

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Recopilación y Descripción de los Métodos de Inoculación  
en Embriones de Pollo para el Diagnóstico de las  
Enfermedades Virales mas Frecuentes de las Aves

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

Juan Eugenio Miranda Illades

GUADALAJARA, JAL. 1977

**A MI MADRE**

**Con profunda gratitud.**

**A LA MEMORIA DE MI PADRE.**

**AL DR. OCTAVIO RIVERA MARTINEZ:**

**Catedrático ejemplar.**

**A MI H. JURADO:**

**DR. FABIAN UVIRA LUNA**

**DR. ANTONIO LADRON DE GUEVARA**

**DR. ENRIQUE LOPEZ PAZARON**

**DR. ANTONIO CESAR SANCHEZ**

**Q.F.B. CARMEN YOLANDA PARTIDA O.**

## INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	2
RESULTADOS	71
DISCUSION	80
CONCLUSIONES	87
SUMARIO	89
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	90

## I N T R O D U C C I O N

En el ejercicio cotidiano efectuado en los laboratorios para diagnósticos de las enfermedades de las aves, con frecuencia se tropieza con la falta de un compendio ágil y adecuado que nos enseñe la metodología exacta para desarrollar la técnica de inoculación del material sospechoso obtenido en el campo y que con auxilio de los embriones de pollo, a la postre nos indique, en primera intención, de qué enfermedad viral se trate.

El objeto de este estudio va con la finalidad de aportar la técnica más adecuada, conjugando la bibliografía existente de los diferentes métodos de inoculación mundiales, para el diagnóstico de las enfermedades virales en las aves y contribuir a hacer más ágil el trabajo de laboratorio de diagnóstico diario.

## MATERIAL Y METODOS

### A. MEDIOS DE CONSERVACION.

#### a). Inmersión en glicerina.

##### Material.

Un fco. de 473 mililitros de glicerina Q.P.

Dos gramos de citrato de sodio.

Quinientos mililitros de agua destilada preservada en estado estéril en un matraz Erlen Meyer pyrex estéril de un litro de capacidad, - con torunda hermética de algodón estéril.

Tres envases estériles de treinta mililitros de capacidad aproximada con rosca y tapadera hermética.

##### Método.

1. Diluir la glicerina al 50% en agua destilada preservada en estado estéril en un matraz Erlen Meyer pyrex estéril con torunda hermética de algodón estéril, y adicionarle citrato de sodio en un 2%, homogeneizando dicha suspensión.

2. Depositar el preservativo elaborado en envases estériles - (adecuados al tamaño de la muestra) de treinta mililitros de capacidad - aproximada con rosca y tapadera hermética.

3. Sumergir el material sospechoso en el medio de conservación

elaborado para su preservación.

(XIX, XXXVII).

b). Refrigeración.

Material.

Una hielera limpia de poliuretano con tapadera hermética, de 45cm. de largo por 30 cm. de ancho por 20 cm. de alto aproximadamente con - hielo renovable de preferencia cada veinticuatro horas, procedente de agua potable, y con un nivel mínimo de hasta la mitad de la capacidad de la hielera.

Tres envases estériles de treinta mililitros de capacidad aproximada, con rosca y tapadera hermética.

Un rollo de cinta adhesiva.

Método.

1. Guardar el material sospechoso para su preservación en envases estériles (adecuados al tamaño de la muestra) de treinta mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética.

2. Se deposita el envase que contiene el material sospechoso (o el espécimen completo) entre el hielo.

3. Se cierra la hielera limpia de poliuretano con tapadera - hermética, y se cincha con cinta adhesiva.

(XIX, XXXVII).

TECNICAS DE OBTENCION DEL MATERIAL SOSPECHOSO A PARTIR DE  
AVES ENFERMAS.

a). Técnica de obtención del exudado traqueal de un ave viva.

Material.

Tres vasos de precipitado pyrex estériles de cincuenta mililitros de capacidad.

Quinientos mililitros de agua destilada preservada en estado estéril en un matraz Erlen Meyer pyrex estéril de un litro de capacidad, - con torunda hermética de algodón estéril.

Tres tubos de cultivo kimax estériles de siete mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

Gradilla de alambre para cuarenta tubos.

Metodo.

1. Provocar una expectoración al ave enferma haciendo presión sobre el cartilagoaritenoides y sobre la parte inferior de la traquea, - habiendo colocado previamente en la abertura bucal del ave un vaso de - precipitado pyrex estéril de cincuenta mililitros de capacidad para recoger el esputo. Otras veces es necesario hacer gargarizar al ave con - agua destilada preservada en estado estéril, para obtener la suficiente cantidad de material sospechoso, habiendo colocado previamente en la - abertura bucal del ave un vaso de precipitado pyrex estéril de cincuenta mililitros de capacidad para recoger el gargarismo.

2. Usualmente en ambos casos se utiliza un recipiente para la obtención de la muestra y otro para su preservación en un medio de conservación, sino ha de ser elaborado en el momento el material sospecho-



so. La muestra se ha de pasar una vez obtenida, del vaso de precipitado, a un tubo de cultivo estéril de siete mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

(XIX).

b). Técnica de obtención de material sospechoso de las lesiones cutáneas de un ave.

Material.

Una botella limpia con rociador conteniendo doscientos mililitros de alcohol de 96 grados G.L.

Una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada.

Una pinza de disección con dientes de ratón de 14.5 centímetros previamente esterilizada.

Tres tubos de cultivo kimax estériles de siete mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

Gradilla de alambre para cuarenta tubos.

Un frasco de boca ancha de quinientos mililitros de capacidad aprox., con trescientos mililitros de alcohol de 96 grados G.L.

Método.

1. Desinfectar de una manera generosa la región de donde se ha de coleccionar el material sospechoso, rociando con alcohol de 96 grados G.L., pero sin friccionar de alguna manera.

2. Remover la lesión con ayuda de una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada, incidiendo profundamente dentro del tejido epitelial y con ayuda de una pinza de disección con dientes de ra

tón previamente esterilizada, sujetar la muestra, a fin de depositarla en un tubo de cultivo estéril de siete mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

(XIX).

TECNICAS DE OBTENCION DEL MATERIAL SOSPECHOSO POR MEDIO DE  
LA NECROPSIA DE UN AVE ENFERMA.

Material general de necropsia.

Un lavabo limpio y un grifo con agua potable.

Una botella limpia con rociador conteniendo doscientos mililitros de alcohol de 96 grados G.L.

Un mango de bisturí número cuatro previamente esterilizado.

Dos hojas cambiabiles de disección estériles número veintidos.

Un arco limpio para segueta.

Dos seguetas previamente esterilizados.

Una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada.

Dos pinzas de disección con dientes de ratón de 14.5 cm. previamente esterilizadas.

Tres envases estériles de treinta mililitros de capacidad aprox.,- con rosca y tapadera hermética.

Un frasco de boca ancha de quinientos mililitros de capacidad aprox., con trescientos mililitros de alcohol de 96 grados G.L.

- a). Técnica de obtención del material sospechoso de la parte superior del tracto digestivo y respiratorio.

Método.

1. Lavar con agua potable las plumas del ave y desinfectar de una manera generosa el área en que se ocupe hacer la incisión, rociando con alcohol de 96 grados G.L.

2. Colocar sobre su dorso al ave en la mesa de necropsias pre

viamente esterilizada en su superficie.

3. Insertar la hoja de una tijera de disección de punta aguda, previamente esterilizada en la abertura bucal, y cortar a través de la articulación de la mandíbula en el ángulo de la boca.

4. Cortar hacia abajo, a través de la faringe, continuando - por el esófago cervical hasta el buche.

5. Separar la piel del cuello y músculos, tirando simplemente con los dedos, protegidos por unos guantes de hule estériles, o a falta de éstos con dos pinzas de disección con dientes de ratón previamente esterilizadas a fin de hacer posible el examen de la parte superior del tracto digestivo y del tracto respiratorio, y de este modo hacer visible el material sospechoso que ha de ser obtenido.

6. Por ejemplo: para la obtención de la traquea sospechosa, - se introducen las hojas de una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada, en la laringe a nivel de la epiglotis, y cortar en toda su longitud la porción cervical de la traquea, obtener los exudados, o extirpar la traquea.

7. Colocar el material sospechoso obtenido en la necropsia, - con ayuda de una pinza de disección con dientes de ratón previamente esterilizada, en un envase estéril (adecuado al tamaño de la muestra) de treinta mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética.

(XIX).

b). Técnica de obtención del material sospechoso de la cavidad torácica y abdominal.

1. Insertar una de las hojas de un par de tijeras de disección de punta aguda previamente esterilizada, en el área donde tiene su

inicio la línea alba en el cartílago xifoides.

2. Partiendo de este punto, cortar la pared torácica, incluyendo el músculo pectoral y las costillas, hacia la región axilar de uno y otro lado del cuerpo.

3. Asir el esqueleto del tórax forzándolo hacia adelante, exponiendo las vísceras torácicas para hacer posible su examen u obtención.

4. Partiendo del mismo punto (inicio de la línea alba en el cartílago xifoides), efectuar una tercera incisión a lo largo de la línea alba, en dirección al tendón prepúbico, a fin de hacer posible el examen de los órganos abdominales o su obtención.

5. Colocar el material sospechoso obtenido en la necropsia, con ayuda de una pinza de disección con dientes de ratón previamente esterilizada, en un envase estéril (adecuado al tamaño de la muestra) de treinta mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética.

(XIX)

c). Técnica de obtención del encefalo.

1. Separar la cabeza del resto del cuerpo desarticulando la articulación atlantoaxoidea, e incidir con ayuda de un bisturí número cuatro previamente esterilizado, armado con una hoja cambiabile de disección estéril número veintidos, los tejidos blandos del cuello, hasta lograr su separación.

2. Se quita con ayuda del mismo bisturí previamente esterilizado y una pinza de disección con dientes de ratón previamente esterilizada, la piel que reviste la cabeza dejando al descubierto la cara externa de los huesos del cráneo.

3. Se debe primeramente localizar el área convexa de los huesos que forman el cráneo (cara externa), que está localizada por detrás de las órbitas hasta la porción anterior de la cresta nugal del occipital. Delinear en la cara externa de los huesos de dicha área, un rectángulo de cuatro lados, en el que las líneas paralelas largas estén ubicadas a cada lado de la cara dorsal del cráneo, que vayan desde la sutura nasofrontal hasta la sutura escamosa, y las líneas cortas estén ubicadas y delineadas en la cara externa de los huesos de la cara dorsal del cráneo, con un trayecto paralelo a la porción anterior y posterior del cerebro respectivamente.

4. Con ayuda de una segueta previamente esterilizada, limar a lo largo de las líneas que forman el rectánculo de cuatro lados, teniendo cuidado de no ir demasiado profundo como para cortar el cerebro, terminando de dividir los huesos de la cara dorsal del cráneo con ayuda de una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada, introduciendo su punta aguda en la cavidad del cráneo sin dañar el cerebro y cortar lo que no se haya podido dividir con la segueta por temor a lesionar el cerebro.

5. Botar el área señalada con ayuda de una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada, introduciendo una de sus puntas dentro de la cavidad del cráneo sin dañar el cerebro, y efectuando una palanca con el mango de la tijera en relación a los huesos de la cara dorsal del cráneo que se desean botar, siendo deseable efectuar la presión en las esquinas del rectángulo.

6. El encefalo puede extraerse removiéndolo con sumo cuidado en su base, con ayuda de una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada, a fin de que pueda salir de la cavidad por la

abertura rectangular que se ha formado.

7. Al ser extraído el encéfalo, se deposita en un envase estéril, de treinta mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética.

(LIV)

TECNICAS DE ELABORACION DEL INOCULO A PARTIR DE MATERIAL SOSPECHOSO.

Material general para elaboración del inóculo.

Un gramo de material sospechoso sin contaminantes, depositado en el envase en que se ha preservado desde su obtención.

Una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada. -

Una pinza de disección con dientes de ratón de 14.5 centímetros -  
previamente esterilizada.

Un mortero de Ten Broeck estéril con su émbolo lleno de hielo picado procedente de agua potable.

Cinco gramos de arena de sílice estéril, depositada en un vaso de precipitado pyrex estéril de cincuenta mililitros de capacidad.

Dos pipetas volumétricas kimax estériles de cinco mililitros (5ml), graduadas en color en décimas de mililitro (0.1 ml.), obturadas con algodón en el extremo bucal.

Dos pipetas volumétricas kimax estériles de diez mililitros (10 ml.), graduadas en color en mililitros (1 ml.), obturadas con algodón en el extremo bucal.

Cuatro tubos de cultivo kimax estériles de siete mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

Una centrífuga limpia de cuatro tubos y 4500 revoluciones por minuto (de uso exclusivo para este fin).

Dos jeringas de tuberculina estériles de dos mililitros (2 ml.), - con medida en décimas de mililitro (0.1 ml:)., con pivote metálico de -



enchufe universal.

Dos jeringas Luer estériles de cinco mililitros con pivote metálico de enchufe universal.

Seis agujas de disección estériles número veinte de una y media - pulgada de longitud.

Quinientos mililitros de agua destilada preservada en estado estéril, en un matraz Erlen Meyer pyrex estéril de un litro de capacidad, con torunda hermética de algodón estéril.

Un frasco comercial conteniendo un gramo de estreptomicina.

Un frasco comercial conteniendo un millón de unidades internacionales de penicilina sódica o potásica.

Un frasco comercial conteniendo un gramo de nistatina.

Un frasco de boca ancha de quinientos mililitros de capacidad -- aprox., con trescientos mililitros de alcohol de 96 grados G.L.

Dos agitadores esterilizados de vidrio de quince mililitros.

Una gradilla de alambre para cuarenta tubos.

a). Técnica de elaboración del inóculo a partir de órganos.

Método.

1. a). Los órganos conservados en glicerina deben ser objeto de un lavado previo a su elaboración con agua destilada preservada en estado estéril, a la vez que se examina el estado de conservación del material sospechoso. De igual manera efectuar un examen previo a la elaboración de los órganos conservados en refrigeración.

b). Los órganos han de ser cortados finamente con una tijera-

de disección de punta aguda previamente esterilizada, ayudado en la sujeción del material sospechoso con una pinza de disección con dientes-de ratón previamente esterilizada.

2. Depositar los trozos de material sospechoso en el interior - de la cámara de un mortero de Ten Broeck estéril. Con peso del material sospechoso de un gramo.

El mortero Ten Broeck estéril es previamente preparado a la molien - da, ya que el émbolo en su interior debe contener hielo picado, proce - dente de agua potable.

3. Añadir una pequeña cantidad de abrasivo, como arena de sílice estéril, al interior de la cámara del mortero de Ten Broeck y hacer - la molienda hasta formar una pequeña pasta fina.

4. Con una pipeta volumétrica kimax estéril de cinco mililitros obturada con algodón en el extremo bucal, tomar cinco mililitros de - agua destilada preservada en estado estéril y depositarla sobre la pas - ta previamente elaboradas, hacer la molienda y homogenizar la suspensión que se ha de formar.

5. Tomar la suspensión con una pipeta volumétrica kimax estéril de diez mililitros obturada con algodón en el extremo bucal, y deposi - tarla en un tubo de cultivo kimax estéril de siete mililitros de capaci - dad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

6. Centrifugar las muestras contenidas en los tubos de cultivo - a 2,500 revoluciones por minuto durante veinte minutos. Poner a la par - otro tubo de cultivo en la centrífuga si solo una suspensión se ha de - centrifugar.

7. Recoger dos y medio mililitros (2.5 ml.) del líquido sobrena

dante de la suspensión con una jeringa Luer estéril de cinco mililitros - con pivote metálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril número veinte de una y media pulgada de longitud.

8. Depositar la suspensión en un tubo de cultivo kimax estéril - de siete mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética - de banquelita.

9. Agregar antibióticos a la suspensión, con ayuda de una jeringa de tuberculina estéril de dos mililitros con pivote metálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril número veinte de una y media pulgada de longitud. 10,000 unidades internacionales de penicilina sódica o potásica, cincuenta miligramos de estreptomina y veinticinco miligramos de nistatina por cada mililitro de suspensión. Mezclar los antibióticos en dicha suspensión, invirtiendo de buen modo el tubo de cultivo para lograr su mejor homogenización. Esperar treinta minutos al término de los cuales es utilizable la suspensión homogénea como inóculo. (XXI, XVIII).

b). Técnica de elaboración del inóculo a partir de lesiones cutáneas.

Método.

Si el material sospechoso de una lesión cutánea se ha secado en el tubo de cultivo que se ha conservado, tiene que ser removido por un agitador estéril de vidrio de quince centímetros a fin de poder depositarlo en el interior de la cámara de un mortero Ten Broeck estéril. Con peso del material sospechoso de un gramo.

El mortero Ten Broeck estéril es previamente preparado a la molienda, ya que el émbolo en su interior debe contener hielo picado, procedente de agua potable.

De ahí se utiliza el mismo procedimiento desde el paso número -- tres de la técnica de elaboración del inóculo a partir de órganos.

(XXI).

c). Técnica de elaboración del inóculo a partir de exudado traqueal .

Método.

1. El exudado traqueal conservado en el tubo de cultivo, se deposita en el interior de la cámara de un mortero Ten Broeck estéril.- Con peso del material sospechoso de un gramo.

2. Con una pipeta volumétrica kimax estéril de cinco mililitros obturada con algodón en el extremo buca tomar cinco mililitros de agua destilada preservada en estado estéril, y depositarlos sobre el exudado sospechoso en el interior de la cámara del mortero Ten Broeck,- hacer la molienda y homogeneizar la suspensión que se ha de formar.

De ahí se utiliza el mismo procedimiento desde el paso número cinco de la técnica de elaboración de inóculo a partir de órganos.

(XXI).

## TECNICA DE DESINFECCION DE LA INCUBADORA

MATERIAL.

Un fco. de un litro de formol al 40%.

Una probeta limpia de cien mililitros (100 ml.), graduada en color en mililitros (1 ml.).

Una franela cuadrada de medio metro.

Una vasija de aluminio o de peltre de veintinueve centímetros de diámetro y dos litros de capacidad.

6.18 gramos de permanganato.

Un grifo con agua potable.

METODO.

1. Después del lavado de la incubadora desinfectar con ayuda de una franela las superficies de la incubadora y charolas portahuevos, con formol al 40% en suspensión homogénea al 10% en agua potable.

2. La vasija en la que se lleva a cabo la reacción debe de ser de aluminio o de peltre, debiendo ocupar el desinfectante a lo más un décimo del nivel de la capacidad de la vasija. Adicionar en la vasija 12.5 mililitros de formol al 40% a 6.18 gramos de permanganato por metro cúbico de espacio de la incubadora.

Con la vasija en el piso de la incubadora dejar el desinfectante reaccionar una hora, con las ventilas abiertas de la incubadora.

3. Introducir los huevos dentro de la incubadora previamente desinfectada una vez que se haya sacado la vasija que contiene el desinfectante.

4. Una vasija de aluminio o de peltre conteniendo quince mililitros de formol al 40%, depositarla en el piso de la incubadora durante tres horas, con los huevos en el interior y las ventilas abiertas, - al séptimo día después de haber sido realizada la primera desinfección. (XXIX, L).

TECNICA DE DESINFECCION DE LA CASCARA DEL HUEVO Y CARA EXTERNA  
DE LA MEMBRANA INTERNA(FARFARA)

Material.

Una incubadora comercial marca Perrusquia previamente desinfectada con capacidad para ciento cincuenta y dos huevos.

Seis litros de agua destilada preservada en estado estéril en un garrafón de diez litros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética.

Ciento veinte gramos de tilosina.

Un fco. de un litro de formol al 40%.

Una probeta limpia de cien mililitros (100 ml.), graduada en color en mililitros (1 ml.).

Dos charolas portahuevos previamente desinfectadas de material plástico o madera.

Una tina previamente desinfectada de trece litros de capacidad -- aproximada, de lámina o de plástico.

Cinco moldes de doce cubitos de hielo cada uno, procedentes los cubitos de hielo de agua destilada.

Método.

1. A los huevos por desinfectar se les ha de calentar dos horas en la incubadora a una temperatura de 99.95 grados Fahrenheit, o sea 37.75 grados centígrados, antes de efectuar la inmersión en la solución desinfectante.

2. Refrigerar a cuatro grados centígrados seis litros de agua destilada preservada en estado estéril en un garrafón de diez litros de

capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética.

3. Lavar de una manera generosa las charolas portahuevos con formol al 40% en suspensión homogénea al 10% en agua potable.

4. Lavar de una manera generosa la tina con formol al 40% en suspensión homogénea al 10% en agua potable.

5. Elaborar en el garrafón la solución desinfectante que consta del 2% de tilosina en suspensión homogénea en agua destilada.

La solución desinfectante elaborada, se vierte del garrafón a la tina previamente desinfectada y se le agregan cubitos de hielo procedentes de agua destilada, a fin de que llegue la solución a la temperatura requerida de menos dos grados centígrados.

6. Colocados los huevos en la charola portahuevos previamente desinfectada, sumergirlos durante dos minutos en la solución desinfectante.

7. Una vez terminado el proceso, volver los huevos a la incubadora a 99.50 grados Fahrenheit, o sea 37.5 grados centígrados. (XXX,L)



## TECNICAS DE INOCULACION

Material general de inoculación.

Un ovoscopio de fabricación casera con un foco de cien watts.

Un mechero de bunsen para gas con llama graduable.

Un lápiz de grafito.

Un frasco de boca ancha de quinientos mililitros de capacidad aproximadamente con trescientos mililitros de alcohol de 96 grados G.L.

Un frasco de cien mililitros de tintura de metafeno y aplicador, o un frasco de cien mililitros de tintura de yodo oficial y aplicador, o un frasco de quince mililitros de merthiolate y aplicador.

Un frasco comercial de colodi6n y aplicador.

Un frasco refractario con parafina liquida fundida de quince mililitros aproximadamente y aplicador.

Cuatro tubos de cultivo kimax estériles de quince mililitros de capacidad aproximadamente con rosca y tapadera hermética de baquelita.

Veinte cubre objetos cuadros de 1.8 cm., desgrasados en alcohol de 96 grados G.L.

Dos compresas de campo de 60 por 35 centímetros.

Un cubre bocas de tela o una mascarilla contra el polvo 22 B.

Una piedra de lenteja previamente esterilizada.

Dos piezas de mano previamente esterilizadas.

Una pinza de iridectomía previamente esterilizada.

Una perita de hule estéril.

Un catéter de hule estéril de diez centímetros aplicables a la perita de hule.

Veinte óvalos de papel estraza estériles de dos centímetros de largo y centímetro y medio de ancho.

Veinte discos de papel de estraza estéril de centímetro y medio de diámetro.

Dos jeringas de tuberculina estériles de un mililitro (1 ml.) o - más común de dos mililitros (2 ml.) de capacidad, con medida en décimas de mililitro (0.1 ml.), con pivote metálico de enchufe universal.

Una guía de hule estéril para inclusión de agujas de disección.

Cuatro agujas de disección estériles número veinte de una y media-pulgada de longitud.

Diez agujas de disección estériles número veinticuatro de una y media pulgada de longitud.

Diez agujas de disección estériles número veintisiete de una pulgada de longitud.

Diez agujas de disección estériles número veintisiete de una y me-dia pulgada de longitud.

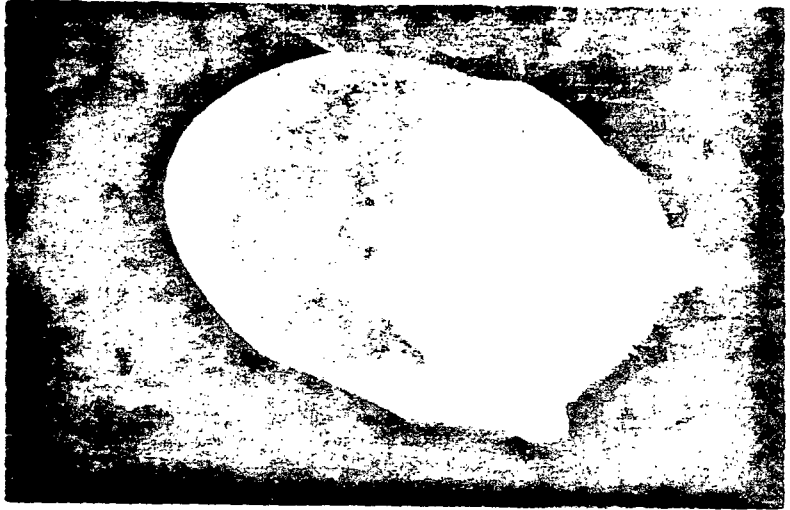


FOTO No. 1. Ovoscopando el huevo para observar a trasluz la -  
disposición de sus estructuras.



### CAMARA DE AIRE

FOTO No. 2. Disposición de la cámara de aire en el huevo, con  
un embrión de pollo de diez días de edad. (XXV).

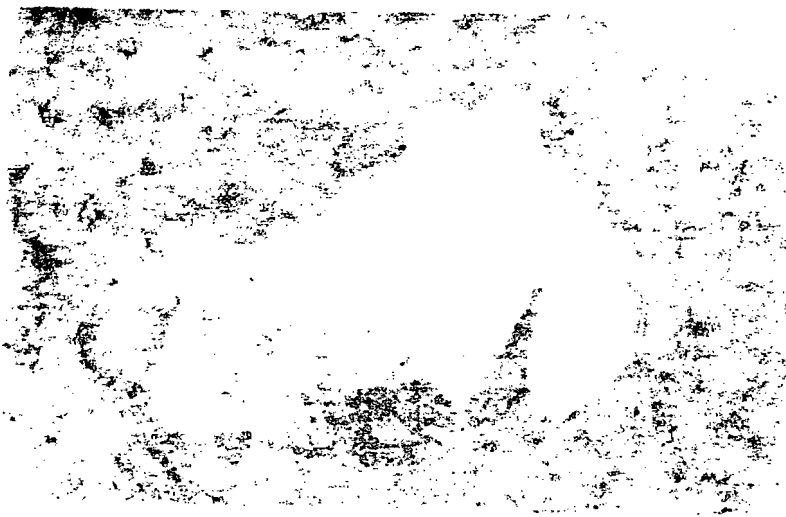


FOTO No. 3. Al observar a trasluz el huevo, se delinea sobre la cáscara el límite del área de la cámara de --  
aire.

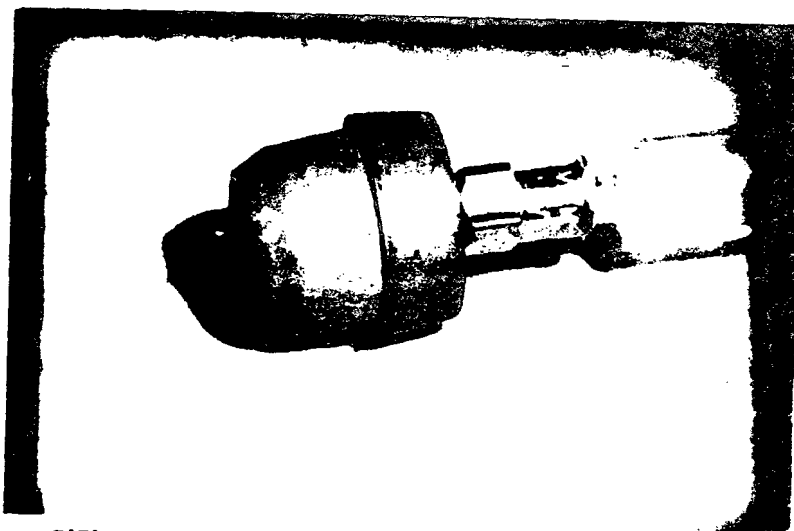


FOTO No. 4. Aguja provista de una goma de hule, para evitar la penetración de ésta a más de dos milímetros al --  
efectuar la perforación de los orificios en la cáscara del huevo.

## TECNICA DE INOCULACION No. 1 EN EL SACO ALANTOIDES

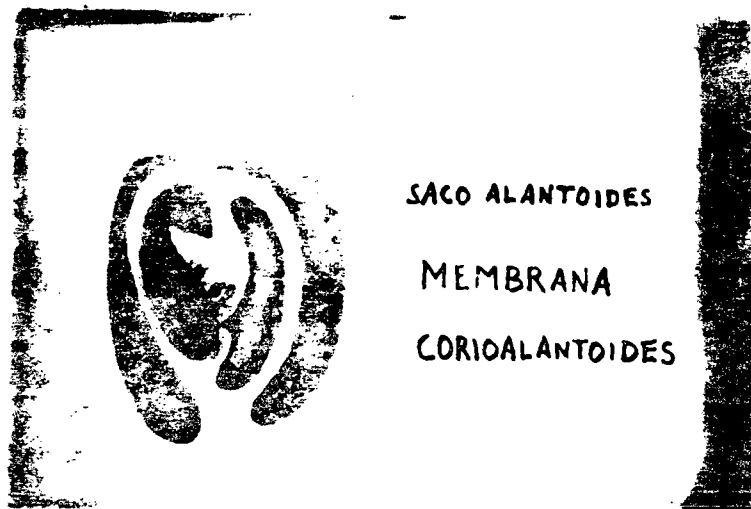


FOTO No. 5. Disposición de la membrana carioalantoides y cavidad alantoides en el huevo, con un embrión de pollo de diez días de edad. (XXV).

Método.

1. Examinar al ovoscopio el huevo y a la vez utilizar un lápiz de grafito para marcar los puntos que se han de señalar sobre la cáscara del huevo.

a). Elíjase una zona en el polo superior del huevo sobre la cámara de aire, a unos cinco milímetros por arriba del límite del saco vitelino, y marcar la zona "A".

b). Elíjase una zona de la membrana corioalantoides distante del embrión y de la cavidad amniótica, libre de grandes vasos sanguíneos, y a unos cinco milímetros por debajo del límite de la cámara de

aire sobre el saco vitelino, y marcarla zona "B".

2. Con ayuda de un aplicador, desinfectar los puntos señalados con tintura de metafero o tintura de yodo oficial, o merthiolate- y dejar secar.

3. a). Reducir el grosor de la cáscara en el punto señalado sobre la cámara de aire en la zona "A", con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada.

b). Se perfora el punto frágil sobre la cámara de aire- en la zona "A" con una aguja de disección estéril número veinticuatro, provista de una guía de hule previamente esterilizada (foto No. 4), para evitar la penetración a más de dos milímetros, asegurándose que vaya lo suficientemente profundo como para que perfora la cáscara y la membrana interna (fárfara).



FOTO No. 6. Horadando el punto señalado sobre la cámara de aire en la zona "A" con una aguja de disección estéril número veinticuatro, provista de una guía de hule previamente esterilizada.

4. a). Reducir el grosor de la cáscara en el punto señalado en la zona "B", con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada.

b). Se perfora el punto frágil en la zona "B" con una aguja de disección estéril número veinticuatro, provista de una guía de hule previamente esterilizada (foto No. 4), para evitar la penetración a más de dos milímetros, asegurándose que vaya lo suficientemente profundo como para que perfora la cáscara y la membrana interna (fárfara).

5. Utilizar para la inoculación una jeringa de tuberculina es téril, de un mililitro (1 ml) o más común de dos mililitros (2 ml.) de capacidad, con medida en décimas de mililitro (0.1 ml.), con pivote metálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril número veintisiete de una pulgada de longitud.

La aguja de disección estéril se inserta a través del orificio situado en la zona "B", por lo menos hasta una profundidad de un cuarto de pulgada, o sea seis milímetros. La aguja de disección estéril se introduce en cuarenta y cinco grados de ángulo, dirigiéndola hacia la cáscara y no al centro del huevo.

Introducir la aguja de disección estéril en el saco alantoides e inyectar la cantidad de inóculo que se desee.

6. Retirar la aguja de disección estéril e inyectar el huevo siguiente o volver la jeringa al tubo estéril de donde se tomó. El cual es un tubo de cultivo kimax estéril, de quince mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

7. Cerrar los orificios de inoculación con colodión o parafina líquida fundida.

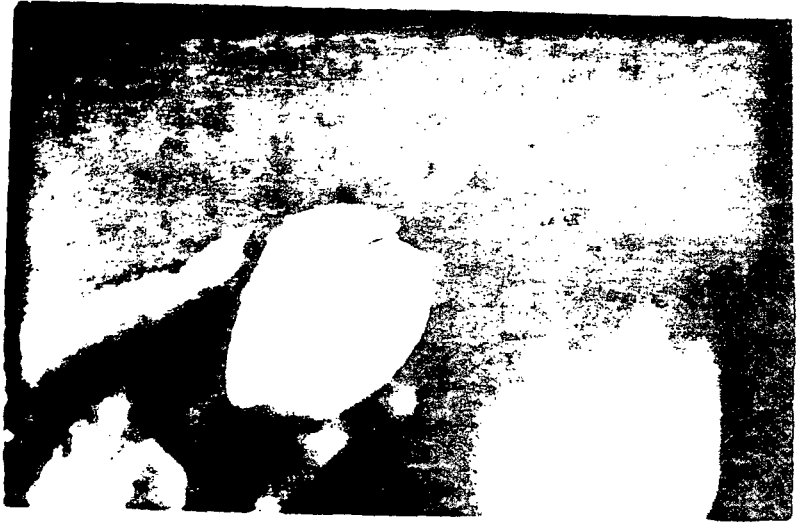


FOTO No. 7. Nótese el ángulo de cuarenta y cinco grados que mantiene la aguja de disección estéril, al ser inoculado el huevo en el saco alantoides.

8. Rotular los huevos con lápiz de grafito para su fácil identificación. (XXI, XXXVII, XVII)



## TECNICA DE INOCULACION No. 2 EN EL SACO ALANTOIDES.

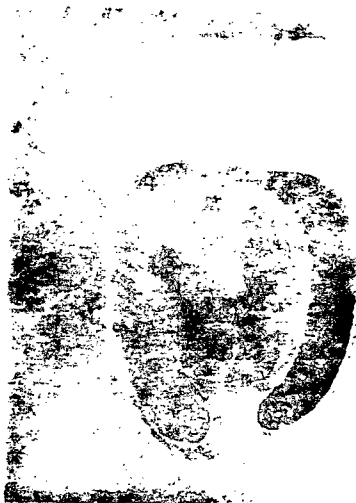


FOTO No. 8. Disposición de la cavidad alantoides en el huevo, con un embrión de pollo de diez días de edad. (XXV).

Método.

1. Examinar al ovoscopio el huevo y a la vez utilizar un lápiz de grafito para marcar los puntos que se han de señalar sobre la cáscara del huevo.

a). Elíjase una zona en el polo superior del huevo sobre la cámara de aire, a unos cinco milímetros por arriba del límite del saco vitelino y marcarla.

2. Con ayuda de un aplicador desinfectar el punto señalado - con tintura de metafero, o tintura de yodo oficial, o merthiolate y de jar secar.

3. a). Reducir el grosor de la cáscara en el punto señalado - en la zona, con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada.

b). Se perfora el punto frágil en la zona con una aguja de disección estéril número veinticuatro, provista de una guía de hule previamente esterilizada (Foto No. 4), para evitar la penetración a más de dos milímetros, asegurándose que vaya lo suficientemente profundo como para que perfore la cáscara y la membrana interna (fárfara).



FOTO No. 9. Horadando el punto señalado en la zona del polo superior del huevo sobre la cámara de aire, a unos cinco milímetros por arriba del límite del saco vitelino, con una aguja de disección estéril número veinticuatro provista de una guía de hule previamente esterilizada.

4. Utilizar para la inoculación una jeringa de tuberculina estéril de un mililitro (1 ml.) o más común de dos mililitros (2 ml.) de capacidad, con medida en décimas de mililitro (0.1 ml.), con pivote metálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril número veintisiete de una pulgada de longitud.

La aguja de disección estéril se inserta a través del orificio, perpendicularmente a la base de la cámara de aire, por lo menos hasta una profundidad de cinco octavos de pulgada, o sea, diez y seis milíme-

tros.

Introducir la aguja de disección estéril en el saco alantoides e -  
inyectar la cantidad de inóculo que se desee.



FOTO No. 10. Nótese la dirección perpendicular con respecto a la -  
base de la cámara de aire que mantiene la aguja de -  
disección estéril al ser inculado el huevo en el sa -  
co alantoides.

5. Retirar la aguja e inyectar el huevo siguiente o volver la  
jeringa al tubo estéril de donde se tomó, el cual es un tubo de cultivo  
kimax estéril de quince mililitros de capacidad aprox., con rosca y ta-  
padera hermética de baquelita.

6. Cerrar el orificio de inoculación con colodión o parafina -  
líquida fundida.

7. Rotular los huevos con lápiz de grafito para su fácil iden-  
tificación. (XXI, XXXVII, XVII).

## TECNICA DE INOCULACION No. 1 EN EL SACO DE LA YEMA



FOTO No. 11. Disposición del saco de la yema en el huevo, con un -  
embrión de pollo de seis días de edad. (XXV)

Método.

1. Examinar al ovoscopio el huevo y a la vez utilizar un lápiz de grafito para marcar los puntos que se han de señalar sobre la cáscara del huevo.

a). Elíjase una zona en el polo superior del huevo, sobre la cámara de aire, a unos cinco milímetros por arriba del límite del saco vitelino, y marcarla zona "A".

b). A la observación en el ovoscopio, colocar el huevo - con el eje mayor en posición horizontal, señalar exactamente la posi - - ción del embrión con una X, girar el huevo ciento ochenta grados y ele - - jir una zona a la altura del saco de la yema, en un punto equidistante - del polo agudo del huevo y de la zona de mayor latitud, o sea el otro po

lo, y marcarla zona "B".

2. Con ayuda de un aplicador desinfectar los puntos señalados con tintura de metafero, o tintura de yodo oficial, o merthiolate y dejar secar.



FOTO No. 12. Charola portahuevos con cuatro huevos secándoseles el desinfectante antes de ser horadados los puntos señalados, a fin de hacer posible su inoculación en el saco de la yema.

3. a). Reducir el grosor de la cáscara en el punto señalado - sobre la cámara de aire en la zona "A", con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada.

b). Se perfora el punto frágil sobre la cámara de aire en la zona "A" con una aguja de disección estéril número veinticuatro, pro vista de una guía de hule previamente esterilizada (Foto No. 4), para evitar la penetración a más de dos milímetros, asegurándose que vaya lo suficientemente profundo como para que perfora la cáscara y la membrana

interna (fárfara).

4. a). Reducir el grosor de la cáscara en el punto señalado - a la altura del saco de la yema en la zona "B", con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada.

b). Se perfora el punto frágil a la altura del saco de la yema en la zona "B", con una aguja de disección estéril número veinticuatro, provista de una guía de hule previamente esterilizada (foto No. 4), para evitar la penetración a más de dos milímetros, asegurándose - que vaya lo suficientemente profundo como para que perfore la cáscara y la membrana interna (fárfara).



FOTO No. 13. Reduciendo el grosor de la cáscara en el punto señalado sobre la cámara de aire, con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada montada en una piza de mano previamente esterilizada.

5. Utilizar para la inoculación una jeringa de tuberculina estéril de un mililitro (1 ml.) o más común de dos mililitros (2 ml.), de capacidad, con medida en décimas de mililitro (0.1 ml.), con pivote metá

lico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril - número veintisiete de una y media pulgada de longitud.

Con el huevo en posición horizontal se inserta la aguja de disección estéril a través del orificio lateral del huevo, perpendicularmente a la cara lateral del huevo, por lo menos hasta una profundidad de  $7/8$  de pulgada, o sea 2.22 cm.

Introducir la aguja de disección estéril en el saco de la yema e - inyectar la cantidad de inóculo que se desee.



FOTO No. 14. Reduciendo el grosor de la cáscara en el punto por el que ha de ser inoculado el huevo en el saco de la yema, con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada, montada en una pieza de mano previamente esterilizada.

6. Retirar la aguja e inocular el huevo siguiente o volver la jeringa al tubo estéril de donde se tomó, el cual es un tubo de cultivo kimax estéril de quince mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

7. Obturar los orificios practicados con colodión o parafina líquida fundida.

8. Rotular los huevos con lápiz de grafito para su fácil identificación.



FOTO No. 15. Nótese la dirección perpendicular con respecto a la - cara lateral del huevo, que mantiene la aguja de di - sección estéril al ser inoculado el huevo en el saco - de la yema. (XXI, XXXVII, XVII).



## TECNICA DE INOCULACION No. 2 EN EL SACO DE LA YEMA.

Método.

1. Examinar al ovoscopio el huevo y a la vez utilizar un lápiz de grafito para marcar los puntos que se han de señalar sobre la cáscara del huevo.

a). A la observación en el ovoscopio colocar el huevo con el eje mayor en posición horizontal, señalar exactamente la posición del embrión con una equis, girar el huevo ciento ochenta grados y elegir una zona a la altura del saco de la yema, en un punto equidistante del polo agudo del huevo y de la zona de mayor latitud, o sea del otro polo, y marcarla zona "A".

b). Elíjase una zona en el polo superior del huevo sobre la cámara de aire, a unos cinco milímetros por arriba del límite del saco vitelino en el mismo meridiano de la señal efectuada a la altura del saco de la yema, y marcarlo zona "B".

2. Con ayuda de un aplicador, desinfectar la zona señalada sobre la cámara de aire punto "B", con tintura de metafero, o tintura de yodo oficial, o merthiolate y dejar secar.

3. a). Reducir el grosor de la cáscara en el punto señalado sobre la cámara de aire en la zona "B", con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada.

b). Se perfora el punto frágil sobre la cámara de aire en la zona "B", con una aguja de disección estéril número veinticuatro provista de una gafa de hule previamente esterilizada (foto No. 4), para evitar la penetración a más de dos milímetros, asegurándose que vaya

lo suficientemente profundo como para que perfora la cáscara y la membrana interna (fárfara).

4. Utilizar para la inoculación una jeringa de tuberculina es téril de un mililitro (1 ml.) o más común de dos mililitros (2 ml.) de capacidad, con medida en décimas de mililitro (0.1 ml.), con pivote metálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril-número veintisiete de una y media pulgada de longitud.

Se inserta la aguja a través del orificio, perpendicularmente a la zona delimitada a la altura del saco de la yema, por lo menos hasta una profundidad de una pulgada y cuarto, o sea treinta y dos milímetros.

Introducir la aguja de disección estéril en el saco de la yema e -  
inyectar la cantidad de inóculo que se desee.



FOTO No. 16. *Nótese la dirección perpendicular a la zona delimitada a la altura del saco de la yema, que mantiene la aguja de disección estéril al ser inoculado el huevo en el saco de la yema, y la equis que señala la posición del embrión.*

5. Retirar la aguja e inyectar el huevo siguiente o volver la

jeringa al tubo estéril de donde se tomó, el cual es un tubo de cultivo kimax estéril, de quince mililitros de capacidad aproximada con rosca y tapadera hermética de baquelita.

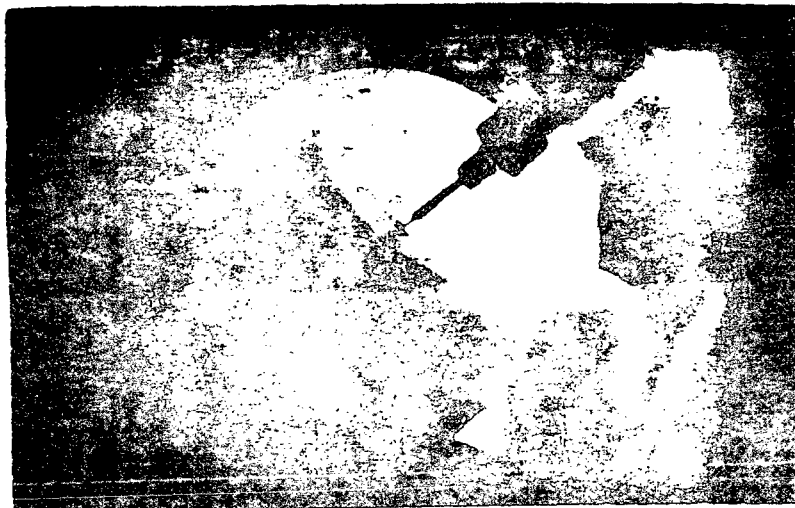


FOTO No. 17. Observando a trasluz la disposición del embrión al ser inoculado el huevo en el saco de la yema.



FOTO No. 18. Se observa la profundidad a la que llega la aguja al ser inoculado el huevo en el saco de la yema (XXV).

6. Cerrar el orificio de inoculación con colodión o parafina líquida fundida.

7. Rotular los huevos con lápiz de grafito para su fácil identificación. (XXI, XXXVII, XVII).

## TECNICA DE INOCULACION SOBRE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDES

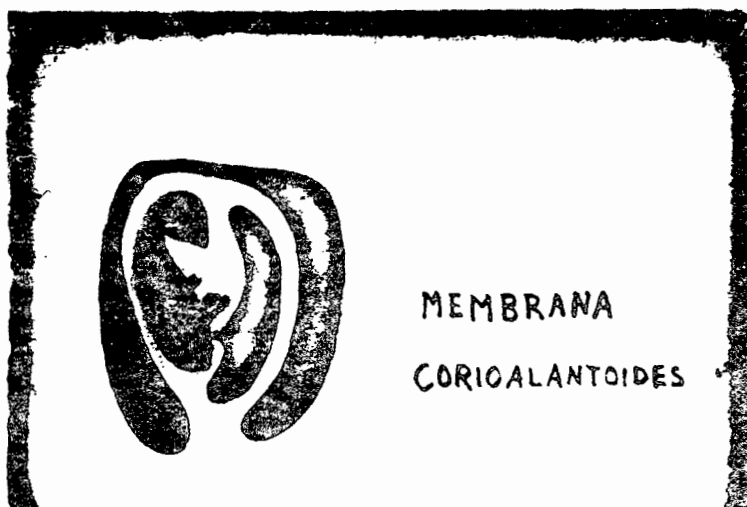


FOTO No. 19. Disposición de la membrana corioalantoides en el huevo, con un embrión de pollo de diez días de edad. (XXV)

Método.

1. Examinar al ovoscopio el huevo y a la vez utilizar un lápiz de grafito para marcar los puntos que se han de señalar sobre la cáscara del huevo.

a). Elíjase una zona en el polo superior del huevo, sobre la cámara de aire, a unos cinco milímetros por arriba del límite del saco vitelino, y marcarla zona "A".

b). A la observación en el ovoscopio el huevo se coloca horizontalmente, y se señala una zona equidistante de ambos polos en forma de rectángulo, con los lados contiguos de centímetro y medio de longitud, y los lados transversales de un centímetro de longitud.

2. Con ayuda de un aplicador, desinfectar la zona y área señalada en la cáscara con tintura de metafeno o tintura de yodo oficial,-

o merthiolate y dejar secar.

3. a). Reducir el grosor de la cáscara en el punto señalado - sobre la cámara de aire en la zona "A", con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada.

b). Se perfora el punto frágil sobre la cámara de aire - en la zona "A" con una aguja de disección estéril número veinticuatro - provista de una guía de hule previamente esterilizada (foto No. 4), para evitar la penetración a más de dos milímetros, asegurándose que va - ya lo suficientemente profundo como para que perfore la cáscara y la - membrana interna (fárfara).

4. Con una piedra de lenteja previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada, seccionar la cáscara en el rectángulo marcado sin lesionar la membrana interna (fárfara).

5. Para eliminar el rectángulo de la cáscara seccionada, se - emplea una aguja de disección estéril número veinte, con el bisel hacia abajo, a fin de poner al descubierto la membrana interna (fárfara). Lo - mejor es levantar tirando de uno de sus ángulos mejor que de los lados - para evitar que por aumentar la presión en alguno de los puntos de la - membrana interna (fárfara) se rompa ésta o la membrana corioalantoides.



FOTO No. 20. Seccionando con ayuda de una piedra de lenteja previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada, el rectángulo marcado sobre la cáscara del huevo.



FOTO No. 21. Huevos con el rectángulo de la cáscara seccionado en espera de ser botado, sobre una charola portahuevos de madera.

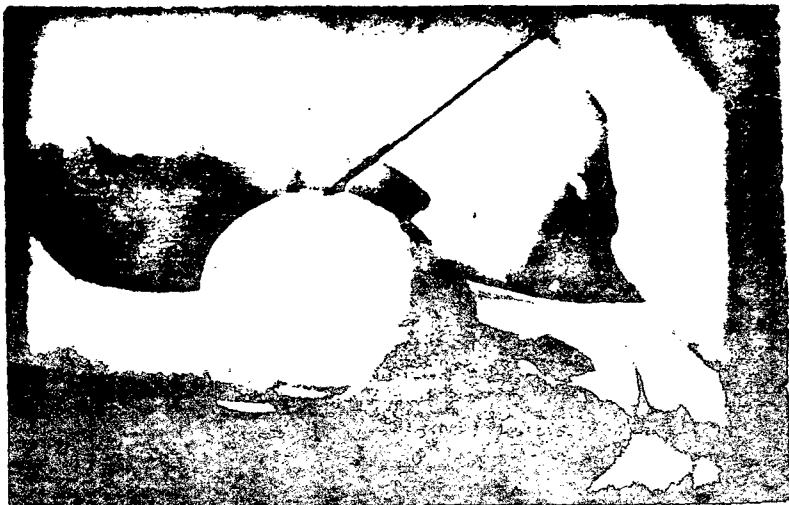


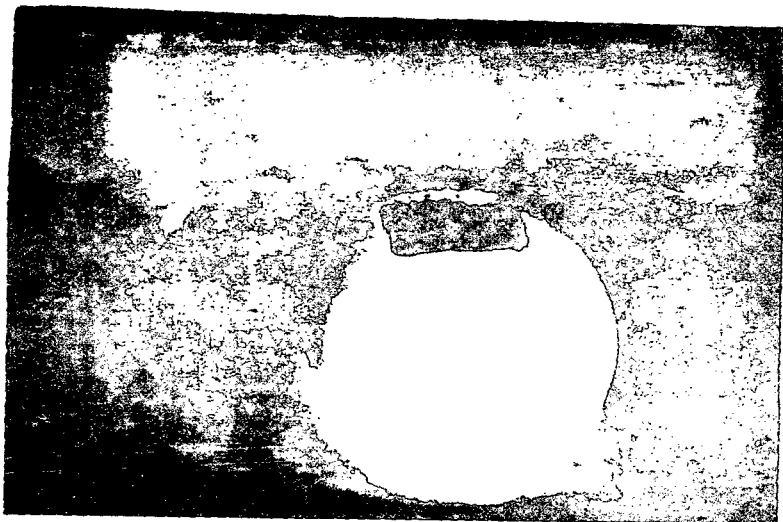
FOTO No. 22. Aplicación de una aguja de disección estéril número - veinte de una y media pulgada de longitud, en el ángulo del rectángulo seccionado.



FOTO No. 23. Rectángulo descascarado, sujeto con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada.



6. Empleando una águja de disección estéril número veinticuatro, incidir la membrana interna (fárfara) en el rectángulo previamente abierto en alguno de los lados del huevo, pero sin lesionar la membrana corioalantoides.



*FOTO No. 24. Fárfara diseccionada del rectángulo descascarado.*

7. Luego se efectúa una aspiración ligera como una perita de hule estéril con su catéter de hule estéril, aplicado al agujero horado en la cámara de aire del huevo.

8. Utilizar para la inoculación sobre la membrana corioalantoides caída, una jeringa de tuberculina estéril de un mililitro (1 ml.) o más común de dos mililitros (2 ml.) de capacidad, con medida en décimas de mililitro (0.1 ml), con pivote metálico de enchufe universal, armada con una águja de disección estéril número veintisiete de una pulgada de longitud.

Introducir la águja de disección estéril a través de rectángulo de la cáscara seccionada, con el bisel hacia abajo, y gotear sobre la mem-

brana corioalantoides caída la cantidad de inóculo que se desee.



FOTO No. 25. Aplicación de una perita de hule estéril con su catéter de hule estéril al agujero horadado en el saco aéreo del huevo, a fin de que el aire pase a través de la abertura fraguada sobre la cámara de aire a la abertura rectangular localizada en uno de los lados del huevo.



FOTO No. 26. Goteo del inóculo sobre la membrana corioalantoides-caída.

9. Retirar la aguja de disección estéril, inocular otro huevo o depositar la jeringa en el tubo estéril de donde se tomó, el cual es un tubo de cultivo kimax estéril, de quince mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

10. Cerrar el orificio horadado sobre la cámara de aire con colodión, o parafina líquida fundida.

11. Tapar la abertura rectangular localizada en uno de los la dos del huevo.

a). Con un óvalo de papel estraza estéril de dos centímetros de largo y centímetro y medio de ancho se cubre el rectángulo - descascarado pegándolo a sus bordes con colodión.

b). O si se desea poder observar el desarrollo de lesio nes macroscópicas sobre la membrana corioalantoides, puede cerrarse la abertura rectangular aplicando a los bordes de la misma colodión, y - adaptando en seguida sobre ésta un cubre-objetos desinfectado, y des - grasado en alcohol de 96 grados G.L.

12. Rotular los huevos con lápiz de grafito para su fácil - identificación. (XXI, XXXVII, XVII).

## TECNICA DE INOCULACION No. 1 EN EL SACO AMNIOTICO



FOTO No. 27. Disposición de la cavidad amniótica en el huevo, con un embrión de pollo de seis días de edad. (XXV).



FOTO No. 28. Disposición de la cavidad amniótica en el huevo, con un embrión de pollo de diez días de edad. (XXV).

### Método.

1. Examinar al ovoscopio el huevo y a la vez utilizar un lápiz de grafito para marcar los puntos que se han de señalar sobre la cáscara del huevo.

a). A la observación en el ovoscopio, señalar en la cáscara la posición exacta del embrión y marcarlo punto "A".

b). Elíjase una zona en el polo superior del huevo, sobre la cámara de aire a unos cinco milímetros por arriba del límite del saco vitelino, y en el mismo meridiano de la señal efectuada a la altura del embrión, y marcarla zona "B".

2. Con ayuda de un aplicador, desinfectar la zona señalada sobre la cámara de aire punto "B", con tintura de metafeno o tintura de yodo oficial, o merthiolate y dejar secar.

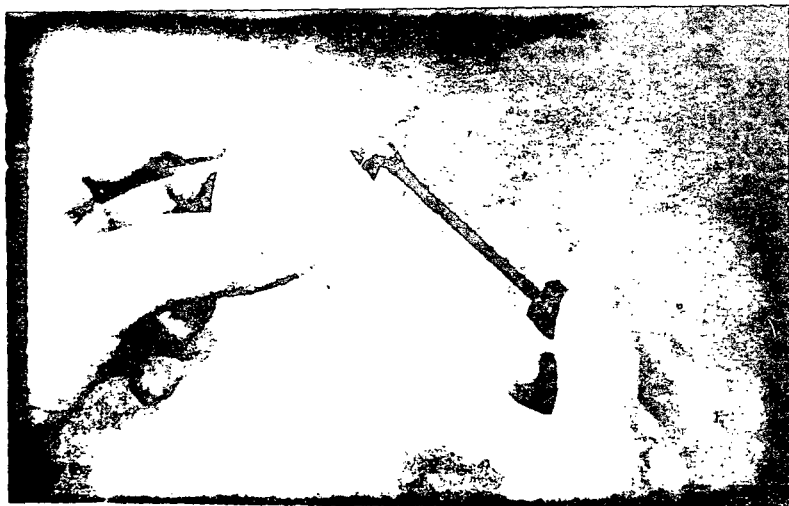


FOTO No. 29. Desinfección de la cáscara del huevo en el punto "B", con ayuda de un aplicador.

3. a). Reducir el grosor de la cáscara en el punto señalado sobre la cámara de aire en la zona "B", con ayuda de una piedra de carburo previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada.

b). Se perfora el punto frágil sobre la cámara de aire en la zona "B", con una aguja de disección estéril número veinticuatro, - provista de una guía de hule previamente esterilizada (foto No. 4), para evitar la penetración a más de dos milímetros, asegurándose que vaya lo suficientemente profundo como para que perfora la cáscara y la membrana (fárfara).



FOTO No. 30. Perforando el punto señalado en la zona del polo superior del huevo, sobre la cámara de aire, a unos cinco milímetros por arriba del límite del saco vitelino.

4. Utilizar para la inoculación una jeringa de tuberculina estéril, de un mililitro (1 ml.) o más común de dos mililitros (2 ml.) de capacidad, con medida en décimas de mililitro (0.1 ml.), con pivote metálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril-

número veintisiete de una y media pulgada de longitud.

Se inserta la aguja de disección estéril a través del orificio, dirigiéndola a la parte anterior de la zona delimitada a la altura del embrión, por lo menos hasta una profundidad de una pulgada y cuarto, o sea, treinta y dos milímetros.

Introducir la aguja de disección estéril en el saco amniótico e inyectar la cantidad de inóculo que se desee.



FOTO No. 31. Se observa la profundidad a la que llega la aguja de disección estéril al ser inoculado el huevo en el saco amniótico. (XXV).

5. Retirar la aguja de disección estéril, inocular otro huevo o depositar la jeringa en el tubo estéril de donde se tomó, el cual es un tubo de cultivo kimax estéril, de quince mililitros de capacidad -- aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

6. Cerrar el orificio de inoculación con colodión o parafina líquida fundida.

7. Rotular los huevos con lápiz de grafito para su fácil identificación. (XXI, XXXVII, XVII).

## TECNICA DE INOCULACION No. 2 EN EL SACO AMNIOTICO

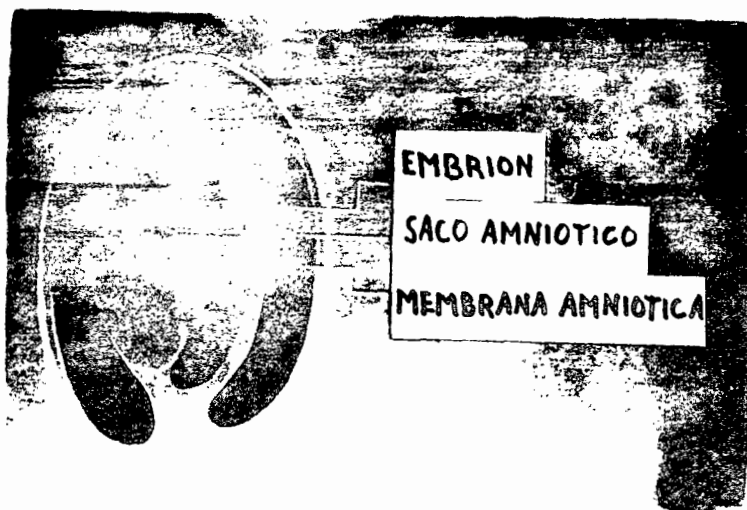


FOTO No. 32. Disposición de la cavidad amniótica y membrana amniótica en el huevo, con un embrión de pollo de diez días de edad. [XXV].

Método.

1. Examinar al ovoscopio el huevo y a la vez utilizar un lápiz de grafito para marcar los puntos que se han de señalar sobre la cáscara del huevo.

a). Delimitar la cámara de aire y marcarla.

b). Ubicar un triángulo de un centímetro (1 cm.) cada lado, cuya base sea (una zona) paralela al límite de la cámara de aire y a unos cinco milímetros por encima de la misma línea que marca el límite del saco vitelino, y marcar el triángulo.

2. Con ayuda de un aplicador, desinfectar el area señalada con tintura de metafero o tintura de yodo oficial, o merthiolate y dejar secar.



3. Con una piedra de lenteja previamente esterilizada montada en una pieza de mano previamente esterilizada, seccionar la cáscara en el triángulo marcado sin lesionar la membrana interna (fárfara).

4. Para eliminar el triángulo de la cáscara seccionada, se emplea una aguja de disección estéril número veinte, de una y media pulgada de longitud, con el bisel hacia abajo, a fin de poner al descubierto la membrana interna (fárfara). Lo mejor es levantar tirando de uno de sus ángulos mejor que de los lados, para evitar que, por aumentar la presión en alguno de los puntos de la membrana interna (fárfara) se rompa.

5. Empleando una aguja de disección estéril número veinte, de una y media pulgada de longitud, incidir la membrana interna (fárfara) en el triángulo previamente descascarado, a fin de hacer posible la manipulación siguiente: hacer una incisión en la membrana corioalantoides por encima del embrión con una aguja de disección estéril número veinte de una y media pulgada de longitud, teniendo cuidado de no romper vasos sanguíneos de gran calibre.

6. Introducir a través de los orificios una pinza de punta delgada como la de iridectomía previamente esterilizada, con sus extremos juntos, y dejar luego que se separen libremente los brazos, coger después la membrana amniótica con las pinzas y tirar suavemente de ella hacia arriba, a través del orificio de la membrana corioalantoides, para formar a modo de una tienda de campaña.

7. Utilizar para la inoculación una jeringa de tuberculina estéril de un mililitro (1 ml.) o más común de dos mililitros (2 ml.) de capacidad, con medida en décimas de mililitro (0.1 ml.), con pivote me-

tálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril-número veintisiete, de una y media pulgada de longitud.

Introducir la aguja de disección estéril en el saco amniótico a través de dicho pliegue e inyectar la cantidad de inóculo que se desee.

8. Abrir la pinza de iridectomía estéril para permitir que la membrana amniótica vuelva a caer en su posición normal.

9. Retirar la pinza de iridectomía estéril y la aguja de disección estéril, inocular otro huevo o depositar la pinza de iridectomía en el fco. con alcohol de 96 grados G.L., y devolver la jeringa al tubo estéril de donde se tomo.

10. Con un disco de papel estraza estéril de centímetro y medio de diámetro se cubre el triángulo descascarado pegándolo a sus bordes con colodión.

11. Rotular los huevos con lápiz de grafito para su fácil identificación. (XXI, XXXVII, XVII).

TECNICA DE COSECHA GENERAL DEL MATERIAL SOSPECHOSO A PARTIR DE  
EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS

Material.

Un frasco de cien mililitros de tintura de metafero y aplicador, o un frasco de cien mililitros de tintura de yodo oficial y aplicador, o un frasco de quince mililitros de merthiolate y aplicador.

Un frasco de boca ancha de quinientos mililitros de capacidad - - aprox., con trescientos mililitros de alcohol de 96 grados G.L.

Una pinza de disección de 14.5 centímetros previamente esterilizada.

Una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada.

Una pinza de iridectomía previamente esterilizada.

Tres jeringas Luer estériles de diez mililitros de capacidad, con pivote metálico de enchufe universal.

Tres agujas estériles número veinte de una y media pulgada de longitud.

Veintidos tubos de cultivo kimax estériles de siete mililitros de capacidad aprox., con rosca y tapadera hermética de baquelita.

Treinta y dos cajas de petri pyrex estériles.

Dos portahuevos individuales de plástico o madera previamente desinfectados.

Método.

1. Los huevos se enfrían dejándolos a menos cuatro grados centígrados durante doce horas, o por menos tiempo en un congelador, para evitar hemorragias.

2. Con ayuda de un aplicador, desinfectar la cáscara que cubre la cámara de aire, con tintura de metafero o tintura de yodo oficial, o merthiolate y dejar secar.

3. Eliminar la cáscara desinfectada que cubre la cámara de aire con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada y una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada. Recortar a lo largo de una zona situada a cinco milímetros por encima del límite de la cámara de aire.

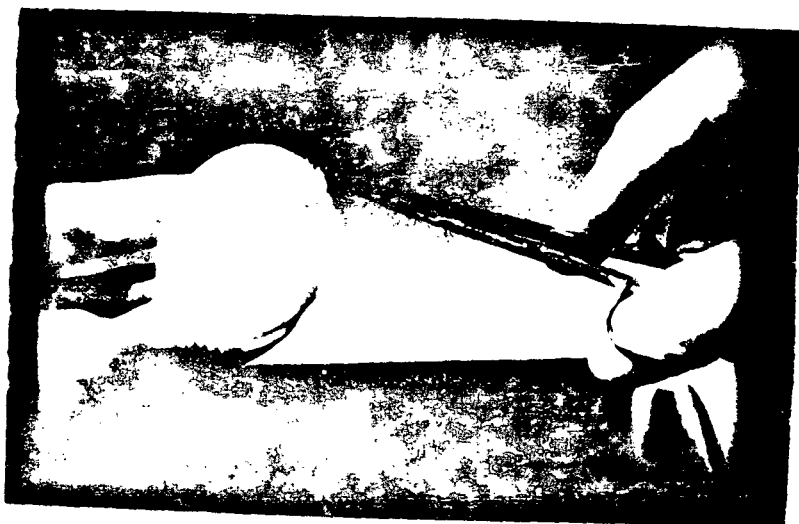


FOTO No. 33. Seccionando con ayuda de una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada, alrededor de la cámara de aire.

4. En la membrana corioalantoides lejos de los vasos sanguíneos importantes, se hace una incisión con la aguja de disección estándar que arma la jeringa conque ha de ser recolectado el líquido alantoides, lo suficientemente grande como para introducir a través de la rasgadura los extremos de una pinza delgada como la de iridectomía previamente esterilizada, la cual se utiliza para mantener al embrión y las -

membranas lejos de la aguja de disección estéril que extraiga el líquido alantoideo.

Para cosechar el líquido alantoideo, se utiliza una jeringa Luer - estéril de diez mililitros de capacidad, con pivote metálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril numero veinte de una y media pulgada de longitud.

Situar la aguja de disección estéril en el saco alantoides y aspirar el líquido.



FOTO No. 34. Sujeción del embrión y las membranas con una pinza de disección previamente esterilizada, para mantener una mejor disposición de los tejidos, manteniéndolos apartados de la aguja de disección estéril al ser extraídos los líquidos del huevo inoculado, con el huevo sobre un portahuevos individual de madera y éste en una caja de petri.

5. Depositar el líquido alantoideo cosechado, en un tubo de cultivo kimax estéril, de siete mililitros de capacidad, con rosca y tapadera hermética de baquelita. Rotular los tubos utilizados para su fá-

cil identificación.

6. Con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada y una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada, - seccionar la membrana corioalantoides de la base de la cámara de aire, - y depositarla en una caja de petri estéril, la cual también ha de servir de receptáculo al resto de la membrana corioalantoides al ser diseccionada en un paso ulterior. El procedimiento anterior se efectúa con el fin de poder apreciar mejor el amnios y el saco de la yema.

7. Para cosechar la yema se utiliza una jeringa Luer estéril de diez mililitros de capacidad, con pivote metálico de enchufe universal, armada con una aguja de disección estéril número veinte de una y media pulgada de longitud, con la cual se realiza la punción en el saco de la yema, disponiéndola a través de la base de la cámara de aire y aspirando en seguida el líquido.

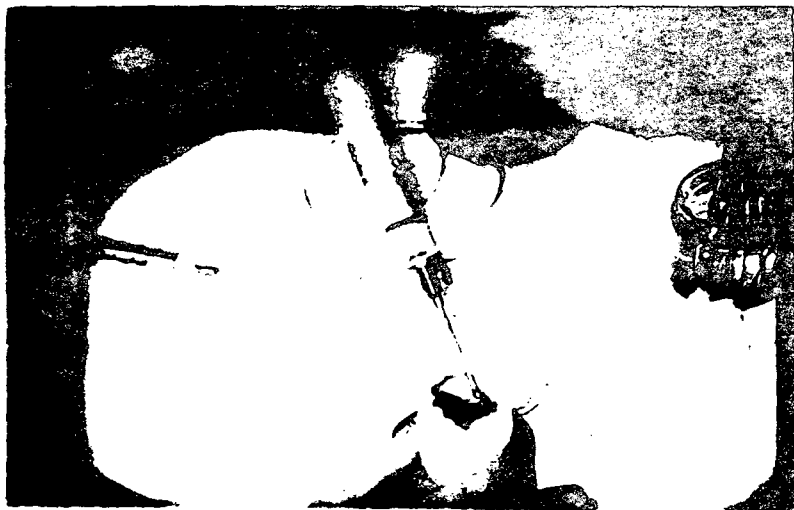


FOTO No. 35. Obtención de la yema del huevo inoculado por medio de una jeringa Luer estéril de diez mililitros, armada con una aguja de disección estéril número veinte de una y media pulgada de longitud, con el huevo sobre un portahuevos individual de madera y este en una caja de petri.

8. Depositar la yema cosechada en un tubo de cultivo kimax - estéril de siete mililitros de capacidad, con rosca y tapadera hermética de baquelita. Rotular los tubos de cultivo utilizados para su fácil identificación.

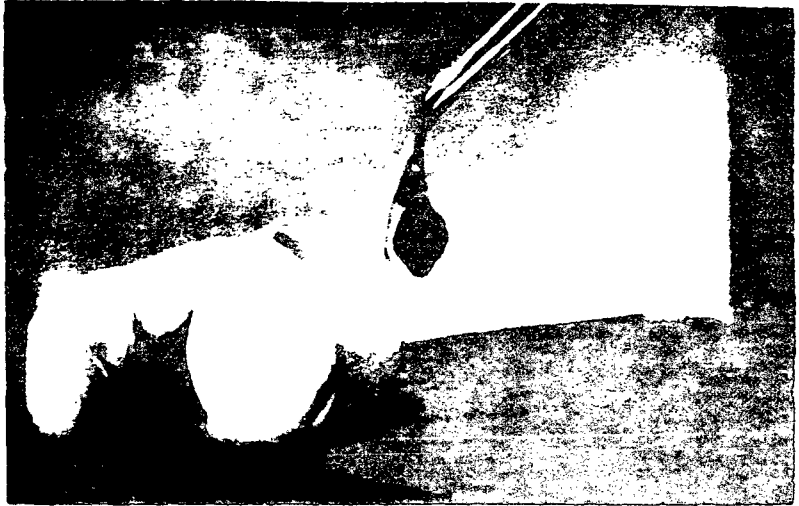
9. Se extrae el embrión a través de la abertura de la cámara de aire descascarada, con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada, a la vez que se separan las membranas del embrión con ayuda de una pinza de iridectomía previamente esterilizada. Depositar el embrión en una caja de petri pyrex estéril.



FOTO No. 36. Sujeción de la cabeza del embrión con una pinza de disección estéril, y a la vez la separación de las membranas del embrión con una pinza de iridectomía estéril para facilitar su extracción a través de la cámara de aire descascarada, con el huevo sobre un portahuevos individual de madre y éste en una caja de petri.

10. Separar con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada y una tijera de disección con punta aguda previamente esterilizada, la membrana corioalantoides adherida a la membrana interna -

(fárfara) así como restos de albumen, para facilitar la extracción de - las membranas a través de la cámara de aire descascarada. Depositar las membranas en una caja de petri pyrex estéril.



*FOTO No. 37. Sujeción de las membranas con una pinza de iridectomía estéril, para facilitar su extracción a través - de la cámara de aire descascarada.*

11. Eliminar los líquidos de la membrana corioalantoides y la membrana del saco de la yema, sujetando los extremos con un par de pinzas de disección previamente esterilizada, y exprimir las una por una longitudinalmente. Colocar por separado las membranas en una caja de petri - pyrex estéril.

12. Eliminar las patas de embrión así como la cabeza, seccionando hasta la mitad del cuello, y ha no ser que se desee recoger el cerebro - se desecha la cabeza. Esta disección se realiza con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada y una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada. Depositar la parte del embrión seccionado que se desee analizar en una caja de petri pyrex estéril.





FOTO No. 38. La membrana del saco de la yema colocada en una caja de petri pyrex estéril con ayuda de una pinza de iri dectomía estéril.



FOTO No. 39. Separación de la cabeza del resto del embrión con ayuda de una tijera de disección estéril de punta aguda y una pinza de disección estéril. Nótese la insición a la mitad del cuello que marca el lugar en que ha de ser separada la cabeza.

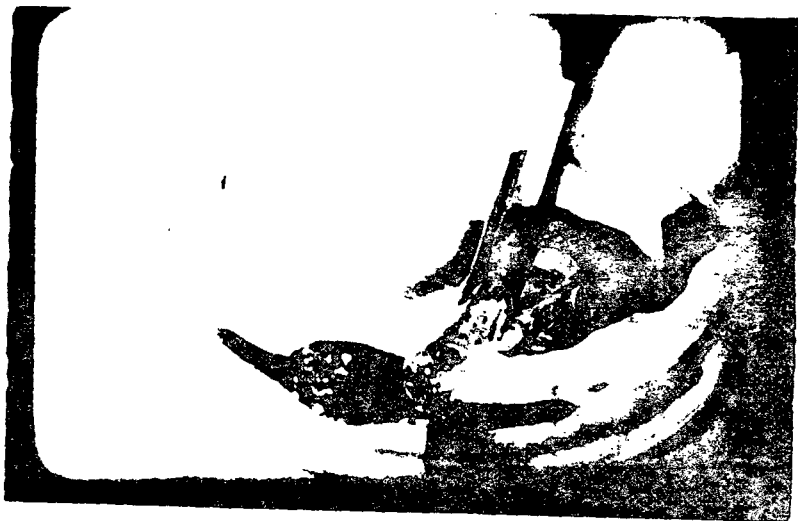


FOTO No. 40. Embrión decapitado y disposición de las membranas corioalantoides y del saco de la yema, al ser colocadas por separado en una caja de petri pyrex estéril para su estudio ulterior.

TECNICA DE COSECHA DE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDES SOSPECHOSA A  
PARTIR DE EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS.

Material.

Un frasco de boca ancha de quinientos mililitros de capacidad - -  
aprox., con trescientos mililitros de alcohol de 96 grados G.L.

Una pinza de disección de 14.5 centímetros previamente esteriliza-  
da.

Una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada.

Tres cajas de petri pyrex estériles de 150 por 15 milímetros.

Método.

1. Quitar el papel o cubreobjetos que cubre el rectángulo des-  
cascarado en uno de los lados del huevo.

2. Eliminar la cáscara que cubre la membrana corioalantoides-  
caída e inoculada, con ayuda de una pinza de disección previamente este-  
rilizada y una tijera de punta aguda previamente esterilizada, recortan-  
do alrededor del rectángulo descascarado, hasta hacer visible en toda su  
extensión la membrana corioalantoides sospechosa que se ha de extraer.

3. Con ayuda de una pinza de disección previamente esterili-  
zada y una tijera de disección de punta aguda previamente esterilizada,  
seccionar la membrana corioalantoides sospechosa y depositarla en una -  
caja de petri pyrex estéril.



FOTO No. 41. Obtención de la membrana corioalantoides con ayuda de una tijera de disección estéril de punta aguda y una pinza de disección estéril. Con el huevo en posición horizontal sobre un portahuevos individual de madera y éste en una caja de petri.

## NEWCASTLE

Aislamiento del virus.

No obstante que el virus de newcastle es patógeno para aves de cualquier edad, el virus es aislado de aves enfermas de preferencia no menores de cuatro semanas de edad, en el período prodromico o clínico de la enfermedad.

Material sospechoso.

Se ha de obtener del ave enferma el material sospechoso, que puede ser tanto el pulmón, el exudado traqueal, traquea, como el cerebro (VI, VII, XII, XIII, LVIII).

Embriones de pollo.

Embriones de pollo viables de diez a doce días de edad en incubación de preferencia de diez días de edad. (fotos No. 5 y 8). (XII, XXXIII).

Cantidad de inóculo.

Una décima de mililitro (0.1 ml.) (XII, XXXIII).

Vía de inoculación.

Para la obtención del virus en primera intención se inocular por vía el saco alantoides. (fotos No. 7 y 10). (XXXIII).

## BRONQUITIS INFECCIOSA

Aislamiento del virus.

El virus de la bronquitis infecciosa es aislado de aves enfermas - en el período prodromico o clínico de la enfermedad, de preferencia no - menores de doce semanas. (XXVII)

Material sospechoso.

Se ha de obtener del ave enferma el material sospechoso, que puede ser tanto el exudado traqueal, traquea, como los pulmones. (XXIII)

Embriones de pollo.

Embriones de pollo viables de diez a doce días de edad en incuba -- ción de preferencia de doce días de edad. (foto No. 19) (XXII, XLIV).

Cantidad de inóculo.

Una décima de mililitro (0.1 ml.). (XXII)

Vía de inoculación.

Para la obtención del virus en primera intención se inocular sobre - la membrana corioalantoides. (foto No. 26). (XXIII)

## LARINGOTRAQUETITIS INFECCIOSA

Aislamiento del virus.

Ya que el virus de la laringotraqueitis infecciosa es raro entre pollos jóvenes que a pesar de ello son susceptibles al virus, ha de ser aislado éste de aves enfermas de preferencia no menores de seis semanas. (XLVIII).

Material sospechoso.

Se ha de obtener del ave enferma el material sospechoso, que puede ser tanto el exudado traqueal, como la traquea. (XXXV, XL).

Embriones de pollo.

Embriones de pollo viables de diez a doce días de edad en incubación, de preferencia de doce días de edad. (foto No. 19). (X, XIV).

Cantidad de inóculo.

Una décima de mililitro (0.1 ml.) (X, XIV).

Vía de inoculación.

Para la obtención del virus en prima intención se inocular sobre la membrana corioalantoides. (foto No. 26). (X, XIV).

## ENCEFALOMIELITIS AVIARIA

Aislamiento del virus.

Ya que la enfermedad de la encefalomiелitis aviaria se presenta a menudo entre los descendientes de la misma parvada, el virus es aislado de pollos enfermos de preferencia de una a cinco semanas de edad, en el período podrómico de la enfermedad. (XXXIX)

Material sospechoso.

Se ha de obtener del ave enferma el material sospechoso, que es el encéfalo. (LX)

Embriones de pollo.

Embriones de pollo viables de seis días de edad en incubación. (foto No. 11) (LX).

Cantidad de inóculo.

De dos décimas a cinco décimas de mililitro (0.2 ml. a 0.5 ml.) - (LX)

Vías de inoculación.

Para la obtención del virus en primera intención se inocular por vía el saco de la yema. (fotos No. 15, 16, 17 y 18). (LX).



## ORNITIS

Aislamiento del virus.

El virus de la ornitosis es aislado de aves enfermas de cualquier edad, en el período clínico de la enfermedad. (XLVI)

Material sospechoso.

Se ha de obtener del ave enferma el material sospechoso, que es el hígado y el bazo. (XLVII).

Embriones de pollo.

Embriones de pollo viables de seis a diez días de edad en incubación, de preferencia de seis días de edad. (fotos No. 5 y 8). (XXXVI)

Antibióticos específico.

Al inóculo deben adicionarse por cada mililitro, cincuenta miligramos de clorotetraciclina y veinticinco miligramos de nistatina. (XXXII)

Cantidad de inóculo.

Una décima de mililitro (0.1 ml.) (XXXVI)

Vías de inoculación.

Para la obtención del virus en primera intención se inocular por vía el saco alantoides. (fotos No. 7 y 10). (XV).

## VIRUELA DE LAS AVES DOMESTICAS

### Aislamiento del virus.

El virus de la viruela es aislado de aves enfermas en el período - clínico de la enfermedad, de preferencia de aves jóvenes no menores de seis semanas de edad. (11)

### Material sospechoso.

Se ha de obtener del ave enferma el material sospechoso, que es el epitelio escamoso de la piel. (VIII, XXXVIII)

### Embriones de pollo.

Embriones de pollo viables de diez días de edad en incubación. - (foto No. 19). (IV, LXI).

### Cantidad de inóculo.

Cinco centésimas de mililitro a una décima de mililitro (0.05 ml. a 0.1 ml.). (LXI).

### Vía de inoculación.

Para la obtención del virus en primera intención se inocular sobre la membrana corioalantoides. (foto No. 26). (IV, LXI).

## R E S U L T A D O S

## NEWCASTLE.

Período de observación.

Algunas de las cepas lentogénicas del virus de newcastle tardan de noventa a ciento cincuenta horas en causarles la muerte a los embriones de pollo que son inoculados a los diez días de edad .

El género lentogénico del virus del newcastle tarda cien horas en causarles la muerte a los embriones de pollo que son inoculados a los - diez días de edad.

El género mesogénico del virus del newcastle tarda de sesenta a noventa horas en causarles la muerte a los embriones de pollo que son inoculados a los diez días de edad.

El género velogénico del virus de newcastle usualmente le causa la- muerte a los embriones de pollo que son inoculados a los diez días de - edad en aproximadamente cincuenta horas. (XIII).

Lesiones macroscópicas.

Las lesiones congestivas o hemorrágicas pueden estar mal definidas- o faltar totalmente en el primero o primeros pases del virus en los em- briones de pollo.

Se aprecian en la parte expuesta de la membrana corioalantoides mi-

núsculos focos grises o la formación de engrosamientos grises en forma de placa rodeados de focos satélites.

La congestión de las patas y la piel varía entre leve y moderada .

La formación de discretas hemorragias petequales o algo mayores - en la piel del embrión son más frecuentes en algunas cepas.

Rara vez los embriones presentan copiosa hemorragia craneal o encefalitis hemorrágica.

En la mayoría de los embriones hay complicación congestiva y hemorrágica en el saco de la yema, bazo y en los pulmones con exudado respiratorio. (XVI, XLII).

#### Lesiones microscópicas.

Múltiples hemorragias capilares en músculo esquelético y médula espinal.

Masiva hemorragia en el cerebro.

Algunas veces se observa hemorragia pulmonar.

Distensión de los vasos sanguíneos del saco de la yema. (XLII).

## BRONQUITIS INFECCIOSA

Periodo de observación.

La mayoría de los embriones de pollo que son inoculados a los doce días de edad con el virus de la bronquitis infecciosa sobreviven en el pase inicial.

En los pases iniciales el período de observación se alarga, pues las muertes de los embriones se producen tardíamente, pero en los siguientes pases el período de observación se acorta pues los embriones mueren hacia finales del segundo día posterior a la inoculación. (III, XXIV).

Lesiones macroscópicas.

Aunque algunas cepas producen enanismo a unos cuantos embriones durante el primer aislamiento, dicha anomalía, lo mismo que el enroscamiento y la muerte del embrión, son más frecuentes a medida que aumenta el número de pases. El embrión se observa enroscado con el cuello encorvado, con sus pies deformados y comprimidos sobre la cabeza con una forma parecida al de una bola, ocasionalmente con el pulmón ralo y el amnios engrosado con fibrosis e íntimamente adherido al embrión.

El retorcimiento y enanismo de los embriones es el resultado de un retraso en el desarrollo del amnios, desarrollo anormal del pulmón y congestión del riñón.

El saco vitelino está encogido y hay un volumen mayor del normal del líquido alantoideo transparente y el volumen del líquido amniótico es menor al normal.

Los signos de los sobrevivientes es la pereza y debilidad en sus mo

vimientos. (XXIX, XXVI, XLIV).

Lesiones microscópicas.

Revestimiento perivascular en el hígado.

Extensa necrosis y depósitos de uratos en el mesonefros y riñón.

Edema en las membranas amniótica y corioalantoides. (XXIV, XLIV)

## LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA

Período de observación.

La muerte de los embriones de pollo que son inoculados a los doce días de edad con el virus de la laringotraqueitis infecciosa usualmente ocurre entre el cuarto y octavo días posterior a la inoculación. - Aunque en el primer aislamiento es mejor examinar todos los embriones-vivos y las lesiones de la membrana corioalantoides, desde el quinto - al sexto día posterior a la inoculación. (XXXV)

Lesiones macroscópicas.

Hacia el tercer día siguiente a la inoculación del virus en la - membrana corioalantoides, se hacen visibles placas circulares con irregularidad en su contorno, de cinco a siete milímetros de diámetro, de color amarillo blanquecino a gris. Los focos producidos por varios géneros tienen un borde elevado, opaco, con el área central deprimida. - La morfología de las placas puede variar considerablemente, no obstante algunos géneros producen superficies planas, lesiones opacas con enturbiamiento menores al diámetro promedio, mientras que ciertos géneros de virus producen placas teniendo el pequeño tamaño de un punto (una décima de milímetro) de centro opaco y circundando áreas de edema trasluciente. Las lesiones crecen hasta el quinto o sexto días, momento en - que por lo regular el embrión muere.

Hay edema en la membrana corioalantoides y el líquido alantoideo-adquiere la consistencia del albumen espeso del huevo.

Los embriones que sobreviven hasta el sexto día posterior a la inculación son enanos (medrados de tamaño). (X, XIV).

Lesiones microscópicas.

La membrana corioalantoides presenta zonas de proliferación de las células ectodérmicas y edema.

Se observan cuerpos de inclusión intranuclear en grupos de células epiteliales ectodérmicas entre los días primero y tercero.

Al avanzar la lesión del epitelio se necroza y se sustituye gradualmente por tejido inflamatorio mesodérmico. (X, XIV)



## ENCEFALOMIELITIS AVIARIA

Período de observación.

Los embriones de pollo que son inoculados a los seis días de edad con el virus de la encefalomiелitis aviaria no demuestran en el pasc inicial signos de haber sido infectados, por ende, es usualmente necesario efectuar varios rápidos pasajes en los embriones, para que los signos de infección puedan ser notados. (LV, LVI).

Lesiones macroscópicas.

Retardo en la motilidad del embrión.

Ocasionalmente retardo en el crecimiento del embrión.

Los embriones sobrevivientes examinados a los veinte días de edad pueden mostrar todavía latido cardíaco, per los músculos voluntarios es es tán parcial o completamente paralizados. (XXVIII, XXXIX, LV)

Lesiones macroscópicas.

Alteraciones de carácter uniforme pero de variable intensidad y lo calización, consistentes en encefalomalacia y distrofia muscular.

Las lesiones nerviosas se caracterizan por intenso edema local, -- gliosis, proliferación vascular, y picnosis, presentándose en mayor gra do las lesiones en el mesencéfalo.

Los cambios musculares consistieron fundamentalmente en infiltración eosinofila y necrosis, fragmentación y pérdida de la estriación de las fibras afectadas y excepcionalmente proliferación sarcolémica, e infiltración heterofila. (XXVIII, XXXIX).

## ORNITOSIS.

Período de observación.

La muerte de los embriones de pollo que son inoculados a los seis días de edad con el virus de la ornitosis ocurre entre el cuarto y sexto día posterior a la inoculación. (XXXVI).

Observación de lesiones.

No es común encontrar exclusivamente lesiones características del virus de la ornitosis, ya que por lo general está presente el virus de la ornitosis como un contaminante de una enfermedad bacteriana. (XLVII).

## VIRUELA DE LAS AVES DOMESTICAS.

Periodo de observación.

A los embriones de pollo que son inoculados a los diez días de edad con el virus de la viruela aviaria, se les examina la membrana corioalantoides cuando sobreviven setenta y dos horas después de la inoculación, o bien, extraer el embrión y membranas dentro del lapso de las veinticuatro horas posterior a su muerte, o examinarlo al quinto o séptimo día posterior a la inoculación. (XI).

Lesiones macroscópicas.

Las placas usualmente se tornan visibles sobre la membrana corioalantoides, de tres a cuatro días posterior a la inoculación.

Los embriones pueden tener hemorragias petequeales en la piel, pero cuando en total es introducida una gran cantidad de virus, las hemorragias se presentan en forma extendida.

Se observa hepatomegalia. (XI).

Lesiones microscópicas.

Edema e infiltración celular, o sea, el desarrollo de inclusiones-citoplasmáticas (cuerpos de bollinger) o cuerpos elementales (cuerpos de borrel). (XI)

## D I S C U S I O N

Es de primordial interés llevar a cabo un estricto control en la preservación de la asepsia de cada uno de los lugares funcionales que se ocupen (previamente desinfectados), así como la preservación de la esterilidad del material que se utilice (previamente esterilizado), para así evitar cualquier agente contaminante que pueda desvirtuar el diagnóstico. (I, XLV).

### Quirófano de virología o área aséptica.

El desarrollo de las técnicas se ha de llevar a cabo en un cuarto limpio de uso exclusivo para este fin, sin corrientes de aire y con un mechero de Bunsen para gas con llama graduable, con un mínimo de veinte centímetros de radio de esterilidad para evitar contaminantes aéreos. (I, XLV).

### Instrumental de campo.

El instrumental de campo que se utilice, debe ser esterilizado por algún modo, siendo usual para este objeto el uso del autoclave. El instrumental de campo debe ir envuelto en una compresa de campo, sellado el envoltorio con cinta adhesiva. En el desarrollo de las técnicas, el instrumental de campo debe ser preservado en estado estéril, introduciéndolo después de cada vez de ser utilizado, en un frasco con alcohol de 96

G.L. (I).

#### Medios de conservación.

En la elección del medio de conservación se debe buscar el modo de preservar las propiedades del material sospechoso hasta el momento en que ha de ser elaborado. Es por ello, que el material sospechoso no debe ser colocado en preservativos usados por los patólogos. (XIX, XXXVII)

#### Inmersión en glicerina.

El método más viejo y más sencillo para preservar virus es el de sumergir el material sospechoso en una suspensión de glicerina (previamente elaborada), siendo este método todavía de utilidad cuando no se cuenta con refrigerante. En dicha suspensión pueden presentarse al laboratorio pequeñas piezas de tejido u órganos completos del ave enferma, cuya preservación es estable en un lapso de aproximadamente ocho días. La mayoría de las bacterias patógenas no sobreviven en la glicerina un lapso mayor de cinco a seis días. (XIX, XXXVII)

#### Refrigeración.

Otro método para preservar virus es el de refrigerar el material sospechoso con hielo, teniendo cuidado de renovar el hielo antes de que se liquidifique por completo, para evitar que la temperatura del agua se aparte de los cero grados centígrados. Este medio de conservación preserva tanto tejidos, exudados, como aves completas en el lapso necesario para que las muestras lleguen al laboratorio. (XIX, XXXVII)

#### TECNICAS DE OBTENCION DEL MATERIAL SOSPECHOSO A PARTIR DE AVES ENFERMAS

Es preferible realizar la necropsia en el ave enferma, para encontrar las lesiones macroscópicas más características que no lleven a

elegir el órgano o exudado que ha de servir para elaborar el inóculo. - Es por ello, que a la vez que se estudia el padecimiento del ave en la necropsia, se debe seguir una estricta preservación de la asepsia de la muestra, ya que hay que evitar contaminantes hasta el momento en que se deposite el material sospechoso en un evase estéril, con rosca y tapadera hermética. Ya que si el material sospechoso es infestado por algún contaminante, se desvirtúa el diagnóstico. (XIX, XXXIV)

#### TECNICAS DE ELABORACION DEL INOCULO A PARTIR DEL MATERIAL SOSPECHOSO

La muestra recolectada del ave sospechosa, ha de ser elaborada a fin de obtener de ella el inóculo deseado que se ha de utilizar para infestar al embrión de pollo. Son desarrolladas las técnicas de elaboración del inóculo, en base al modo en que ha de ser elaborado el material sospechoso, según la consistencia de la muestra y bajo un estricta seguridad de la preservación de la asepsia del procedimiento. (XXI, XVIII).

#### TECNICA DE ELABORACION DEL INOCULO A PARTIR DEL EXUDADO TRAQUEAL.

El exudado traqueal puede variar en su consistencia por la forma en que se obtenga, así tenemos que el material sospechoso obtenido por la expectoración provocada a un ave enferma, será más espeso de otro que se haya obtenido al hacer gargarizar un ave con agua destilada preservada en estado estéril. Es por ello que la cantidad de agua destilada preservada en estado estéril que se ha de añadir para formar la suspensión del material sospechoso en un 20%, debe ser en base al criterio del operador.

## PRUEBA DE ESTERILIDAD BACTERIOLOGICA

Una vez terminada la elaboración de la suspensión homogénea del material sospechoso, que se ha de utilizar como inóculo, se ha de congelar un mililitro de dicha suspensión, para aguardar la prueba de esterilidad bacteriológica. (XLV)

### TECNICA DE DESINFECCION DE LA CASCARA DEL HUEVO Y CARA EXTERNA DE FARFARA.

Debiendo ser desinfectada la cáscara de los huevos antes de ser inoculados, pero de preferencia realizarla al fin de la colecta de los huevos necesarios, para inducir la asepsia en la cáscara. El calor de los huevos y lo frío de la solución desinfectante son benéficos, ya que facilita la adsorción de la solución desinfectante por la cáscara del huevo y cara externa de la membrana interna (fárfara). (XXX)

### TECNICAS DE INOCULACION

Las técnicas de inoculación intravenosa (en el cordón umbilical),- intraembrionaria o intraocular, varían de la técnica de inoculación -- No. 1 en el saco de la yema, únicamente por el punto en que se ha de inyectar el inóculo, sólo que la manipulación de estas tres técnicas requieren que sean efectuadas por personal capacitado, ya que muestran una mortalidad elevada de los embriones, provocada por el traumatismo de la aguja y la presión que ejerce el inóculo en los tejidos y líquidos del embrión.

Las técnicas de inoculación en el saco alantoides, saco amniótico, saco de la yema y sobre la membrana corioalantoides, exigen una menor manipulación que origine un traumatismo que pueda dañar al embrión, no-

obstante se debe tener cuidado en las causas que puedan motivar la muerte del embrión.

Los huevos viables que han sido inoculados deben revisarse a través en el ovoscopio a las veinticuatro horas después de la manipulación, para determinar la viabilidad del embrión, o si éste ha de ser retirado de la incubadora por su muerte o por alguna alteración no deseable que se haya provocado al ser inoculado y que no vaya a ser de utilidad el huevo para el diagnóstico.

La perforación que se efectúa en la cáscara del huevo sobre la cámara de aire, se utiliza como orificio de inoculación (por donde es inoculado el huevo viable) o bien se hace con el fin de evitar la compresión que ejercen los líquidos sobre el embrión al ser inoculada la suspensión del material sospechoso, pues al dar salida al aire por el agujero horadado sobre la cámara de aire, se permite igualar la presión interna del embrión, impidiendo que por el orificio de inoculación efectuado en la cáscara del huevo sobre el saco vitelino refluyan el inoculo y los líquidos extraembrionarios.

#### TECNICA DE COSECHA GENERAL DEL MATERIAL SOSPECHOSO A PARTIR DE EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS

En la obtención del material sospechoso a partir de embriones de pollo inoculados, usualmente es utilizada una técnica general que consta de pasos seriales para la cosecha de los tejidos y líquidos del embrión, dado que, para deducir la etiología de las alteraciones observadas se han de analizar cada uno de los tejidos y líquidos de los embriones de pollo inoculados, así como para tener un conocimiento general y más amplio de la patogenia producida por los virus inoculados a los embriones de pollo. (XXI, XX)



TECNICA DE COSECHA DE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDES SOSPECHOSA  
A PARTIR DE EMBRIONES DE POLLO INOCULADOS

Para coleccionar las membranas corioalantoideas inoculadas, se sigue la técnica de cosecha de la membrana corioalantoideas sospechosa de los embriones de pollo que han sido inoculados por esta vía. Dicha técnica se efectúa cuando se han completado previamente los requisitos a los que debe ir aparejado, pues el resultado obtenido en la observación macroscópica de las lesiones en la membrana corioalantoideas caída e inoculada, debe ir aunado a un estudio previo, ya que dichas alteraciones pueden tener semejanza aún con etiología diferente. (XXI).

Huevos viables.

Es de primordial interés cuidar la integridad de los embriones de pollos seleccionados, de normal desarrollo y libre de anomalías, para que puedan ser útiles para el diagnóstico de una enfermedad viral, dependiendo dicha integridad de tres factores:

1. Pureza de la viabilidad del embrión.

Los embriones de pollo que han de ser utilizados para el diagnóstico de una enfermedad viral, han de ser procedentes de parvadas sanas, de líneas libres de los posibles gérmenes patógenos específicos o sin clasificar SPF, y procedentes dichos embriones de pollo de parvadas sin vacunar. (XLIII).

2. Manejo.

Indudable es la precaución que ha de ser necesario tomar en el manejo de los huevos viables, a fin de obtener los satisfactorios embriones que han de ser inoculados, así como el cuidado que debe tenerse en-

el manejo de los embriones inoculados, ya que son objeto del traumatismo que provoca dicha manipulación. A la vez se debe estar pendiente de evitar cualquier falla en el manejo de dichos huevos viables, porque pudiera dar lugar a que acontecieran alteraciones en la naturaleza del embrión de pollo viable, y que por ende desvirtuaran el diagnóstico.

### 3. Incubación.

La incubación de los embriones de pollo ha de ser a 37.5 grados -- centígrados, o sea 99.51 grados fahrenheit, con una humedad relativa de ochenta y cinco grados higrométricos o por encima de esta normal, y se han de cambiar de posición a los embriones de pollo incubados como mínimo cuatro veces al día o sea cada seis horas. (XXIX, LVII)

#### Peso de los huevos viables.

El peso de los huevos viables ha de ser de cincuenta y cinco a sesenta y siete gramos por huevo y libre de manchas. (LVII)

## CONCLUSIONES

Las técnicas descritas en esta tesis cumplen los requisitos - que se deben tener en cuenta para la obtención de un diagnóstico acertado mediante el uso de los embriones de pollo, pues al deducir la etiología de las enfermedades virales mas frecuentes que aquejan a las aves, se ha tenido como base la economía en el costo de operación así como - la eficacia en el tiempo que ha de ocupar el personal capacitado, en - el desarrollo de dichas técnicas.

### ENFERMEDADES NEOPLASICAS DE LAS AVES

1. Marek o Linfomatosis neural.
2. Leucosis linfoide.
3. Sarcoma de rous.

En lo que corresponde a estas tres enfermedades virales de - las aves el diagnóstico no se realiza por medio de la inoculación en el embrión de pollo, ya que hay medios más convenientes para obtener un -- diagnóstico precoz y correcto, como por medio del estudio histopatológico de los tejidos lesionados del ave enferma, así como de la observación del ave inoculada en el laboratorio para observar los signos de la enfermedad. (IX, XLIX, LI, LIII).

## D I A G N O S T I C O

El diagnóstico de las enfermedades virales más frecuentes de las aves por medio de la inoculación del material sospechoso al embrión de pollo, se puede inducir tanto del estudio histopatológico de los tejidos del embrión y sus membranas, como de las propiedades bioquímicas de los líquidos contenidos en el saco vitelino, deducidas principalmente de las pruebas de hemaglutinación y fijación de complemento.

## S U M A R I O

La presente tesis contiene la serie de técnicas necesarias - que han de ser utilizadas en el trabajo diario que se lleva a cabo en el laboratorio de virología, para obtener el diagnóstico de las enfermedades virales mas frecuentes de las aves.

El objetivo de esta tesis es el de proveer con prontitud, en el momento que se necesite, un conocimiento ordenado para el laboratorista, ya que su trabajo depende de la elaboración de una serie de técnicas que requieren una concientización previa.

En la presente tesis se han descrito una serie de técnicas - "modelo" que norman un criterio para obtener un diagnóstico acertado y económico , por el conocimiento que plantean para la ejecución más -- concienzuda.

Al consultar con prontitud el operario, en la tesis, la serie de pasos que ha de seguir para la elaboración de una técnica, se aumenta la eficiencia en su trabajo, pues la gran cantidad de trabajo que desarrolla el laboratorista en recordar la serie de conocimientos necesarios para elaborar las técnicas, se facilita al consultarlos en forma detallada en dicho compendio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- I. Alfonso Alexander: 1974. TECNICA QUIRURGICA EN ANIMALES. Nueva editorial Interamericana.
- II. Beaudette, F.R.: 1929. SOME ASPECTS OF FOWL-POX AND ITS - CONTROL. Jour Am. Vet. Med. Assn. 75:563.
- III. Beaudette, F.R., Hudson, C.B.: 1937. CULTIVATION OF THE - VIRUS OF INFECTIOUS BRONCHITIS. Jour. Am. Vet. Med. Assn. 90:51.
- IV. Beaudette, F. R., Hudson, C.B.: 1938. CULTIVATION OF PI - GEON-POX VIRUS ON THE CHORIO-ALLANTOIC MEMBRANE. Jour. Am. Vet. Med. Assn. 93-146.
- V. Beaudette, F.R.: 1943. A REVIEW OF THE LITERATURE ON NEW- CASTLE DISEASE. Proc. 74th Ann. Mett. U.S. Livestock Saint Assn, p. 122.
- VI. Beaudette y col., 1948. USE OF ANTIBIOTIC AGENTS FOR BAC - TERIAL STERILIZATION OF RESPIRATORY EXUDATES FROM NATURA - LLY INFECTED CASES OF NEWCASTLE DISEASE. Am. Jour. Vet. - Res. 9:97.
- VII. Beaudette, F. R. y col., 1949 a. A COMPARISON OF FILTRA -- TION AND ANTIBIOTIC TREATMENT FOR THE RECOVERY OF NEWCAS - TLE VIRUS FROM SPONTANEOUS CASES. Am. Jour. Vet. Res. - 10:92.
- VIII. Biester, H.E., Schwarte, L. H.: Julio 1959. ENFERMEDADES - DE LAS AVES. Uteha.
- IX. Biggs, P.M., A. E. Churchill, D.G. Rootes, and Chubb, R. - C. 1968. THE ETIOLOGY OF MAREK'S DISEASE AN ONCOGENIC HER - PES TYPE VIRUS. In M. Pollard (ed.), Perspectives in Virolo - gy, Academic Press, N.Y. 6:211-237.
- X. Brandly, C.A.: 1935. SOME STUDIES OF INFECTIOUS LARYNGOTRA - CHEITIS. The continued propagation of the virus upon the - chorio-allantoic membrane of the hen's egg. Jour. Infect. - Dis. 57:201.
- XI. Brandly, C.A.: 1941. PROPAGATION OF FOWL - AND PIGEON - POX VIRUSES IN AVIAN EGGS AND USE OF EGG - CULTIVATED VIRUSES - FOR INMUNIZATION. I, II. Agr. Exper. Sta., Bul. 478.

- XII. Brandly y col., 1946b: THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS. *Am. Jour. Vet. Res.* 7:289.
- XIII. Bureau of Animal Industry: 1946a. THE DIAGNOSIS OF NEWCASTLE DISEASE. *Bur. Anim. Ind. U.S. Dept. Agr. Bul.*, Aug. 15.
- XIV. Burnet, F. M.: 1934. THE PROPAGATION OF THE VIRUS OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS ON THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF THE DEVELOPING EGG. *Brit. Jour. Exper. Path.* 15:52.
- XV. Burnet, F.M., Runtree, P.M.: 1935. PSITTACOSIS IN THE DEVELOPING EGG. *Jour. Path. and Bact.* 40: 471.
- XVI. Burnet, F.M.: 1942. THE AFFINITY OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS TO THE INFLUENZA VIRUS GROUP, *Australian Jour. Exper. Biol. Med. Sci.* 20:81.
- XVII. Burrows William: TEXTBOOK OF MICROBIOLOGY. Seventeenth edition. Saunders.
- XVIII. Carpenter, Ph. L.: 1967. MICROBIOLOGIA, Editorial Interamericana.
- XIX. Coffin, D.L., V.M.D.: 1966. LABORATORIO CLINICO EN MEDICINA VETERINARIA. La Prensa Médica Mexicana.
- XX. Cox, H.R.: 1952. GROWTH OF VIRUSES AND RICKETTSIAE IN THE DEVELOPING CHICK EMBRYO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55:236.
- XXI. Cunningham, C.H.: 1959. VIROLOGIA PRACTICA, Editorial Acribia.
- XXII. Cunningham, C.H.: 1966. A LABORATORY GUIDE IN VIROLOGY. - 6th ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- XXIII. Delaplane, J.P., and Stuart, H.O.: 1939. STUDIES OF INFECTIOUS BRONCHITIS. *R.I. Agr. Exper. Sta. Bul.* 273.
- XXIV. Delaplane, J.P., and Stuart, H.O.: 1941. THE MODIFICATION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS OF CHICKENS AS A RESULT OF PROPAGATION IN EMBRYONATED CHICKEN EGGS. *R.I. Agr. Exper. Sta., Bul.* 284.
- XXV. Departamento del Estado Oficial de los Estados Unidos, PUBLICACION NACIONAL DE AVES DE CORRAL Y PAVOS, SUS PLANES DE PROGRESO Y PRECAUCIONES AUXILIARES. 1963.
- XXVI. Fabricant, J.: 1949. STUDIES ON THE DIAGNOSIS OF NEWCASTLE DISEASE AND INFECTIOUS BRONCHITIS OF FOWLS. II. THE DIAGNOSIS OF INFECTIOUS BRONCHITIS BY VIRUS ISOLATION IN CHICK EMBRYOS. *Cornell Vet.* 39: 414.
- XXVII. Fabricant, J., and Levine P.P.: 1951. THE PERSISTENCE OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN EGGS AND TRACHEAL EXUDATES OF INFECTED CHICKENS. *Cornell Vet.* 41: 240-246.

- XXVIII. Feibel, F., Helmoltd, C.F., y col.: 1952. AVIAN ENCEPHALOMYELITIS - PREVALENCE, PATHOGENICITY OF THE VIRUS, - AND BREED SUSCEPTIBILITY, Am. Jour. Vet. Res. 13:260.
- XXIX. Funk, E.M., Irwin, M.R.: 1958. INCUBACION ARTIFICIAL. - UNION TIPOGRAFICA, Editorial Hispanoamericana.
- XXX. Godhaft y Wernicoff: COMUNICACION PERSONAL.
- XXXI. González, E. coordinador y col.: 1966. MANUAL PARA LA - OPERACION DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE PATOLOGIA - ANIMAL. METODOLOGIA SEGUIDA EN EL LABORATORIO DE DIAG - NOSTICO DE PATOLOGIA ANIMAL DE PLAN LERMA-ASISTENCIA - TECNICA DEL DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL EN TLAQUEPA - QUE, JALISCO. S.A.G.
- XXXII. Gordon, F.B., Andrew, V. W., Wagner, J.C.: 1957. DEVELOP - MENT OF RESISTANCE TO PENICILLIN AND TO CHLORTETRACYCLI - NE IN PSITTACOSIS VIRUS. Virology 4:156.
- XXXIII. Hanson, R.P., y col.: 1947. INFLUENCE OF THE ROUTE OF - INOCULATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS ON SELECTIVE IN - FECTION OF THE EMBRYONATING EGG. Amer. Jour, Vet. Res. 8: 416.
- XXXIV. Hanson, R.P., y col.: 1967. CRITERIA FOR DETERMINING THE - VALIDITY OF A VIRUS ISOLATION. Avian Dis. II: 49-53.
- XXXV. Hitchner, S.B., White, P.G.: 1957. THE CORRELATION OF - EMBRYO AND BIRD INFECTIVITY WITH FIVE STRAINS OF LARYN - GOTRACHEITIS VIRUS. (Abst.) Poultry Sci. 36:1126.
- XXXVI. Hudson, C.B., y col.: 1955. USE OF THE CHICKEN EMBRYO - TECHNIQUE FOR DIAGNOSIS OF PSITTACOSIS IN AVIAN HOSTS, - WITH EPIDEMIOLOGICAL NOTES. Jour. Am. Vet. Med. Assn. - 126: III.
- XXXVII. Jawetz, E.: 1968. MICROBIOLOGIA MEDICA. El manual moder - no.
- XXXVIII. Johnson, E.P.: 1938. AN UNUSUAL OUT BREAK OF CHICKENS - PROX. Jour. Am. Vet. Med. Assn, 93:115.
- XXXIX. Jones, E.E.: 1934. EPIDEMIC TREMOR, AN ENCEPHALOMYELITIS - AFFECTING YOUNG CHICKENS. Jour. Exper. Med. 59:781.
- XL. Jordan, F. T. W., y col.: 1967. THE SURVIVAL OF THE VI - RUS OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS. Zentr. Vet. Med. - 14:135-150.
- XLI. Jungherr, E. L., Minard, E.L.: 1942. THE PRESENT STATUS - OF AVIAN ENCEPHALOMYELITIS. Jour. Am. Vet. Med. Assn. - 100:38.



- XLII. Jungherr, E.L. y col.: 1946. THE COMPARATIVE PATHOLOGY OF FOWL PLAGUE AND NEWCASTLE DISEASE. *Am. Jour. Vet. Res.* 7: 250.
- XLIII. Landauer, W.: 1941. THE HATCHABILITY OF CHICKEN EGG AS INFLUENCED BY ENVIRONMENT AND HEREDITY. *Bull. Connecticut -- (storss) Agr. Exp. Sta.* 236:5-24.
- XLIV. Loomis, L.N., y col.: 1950. PATHOLOGY OF THE CHICKEN EMBRYO INFECTED WITH INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS. *Am. Jour. Vet. Res.* II:245.
- XLV. Merchant, I. A., Packer, R.A.: BACTERIOLOGIA Y VIROLOGIA - VETERINARIAS. Editorial Acribia. Segunda Edición Española.
- XLVI. Meyer, K.F.: 1955. PROBLEMS IN THE CONTROL OF PSITTACOSIS- AND ORNITHOSIS. *Proc. Book, 92nd. Ann. Meet., Am. Vet. Med. Assn.* P. 412.
- XLVII. Olson, N.O., Kerr, K.M.: 1966. SOME CHARACTERISTICS OF AN AVIAN ARTHRITIS VIRAL AGENT. *Avian Dis.* 10:470-476.
- XLVIII. Pulsford, M.F.: 1954. VARIATION IN THE VIRUS OF INFECTIOUS LARINGOTRACHEITIS AND ITS EPIDEMIOLOGICAL IMPLICATIONS. 10th World's Poultry Cong. P. 242.
- XLIX. Purchase, H.F., y col.: 1970a. FIELD TRIALS WITH THE HERPES VIRUS OF TURKEYS (HVT) STRAIN FC 126 AS A VACCINE AGAINST MAREK'S DISEASE. Manuscript in preparation.
- L. Reddish, G.F., (ed): 1957. ANTISEPTICS, DESINFECTANTS, FUNGICIDES AND STERILIZATION. Lea and Febiger, Philadelphia. 4751.
- LI. Rubin, H.: 1960. A VIRUS IN CHICK EMBRYOS WHICH INDUCES RESISTANCE IN VITRO TO INFECTION WITH ROUS SARCOMA VIRUS. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46:1105-1119.
- LII. Schalk, A.F., Haen, M.C.: 1931. AN APPARENTLY NEW RESPIRATORY DISEASE OF BABY CHICKS. *Jour. Am. Vet. Med. Assn.* 78:413.
- LIII. Sevoian, M., y col: 1964b. AVIAN LYMPHOMATOSIS. VIII PATHOLOGICAL RESPONSE OF THE CHICKEN EMBRIO TO "T" VIRUS. *Nat. Cáncer. Inst. Monogr.* 17:99-119.
- LIV. Sisson, S., Grossman, J.D.: ANATOMIA DE LOS ANIMALES DOMESTICOS. Salvat.
- LV. Sumner, F., Luginbuhl, R.E.: 1956. PATHOLOGY OF EGG ADAPTED AVIAN ENCEPHALOMYELITIS. *Science* 124:80.
- LVI. Sumner, F.W., y col.: 1957b. STUDIES ON AVIAN ENCEPHALOMYELITIS. II. FLOCK SURVEY FOR EMBRYO SUSCEPTIBILITY TO THE VIRUS. *Amer. Jour. Vet. Res.* 18:720-723.

- LVII. Taylor, L.W. (ed.): 1949. FERTILITY AND HATCHABILITY - OF CHICKEN AND TURKEY EGGS. John Wiley and Sons, New York, 423. P.
- LVIII. Thompson, Jr., y Col.: 1948. A TECHBIQUE FOR THE ISOLA- TION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS USING STREPTOMYCIN AS A BACTERIAL INHIBITOR. Am. Jour. Vet. Res. 9:303.
- LIX. Walker, R. V. L., Mc Kercher, P.D.: 1954. STUDIES IN - NEWCASTLE DISEASE. IX. FURTHER INVESTIGATION OF THE CA- RRIER PROBLEM. Can. Jour. Comp. Med. 18:431-432.
- LX. Wills, F. M., Moulthrop, I.M.: 1956. PROPAGATION OF - AVIAN ENCEPHALOMYELITIS VIRUS IN THE CHICK EMBRYO. South west. Vet. 10: 39-42.
- LXI. Woodruff, A.M., Goodpasture, E.W.: 1931. THE SUSCEPTIBI LITY OF THE CHORIO- ALLANTOIC MEMBRANE OF CHICK EMBRYO- TO INFECTION WITH THE FOWL-POX VIRUS. Am. Jour. Path. - 7:209-222.