



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

CONSERVACION DE ANTICUERPOS INHIBIDORES
DE HEMAGLUTINACION PARA EL VIRUS DE LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

TESIS PROFESIONAL

RAUL E. VARGAS GARCIA

México, D. F.

1967



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 esta 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**CONSERVACION DE ANTICUERPOS INHIBIDORES
DE HEMAGLUTINACION PARA EL VIRUS DE LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

**BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
R A U L E . V A R G A S G A R C I A**

A S E S O R E S :

**M. V. AURORA VELAZQUEZ E.
M. V. RAYMUNDO G. CUNHA**

México, D. F. 1967

A mis padres.

A mis hermanos.

A mis amigos.

A mis maestros:

M.V.Z. Raymundo G. Cunha.

M.V.Z. Aurora Velázquez E.

M.V.Z. Fernando Martínez y M.

M.V.Z. Ma. Inés Izaguirre

Maestro Antonio Lechuga

Teniente Cor. Carlos Castelán C.

**Maestro es aquel, que no
solo imparte conceptos
sino que se proyecta a
si mismo siendo arquetipo
para el alumno.**

INTRODUCCION.

La utilización de eluidos de suero o sangre adsorbidos en papel de filtro, viene siendo empleado desde hace algunos años para la constatación de anticuerpos en diversas enfermedades de los animales.

Adam y Hanson (1) en 1956, investigan la utilización de sueros adsorbidos en papel mediante pruebas de sueroneutralización para el virus de la estomatitis vesicular. En 1957, Karstad y col., (2) emplean la técnica de adsorción en papel, de suero o sangre, en encuestas serológicas para el virus de la encefalomiелitis equina, mediante pruebas de sueroneutralización y fijación de complemento. Brody, (3) en 1963, utiliza eluidos de sangre en pruebas de inhibición de hemaglutinación y sueroneutralización respectivamente, para los arbovirus y enterovirus; el método ha sido también investigado para el moquillo canino por Benson y Mickle (4) en 1964 y para la fiebre aftosa por Gaggero y Sutmöller, (5) en 1965.

Trainer y col., (6) utilizan una técnica para la colecta de pequeñas cantidades de sangre de faisanes convalecientes de encefalomiелitis equina.

Todos estos autores reconocen las ventajas del método, en cuanto a recolección y transporte de muestras, permitiendo también el examen de pequeñas cantidades de sangre.

Los resultados obtenidos indican que el método es de confianza y demuestran una estrecha correlación de títulos entre los eluidos y los sueros sin adsorber correspondientes.

En esta tesis describimos los estudios realizados con la sangre y suero de aves inmunes al virus de la enfermedad del Newcastle, adsorbidos en papel filtro y la conservación de los anticuerpos a temperatura ambiente y congelación, mediante evaluación periódica de anticuerpos, por la prueba de inhibición de hemaglutinación.

MATERIAL Y METODOS.

AVES. Las aves utilizadas para el trabajo, eran pollos Leghorn, vacunados a las seis semanas contra el Newcastle con un producto comercial - cepa B1. Tres semanas después, fueron expuestas a la cepa Querétaro, ----- 400 000 DLE 50%, mostrándose inmunes.

PAPEL. Mediante las características conocidas de varios tipos de papel filtro, se escogieron tres de ellos para la realización de pruebas, con



BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
U. N. A. M.

el objeto de seleccionar uno para el propósito específico del trabajo. Estos papeles fueron: 20-DD; 30/N y No. 116, conforme especificaciones del fabricante.

Para la selección del tipo de papel a utilizar, se cortaron tiras de 8 x 22 cm., las que luego se marcaron de dos en dos cm. para una mejor observación y cuantificación de la sangre adsorbida. Después de haber sangrado a un ave con una jeringa conteniendo Citrato de Sodio al 10%, se depositaba la sangre en un recipiente para luego, con una pipeta, distribuir la sangre sobre las tiras de papel, y de esa manera poder observar qué volumen sanguíneo adsorbía una tira de 8 x 22 cm. sin que hubiera escurrimiento, es decir, la cantidad de sangre que era capaz de aceptar cada uno de los tipos de papel. De esta manera, se llegó al conocimiento de que el papel 20-DD, adsorbía 0.43 ml.; el 116: 0.42 y el 30/N: 0.85; se pudo observar además, que una vez secado al medio ambiente, el papel 30/N no sufría arrugamiento o endurecimiento, como ocurría con las otras muestras. En vista de estos resultados, se decidió por el 30/N, Papeles filtro "Ederol", 30/N fabricado por J.C. Binzer - Hatzfeld/Eder, Alemania.

SANGRIA. Aves inmunes fueron sangradas a blanco, mediante punción cardiaca por el costado izquierdo, utilizando una jeringa de 25 ml.

con una aguja de dos pulgadas y del No. 18, evitando la coagulación con 0.2 ml. de Citrato de Sodio al 10%, por cada 5 ml. de sangre.

Una vez hecha la sangría, se procedió a la adsorción en el papel, depositando lentamente la sangre de manera uniforme sobre la superficie de las tiras, que luego eran colgadas con un sujetapapeles (clip) de un cordel tendido horizontalmente a cierta altura. Previo a esta operación, se habían numerado las tiras de papel, correspondiendo dos a cada ave en experimentación. Se dejaron colgadas para su secado durante 24 hs., terminadas las cuales, se dividieron en dos lotes: uno para guardar en medio ambiente y otro para congelación; cada lote fué introducido en una bolsa doble de plástico ahulado conteniendo, además, una bolsita de gasa con 25 g. de DRIERITE (CaSO_4 anhidro, tamaño de maya 8) con el objeto de evitar la humedad en el interior de las bolsas.

PRUEBAS DE HEMAGLUTINACION (HA) E INHIBICION DE HEMAGLUTINACION (IHA).

VIRUS. Obtenido de líquido alantoide de huevos embrionados e infectados con virus de la enfermedad de Newcastle cepa Querétaro.

HEMAGLUTINACION. En la realización de la prueba (Ha) -

para la titulación del virus, se siguió la técnica indicada por Cunningham. (7)

En una gradilla con 20 tubos de hemólisis, se ponía 0.4 ml. de solución salina al 0.85% en el primer tubo y 0.25 ml. en los siguientes. Adicionándose en el primer tubo 0.1 ml. de líquido alantoide, obteniéndose una dilución de 1 : 5. Después de pipetear 0.25 ml. de esta dilución, era transferido al segundo tubo teniendo una dilución de 1 : 10. De éste, 0.25 ml. transferido al tercer tubo y así sucesivamente hasta obtener una dilución de 1:2560, eliminando 0.25 ml. de la última dilución. En seguida, se distribuía en cada uno de los tubos 0.25 ml. de solución salina y 0.25 ml. de suspensión de glóbulos rojos de gallina al 0.5 %. Tubos controles de solución salina y glóbulos, eran anexados a la prueba. Los tubos eran agitados y dejados a temperatura ambiente por 45 minutos, registrándose la lectura, al término de ellos. Una reacción positiva de hemaglutinación completa, era indicada por el depósito de numerosos pequeños grupos de glóbulos aglutinados, ocupando todo el fondo del tubo. Una reacción negativa, era apuntada por el depósito de glóbulos en un círculo compacto, ocupando el centro del fondo del tubo, como en los tubos controles con solución salina y glóbulos rojos. Reacciones intermedias son observadas en una escala de 4 a 0. El título del virus era considerado como la dilución más alta de líquido alantoide en que la aglutinación era evidente; grado de 2 ó más.

Los glóbulos para la suspensión al 0.5% eran obtenidos por punción cardiaca de una gallina, recibiendo la sangre en una jeringa con Citrato de Sodio. La sangre era centrifugada a 1 500 r.p.m. durante 10 minutos, desechando el sobrenadante. Los glóbulos eran resuspendidos en solución salina y centrifugados en seguida. Este ciclo era repetido tres veces. El sobrenadante del último ciclo era excluido y el sedimento utilizado para la suspensión de glóbulos.

INHIBICION DE HEMAGLUTINACION (IHA). Se utilizó un proceso de inhibición de hemaglutinación descrito como beta (7). La técnica de trabajo fué la misma que para la prueba de hemaglutinación, pero para ello, se preparó una solución obtenida de la elución de anticuerpos adsorbidos en el papel filtro, mediante la maceración del papel en solución salina, calculando la cantidad de ésta en base al volumen de suero adsorbido por el papel, puesto que es en esta fracción sanguínea en la que encontramos los anticuerpos; siendo este volumen de 0.8 ml. para una tira de 1 x 8 cm., se utilizó 1.67 ml. de solución salina para lograr, de esta manera, una solución de 1:5. Esta maceración, se llevaba a efecto durante 24 hrs., transcurridas las cuales, con una varilla de cristal se prensaba el papel para eluir el contenido.

Una vez preparada la dilución, se distribuía en cada tubo 0.25

ml. de solución salina. Al segundo tubo se adicionaba 0.25 de la dilución -- 1:5, quedando entonces 1:10 y así sucesivamente pipeteando hasta llegar a la dilución 1:2560. Se agregaba luego 0.25 ml. de suspensión de virus con ocho unidades hemaglutinantes, o sea, 0.25 ml. de una solución obtenida, dividiendo la dilución del título por ocho. Se permitía un período de incubación de-- quince minutos y en seguida, se agregaba 0.25 ml. de suspensión de glóbulos -- al 0.5%, se hacía la lectura 45 minutos después. En cada prueba, se utilizaron controles de la dilución de virus y controles de glóbulos. El título del suero era dado por la dilución más baja en que la hemoaglutinación era indudablemente inhibida. (ver HA).

EXPERIMENTACION Y RESULTADOS.

Luego de haberse sangrado las aves inmunes, se procedía a la adsorción de sangre en el papel filtro, así como recolección de ésta en placas de Petri con la obtención de suero.

Después del secado, la mitad del papel fué guardado en temperatura ambiente y la otra mitad en congelación (- 20°C).

Obtenido el suero quedó durante los primeros cinco días en refrigeración. Cuando fué transferido a trece tubos, se pasaron a congelación. En vista de la pequeña cantidad de suero en algunas de las muestras, no fué po

sible distribuir en un número de tubos suficiente. La muestra No. 11, no alcanzó a ser distribuída.

En esta fecha y a los seis días de la sangría, fué realizada la primera prueba de inhibición de hemaglutinación, que está registrada como seis días. Posteriormente, a intervalos de 12, 27, 50, 60, 88, 123, 150 y 180 días de la sangría, fueron realizadas pruebas idénticas con el papel sangre conservadas a temperatura ambiente.

Con intervalos de 14, 29, 62, 90, 125, 152 y 182 días, fueron llevadas a cabo las pruebas, con papel sangre y suero conservados en congelación.

Los resultados de estas pruebas figuran en el cuadro 1, 2 y 3 y en la representación gráfica de los mismos.

Estos resultados muestran una pequeña variación en los títulos, de prueba a prueba, para los exámenes de una misma muestra. La variación puede ser hasta cuatro títulos mayor o menos en el título final.

En vista de esta variación consideramos los resultados obtenidos al sexto mes, como indicativo de que, tanto en papel mantenido a temperatura ambiente como en congelación, los anticuerpos se conservan en niveles prácticos para fines diagnósticos.

TITULOS DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION DE LOS ELUIDOS
DE PAPEL SANGRE CONSERVADOS EN MEDIO AMBIENTE.

No. de Muestra.	D I A S .								
	6	12	27	50	60	88	123	151	181
1	320	640	160	320	320	160	320	320	320
2	160	160	40	80	160	80	320	160	640
3	320	1280	80	80	160	80	160	320	320
4	640	640	320	320	160	160	320	320	320
5	640	640	160	320	160	160	320	640	640
6	640	1280	160	160	160	160	640	320	640
7	640	640	640	640	640	160	640	320	640
8	160	160	80	160	320	80	640	160	320
9	640	1280	1280	1280	640	160	320	320	320
10	320	640	640	640	320	80	320	160	320
11	320	320	320	160	320	80	320	160	320
12	320	640	640	640	320	320	160	320	160
13	160	160	320	320	320	160	160	160	320

CUADRO No. 1

TITULOS DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION DE LOS ELUIDOS
DE PAPEL SANGRE CONSERVADOS EN CONGELACION.

No. de muestra.	D I A S .						
	14	29	62	90	125	153	183
1	640	640	320	320	320	640	640
2	160	160	80	160	160	320	320
3	160	160	160	320	160	320	320
4	640	640	320	640	320	640	640
5	640	640	640	640	320	640	640
6	640	640	640	640	320	640	640
7	320	1280	1280	640	640	640	1280
8	160	160	320	320	160	320	320
9	1280	640	1280	640	320	1280	1280
10	160	160	320	320	160	320	320
11	160	160	160	160	160	320	320
12	1280	640	640	1280	640	1280	1280
13	640	320	320	640	320	640	320

CUADRO No. 2

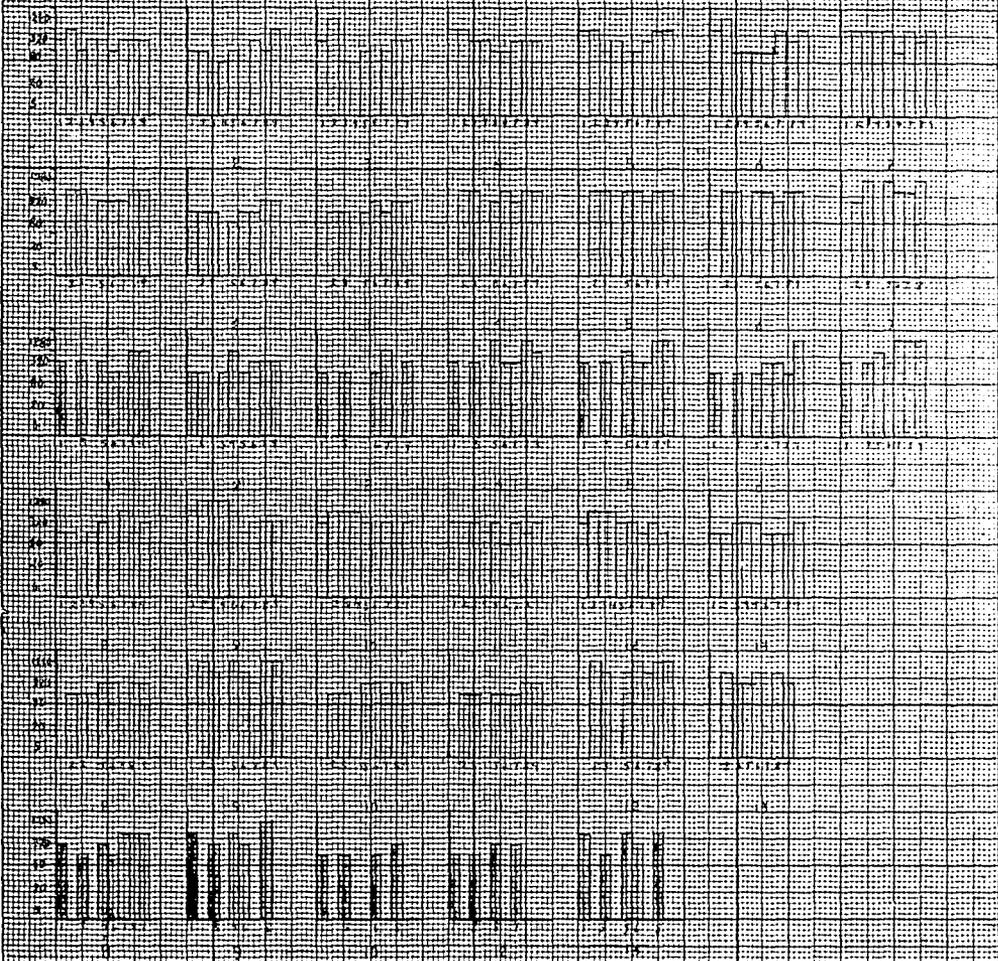
TITULOS DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION DE SUEROS
CONSERVADOS EN CONGELACION.

No. de muestra.	D I A S .						
	8	29	52	90	125	153	183
1	320	320	320	160	160	640	640
2	160	160	640	160	320	320	320
3	160	160	Nr	160	640	Nr	320
4	320	320	1280	320	320	1280	640
5	320	320	640	320	320	1280	1280
6	160	160	640	320	320	160	1280
7	320	320	640	320	1280	1280	1280
8	320	160	320	160	640	640	640
9	640	320	640	320	Nr.	1280	Nr.
10	160	160	Nr.	160	Nr.	640	Nr.
11	160	160	Nr.	320	Nr.	320	Nr.
12	160	160	Nr.	320	Nr.	320	Nr.
13	640	160	640	320	Nr.	640	Nr.

Nr.: No realizada.

CUADRO No. 3.

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS TITULOS DE HA DE LOS
FLUIDOS DE PAPEL CON SANGRE Y DEL SUERO



		PERIODOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Papel neutro ambiente	6	12	27	50	60	88	123	151	181	DIAS	
Papel en congelación	Nr.	14	29	Nr.	62	90	125	153	183	"	
Suero en congelación	9	Nr.	29	Nr.	62	90	125	152	183	"	

Nr.: No realizado

DISCUSION.

Los trabajos de investigación anteriormente realizados, sobre — utilización de anticuerpos por adsorción de suero o sangre en papel filtro, no — muestran una periódica y sistemática mensuración de los mismos.

Adam y Hanson (1), mencionan que, discos impregnados de sue— ro fueron conservados por siete días a 37°C sin pérdida apreciable en títulos de anticuerpos para la estomatitis vesicular.

Karstad y col. (2), registran que muestras de sueros y sangre se— cados en papel, pueden ser remitidos al laboratorio sin refrigeración y que ob— servaciones posteriores, indican que estas muestras pueden ser conservadas por— un lapso considerable, sin deterioro; pero ningún período específico es mencio— nado.

Brody (3), menciona que no observó caída de título en discos— conservados a temperatura ambiente por un mes, además de un experimento con seis meses; ni el número de observaciones ni los resultados, son presentados.

En nuestro trabajo, se procuró hacer la determinación de anti—

cuerpos con intervalos de cerca de 30 días, durante seis meses, de eluidos de papel con sangre conservados a temperatura ambiente y papel con sangre en congelación. Para comparación y término de referencia, se determinaron también, los títulos de los sueros correspondientes, conservados en congelación. Los resultados de las pruebas mensuales, mostraron una pequeña variación de título que llegó hasta cuatro diluciones mayor o menor en el punto final del título del suero o del eluido correspondiente.

Esta variación puede tener como causa el mismo método de trabajo, en que las mismas condiciones son prácticamente imposibles de ser reproducidas de mes en mes como ya antes anotara Karstad y col. (2)

El suero conservado en congelación, también mostró una variación, en el decurso de las pruebas, para más o para menos; al sexto mes los títulos fueron, en general, una dilución más alta de los que mostraban los eluidos de sangre; en los eluidos del papel conservado en congelación o en temperatura ambiente, los títulos fueron prácticamente los mismos.

En ningún caso, una muestra dejó de revelar presencia de anticuerpos.

Estos resultados confirman y aclaran observaciones anteriores, -

demostrando que el método de adsorción de sangre, en papel, es un sistema --- práctico para la toma de muestras de sangre y conservación de anticuerpos.

Una utilización más frecuente debe ser hecha para encuestas se rológicas, diagnóstico retrospectivo de muchas enfermedades y en todos los ca sos en que se busca la presencia de anticuerpos y cuando se dispone de mínimas cantidades de sangre .

En países como el nuestro, en que las condiciones de trabajo de campo son precarias, este método debe tener más amplia aplicación.

CONCLUSIONES.

Sangre de aves inmunes al virus de la enfermedad de Newcastle adsorbida en papel filtro y mantenida a temperatura ambiente o en congelación conserva los anticuerpos inhibidores de hemaglutinación a niveles prácticamente iguales durante seis meses.

Resultado similar fué observado con suero, distribuido en tubos y conservados en congelación, utilizando como control y punto de referencia para el trabajo.

Las muestras de papel se mantuvieron en buen estado de conservación y libres de contaminación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adam, Eugene y Manson, R.P. 1956.
A procedure for adsorbing virus neutralizing antibodies on paper discs. *Jour Bact.* 72 : 572.
- 2.- Karstad, L., Spalatin, J. Hanson R.P. 1957.
Application of the paper discs technique to the collection of --
Whole blood and serum samples in studies on eastern equine --
encephalomyelitis. *Jour. infect. Diseases.* 101: 295-299.
- 3.- Brody, J. A. 1963.
Hemagglutination inhibition and re-collection test using Whole--
blood dried filter paper discs. *The Lancet.*, Sep. 21: 616.
- 4.- Benson, T.F. and Mickle, E. 1964.
A filter paper disc method for collecting canine blood samples
for serological procedures. *Cornell Vet.* 54: 331-334.
- 5.- Gaggero, A. Suttmöller. P. 1965.
The use of serum and blood dried on blotting paper in the de-
tection of foot and mouth disease antibody. *Brit. Vet. Jour.* --
121: 509-514.
- 6.- Trainer D. O., Lec. V.H. and Hanson R.P.
The use of paper disc adsorbed blood samples in the serologi--
cal surveillance of eastern viral encephalitis. *Zoonoses Rese--*
arch. 2 (2): 105-116- Ang-63.
- 7.- Cunningham, C.H. - 1952.
Methods employed in the diagnosis and investigation of infec--
tions bronchitis and Newcastle disease. *Proc. Book. Amer.*
Vet. Med. Ass. 89 th. annual meet (Atlantic City, June 23-
26, 1952 pg. 250-257.