

108
2 eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION PASIVA COMO
UNA ALTERNATIVA EN LA DETECCION DE
ANTICUERPOS CONTRA LA INFECCION DE LA
BOLSA DE FABRICIO Y SU COMPARACION CON
VIRUS-SUERO-NEUTRALIZACION Y ELISA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A :

ENRIQUE LIZARRAGA RUIZ

Asesores : M.V.Z. Angel Retana Reyes
M.V.Z. Rebeca Pérez Becerra



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

DEDICATORIA

A MIS PADRES CON CARIÑO,

MA. LUISA RUIZ M. Y ENRIQUE LIZARRAGA C.

A MIS HERMANOS,

MONI, PILI Y PACO.

A MIS TIOS Y PRIMOS,

EN ESPECIAL, A MI TIO FERNANDO, Y A MI PRIMO JORGE.

A TODOS ELLOS DEDICO ESTE TRABAJO.

AGRADECIMIENTOS

**A MIS ASESORES,
POR SU AYUDA, AMISTAD Y CONFIANZA.**

**A LA DRA. AURORA VELAZQUEZ E. Y
A LA DRA. L. PATRICIA NOE MARTINEZ
POR SU GRAN AYUDA PARA DARLE
FORMA A ESTE TRABAJO.**

A MI JURADO POR SU PACIENCIA.

A TODOS USTEDES MIL GRACIAS.

CONTENIDO

	<u>página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS	9
DISCUSION	10
CONCLUSIONES.....	13
LITERATURA CITADA.....	14
CUADROS.....	18
GRAFICAS.....	20

RESUMEN

LIZARRAGA RUIZ ENRIQUE. La prueba de Hemoaglutinación Pasiva como una alternativa en la detección de anticuerpos contra la Infección de la Bolsa de Fabricio y su comparación con Virus-Suero-Neutralización y ELISA (bajo la dirección de: MVZ. Angel Retana Reyes y MVZ. Rebeca Pérez Becerra).

Se trabajaron 67 sueros de aves sospechosas a la Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), las cuales se analizaron por las pruebas de hemoaglutinación pasiva, virus-suero-neutralización y ELISA. En los resultados obtenidos se encontró que para las pruebas de hemoaglutinación pasiva, virus-suero-neutralización y ELISA la sensibilidad y la especificidad fué del 100%. Por lo anterior se puede decir que la prueba de hemoaglutinación pasiva es eficiente para el diagnóstico de IBF.

INTRODUCCION.

La infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), es una enfermedad aguda y altamente contagiosa de las aves, causada por un Bimavirus que se caracteriza por inducir inmunodepresión (12, 14, 19).

Fué descrita por Cosgrove en 1962, en el poblado de Gumboro, Delaware en EUA (5, 14, 17, 25).

En México, Correa aisló un agente infeccioso con características similares a las del virus de IBF en 1965, y en 1969 reprodujo la enfermedad en aves susceptibles. En 1972 Lucio y col. determinaron la presencia de anticuerpos contra la IBF (12).

El virus pertenece a la familia Bimaviridae, es desnudo, de forma icosaédrica, su diámetro es de 55 a 60 nm, el genoma es RNA de doble cadena y segmentado. El peso molecular del RNA es 2×10^6 daltons (3,17, 20, 25).

La susceptibilidad a sufrir la IBF está en relación con la edad y la presencia de anticuerpos maternos. Los pollos susceptibles expuestos al virus virulento, dentro de la primera semana de vida, presentan un cuadro subclínico causando una inmunodepresión, también disminución de la tasa de crecimiento y deficiencia en la conversión alimenticia. Si las aves se infectan durante la tercera semana de edad en adelante, pueden presentar signos clínicos como diarrea blanquecina acuosa, anorexia, depresión, temblores, postración y muerte (12, 22, 23).

La morbilidad es del 100% y la mortalidad puede ser hasta del 30% en el pollito y en aves mayores de tres semanas la mortalidad baja al 20% (1, 22, 23).

Se han descrito dos serotipos: el serotipo 1 aislado de gallinas y patos, y el serotipo 2 aislado de gallinas y pavos (10, 12, 17).

Los dos serotipos pueden ser diferenciados por la prueba de virus-suero-neutralización (VSN), pero no pueden ser detectados por las pruebas de inmunofluorescencia o ELISA.

La incidencia de la enfermedad en México es alta del 80 al 90% y uno de los métodos de prevención y control contra la IBF es la aplicación de programas adecuados de vacunación (12, 17, 22, 23).

El diagnóstico de la enfermedad puede realizarse mediante la historia clínica, lesiones a la necropsia, histopatología y pruebas de laboratorio (12).

La determinación de anticuerpos contra la IBF se confirma mediante pruebas serológicas en el laboratorio, dentro de éstas, las más utilizadas son:

Virus-Suero-Neutralización: mide la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la infectividad vírica (2, 12).

Esta es una prueba cualitativa y cuantitativa que determina niveles de anticuerpos neutralizantes. Detecta antígenos de serogrupo, por lo que ha sido empleada para la identificación antigénica de la cepa prototipo del serotipo 1 contra las cepas variantes (12).

Prueba de ELISA (Inmunoensayo con enzimas asociadas): es una prueba cuantitativa similar en aplicación a la prueba de VSN. Su desventaja es que es altamente sensible y por lo tanto poco específica (12).

Puede ser utilizada para detectar antígenos (método directo) o para detectar anticuerpos (método indirecto) (4, 11, 13).

Para cuantificar los anticuerpos es necesario contar con sueros testigo o referencia, uno positivo y otro negativo, los cuales se comparan con los sueros problema mediante un cálculo matemático (4, 11, 13).

Las muestras son leídas por un espectofotómetro, que puede conectarse a una computadora, la cual correlaciona el grado de absorbancia con el título o la cantidad de anticuerpos presentes en el suero. La intensidad de color de la reacción, dada por un agente cromógeno es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos ligados a enzimas que reaccionan con los anticuerpos del suero unidos al antígeno específico a la fase sólida de cada pozo en la microplaca (4, 11, 25, 26).

Existe una prueba que puede ser alternativa para cuantificar los niveles de anticuerpos contra la IBF, esta prueba se llama Hemoaglutinación Pasiva (H.P.) que consiste en combinar químicamente un antígeno con un eritrocito de manera que los anticuerpos específicos aglutinen a los eritrocitos sensibilizados (27).

Las técnicas de hemoaglutinación han llegado a ser métodos mucho más eficientes para el descubrimiento de cantidades pequeñas de anticuerpos, desde que se demostró que los eritrocitos podían adsorber diversos polisacáridos, como es el caso de los eritrocitos tratados con ácido tánico que pueden recubrirse con antígenos proteicos. Estos eritrocitos pueden aglutinarse con los anticuerpos específicos para el antígeno que ha sido adsorbido (9).

La sensibilidad de la técnica de H.P. es muy alta, bastan valores

de 0.003 a 0.006 de nitrógeno del anticuerpo para dar una aglutinación mínima que se puede descubrir en 0.006 μg de nitrógeno que corresponden a más o menos 50 moléculas de anticuerpo por glóbulo rojo. Su especificidad es cercana a la prueba de VSN (9).

Objetivo: Evaluar la prueba de hemoaglutinación pasiva en la determinación de anticuerpos contra la IBF, comparativamente con VSN y ELISA.

Material y Métodos.

Se utilizaron 67 sueros de pollo de engorda sospechosos a IBF de la estirpe Arbor Acres y de 3 a 4 semanas de edad y utilizándose controles para cada prueba.

Todos los sueros fueron analizados mediante las siguientes técnicas:

Virus-Suero-Neutralización: se realizó la técnica descrita por Cunningham, diluciones decrecientes de suero, virus constante (2).

Técnica de la prueba de ELISA: en ésta se utilizaron kits comerciales* y la técnica se realizó según Marquardt (13).

Técnica de la prueba de Hemoaglutinación Pasiva: se realizó la técnica descrita por Romero (19).

Para poder realizar esta prueba se empleó una suspensión de glóbulos rojos. La sangre fué obtenida de un camero puncionando la vena yugular en condiciones asépticas y recibida directamente en un matraz que contenía solución de Alsever. Para un volumen de sangre de camero (100 ml); se empleó un volumen de la solución de Alsever (100 ml). Se dejó reposar durante 24 horas en refrigeración.

Los eritrocitos se lavaron con PBS pH 7.2 tres veces consecutivas.

Se tanizaron los glóbulos rojos depositando 1 ml del paquete de eritrocitos en 39 ml de PBS pH 7.2 para obtener una suspensión al 2.5%. Se añadió un volumen igual (40 ml) de ácido tánico 1:20,000, mezclando e incubando en baño de maría a 37°C por 10 minutos, y se

centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se lavaron con PBS pH 7.2, se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos y se resuspendieron los eritrocitos en PBS pH 6.4 para hacer una suspensión al 2.5%.

Después se procedió a fijar los glóbulos rojos con glutaraldehído al 1%. A un volumen de 3 ml de la suspensión de glóbulos rojos se le añadieron 25 ml de la solución de glutaraldehído al 1%.

La adsorción del antígeno a los eritrocitos tanizados y fijados se realizó con un volumen de 50 ml mezclándose con un volumen igual de la solución de antígeno (Virus de IBF cepa Lukert) en PBS pH 7.2 y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos; se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en PBS pH 7.2, para su uso.

Para la prueba de hemoaglutinación pasiva en microplaca a cada pozo de la placa de microaglutinación se le añadió una gota (40 μ l) de PBS pH 7.2. Se depositó una gota (10 μ l) del suero problema haciendo una dilución 1:5 en la primera hilera vertical, y haciendo diluciones hasta 1:640. A cada pozo se le agregó la suspensión de eritrocitos de camero tratados y por último se agitó la placa hasta obtener una suspensión homogénea de los eritrocitos. Se colocó en refrigeración durante 24 horas y se realizó posteriormente la lectura.

Método estadístico: Se tomaron 67 sueros sugestivos a IBF y las pruebas realizadas (H.P., VSN, y ELISA) se analizaron mediante el método descrito por Méndez (15). Para determinar la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas se utilizaron las siguientes fórmulas:

Sensibilidad = $P/P+FN$

Especificidad = $N/FP+N$.

donde:

P - Positivo: Número de sueros positivos correctamente identificados por la prueba.

FP - Falso positivo: Número de sueros negativos incorrectamente clasificados como positivos en la prueba.

N - Negativo: Número de sueros negativos correctamente identificados por la prueba.

FN - Falso negativo: Número de sueros positivos incorrectamente clasificados como negativos en la prueba.

RESULTADOS.

En el cuadro N° 1 se presentan los resultados obtenidos en las pruebas de hemoaglutinación pasiva, virus-suero-neutralización y ELISA.

En el cuadro N° 2 se encuentra la comparación de los resultados de las pruebas de hemoaglutinación pasiva, virus-suero-neutralización y ELISA.

APLICACION DEL METODO ESTADISTICO.

Prueba de hemoaglutinación pasiva.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{P}{P+FN} \times 100 = \frac{58}{58+0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{N}{FP+N} \times 100 = \frac{9}{0+9} \times 100 = 100\%$$

Pruebas de virus-suero-neutralización y ELISA.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{P}{P+FN} \times 100 = \frac{57}{57+0} \times 100 = 100\%.$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{N}{FP+N} \times 100 = \frac{10}{0+10} \times 100 = 100\%.$$

La grafica 1 muestra la comparación de los resultados obtenidos por las pruebas de H.P., VSN. y ELISA.

DISCUSION.

En el presente trabajo se emplearon tres diferentes técnicas de detección de anticuerpos contra el virus de la IBF.

De los 67 casos los positivos (P) corresponden a 57 sueros en los que se detectó la presencia de anticuerpos, tanto en VSN y ELISA, pero para la prueba de H.P. 58 sueros fueron positivos a IBF. Los sueros que resultaron negativos (N) a la presencia de anticuerpos fueron 9, para la prueba de H.P. y 10 para VSN y ELISA.

La prueba de hemoaglutinación pasiva se utilizó para la detección de anticuerpos contra IBF, de la cual se puede decir que es una prueba sencilla, y que la disponibilidad de los reactivos y equipo hacen que su montaje sea más fácil que otras pruebas, como es el caso de VSN y ELISA.

En este caso los eritrocitos sensibilizados permanecieron aptos para la prueba por más de 5 meses, sin que perdieran sus propiedades de aglutinación y ésta fuera bien definida.

Los títulos obtenidos en los sueros de ave empleando la técnica de H.P. variaron desde 1:5 hasta 1:30. El título fué considerado como la máxima dilución que presentó el 100% de aglutinación.

Por los resultados obtenidos en la prueba de hemoaglutinación pasiva podemos decir que fué adecuada para la identificación de anticuerpos en los sueros de aves sospechosas a IBF. Se encontró que su especificidad llegó al 100% tal como lo indica Huerta (8). Aunque ellos trabajaron con otro antígeno diferente al de IBF. Estos resultados llegaron a tener cierta similitud con los resultados obtenidos por

Serrano (21) que obtuvo una sensibilidad del 85% trabajando con el virus de Bronquitis infecciosa.

Por otra parte, los títulos obtenidos mediante la prueba de VSN fueron mayores a los obtenidos por la prueba de H.P. y los resultados obtenidos por la prueba de ELISA sólo son mencionados como positivos y negativos, esto es porque en la prueba de ELISA sólo se manejó una dilución que fué 1:50.

Nicholas y col (18) hacen notar que para poder comparar estas pruebas se tendría que realizar la prueba de ELISA con diluciones seriadas lo cual haría la prueba de ELISA más complicada y eliminaría sus ventajas, y por tratarse de pruebas diferentes no se pueden comparar con respecto a su título.

A diferencia de los 57 sueros positivos que se encontraron en las pruebas de VSN y ELISA, en la prueba de H.P. resultaron 58 sueros positivos.

Es probable que esta ave se encontrara en una fase inicial de la infección contra IBF, con la consecuente producción de anticuerpos IgM, que son los primeros que se detectan en una respuesta primaria y que son más sensibles para la aglutinación.

Aunque se esperaba que en este trabajo los parámetros de sensibilidad fueran más bajos de los encontrados para la prueba de ELISA con respecto a la prueba de VSN. Los parámetros de sensibilidad y especificidad fueron iguales para H.P; VSN y ELISA. Esto concuerda con los resultados de Marquardt y col. (13) y de Nicholas y col. (18), los cuales encontraron sensibilidad similar.

Es importante mencionar que para las pruebas de VSN y ELISA se debe de contar con el material adecuado, además de personal altamente calificado para que los resultados obtenidos sean confiables y no existan errores.

CONCLUSIONES

1. La prueba de hemoaglutinación pasiva es una técnica sencilla con la cual se puede cuantificar anticuerpos contra el virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio.

2. La prueba detecta anticuerpos contra la IBF en el suero de aves por lo que puede ser una excelente opción para el diagnóstico serológico.

LITERATURA CITADA.

- 1- Calnek, W.B. and Barnes, H.J.: Infectious Bursal Diseases In: Diseases of Poultry. 9th ed. Edited by P.D. Lukert 648-663 Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1991.
- 2- Cunningham, Ch. H.: Virología Práctica. 3ª ed. Acribia. Zaragoza, España, 1971.
- 3- Fenner, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E.P., Murphy, P.A., Studdert, J.M. y White, D.O.: Virología Veterinaria. Acribia. Zaragoza, España, 1987.
- 4- Garret, J.K., Davis, R.B. and Ragland, W.L.: Enzyme-linked immunoabsorbent assay for detection of antibodies to avian encephalomyelitis virus in chickens. Avian Dis., **28**: 117-130 (1983).
- 5- Hagan, W.A. y Bruner, D.B.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 4a ed. La Prensa Médica Mexicana, México D.F. 1983.
- 6- Huerta, I.L.: Desarrollo de la prueba de hemaglutinación pasiva para la detección de anticuerpos contra el virus del cólera porcino. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1987.
- 7- Ismail, N.M. and Saif, Y. M.: Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens. Avian Dis., **35**:460-469 (1991).
- 8- Ismail, N.M. and Saif, Y.M.: Differentiation between antibodies to serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus in chicken sera. Avian Dis., **34**:1002-1004 (1990).

- 9- Kabat, E.A. and Mayers. M.M.: Experimental Immunochemistry. 2nd ed. Charles C. Thomas. Springfield, Ill. 1971.
- 10- Lam, K.M.: Lysis of chicken lymphocytes by infectious bursal disease virus. Avian Dis., 32:818-821 (1988).
- 11- Leinikki, P.O., and Pasilla, S.: Quantitative, semiautomated enzyme-linked immunoabsorbent assay for viral antibodies. J. Infect. Dis., 136: 5294-5299 (1977).
- 12- Lucio, D.E.: La Infección de la Bolsa de Fabricio. II Jornada Médico Avícola. Fac. Med. Vet. y Zoo. UNAM pags:108-117 México D.F. 1991.
- 13- Marquardt, W.W. and Johnson, R.B.: An Indirect enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. Avian Dis., 24: 375-385 (1980).
- 14- Mazariegos, L. A., Lukert, P.D. and Brown J.: Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease "intermediate" strains. Avian Dis., 33:203-208 (1990).
- 15- Méndez, I., Namihira, D., Moreno, L. y Sosa, C.: El Protocolo de la Investigación, Lineamientos Para su Elaboración y Análisis. Trillas, México D.F. 1990.
- 16- Mohanty, S.B. y Dutta, S.K.: Virología Veterinaria. Interamericana. México, D.F., 1983.
- 17- Mosqueda, T.A. y Lucio, M.B.: Enfermedades Comunes de las Aves Domésticas. Fac. Med. Vet. y Zoo, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1985.

- 18- Nicholas, R.A.J., Reed, N.E., Wood, G.W., Hebert, C.N., Muskett, J.C. and Thomson, D.H: Detection of antibodies against infectious bursal disease virus: a comparacion of three serological methods. Res. vet Sci., **38**: 189-192. (1985).
- 19- Romero, A. E.: Comparación de las técnicas de hemoaglutinación pasiva, doble inmunodifusión y prueba intradérmica en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Tesis de licenciatura. Fac. de Est. Sup. Cuautitlan. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1986.
- 20- Rosales, A.G., Villegas, P., Lukert, P.D., Fletcher, O.J., Mohamed, and Brown, J.: Isolation, identificación and pathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus. Avian Dis., **33**: 33-41 (1989).
- 21- Serrano, V.J.E. : Evaluación de las pruebas de hemoaglutinación pasiva e inmunodifusión para el diagnóstico de la Bronquitis infecciosa. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1991.
- 22- Shane, S.M.: La enfermedad de Gumboro en pollo de engorda. Memorias V curso de actualización Avímex. México D.F. Julio de 1993. Pags. 15-20 Publicidad Castelo Branco S.A. México D.F., (1993).
- 23- Shane, S.M.: Programa de prevención y control de la Infección de la Bolsa de Fabricio, en condiciones de campo. V Curso de actualización Avímex. México D.F. Julio de 1993. Pags. 45-51 Publicidad Castelo Branco S.A. México D.F., (1993).

- 24- Snyder, D.B.: Changes in the field status of infectious bursal disease virus. Avian Pathol., 19:419-423 (1990).
- 25- Snyder, D.B., Lana, D.P., Cho, B.R. and Marquardt, W.W.: Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. Avian Dis., 32:527-534 (1988).
- 26- Solano, W., Giambone, J.J. and Panangala, V.S.: Comparison of kinetic-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and virus-neutralization test for infectious bursal virus. I. Quantitation of antibody in white Leghorn hens. Avian Dis., 29: 662-671 (1984).
- 27- Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. 3ª ed. Interamericana. México D.F., 1987.

CUADRO 1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE H.P., VSN Y ELISA.

Nº DE SUEROS.	HEMOAGLUTINACION PASIVA	VIRUS-SUERO NEUTRALIZACION.	ELISA.
1	1:5	1:5	POSITIVO
2	1:5	1:20	POSITIVO
1	1:5	1:40	POSITIVO
3	1:10	1:10	POSITIVO
4	1:10	1:20	POSITIVO
7	1:10	1:40	POSITIVO
3	1:10	1:80	POSITIVO
2	1:10	1:160	POSITIVO
5	1:20	1:20	POSITIVO
4	1:20	1:40	POSITIVO
5	1:20	1:80	POSITIVO
11	1:20	1:160	POSITIVO
1	1:40	1:40	POSITIVO
6	1:40	1:160	POSITIVO
1	1:80	1:80	POSITIVO
1	1:80	1:160	POSITIVO
1	1:5	--	--
9	NEGATIVOS	--	--
10	--	NEGATIVOS	NEGATIVOS

TOTAL 67

**CUADRO 2. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE
LAS PRUEBAS DE H.P, VSN. Y ELISA.**

SUEROS	H.P.	VSN	ELISA
POSITIVOS	58	57	57
NEGATIVOS	9	10	10
TOTAL	67	67	67

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

GRAFICA 1. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE H.P, VSN, Y ELISA.

