

94
Res



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Trabajo Final Escrito de la Práctica
Profesional Supervisada

**COMPARACION DE LOS TITULOS OBTENIDOS POR
LA TECNICA DE ELISA PARA LA INFECCION DE
LA BOLSA DE FABRICIO A PARTIR DE
MUESTRAS DE SANGRE ABSORBIDA EN PAPEL
FILTRO Y SUERO.**

En la Modalidad de:
Producción Animal: Aves

**PRESENTADO ANTE LA DIVISION
DE ESTUDIOS PROFESIONALES
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P O R

JUAN LUIS GARCIA MELO

Asesores : MVZ Alejandro Banda Castro
MVZ Odette Urquiza Bravo
MVZ María Elena Rubio García



México, D. F.

Febrero de 1995

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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TRABAJO FINAL ESCRITO DE LA PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

**COMPARACION DE LOS TITULOS OBTENIDOS POR LA TECNICA DE ELISA
PARA LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO A PARTIR DE MUESTRAS
DE SANGRE ABSORBIDA EN PAPEL FILTRO Y SUERO.**

**EN LA MODALIDAD DE:
PRODUCCION ANIMAL: AVES**

PRESENTADO ANTE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DE LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR:**

JUAN LUIS GARCIA MELO

ASESORES:

MVZ ALEJANDRO BANDA CASTRO

MVZ ODETTE URQUIZA BRAVO

MVZ MARIA ELENA RUBIO GARCIA

MEXICO D.F., FEBRERO DE 1995.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	11
OBJETIVOS	12
ANTECEDENTES	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	16
DISCUSION	18
BIBLIOGRAFIA	21

DEDICATORIA

A mis padres Sergio Garcia Torres y Carlota Melo de Garcia, con cariño y admiración por que sin su apoyo no hubiese llegado a lograr este objetivo.

A mis hermanos Sergio, Carla y Pablo, que sin saberlo siempre han sido un apoyo.

Con gran amistad y cariño a Alvaro de Tomas, Rafael Venegas, Alvaro Meneses y Andres de Vizcaya, por su sinceridad y entusiasmo.

Al Dr. Juan Manuel Venegas.

A G R A D E C I M I E N T O S

A LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Y

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Por darme la oportunidad de ser universitario

A TODOS MIS PROFESORES
Por sus conocimientos y esperanzas

A TODOS MIS COMPANEROS

EN ESPECIAL A
MVZ ALEJANDRO BANDA CASTRO
MVZ COLETTE URQUIZA BRAVO
MVZ MARIA ELENA RUBIO GARCIA

POR SU PACIENCIA Y SU AYUDA PARA LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO

RESUMEN

García Melo, Juan Luis.: Comparación de los títulos obtenidos por la técnica de ELISA para la infección de la Bolsa de Fabricio a partir de muestras de sangre absorbida en papel filtro y suero.
Bajo la supervisión de MVZ Alejandro Banda Castro, MVZ Odette Urquiza Bravo y MVZ María Elena Rubio García.

Se muestreó una granja de engorda ubicada en el Municipio de Teotoluca Estado de México. Se obtuvo suero y sangre completa absorbida en papel filtro en los días 1, 8, 15, 22, 29, 36 y 43 del ciclo de engorda. Se determinó el título de anticuerpos contra la Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), de las muestras obtenidas con papel filtro y suero por medio de la técnica de ELISA. Los resultados se analizaron con el programa estadístico SAS obteniendo las medias de los títulos de anticuerpos, las medias geométricas, desviaciones estandar, coeficientes de variación, coeficientes de correlación y coeficientes de regresión de los resultados obtenidos. Se observó una correlación alta de 0.7206 a 0.9502, con excepción de los días 15 y 22 que fueron de -0.0252 y -0.4052. Los coeficientes de regresión fueron positivos con excepción de los días 15 y 22. La diferencia entre dichos días pudo deberse a variaciones en la obtención, almacenamiento y procesado de la muestra. De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede decir que la técnica de ELISA es útil para detectar anticuerpos por medio de muestras de sangre completa absorbida en papel filtro. Es necesario realizar más estudios para poder aplicar este procedimiento de recolección, en las evaluaciones rutinarias del estado inmunológico de las parvadas, ya que en este estudio se encontraron variaciones en los resultados obtenidos.

FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

La Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), es una enfermedad de curso agudo que afecta principalmente a los linfocitos B de la bolsa de Fabricio, causando atrofia de dicho órgano y por lo tanto un estado de inmunodepresión en las aves que se recuperan de la infección: el virus de IBF también tiene una replicación en menor grado en los linfocitos B del bazo y timo.(5)

La IBF, bursitis infecciosa o enfermedad bursal, fué reconocida como enfermedad de las aves en 1957 y en 1962 se descubrió que el agente causal era de origen viral. En 1964 se clasificó como un binnavirus. Esta enfermedad se presentó por primera vez en el condado de Gumboro, Delaware USA; por lo que también recibe el nombre de enfermedad de Gumboro.(5,15,16, 24).

La IBF tiene una especial importancia ya que la inmunodepresión producida origina una mayor susceptibilidad a enfermedades ocasionadas por Salmonella sp. Micoplasma y agentes oportunistas como E.coli. La IBF ocasiona una disminución en la respuesta inmune a la vacunación, principalmente a enfermedad de Newcastle (NC), Bronquitis infecciosa (BI), Enfermedad de Marek (EM), Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (HCI) y LaringoTraqueitis Infecciosa (LTI). Favorece la presentación de infecciones latentes como HCI, después de la recuperación de las aves a la infección. La IBF es de gran importancia económica ya que afecta negativamente los parámetros productivos, en pollo de engorda retrasa el crecimiento y aumenta la mortalidad, en gallina de postura disminuye la producción de huevo y en aves reproductoras disminuye la incubabilidad del huevo fértil (5, 7, 8, 13, 15, 16, 17, 22, 24).

FALLA DE ORIGEN

La IBF es causada por un virus de la familia Birnaviridae, su genoma está formado por dos segmentos de RNA de doble cadena, el virión es icosaédrico y no posee envoltura, tiene 60 nm de diámetro y 32 capsómeros. Este virus es resistente al calor a una temperatura de 56 °C por 5 horas, se puede inactivar a un pH 2 y pH 12; es resistente a la acción de éter y del cloroformo.(5, 8, 9, 11, 13, 15, 16, 24).

Existen dos serotipos del virus de la IBF, I y II, que presentan una antigenicidad mínima cruzada, de los cuales el serotipo I es patógeno para los pollos, y ha sido aislado de patos y pollos, presenta cierta variación antigénica; y se han encontrado 6 subtipos con base en pruebas de virus neutralización (VN). Cinco de estos subtipos son llamados "estandar" y existen cepas variantes como la Delmarva, A-E, Md, Ark., GA, GLS y otras, la diferencia entre cepas variantes y clásicas está dada por la eliminación de uno de los dos sitios antigénicos inductores de la formación de anticuerpos neutralizantes. Es importante mencionar que la inmunización con una cepa estandar brindará una protección contra los demás subtipos estandar y una mínima protección contra las cepas variantes pero no a la inversa. La inmunización con el serotipo II al parecer no brinda protección contra el serotipo I.(8,9, 13).

La IBF tiene dos formas de presentación, la clínica y la subclínica.(13, 15,16).

La forma clínica se presenta en aves mayores de 4 semanas, produciendo un síndrome nefrítico hemorrágico, con una mortalidad que puede alcanzar un 20 %, mostrando los siguientes signos: tendencia a picarse la región de la cloaca, depresión, anorexia, excremento blanco, acuoso, con apariencia similar a yeso, y

FALLA DE ORIGEN

en aves muy afectadas se observa deshidratación, tembor y marcha vacilante antes de morir.(13, 15, 16, 24).

La forma subclínica se presenta en aves menores de 4 semanas de edad, ocasionando una inmunodepresión producida por la atrofia de la bolsa de Fabricio (BF) en aves que se recuperan de la infección.(7, 15).

La presentación de las cepas variantes, producen una atrofia rápida de BF asociada a una mínima respuesta inflamatoria de la misma. En campo se han asociado a la presentación subclínica.(13, 15).

Las lesiones macroscópicas encontradas en animales afectados por IBF clínica son: marcada deshidratación de los tejidos, congestión muscular, hemorragias subcutáneas y musculares en pechuga, pierna y muslo, ocasionalmente se encuentran hemorragias en proventrículo y otros órganos, riñones aumentados de volumen y pálidos, túbulo renales y uréteres repletos de uratos, esplenomegalia. (16).

Los cambios macroscópicos observados en BF son: durante los 2-3 días de la infección se observa aumento de volumen, edema, aspecto gelatinoso, contenido mucoso o cremoso de color amarillento y petequias; del 4-5 día en adelante se observa atrofia de la bolsa hasta quedar a 1/3 de su tamaño normal, contenido caseoso y equinosis.(16,21).

FALLA DE ORDEN

Las lesiones microscópicas observadas en BF son: necrosis de las células linfoides, edema, hiperemia, degeneración, necrosis de los linfocitos de la región medular, infiltración de macrófagos a los folículos afectados, necrosis de los folículos de la corteza; estos cambios se generalizan en toda la bolsa. (16,21).

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se puede obtener por la observación del cuadro clínico y lesiones a la necropsia. Un diagnóstico definitivo se puede dar por medio de aislamiento viral en embrón de pollo, en cultivos celulares o por la detección de antígenos en tejidos como bolsa de Fabricio y bazo por la técnica de inmunofluorescencia, o la detección de anticuerpos que se puede lograr por medio de precipitación en agar (PA), virus suero neutralización (VSN), y la técnica de ELISA (8, 9, 10, 13, 15, 16, 20).

La prevención de esta enfermedad se realiza mediante medidas sanitarias estrictas y por vacunación a reproductoras que confieren una inmunidad pasiva al pollito a través de anticuerpos maternos los cuales están presentes en un nivel mínimo de protección hasta los días 4-7 de edad, pero se detectan anticuerpos maternos hasta 3-4 semanas de edad. (4, 25).

La depleción de anticuerpos maternos empieza desde el momento del nacimiento, y no se puede depender de la inmunidad materna para prevenir la presentación clínica de la enfermedad, por lo que en zonas con un alto desafío, los pollitos se vacunan a temprana edad aún con la presencia de anticuerpos maternos, para producir una respuesta inmune activa, capaz de proteger al animal de una presentación clínica. (5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, 23, 26).

FALLA DE ORIGEN

Es importante mencionar que la respuesta inmune en aves con bajos títulos de anticuerpos maternos es retardada y moderada con el virus vacunal y es más rápida y significativa con el virus de campo. (5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, 23, 26).

La inmunidad pasiva previene la inmunodepresión y para prevenir el síndrome nefrítico hemorrágico hay que recurrir a la inmunidad activa. (5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, 23, 26).

Algunos estudios realizados han demostrado que aves reproductoras vacunadas con virus IBF a las 3-4 sem. y que han sido revacuadas a las 18 semanas de edad con vacunas de virus inactivado en adyuvante oleoso producen anticuerpos neutralizantes durante 10 meses de postura. Los títulos de anticuerpos en los pollitos nacidos durante los mismos meses de postura, son similares al de las aves de las cuales procedían. (5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, 23, 26).

Se menciona que en los primeros días los niveles de anticuerpos maternos son suficientes para neutralizar virus vacunales y de campo, pero conforme avanza el tiempo, los anticuerpos maternos pueden neutralizar a los primeros, entorpeciendo la vacunación y sin embargo ser insuficientes para la protección de un virus patógeno de campo. (5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, 23, 26).

Los pollitos con alta tasa de anticuerpos maternos al ser vacunados no presentan una respuesta inmune activa, los que tienen una inmunidad materna baja responden

activamente contra los virus vacunales y de campo. (5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, 23, 26).

Para poder realizar un calendario de vacunación en pollo de engorda es necesario tomar en cuenta varios factores, como son la comprobación de la enfermedad de la zona, verificar la edad de la presentación ya que los daños son diferentes según la edad del animal, conocer la patogenicidad del virus de cada granja; esto se debe hacer con seguimientos serológicos semanales, estudios histológicos rutinarios de BF, mediciones de la bolsa de Fabricio y otros órganos linfoides como timo y bazo. También es de suma importancia conocer la inmunidad materna de la parvada. Hay que tomar en cuenta que en una parvada al menos el 5% de las aves tienen nula o poca inmunidad materna, por lo que es necesario conocer el nivel inmunitario de la parvada mediante un programa de verificación serológica, como confirmación de la respuesta de la aves a la vacunación mediante la detección de títulos de anticuerpos, así como de inmunidad pasiva en los primeros días del pollito. (5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, 23, 26).

Es necesario conocer los tipos de vacunas ya que hay vacunas inactivadas y modificadas de las cuales existen variantes patogénicas:

- a) Vacunas suaves (virus modificado)- avirulenta
- b) Vacunas intermedias(virus modificado) - suavemente patogénica
- c) Virulenta (virus atenuado) - variante de campo (10% de morbilidad y mortalidad)
- d) Altamente virulenta - (50 % de morbilidad y mortalidad)

Las cepas del serotipo I y las variantes estándar son:

Lukert, D7H, P8G9H, 2512.

Las cepas de los virus variantes son: Delmarva, A-E, Md, Ark, GA, GLS, y otras, que en México no se utilizan ya que las condiciones son diferentes a las de los EU donde ya existen en el mercado.

También es necesario tomar en cuenta las vías de aplicación, las cuales pueden ser en agua de bebida, gota ocular (vacunas vivas) y por inyección subcutánea (inactivadas). (6, 23)

Para la verificación del suero, el muestreo se realiza mediante la extracción de sangre con aguja y jeringa; esto puede ocasionar que la transportación, procesamiento y almacenamiento de las muestras sea difícil, sobre todo cuando se maneja un número elevado de muestras, con un consecuente costo elevado; además con la necesidad de contar con un personal capacitado para evitar las muestras deficientes y un tiempo de elaboración prolongado. (1)

La toma de muestras a través de la absorción de sangre con papel filtro es un método práctico y sencillo ya que tiene la ventaja de reducir los costos por concepto de material, facilitar el envío de un número elevado de muestras, no requiere de mano de obra calificada para la obtención y envío de las mismas y se reduce el tiempo de procesamiento. (2)

La determinación de los títulos de anticuerpos se realiza a través de la técnica de ELISA, que tiene cualidades como especificidad, sensibilidad, rapidez y bajo costo, pudiéndose manejar un número elevado de muestras de manera sencilla y simultáneamente (1, 7, 11, 20).

FALLA DE ORIGEN

En estudios similares realizados anteriormente por Brugh y Beard en 1960, para realizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI), con la enfermedad de Newcastle e Influenza aviar, el papel filtro utilizado fué del número 740 -E y se cortó en tiras de 5 x 30 mm; se absorbió 1 ml de sangre (aproximadamente 0.04 de suero) por lo que las muestras diluidas en .4 ml de diluyente deberán tener una equivalencia de 1:10 de la dilución del suero. La dilución se hizo en en PBS de pH 7.2, se agitaron automáticamente hasta que se mojara completamente el papel filtro y se dejaron reposar toda la noche a una temperatura de 40°C para una completa dilución, o bien 2 hrs a 25°C en un agitador automático de microplacas de ELISA. En este estudio no encontraron una diferencia significativa en los títulos obtenidos.(3).

En 1985 Avakian y Dick utilizaron esta técnica para comparar títulos por ELISA para Pasteurella sp; ellos tomaron muestras de sangre completa en tiras de papel filtro del número 740-E, se secaron a temperatura ambiente durante 48 hrs. y se almacenaron a 4°C en bolsas de plástico selladas. Así mismo tomaron muestras de suero, siguiendo el método tradicional y almacenandolo a -20°C hasta su utilización. Mediante la técnica de ELISA se comparó la actividad de los anticuerpos en las diferentes muestras. La sangre fué extraída del papel filtro cortando discos de 4.8 mm de diámetro y dejándolos sumergidos a 4°C durante toda la noche en 200µl de solución salina buferada. Las muestras similares tomadas al mismo tiempo y de la misma ave no mostraron diferencias significativas en la actividad de los anticuerpos, cuando las muestras de sangre presente en los discos fue considerada 1:20. Por lo

FALLA DE ORIGEN

que esta técnica se consideró como una buena alternativa para la obtención de suero y medir la actividad de los anticuerpos por la técnica de ELISA.(1).

En un estudio realizado por Barbosa y Lucio, para realizar la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación en microplaca contra la enfermedad de Newcastle, se utilizó un papel filtro de fabricación nacional (S-917), cortandolo en tiras de 1.3 x 10 cm. La recolección fué absorbiendo la sangre con estas tiras, despues de ser puncionada la vena radial del ala. Se absorbieron 2-3 cm de sangre en el papel filtro y se cortaron discos de 4.8 mm de diámetro (2) de cada muestra, se diluyeron durante 20 min. en 200µl de solución salina fosfatada pH 7.2 siendo agitados por un agitador mecánico; se almacenaron durante toda la noche a 4°C, obteniendo una dilución 1:10 equivalente a la del suero. Ellos encontraron una alta correlación en los dos tipos de muestras, por lo que concluyeron que la técnica es confiable.(2).

FALLA DE ORIGEN

HIPOTESIS

No existe diferencia en los títulos de anticuerpos contra la Infección de la bolsa de Fabricio (IBF) , con la técnica de ELISA entre las muestras de suero y las de sangre completa obtenida con papel filtro.

FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo es evaluar el método de obtención de muestras de sangre completa absorbida en papel filtro para la medición de anticuerpos contra la IBF por ELISA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener los títulos de anticuerpos contra IBF por la técnica de ELISA a partir de muestras de suero y de sangre completa absorbida en papel filtro.
- 2.- Comparar los títulos obtenidos por ambos métodos y obtener la correlación estadística.
- 3.- Calcular la regresión lineal entre los títulos obtenidos por ambos métodos para poder estimar títulos de suero a partir de muestras de sangre completa absorbida en papel filtro.

FALLA DE MÁQUINA

ANTECEDENTES

El presente estudio se realizó en una granja de pollo de engorda localizada en el municipio de Teoloyucan, Estado de México, dicha granja consta de 9 casetas de ambiente natural, con un promedio de 11000 aves por caseta. La estirpe explotada es Arbor Acres.

El programa de vacunación empleado es el siguiente:

EDAD	VACUNA	CEPA	VIA DE APLICACION
DIA 0	NEW CASTLE	B1	OCULAR
DIA 8	BRONQUITIS INFECC.	M41	OCULAR
DIA 8	VIRUELA	HOMOLOGA	INTRADERMICA
DIA 15	GUMBORO	LUKERT	PLIEGUE DEL ALA
DIA 16 Y 17	NEWCASTLE EMULSION	LA SOTA	ORAL EN AGUA DE BEBIDA
DIA 30	NEWCASTLE	CLONE30	SUBCUTANEA
DIA 30	BRONQUITIS	H120	SUBCUTANEA
DIA 30	PASTEURELLA Y E.COLI		

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un muestreo semanal a partir del primer día de edad hasta la séptima semana en una caseta. Se sangraron 10 aves de manera aleatoria en cada muestreo. La sangre se obtuvo puncionando la vena yugular en pollitos y la vena braquial en aves mayores, utilizando agujas hipodérmicas de 21G X 1 1/4" y jeringa de 3cc.

La muestra obtenida se colocó en popotes para permitir la separación del suero y después de 24 hrs. se retiró el coágulo y el suero obtenido se guardó en refrigeración hasta el momento de su procesamiento.

Para la obtención de sangre completa mediante la absorción en papel filtro, se utilizó papel de fabricación nacional S-917 que se cortó en tiras de 1cm por 10cm. Se unieron cuatro tiras por el centro de tal manera que quedaron dispuestas en forma de estrella y se identificaron en la parte central, en orden ascendente. Cada estrella se utilizó para coleccionar ocho muestras de sangre. (3)

Con las tiras de papel filtro se obtuvieron las muestras de sangre completa, mediante la absorción por un extremo de la tira, posteriormente se dejó secar la muestra a temperatura ambiente.

Las muestras de suero y sangre completa, provenientes de un mismo animal se identificaron con un número.

FALLA DE ORIGEN

De cada tira de la estrella se cortaron dos discos de 4.7 mm. de diámetro con una perforadora de papel y se colocaron en un pozo de la microplaca de fondo redondo, se agregaron 200µl de solución buffer con un pH 7.2 a cada pozo, se agitó con un palillo hasta humedecer completamente el disco. Se dejó reposar la microplaca por 24 horas y posteriormente se comprimieron los discos de cada pozo con pinzas para remover la mayor cantidad de líquido posible de dichos discos.

Se colocaron 50µl de solución buffer en una microplaca de 96 pozos, de fondo plano, revestido con antígeno de IBF para la realización de la técnica de ELISA. Después se agregaron 50µl del líquido obtenido del lavado de los discos de papel filtro, obteniendo así una dilución 1:2.

Por otra parte, se tomaron 4µl. de suero en la microplaca para ELISA y se colocaron 200 µl de buffer para obtener una dilución 1:50.

Posteriormente para desarrollar la técnica de ELISA para las muestras de suero, y suero a partir de sangre completa, se siguieron los pasos que establece el protocolo de ELISA recomendado para el sistema KPL. (6).

Los resultados obtenidos se analizaron calculando el coeficiente de correlación de Pearson y el análisis de regresión lineal, utilizando el paquete estadístico SAS.

RESULTADOS

Los promedios de los títulos medios, las medias geométricas, los valores de desviación estandar y coeficientes de variación para las muestras de suero y sangre completa absorbida en papel filtro (SCAPF), se muestran en el cuadro No. 1

En el análisis estadístico del presente estudio se observaron los siguientes resultados:

Los títulos medios de las muestras de SCAPF son mayores en comparación con las correspondientes a las muestras de suero, con excepción de los días 15 y 29, donde ocurre lo contrario. La mayor diferencia se observó en el día 15, donde el título medio del suero fué de 3302.1 en comparación de la SCAPF cuyo título medio fué de 68.4. Cuadro No.1

Las medias geométricas, también son mayores los valores para sangre completa con excepción de los días 8 y 43. La diferencia mayor entre ambos grupos de muestras ocurrió en el día 15, donde la media geométrica del suero fue de 2962 y la obtenida con SCAPF fué de 2. Cuadro No.1

En relación a los coeficientes de variación (CV) se observó una tendencia del suero a presentar valores más elevados ya que en los días 1,8, 22 y 29 este indicador fue mayor en comparación de los obtenidos para muestras de SCAPF, por ejemplo

en el día 22, el CV para suero fué de 105.3% en comparación con el obtenido para SCAPF que fué de 66.1%. Sin embargo la mayor diferencia se observa en el día 15 en donde el CV para sangre fué de 315.2% y para el suero de 44.7%. Cuadro No. 1

En relación a los coeficientes de correlación de Pearson. Se obtuvo el valor más alto de correlación al día 8, que fue de 0.95026, y la más baja ocurrió en el día 15 que fué de -0.02527. Para los días 1, 8, 29, 36 y 43, las correlaciones fueron positivas; para los días 15 y 22 tuvieron valores negativos, de -0.02527 y -0.48529 respectivamente. Cuadro No. 2

Los coeficientes de regresión lineal se muestran en el cuadro No. 2 y las rectas de regresión en las gráficas 1-7. Para los muestreos realizados el día 1, 8, 29, 36 y 43 dichos valores fueron positivos. Los coeficientes fueron negativos, para los días 15 y 22 y fueron de -0.003705 y -0.325545 respectivamente.

DISCUSION

En el presente estudio se evaluaron los títulos de anticuerpos en suero y SCAPF para la IBF.

Fue posible detectar anticuerpos por la técnica de ELISA, mediante el uso de muestras de SCAPF. Sin embargo se observaron variaciones en relación a los títulos obtenidos de suero.

Al momento de realizar el lavado de los dos discos en los 200 μ l de buffer, algunos autores mencionan que con esto se logra una dilución de 1:10 (2) (3) y de 1:20 (1). Sin embargo, en el presente estudio, tomando en cuenta el grosor y tamaño de poro del papel, no se pudo determinar si era similar la dilución. Se sugiere se realice un cálculo de la dilución inicial al momento de realizar el lavado, para el papel que se utilizó.

Se observó una tendencia a que los títulos de SCAPF fueran mayores en comparación con los obtenidos por suero. Esto pudo deberse a que para la preparación de las diluciones, se hizo una dilución mayor para el suero en comparación con la del líquido obtenido a partir del SCAPF. Esto se podrá solucionar, estableciendo de manera exacta la dilución inicial.

En general se observaron correlaciones altas entre ambos tipos de muestras, también la regresión lineal fue positiva, esto quiere decir que existe una relación

directamente proporcional entre los títulos de suero en comparación con los títulos de SCAPF. Sin embargo, en los días 15 y 22, se observó una correlación demasiado baja, y una regresión lineal negativa, esto quiere decir que para estos dos muestreos, se presentó una relación inversamente proporcional entre los títulos de suero y de sangre completa.

Los coeficientes de variación del día 15 para suero y SCAPF fueron de 44.7% y 316% respectivamente. El coeficiente de suero se puede clasificar como bueno y el correspondiente a papel se puede tomar como un coeficiente pobre. Por otra parte, los coeficientes de variación del día 22 fueron de 105.3% y 66.1% para suero y SCAPF respectivamente, estos se pueden clasificar como pobre para el suero y de regular para SCAPF.

Tomando en cuenta las diferencias tan marcadas en los coeficientes de variación la baja correlación y la regresión negativa que existe entre ambos tipos de muestras para los días 15 y 22, se puede suponer que existió variación en la obtención y procesamiento de las muestras.

De acuerdo a lo obtenido en la regresión lineal se observaron variaciones que van desde -0.003705 a 1.215472 para el día 15 y 43 respectivamente, esto indica que la relación entre los títulos de ambas muestras no fue uniforme en los siete muestreos, esto puede dificultar el establecimiento de un modelo de estimación de títulos de suero a partir de muestras de SCAPF.

Se sugiere realizar más estudios, donde se estandarice de manera exacta la dilución inicial que se obtiene al momento de realizar el lavado de los discos de papel filtro; también que se incluya un mayor número de grupos con repeticiones para poder realizar un análisis estadístico más preciso. En relación a la técnica de ELISA, se debe tomar en cuenta la dilución a la que se va a trabajar el líquido obtenido del lavado de discos, para poder obtener mayor concordancia entre los títulos.

La técnica de obtención de muestras de SCAPP ofrece varias ventajas, como son la facilidad de obtención, de manejo, almacenamiento y transporte, disminuye el riesgo de contaminación y favorece el procesado de un gran número de muestras (2), sin embargo por lo obtenido en este trabajo, es útil para la detección de anticuerpos, pero debido a las diferencias observadas en los títulos, es necesario realizar más estudios para poder estandarizarla y aplicarla en las evaluaciones rutinarias del estado inmunológico de las parvadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Avakian, A.P. and Dick, J.W.: Comparison of Filter Paper Eluted Whole Blood with Serum in Fowl Cholera Serology using the Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Avian Dis.* 29:1277-1200. (1985).
- 2.- Barbosa, E.J., Marcial, A.M. y Lucio, M.B.: Evaluación del método de recolección, procesamiento y costo de muestras de sangre en papel filtro para la inhibición de la hemaglutinación en microplaca contra la enfermedad de Newcastle. *Memorias de IX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas.* Guanajuato Gto.:27-37.(1984).
- 3.- Brugh, M. and 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).
- 4.- Etcharren, M.L., Valladares, J.C., Rubio, G.M., Lopez, C.C. y Peñalva, G.: Evaluación de la transferencia de inmunidad materna para la infección de la bolsa de Fabricio y enfermedad de Newcastle. *Memorias de XIX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas.* Puerto Vallarta Jalisco. 03-08,(1994).
- 5.- Fenner, F., Bachmann, A., Gibbs, E. y Murphy, F.: *Virología Veterinaria.* 1a Edición. Edit. Acribia. Mallorca. España.(1992).
- 6.- Giambone, J.: Vacunación contra variantes de IBF. Gallina Pesada. *Memorias 1er Curso Anual.* Saltillo Coahuila, México. 44-47, (1993).
- 7.- Gonzalez, C.M.: Causas de inmunosupresión. *Memorias, Tercera Jornada Médico Avícola, FMVZ, UNAM.* México D.F. (1992).
- 8.- Goodwin, M.A.: Virus causantes de inmunodepresión en pollos. *Sexto curso de Actualización Avimex. Procesos patológicos que afecten la producción avícola e Influenza Aviar.* México. 15-83,(1994).
- 9.- Hitchner, S.B., Domermith, C.H., Purchase, H.G., Williams, J.E.: Isolation and Identification of Avian Pathogens. *The American Association of Avian Pathologists.* Texas A&M University. Texas. (1975).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Avakian, A.P. and 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).
- 2.- Barbosa, E.J., Marcial, A.M. y 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 de IX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas.* Guanajuato Gto.:27-37.(1984).
- 3.- Brugh, M. and 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).
- 4.- Etcharren, M.L., Valladares, J.C., Rubio, G.M., Lopez, C.C. y Peñalva, G.: Evaluación de la transferencia de inmunidad materna para la infección de la bolsa de Fabricio y enfermedad de Newcastle. *Memorias de XIX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas.* Puerto Vallarta Jalisco. 83-88.(1994).
- 5.- Fenner, F., Bachmann, A., Gibbs, E. y Murphy, F.: *Virología Veterinaria.* 1a Edición. Edif. Acribia. Mallorca. España.(1992).
- 6.- Giambone, J.: Vacunación contra variantes de IBF. Gallina Pesada. *Memorias 1er Curso Anual.* Saltillo Coahuila, México. 44-47, (1993).
- 7.- Gonzalez, C.M.: Causas de inmunosupresión. *Memorias, Tercera Jornada Médico Avícola, FMVZ, UNAM.* México D.F. (1992).
- 8.- Goodwin, M.A.: Virus causantes de inmunodepresión en pollos. *Sexto curso de Actualización Avimex. Procesos patológicos que afectan la producción avícola e Influenza Aviar.* México. 15-83.(1994).
- 9.- Hitchner, S.B., Domermuth, C.H., Purchase, H.G., Williams, J.E.: Isolation and Identification of Avian Pathogens. *The American Association of Avian Pathologists.* Texas A&M University. Texas. (1975).

FALLA DE ORDEN

10.- Kirkegaard & Perri, L.I.: The KPL Diagnostic Sistem. Bangkok,Thailand. (1993).

11.- Lana, D.P . Marquardt, W.W. and Sinder, D.B.: Comparison of Whole BloodDried on Filter Paper Serum for Measurement of the Temporal Antibody Response to Avian Infectious Bronchitis Virus by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Avian Dis.*27: 813-821. (1983).

12.- Lozano, D.B.; Lucio, M.B.: Insaturación práctica de un programa de prevención y control de la IBF.Memorias del primer seminario sobre la prevención y control de la infección de la bolsa de Fabricio. Asociación Nacional de Especialistas de Ciencias Avícolas de México. México, D.F.52-60, (1993).

13.- Lucio, M.B. : Fallas de Vacunación Contra la Infección de la Bolsa de Fabricio. Memorias de XIX Convención Nacional de la Asociación Nacional De Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta Jalisco.133-149, (1994).

14.- Lucio, B.: Seguimiento de la vacunación contra la infección de la bolsa de Fabricio en México.Memorias del primer seminario sobre la prevención y control de la infección de la bolsa de Fabricio. Asociación Nacional de Especialistas de Ciencias Avícolas de México. México, D.F.42-53, (1983).

15.- Lukert, P.D. and Saif, Y.M. : Infectious Bursal Disease. In *Diseases of Poultry*. Edited by Calnek, B.W. 640-663. Iowa State University Press. Ames Iowa. (1991).

16.- Mosqueda, A. y Lucio, M.B.: Enfermedades Comunes de las Aves Domésticas. 1a edición. Ed. UNAM, D.F. (1985).

17.- Munner, M.A., Farah, I.O., Newman, J.A. and Goyal, S.M.: Immunosuppression in Animals. *Br. Vet. J.* 144: 268-301. (1988).

18.- Naqui, S.A.: Relación de los anticuerpos maternos con la inmunización de la infección de la bolsa de Fabricio.Memorias del primer seminario sobre la prevención y control de la infección de la bolsa de Fabricio. Asociación Nacional de Especialistas de Ciencias Avícolas de México. México, D.F.24-42, (1983).

19.- Oibers, C.: Prevención de la infección de la bolsa de Fabricio por medio de vacunas inactivadas.Memorias del primer seminario sobre la prevención y control de la infección de la bolsa de Fabricio. Asociación Nacional de Especialistas de Ciencias Avícolas de México. México, D.F.6-17, (1983).

FALLA DE VACUNACIÓN

20.- Pages, A., Artigas, G. y Ducha, J.: Cinética de Anticuerpos Frente a la Enfermedad de Gumboro (IBD) en Reproductoras Pesadas mediante una Técnica de ELISA indirecto. *Med. Vet.* 9.7-8: 449-454. (1992).

21.- Pasch, L.: Secuencia de la presentación de lesiones histopatológicas en la bolsa de Fabricio de aves afectadas con infección de la bolsa de Fabricio. Memorias del primer seminario sobre la prevención y control de la infección de la bolsa de Fabricio. Asociación Nacional de Especialistas de Ciencias Avícolas de México. México, D.F. 1-6 (1993).

22.- Saif, Y.M.: Immunosuppression induced by Infectious Bursal Disease virus. *Vet. Immunol. And Immunopathol.* 30:45-50. (1991).

23.- Simon, M.S.: Protection Against Bursal Disease. Under certain conditions viability and certain degree of damage to the bursa can be tolerated. *Tecnología Aviecuaria.* 7, (75), México. (1994).

24.- Virgil, S.D.: Avances Tecnológicos de la Vacuna para la Prevención de la Infección de la Bolsa de Fabricio. Una Nueva Generación de Vacunas. Memorias de XIX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta, Jalisco. 370-374. (1994).

25.- Zavaleta, O.E. : Desarrollo de la Prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta en Tejidos Fijados en Formalina para la Detección del Virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF). Memorias de XIX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta, Jalisco. 388-392, (1994).

26.- Zoll, Z.: Programas de vacunación para pollos de engorda contra la infección de la bolsa de Fabricio. Memorias del primer seminario sobre la prevención y control de la infección de la bolsa de Fabricio. Asociación Nacional de Especialistas de Ciencias Avícolas de México. México, D.F. 17-23, (1993).

CUADRO No. 1

TITULOS MEDIOS, MEDIAS GEOMETRICAS Y COEFICIENTES DE VARIACION DE LAS MUESTRAS DE SUERO Y SANGRE COMPLETA.

EDAD	No MUESTRAS	TITULO MEDIO SUERO	MEDIA GEOMETRICA SUERO	DESVIACION ESTANDAR SUERO	COEFICIENTE DE VARIACION SUERO	TITULO MEDIO PAPEL	MEDIA GEOMETRICA PAPEL	DESVIACION ESTANDAR PAPEL	COEFICIENTE DE VARIACION PAPEL
1	10	4149.6	3379	2101.64	50.6	4248.7	3573	1886.48	44.6
8	10	2054.9	445	2039.26	99.2	2702.0	2042	2022.36	74.8
15	10	3302.1	2962	1475.28	44.7	68.4	2	216.30	316.2
22	10	1133.2	85	1193.28	105.3	1211.7	332	800.48	66.1
29	10	3512.4	1658	1579.10	45.0	3383.7	3170	1035.90	30.6
36	10	3185.5	3021	1118.07	35.1	4000.2	3702	1611.37	40.3
43	10	4776.0	4520	1212.39	25.9	4912.8	4516	2044.75	41.6

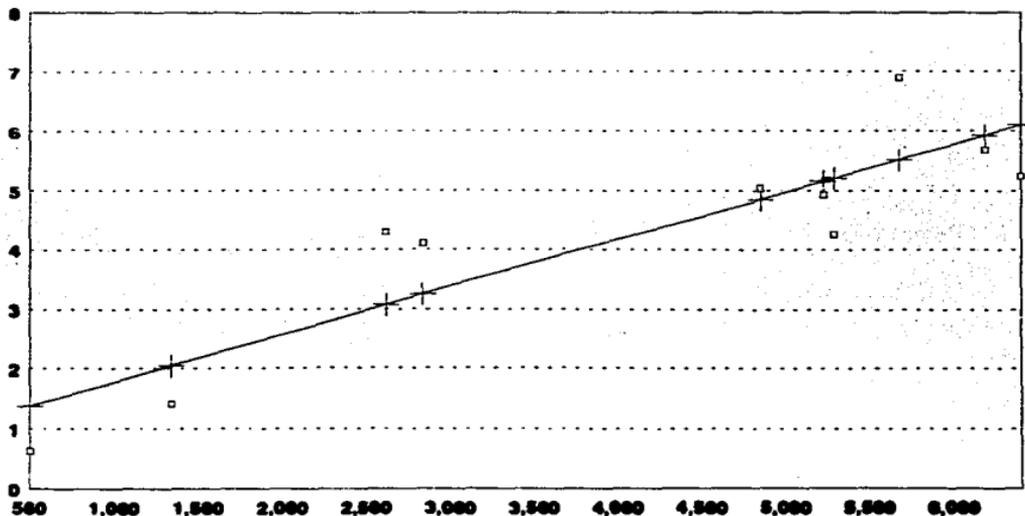
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTE

CUADRO No. 2**COEFICIENTES DE CORRELACION Y DE REGRESION LINEAL DE LAS MUESTRAS DE SUERO Y DE SANGRE COMPLETA.**

EDAD	No. DE MUESTRAS	COEFICIENTE DE CORRELACION	PROBABILIDAD DE ERROR DEL COEFICIENTE DE CORRELACION	COEFICIENTE DE REGRESION DE SUEROPAPEL	COEFICIENTE DE DETERMINACION (r^2)
1	10	0.88668	0.0006	0.8001209	0.7862
8	10	0.95826	0.0001	0.950315	0.9183
15	10	-0.02527	0.9448	-0.003705	0.0006
22	10	-0.48529	0.1551	-0.325545	0.2355
29	10	0.80654	0.0048	0.529097	0.6505
36	10	0.76107	0.0106	1.086854	0.5792
43	10	0.72069	0.0187	1.215472	0.5194

REGRESION LINEAL ENTRE TITULOS DE IBF OBTENIDOS POR SUERO Y SANGRE COMPLETA
DIA No. 1

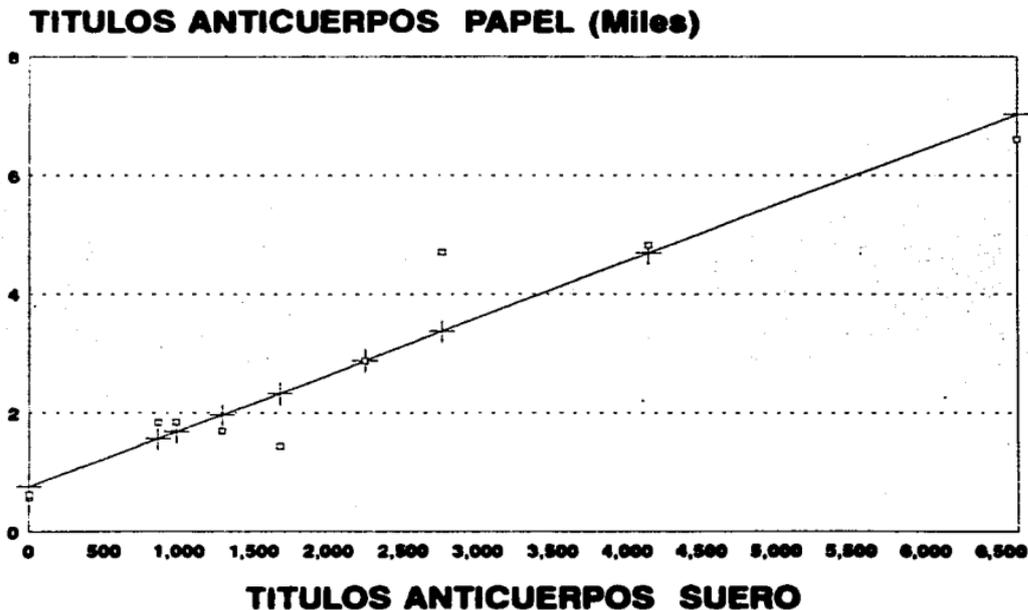
TITULOS ANTICUERPOS PAPEL (Miles)



TITULOS ANTICUERPOS SUERO

Coef. Correl. 0.8866 (P=0.0006), r²= 0.7862
Ecuación Predicción: Y=928.51 + 0.800X

REGRESION LINEAL ENTRE TITULOS DE IBF OBTENIDOS POR SUERO Y SANGRE COMPLETA
DIA No. 8

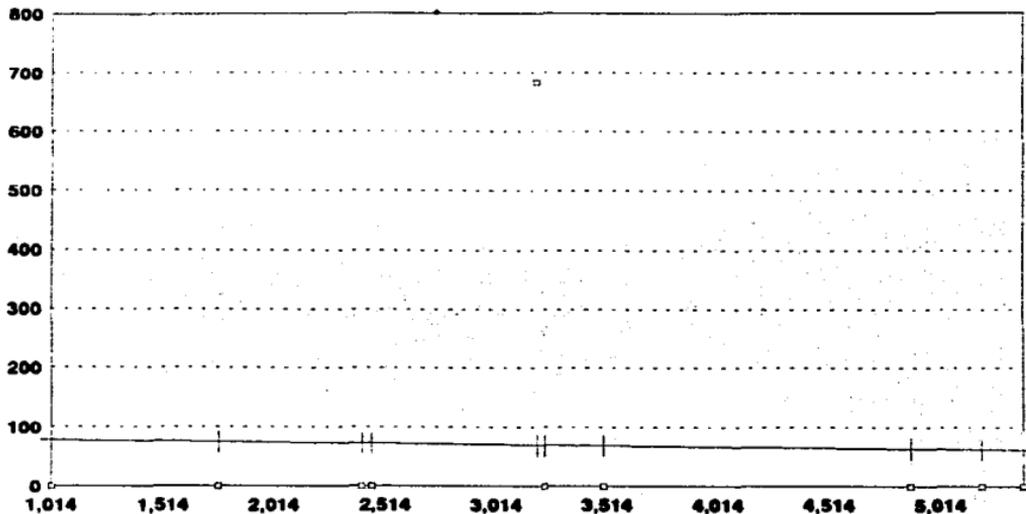


Coef. Correl. 0.9582 (P=0.0001), $r_2 = 0.9183$

Ecuación Predicción: $Y = 749.19 + 0.950X$

REGRESION LINEAL ENTRE TITULOS DE IBF OBTENIDOS POR SUERO Y SANGRE COMPLETA
DIA No. 15

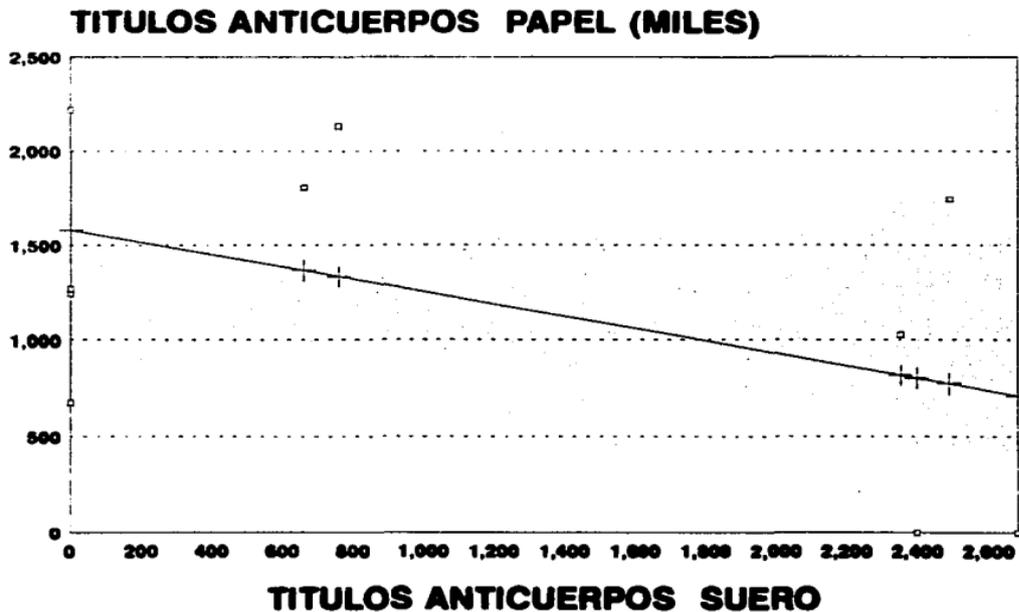
TITULOS ANTICUERPOS PAPEL



TITULOS ANTICUERPOS SUERO

Coef. Correl. -0.02527 (P=0.9448), r² = 0.0006
Ecuación Predicción: Y=80.63 - 0.00370X

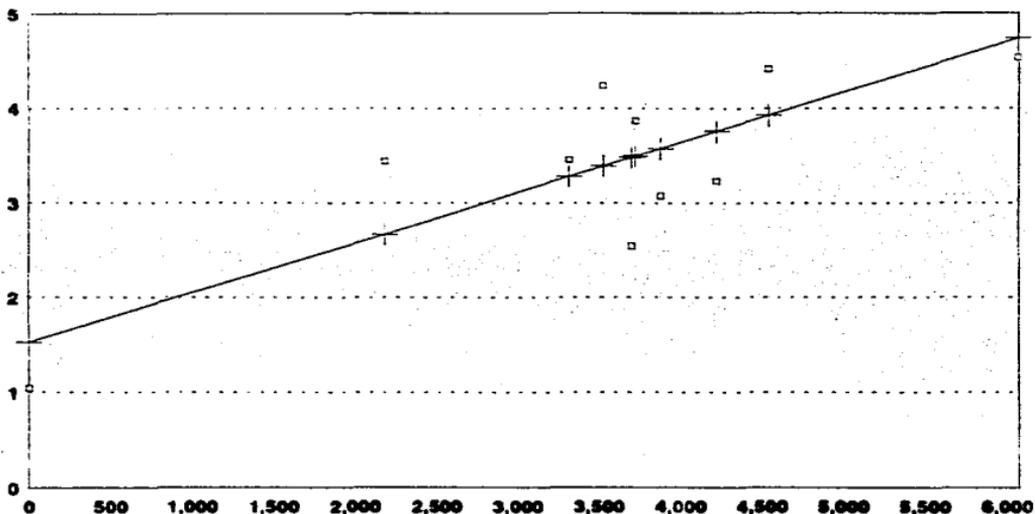
**REGRESION LINEAL ENTRE TITULOS DE ISF OBTENIDOS POR SUERO Y SANGRE COMPLETA
DIA No. 22**



**Coef. Correl. -0.48529 (P=0.1551), $r^2= 0.2355$
Ecuación Predicción: $Y=1580.60 - 0.3255X$**

REGRESION LINEAL ENTRE TITULOS DE IBF OBTENIDOS POR SUERO Y SANGRE COMPLETA
DIA No. 29

TITULOS ANTICUERPOS PAPEL (Miles)



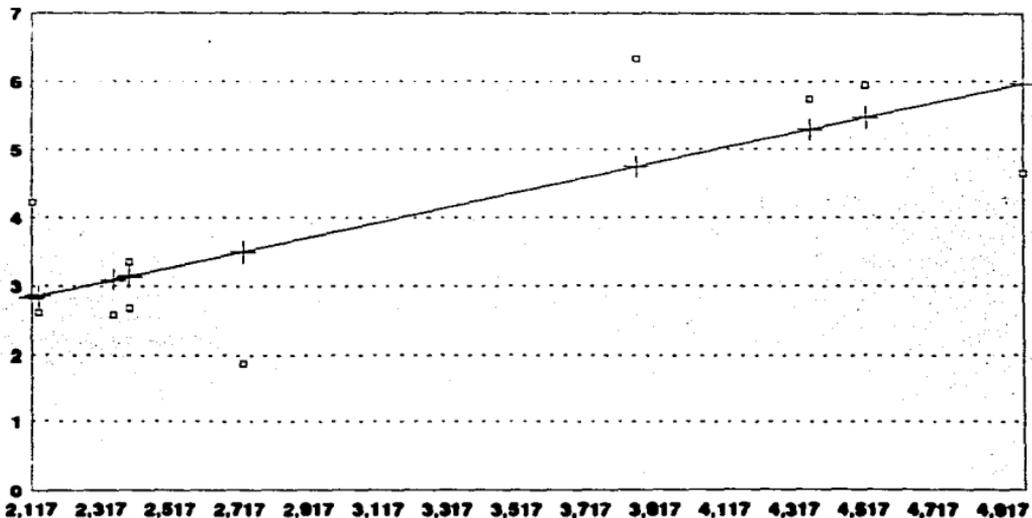
TITULOS ANTICUERPOS SUERO

Coef. Correl. 0.8065 (P=0.0048), $r^2 = 0.6505$

Ecuación Predicción: $Y = 1525.30 + 0.5290X$

REGRESION LINEAL ENTRE TITULOS DE IBF OBTENIDOS POR SUERO Y SANGRE COMPLETA
DIA No. 36

TITULOS ANTICUERPOS PAPEL (Miles)

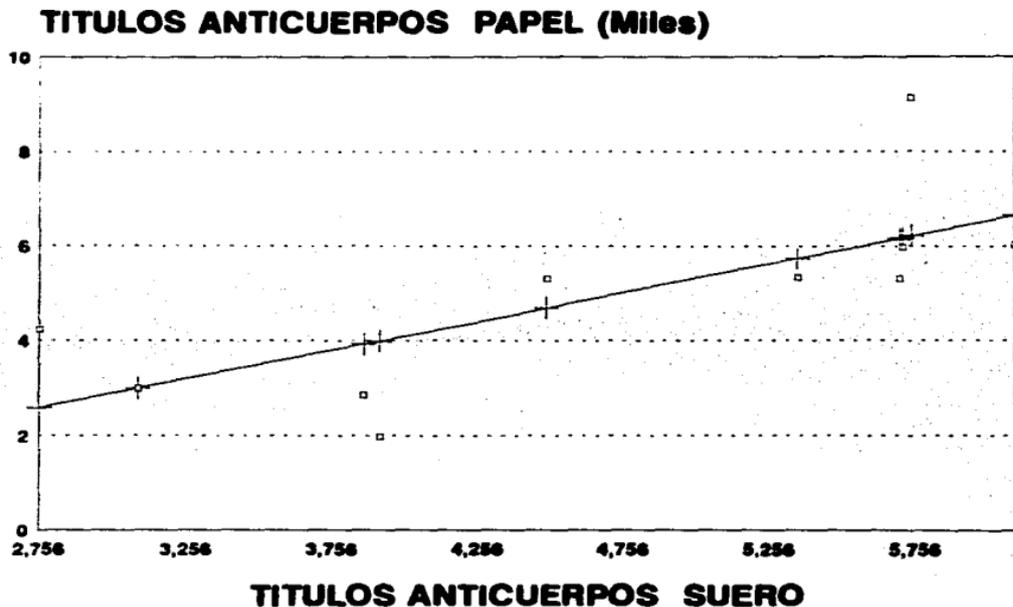


TITULOS ANTICUERPOS SUERO

Coef. Correl. 0.7610 (P=0.0106), $r^2 = 0.5792$

Ecuación Predicción: $Y = 506.172 + 1.0968X$

REGRESIÓN LINEAL ENTRE TÍTULOS DE IBF OBTENIDOS POR SUERO Y SANGRE COMPLETA
DIA No. 43



Coef. Correl. 0.7206 (P=0.0187), r²= 0.5194

Ecuación Predicción: Y=-770.74 + 1.2154X