta dilución fué adoptada con el objeto de averiguar si las diferencias observadas en los

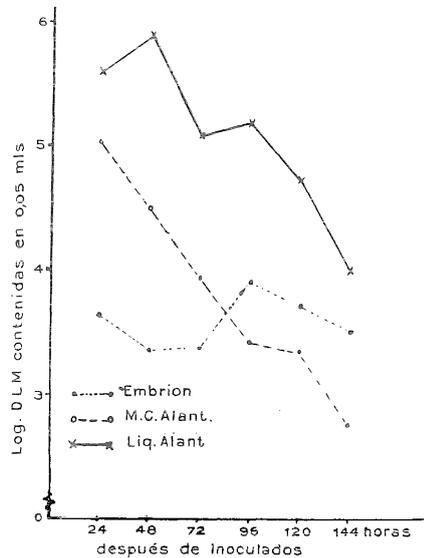


GRÁFICO 1.

Experimentos 2 y 3 eran motivadas por la concentración del inoculo. En el Cuadro 4 se muestran los resultados, los cuales no difieren de los observados en los experimentos anteriores, cuyo inoculo fué de dilución de 10^{-6} .

RESULTADOS

Los datos obtenidos evidencian que los títulos, tal como lo comprobáramos en un trabajo anterior⁽¹⁾, en el embrión no parecen sufrir mayores modificaciones, en cambio, en la membrana corioalantoidea son francamente descendentes a partir de las 24 horas de la inoculación, momento en el cual alcanzan su nivel máximo; en tanto que en el líquido alantoideo el máximo se manifiesta a las 48 horas para luego descender gradualmente hasta las 144 horas, pero conservando un nivel superior a los títulos correspondientes a los embriones y a las membranas corioalantoideas (Gráfico 1).

El monto total de virus de cada uno de estos elementos permite el trazado de curvas del mismo tipo para cada uno de ellos, pero sus relaciones son distintas (ver Gráfico 2). Mientras el líquido alantoideo, tanto en lo que respecta a título, como a la cantidad de virus contenido, conserva el más alto nivel, la membrana corioalantoidea cuyo título, frente al de los embriones, era inferior recién a las 96 horas, su contenido total de virus se iguala al de éstos a las 48 horas, y se hace francamente inferior a las 72 horas.

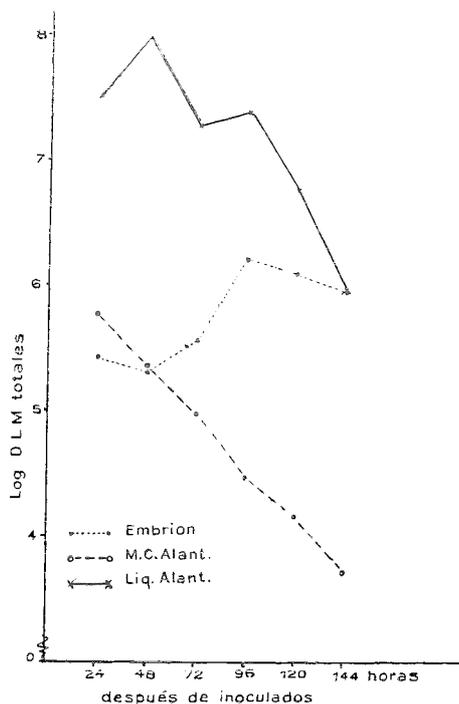


GRÁFICO 2.

Los títulos correspondientes al líquido alantoideo y a los embriones, se aproximan hacia las 144 horas (Gráfico 1), y el contenido total de virus para esa hora es igual para ambos.

En el Gráfico 3 se han escrito las variaciones ponderales de estos elementos con el propósito de evidenciar la relación entre éstas y los títulos y contenidos de virus. Sumando el contenido total de virus de estos tres elementos cada 24 horas, se hace notable que el máximo de virus se obtiene a las 48 horas, y a partir de ese momento decrece lentamente, llegando a las 144 horas, a ser 90 veces menor (Gráfico 4).

Los Experimentos 2, 3 y 4 revelan que el título de virus de las distintas partes del embrión, ya sea estudiado en un "pool" de 8, ya individualmente o variando la cantidad de virus inoculada, no

sigue una curva regular en ninguno de los órganos. Hay, sin embargo, una tendencia a disminuir el título desde la 24 horas de inoculados hasta las 144 horas en que se ha estudiado, pero en el ínterin hay en cada órgano aumentos y disminuciones en el título sin seguir un orden fijo para cada uno de ellos.

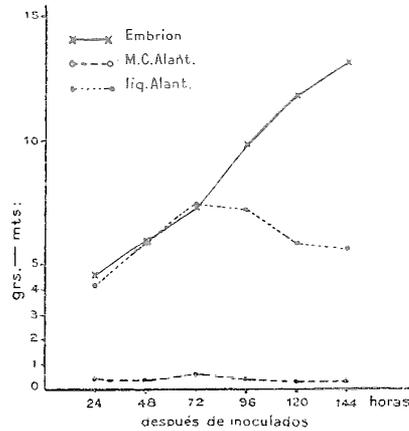


GRÁFICO 3.

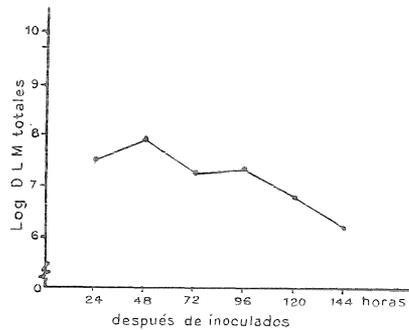


GRÁFICO 4.

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos sugieren que el virus se distribuye por todo el embrión y que en él se mantiene más o menos uniformemente. Si el virus contenido en el embrión es producto de una reproducción del mismo en el embrión, o es una especie de inhibición de todo el embrión por el virus producido en la membrana corioalantoidea, no podemos saberlo, pero es evidente que hay órganos en que hay más virus que en otros, cosa que sugiere apoyo de la primera hipótesis.

Por otra parte es obvio que una curva de títulos para un órgano determinado en función del tiempo sería incorrecto, porque cada

día se utiliza un embrión distinto y no todos tienen un desarrollo uniforme. Habría que hacer en ese caso el análisis de cientos de embriones, cosa prácticamente imposible por el tiempo y el material que requeriría.

El monto total de virus de las distintas partes del huevo (embrión, membrana y líquido alantoideo) señala que el monto total de virus aumenta en el embrión. Esto es lógico, pesado como una consecuencia del aumento de peso del mismo y el mayor número de células que se ponen a disposición del virus.

Otros autores han estudiado la distribución del virus de influenza (5, 6, 7, 8 y 9); pero los experimentos no se extendían a más de las 48 horas, o las condiciones en que se realizaron las experiencias no son las mismas en que se han realizado las nuestras. Pearson (9) es el único autor que extiende la observación hasta el 6º día de inoculados los huevos, pero la técnica adoptada, como los resultados que obtiene, difieren algo de los obtenidos en el trabajo antes mencionado (2); las diferencias son imputables, sin duda, a las técnicas seguidas, a las distintas cepas de virus utilizadas, a las diluciones inoculadas a los huevos.

RESUMEN

1) Se han estudiado la distribución y monto total de virus en el huevo fértil de pollo.

2) Se estudió la curva de los títulos de los distintos órganos del embrión de pollo.

3) Se deduce de los experimentos que: el monto total de virus aumenta con el aumento de peso del embrión; el virus se distribuye en forma desigual en los distintos órganos del embrión, sin seguir un orden determinado desde las 24 hasta las 144 horas de inoculados.

4) Se discuten los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) PENNIMPEDE F. C., PARODI A. S., LAJMANOVICH S., MITTELMAN N., 1946, (en prensa).
- (2) SORDELLI A., TAYLOR R. M., PARODI A. S., *Revista del Inst. Bact. "Malabrán"*, 1941, 10, 265.
- (3) REED L. J., y MUENCH H., *Am. J. Hyg.*, 1938, 27, 493.
- (4) PARODI A. S., PENNIMPEDE F. C., LAJMANOVICH S., MITTELMAN N., 1946, (en prensa).
- (5) NIGG C., WILSON D., CROWLEY J. H., *Amer. J. Hyg.*, 1941, 34, 134.
- (6) HENLE W., CHAMBERS L. A., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, 46, 713.
- (7) HENLE W., HENLE G., *Science*, 1943, 98, 87.
- (8) MILLER G. L., *J. Exp. Med.*, 1944, 79, 173.
- (9) PEARSON H. E., *J. Bact.*, 1944, 48, 369.