



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE LOS TITULOS OBTENIDOS
POR INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINA-
CION PARA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE
ABSORBIDA EN PAPEL FILTRO Y SUERO

TRABAJO FINAL ESCRITO DEL IV
SEMINARIO DE TITULACION EN EL
AREA DE: PRODUCCION ANIMAL: AVES

Presentado ante la División de Estudios Profesionales
de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
IRMA PATRICIA LOPEZ ALCANTARA

Asesores:

M.V.Z. Alejandro Banda Castro

M.V.Z. Odette Urquiza Bravo

T E C Juan Merino



México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN.	1
INTRODUCCION.	2
HIPOTESIS.	6
OBJETIVO.	7
MATERIAL Y METODOS.	8
RESULTADOS	10
DISCUSION.	11
LITERATURA CITADA.	14
GRAFICAS.	19

RESUMEN

LOPEZ ALCANTARA, IRMA PATRICIA. Comparación de los títulos obtenidos por inhibición de hemoaglutinación para enfermedad de Newcastle a partir de muestras de sangre absorbida en papel filtro y de suero. IV Seminario de Titulación en el Área de : Aves. (bajo la supervisión de: MVZ Alejandro Banda Castro , MVZ Odette Urquiza Bravo y TEC Juan Merino).

Se vacunaron veintiocho pollos de engorda comerciales de quince días de edad con vacuna cepa La Sota atenuada administrada por vía ocular y simultáneamente vacuna emulsionada inactivada cepa La Sota por vía subcutánea, y se revacunó a los 21 días de edad. Las aves se muestrearon semanalmente en tres ocasiones para la obtención de suero y simultáneamente, se obtuvieron muestras de sangre completa con papel filtro. Se determinó el título de anticuerpos de ambas muestras por la técnica beta de inhibición de la hemoaglutinación (IH) utilizando cuatro y ocho unidades hemoaglutinantes del virus de ENC. Los títulos de IH se expresaron en logaritmo base dos, se compararon medias geométricas, se realizaron pruebas de correlación y regresión lineal simples y pruebas de hipótesis para la diferencia entre medias. Se observaron diferencias marcadas entre las medias de los títulos obtenidos con suero y sangre absorbida en papel filtro. Se observó una correlación baja entre los títulos obtenidos de ambas muestras.

INTRODUCCION

La enfermedad de Newcastle (ENC) es un padecimiento, de origen infeccioso de las aves, ocasionado por un virus del género Paramixovirus-1, que se caracteriza por presentar un cuadro clínico con signos respiratorios, digestivos y nerviosos. Afecta significativamente a la avicultura ya que causa considerables pérdidas económicas por la mortalidad y una disminución importante en los parámetros productivos (13,15,18).

El virus de ENC posee en su cubierta enzimas neuraminidasas que le confieren la capacidad de hemoaglutinar y permiten su identificación en el laboratorio. (1,2).

Las cepas del virus de ENC inducen la producción de anticuerpos en aves. Los antígenos asociados a la envoltura inducen la formación de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemoaglutinación. Los anticuerpos neutralizantes son los que incapacitan al virus para infectar a pollos, embriones y cultivos celulares. Estos aparecen en el suero entre seis y diez días después de la infección y alcanzan sus niveles máximos a las tres o cuatro semanas (2,13)

Existe controversia acerca de la relación entre los niveles de anticuerpos séricos y la resistencia de las aves a la enfermedad, ya que se pueden encontrar aves que a pesar de

tener altos títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, resultan afectadas por ENC, mientras que aves con bajos títulos sobreviven al desafío (13).

Las parvadas que poseen títulos de anticuerpos por IH superiores a 5 Log₂ están protegidas contra un virus patógeno de campo y la producción de huevo no se ve afectada si estos niveles son mayores de 7 Log₂ (7,16). Los títulos mayores de 4 Log₂ confieren protección (10).

Mediante la inoculación subcutánea con emulsión en aceite y una vacunación con virus vivo (B1) en aspersión o instilada en el saco conjuntival, los pollos muestran una tasa de anticuerpos IH séricos de aproximadamente 6 Log₂ hasta las ocho semanas post-vacunación (16,17).

Por otra parte, un aspecto importante dentro de la producción avícola, es el conocimiento del estado inmunológico de las aves para ENC mediante el uso de pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH), ya que constituyen un método de diagnóstico y permiten la evaluación de los programas de vacunación (9).

Los programas a gran escala para la determinación del estado inmunológico de las parvadas mediante IH, presentan problemas relacionados con la recolección, manejo, transporte y procesamiento de un elevado número de muestras. Algunos

autores reportan que la recolección de sangre completa con papel filtro, presenta mayores ventajas en los aspectos antes mencionados, en comparación con el manejo del suero (9).

Este método ofrece algunas ventajas con respecto a la obtención de suero, como es la facilidad de obtención, una menor posibilidad de contaminación bacteriana, economía y facilidad de transporte lo que permite que el dueño de la granja o el casetero obtenga sus propias muestras. En el laboratorio no se requiere de equipo especial, ya que se trabaja de manera similar al suero (5,9).

La recolección de sangre completa mediante papel filtro, se ha aplicado para el diagnóstico de algunas enfermedades aviares como enfermedad de Newcastle por inhibición de la hemoaglutinación (4,6,8). Para influenza aviar por inhibición de la hemoaglutinación (9). En ELISA se a aplicado para cólera aviar y para Bronquitis infecciosa (3,12).

La prueba de IH en microtécnica también se ha utilizado con muestras de sangre obtenidas con papel filtro para el serodiagnóstico de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos (11).

El presente trabajo tiene la finalidad de comparar y evaluar los resultados obtenidos mediante la microtécnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) para la enfermedad de

Newcastle con suero y con la recolección de sangre completa
con papel filtro.

HIPOTESIS

Los títulos de anticuerpos por IH contra la enfermedad de Newcastle son similares si se obtienen a partir de muestras de suero y de sangre completa en papel filtro.

OBJETIVOS

1.- Obtener y correlacionar los títulos de inhibición de la hemoaglutinación para ENC en sangre completa absorbida en papel filtro y suero.

MATERIAL Y METODOS

Se vacunaron veintiocho pollos de engorda comerciales de quince días de edad de acuerdo al siguiente esquema:

1a vacunación con vacuna cepa La Sota atenuada por vía ocular 0.03 ml y simultáneamente vacuna inactivada emulsionada cepa La Sota 0.5 ml por vía subcutánea en la parte posterior del cuello.

2a vacunación ocho días después con cepa La Sota inactivada emulsionada 0.5 ml por vía subcutánea en la parte posterior del cuello.

Las aves se mantuvieron en piso dentro de una unidad de aislamiento del DPA: Aves y se les proporcionó agua y alimento a libre acceso.

Las tres semanas siguientes a la última vacunación, se muestrearon a las aves, obteniéndose aproximadamente 3 ml. de sangre en tubos de ensaye, se permitió la formación del coágulo, los sueros se centrifugaron a 2000 rpm por diez minutos y se inactivaron a 56 °C por 30 minutos.

Se cortaron tiras de papel filtro de fabricación nacional S-917 de 1.3 cms de ancho por 10 cms. de largo .

Para la obtención de las muestras de sangre con papel filtro, se puncionó con una aguja hipodérmica la vena braquial y se absorbió la sangre en un extremo del papel, saturando 4cm de la tira. Las tiras se dejaron secar a temperatura ambiente.

De cada tira se cortaron cuatro discos de 4.7 mm de diámetro con un perforador de papel y se colocaron dos discos en cada pozo de microplacas de 96 pocillos de fondo redondo conteniendo 0.2 ml de solución salina con fosfatos (PBS) pH 7.2. Se agitó durante 20 minutos y se tomaron 0.05 ml de un pozo para realizar la técnica beta de inhibición de la hemoaglutinación a los 30 minutos de haber tomado las muestras (6). El otro par de discos se almacenó a 4°C para realizar la prueba de IH 24 horas después de que se obtuvo la muestra.

Se ha establecido que mediante este lavado se obtiene una dilución inicial de 1:10 de suero (9,13).

Posteriormente, se transfirieron 0.05 ml. de suero y del lavado del papel filtro a otras microplacas para realizar la inhibición de la hemoaglutinación por el método beta.

De los títulos obtenidos, se calculó la media geométrica de acuerdo al método descrito por Brugh en 1978 se expresaron en Log_2 para la realización de pruebas de correlación, regresión lineal simple y diferencia de medias por t-student (8,19).

RESULTADOS

Los resultados de seis pruebas (a,b,c,d,e,f) para comparar los títulos de IH entre suero y papel con cuatro unidades hemocglutinantes se muestran en el cuadro No.1. Las diferencias entre las medias geométricas de los títulos de IH entre suero y papel están comprendidas en un rango de -2.41 a 0.46 Log₂. En solo dos comparaciones, e) y f), no se observaron diferencias estadísticas significativas en las medias geométricas ($p > 0.05$). En cuatro comparaciones (a,b,c y d) se observa que los títulos con suero son mayores a los obtenidos con papel, excepto en los incisos e) y f). Los coeficientes de correlación están en un rango de -0.022 a 0.681.

Los resultados de seis pruebas para comparar los títulos de IH entre suero y papel utilizando ocho UHA del virus de EMC, se muestran en el cuadro 2. Las diferencias de las medias geométricas de los títulos con suero y papel están dentro de un rango de -2.28 a 0.10 Log₂. En tres comparaciones a), e), y f), no se observaron diferencias estadísticas en las medias geométricas de los títulos de IH ($p > 0.05$). En cuatro comparaciones (a,b,c y d) se observa que los títulos de suero son mayores a los obtenidos en papel. Los coeficientes de correlación tienen un rango de 0.180 a 0.676.

DISCUSION.

En un estudio similar realizado anteriormente utilizando 10 UHA y estimando una dilución 1:20 al momento de lavar el papel, se encontró diferencias entre medias geométricas de 0.46 a 1.50 Log₂. En otro estudio llevado a cabo por los mismos autores utilizando 10 UHA y cortando el papel con discos de 4.8 mm encontraron que las diferencias estuvieron en un rango de -0.2 a 0,1 Log₂ y de 105 muestras pareadas, 73 fueron iguales (10).

En los resultados obtenidos en este estudio se observaron marcadas diferencias entre las medias geométricas de los títulos de IH con suero y con sangre completa; en las pruebas en donde se utilizaron 4 UHA de ENC, se observó un rango de variación de -2.41 a 0.67 Log₂ y en la utilización de 8 UHA el rango de variación fué de -2.28 a 0.394 Log₂, lo que no se asemeja a lo encontrado por los otros dos investigadores, ya que las diferencias entre medias geométricas de los títulos de IH en suero y papel son mayores en este estudio (10).

En pruebas de correlación de otro estudio realizado anteriormente, se obtuvieron coeficientes de 0.65 a 0.85, que son más altos si se comparan con los obtenidos en el presente estudio (4).

En este trabajo, obtuvieron coeficientes de Pearson que corresponden a correlaciones bajas (0.022 y 0.180 para cuatro y ocho UHA respectivamente) y de correlaciones medias, (0.5756 a 0.681 cuatro y ocho UHA respectivamente) este último valor fué el coeficiente más alto obtenido.

Las diferencias mayores entre las medias geométricas con suero y papel, y las correlaciones menores en comparación con otros trabajos pudieron deberse a la heterogeneidad de los niveles de anticuerpos de las aves vacunadas.

Las medias de los títulos de IH obtenidos de las muestras de papel lavadas durante 24 horas son más elevados en comparación con los títulos de las muestras lavadas solamente durante 30 min., lo anterior sugiere que se lleva a cabo un mejor lavado de los anticuerpos contenidos en la muestra de papel.

Tomando en cuenta las ventajas que ofrece el papel filtro en la obtención de muestras, la aplicación de éste método puede ser adecuada para realizar otras pruebas serológicas, tal y como afirman Beard y Brugh, sin embargo, debido a la hemólisis que se observó en las muestras de sangre completa, puede ser difícil la aplicación de éste método para pruebas de virus-sero neutralización en cultivo de tejidos, debido a que dicha hemólisis podría tener efecto tóxico en las

células, por lo que se requiere realizar estudios para dichas técnicas (10).

La recolección de muestras de sangre completa en papel filtro confiere sensibilidad al realizar la técnica beta de IH, sin embargo, las correlaciones de los títulos obtenidas en este trabajo, indican que se requiere realizar una estandarización completa de la prueba, así como determinar exactamente el valor de la dilución inicial al momento de proceder al lavado del papel filtro en PBS, por lo anterior se recomienda efectuar más pruebas con éste método.

No se encontró ninguna dificultad para la realización de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con muestras de sangre completa en papel filtro y tampoco se observaron reacciones de hemoaglutinación por acción inespecífica con el suero o el lavado del papel filtro.

LITERATURA CITADA

1. Alexander, D.J.: Newcastle disease. En A Laboratory Manual for the Isolation and identification of Avian Pathogens. editado por Purchase, G.H. 3a ed. American Assoc of Avian Pathologist. 1989.
2. Alexander, D.J.: Newcastle Disease and other Paramyxovirus Infections. in Diseases of Poultry. editado por Calnek B.W 496-519, Iowa State University Press. Ames Iowa USA 1991.
3. Avakian, A.P.; Dick, J.W.: Comparison of filter- paper-eluted whole blood with serum in fowl cholera serology using the enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 29:1277-1280 (1985).
4. Barbosa, E.J; Marcial, A.M.; Lucio, M.B.: Evaluación del método de recolección, procesamiento y costo de muestras de sangre en papel filtro para la inhibición de la hemoaglutinación en microplaca contra la enfermedad de Newcastle. Memorias IX Convención de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Aviares. (1984)
5. Beard, C.W.; Brugh, M.: Use of the Nobuto blood-sampling paper strip for Newcastle disease serology. Avian Dis. 21:630-636 (1977).

6. Beard, C.W.: Serologic Procedures. En A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Editado por Purchase, H.G. 3a ed. American Assoc. of Avian Pathologist. 1989.
7. Box, P.G.: Newcastle disease antibody levels in chickens after vaccination with oil emulsion adjuvant killed vaccine. Vet. Rec. 96 108-111 (1975).
8. Brugh, M.: A simple method for recording and analyzing serological data. Avian Dis. 22:362-365 (1978).
9. Brugh, M. Beard, C.W.: Collection and processing of blood samples dried on paper for microassay of Newcastle disease virus and avian influenza virus antibodies. Am. J. Vet. Res. 41:1495-1498 (1980).
10. Galván, G.: Relación entre Título de Inhibición de la Hemoaglutinación y protección contra la enfermedad de Newcastle. Vet. Mex. 7:55-56 (1976).
11. Gay, G.M.; Hamdy, M.F.: Prueba de inhibición de la hemoaglutinación en microtécnica con muestras de sangre obtenidas con papel filtro para el serodiagnóstico de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos (EHVC). Memoria Reunión Anual de Investigación Pecuaria. UNAM INIFAP (1989).

12. Lana, D.P.; Marquard, W.W.; Snyder, D.B.: Comparison of whole blood dried on filter paper and serum for measurement of the temporal antibody response to avian infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 27:813-821 (1983).

13. Lucio M.B.: Panorama de la Enfermedad de Newcastle en México. Vet. Mex. 7: 30-34 (1976)

14. Moreno, C.R.: Inhibición de la Hemoaglutinación y sus usos en la Avicultura. Memorias Tercera Jornada Médico Avícola. FMVZ UNAM (1992)

15. Mosqueda, T. A.: Enfermedades comunes de las aves domésticas. Editado SUA, México, D.F., 1985.

16. Robertson, W.W.; Warden, D.; Furminger, G.S.: Field evaluation of Newcastle disease immunization by concurrent inactivated oil-emulsion and live B1 vaccines. Vet. Rec. 98 14-15 (1976).

17. Stone, H.D.; Brugh, M.; Erickson, G.A.; Beard, C.W.: Evaluation of inactivated Newcastle disease: Oil-Emulsion Vaccines. Avian Dis. 24 99-111 (1979).

18. Urquiza, B.O.: Eficacia de una vacuna emulsionada concentrada experimental contra la enfermedad de Newcastle

(ENC) en pollo de engorda de diez días de edad. Tesis Licenciatura FMVZ UNAM 1986.

19. Villegas, P.; Purchase, H.G.: Titration of Biological Suspensions. En A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Editado por Purchase H.G. 3a ed. American Assoc. of Avian Pathologists. 1989.

20. Whiteman, C.E.; Bickford, A.A.: Avian Disease Manual. American Assoc. of Avian Pathologists. Colorado USA 1979.

CUADRO No. 1

TITULOS DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION ENFERMEDAD DE NEWCASTLE POLLOS DE ENGORDA

CUATRO UNIDADES HEMOAGLUTINANTES

	DIAS POST- INOC.	No. POLLOS	TIEMPO HRS.	SUERO (a)	SANGRE COMP. (a)	DIFF. Log2(b)	COEF. CORREL.
a)	7	28	0	86.13	42.03	-1.03	0.4379
b)	7	27	24	219.45	84.06	-1.38	0.5756
c)	14	27	0	376.25	70.68	-2.41	0.5680
d)	14	28	24	168.06	80.00	-1.07	0.2860
e)	21	28	0	53.81	74.27	0.46c	-0.0220
f)	21	28	24	62.61	99.96	0.67c	0.6810

(a) TITULOS HI MEDIAS GEOMETRICAS

(b) DIFERENCIA DE LA SANGRE COMPLETA EN RELACION AL SUERO.

(c) MEDIAS ESTADISTICAMENTE NO DIFERENTES (P < 0.05)

CUADRO No. 2

TÍTULOS DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION ENFERMEDAD DE NEWCASTLE POLLOS DE ENGORDA

OCHO UNIDADES HEMOAGLUTINANTES

	DIAS POST- INOC.	No. POLLOS	TIEMPO HRS.	SUERO (a)	SANGRE COMP. (a)	DIF. Log2(b)	COEF. CORREL.
a)	7	28	0	46.38	34.47	-0.64c	0.5904
b)	7	23	24	220.19	45.27	-2.28	0.5565
c)	14	28	0	101.59	42.03	-1.26	0.6760
d)	14	19	24	104.23	27.77	-1.91	0.2801
e)	21	28	0	33.62	36.22	0.108c	-0.2660
f)	21	28	24	35.33	46.40	0.394c	0.1800

(a) TÍTULOS Y MEDIAS GEOMETRICAS

(b) DIFERENCIA DE LA SANGRE COMPLETA EN RELACION AL SUERO

(c) MEDIAS ESTADISTICAMENTE NO DIFERENTES (P < 0.06)