

## INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN SOBRE EL TÍTULO DE ANTICUERPOS PARA VIRUS DE NEW CASTLE EN POLLOS DE CARNE

### INFLUENCE OF REFRIGERATION TIME ON ANTIBODIES TITRE IN CHICKEN SERUM

Jeri JC<sup>1</sup>, Camero J<sup>2</sup>, Angulo-Tisoc J<sup>3</sup>, Thimothée JA<sup>1</sup>, Del Solar JM<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, Brasil

<sup>2</sup>Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones IVITA, sede Maranganí, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Cusco, Perú

<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Brasil

**RESUMEN.** El presente estudio evaluó el efecto del tiempo de refrigeración, 11 días, de suero de pollo la línea Coob500 de 4 semanas de edad para New Castle; con esto determinar si ocurren cambios en el título de anticuerpos por medio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI). Los tratamientos (T) fueron tres para los análisis de las muestras en el día 1 (T1), en el día 6 (T2) y en el día 11 (T3). La variable dependiente fue la titulación serológica de anticuerpos de pollos. Obtenidos los resultados y para el análisis de medias que se hizo por medio de un ANOVA con 95% de significancia, para determinar si existen diferencias estadísticas entre tratamientos. Finalmente, se determinó que la titulación de anticuerpos entre tratamientos fue similar entre sí ( $p < 0.05$ ). Puede concluirse que el valor de los títulos evaluados no sufrió variación entre los días de evaluación, pudiendo hacerse tal evaluación hasta el día 11 después de su colecta en muestras a 4 °C.

**Palabras clave:** Suero, título, inmunoglobulina IgG, New castle, cuantificación.

**ABSTRACT.** The present study aimed the refrigeration effect, for 11 days, of Coob500 chicken serum with 4 weeks of age for New Castle; with this to determine if changes in the antibody titer occur through the HI technique. The treatments (T) were three for sample analyzes: on day 1 (T1), day 6 (T2) and day 11 (T3). The dependent variable was the serological titration of chickens antibodies. The results were obtained and for means analysis, was done by ANOVA with 95% of significance, to determine if there are statistical differences between treatments. Finally, it was determined that the titration of antibodies between treatments was similar to each other ( $p < 0.05$ ). It can be concluded that the value of the evaluated titers did not change between the days of evaluation, being able to make such evaluation until day 11 after their collection in samples at 4 °C.

**Keywords:** Serum, title, immunoglobulin IgG, Newcastle, quantification.

doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2019.09.01.46-50

**Dirección para correspondencia:** Mgt. Med. Vet. Julio Constantino Jerí Molina - Programa de Pós-graduação em em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe - Av. Marechal Rondon, s/n - Jd. Rosa Elze, São Cristóvão - SE, 49100-000 - Campus Universitario - Brasil.

**E-Mail:** jcjerim@gmail.com

**Recibido:** 13 de abril de 2018/**Aceptado:** 05 de setiembre de 2018

## INTRODUCCIÓN

La actividad avícola mundial ha experimentado respetable crecimiento en los últimos años, destacándose dentro de este rubro la producción de carne de pollo por haber desarrollado un alto nivel tecnológico cuando se compara con otras especies. Para que este sistema productivo sea eficiente tiene que ser capaz de reconocer, controlar y resolver rápidamente las enfermedades que puedan emerger (1). Cuantificar los niveles de anticuerpos, o sea la cantidad de inmunoglobulinas producidas en respuesta a algún antígeno particular, es necesario para evaluar la eficacia de las vacunas y controlar las condiciones sanitarias del medio ambiente en ausencia y/o exposición de enfermedades (2). Su utilización es importante ya que garantiza un programa sanitario ideal, incrementando la eficiencia de la granja reflejando ganancias económicas para el productor (3).

Existen tres grandes isotipos de anticuerpos en gallinas: i) una molécula de alto peso molecular tipo IgM; ii) dos subclases, 7y 8, del tipo IgG, que constituyen la mayor cantidad de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo, y finalmente iii) una del tipo IgA que se encuentra en las secreciones externas como la vesícula biliar y el oviducto (4,5) Estas inmunoglobulinas pueden ser cuantificadas mediante técnicas serológicas, cuyos valores pueden brindar información útil del estado sanitario aviar, para la toma de decisiones en distintos sistemas de producción.

En este sentido, obtener resultados confiables de estudios serológicos depende de procedimientos bien elaborados y ejecutados siendo la extracción de sangre el primer paso fundamental para obtener posteriormente una muestra de suero de calidad, seguido con un buen manejo, transporte, conservación hasta su estudio (6). Finalmente, la calidad de esta muestra depende, a su vez, del desarrollo de una plataforma cuidadosamente optimizada y estandarizada en el laboratorio (7).

En este sentido la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la relación entre título de anticuerpos en función al tiempo de almacenamiento en refrigeración en suero sanguíneo de pollos comerciales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron estudiados 15 pollos de la línea genética Cobb500 de 4 semanas de edad y escogidos

aleatoriamente de la granja Guayabo Empresa "Alimentos San Joaquín", ubicada en el distrito de San Joaquín, provincia de ICA (Long: 75°73; Lat: 14°18; 407 m.s.n.m.) antes de ser sacrificados y comercializados.

Para la obtención de suero sanguíneo, inicialmente se tomaron las muestras de sangre en tubos de ensayo a partir de una punción en la vena ala braquial con aguja de calibre 25" con jeringa de 1 ml en inclinación de 10 – 20° aproximadamente con el bisel hacia arriba (8). Las muestras de sangre fueron colocadas con una inclinación de 60° en una caja de fibra de vidrio con hielo para inmediatamente ser encaminadas al laboratorio, finalmente fueron colocadas en la refrigeradora a 4°C para su almacenamiento y para su posterior uso.

Cada pollo fue considerado como unidad experimental. Las unidades experimentales fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos de evaluación, donde el grupo uno (G1) consistió en cinco unidades experimentales a partir de una submuestra aleatoria, así como el grupo dos (G2) y el grupo tres (G3). A partir del suero obtenido de cada una de las unidades experimentales, fue evaluada la cantidad de inmunoglobulinas de acuerdo con el método inhibición de la hemaglutinación (HI) (9), para la titulación de anticuerpos con indicador de la enfermedad de New Castle.

Las muestras de suero sanguíneo fueron procesadas en el laboratorio de Patología aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de la San Marcos (UNMSM), Lima - Perú.

## Diseño experimental

Se uso un diseño experimental completamente al azar, donde la variable dependiente fue la titulación de anticuerpos de la enfermedad de New Castle en suero sanguíneo, y los grupos de estudio en función del tiempo, G1, G2 y G3, fueron considerados variables independientes.

## Análisis estadístico

Fue utilizado el modelo aditivo lineal:  $Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$ ; donde  $Y_{ij}$  es el  $i$ -ésimo valor de titulación de anticuerpos para New Castle en el  $j$ -ésimo grupo de estudio;  $\mu$  representa el promedio poblacional esperado en función de la observación  $Y_{ij}$ ;  $G_i$  representa al  $i$ -ésimo grupo de estudio en función del tiempo de refrigeración; finalmente,  $e_{ij}$  representa el efecto aleatorio residual asociado a cada

observación.

Para verificar diferencia estadística entre los tiempos de evaluación en la titulación de anticuerpos a partir de suero, fue utilizado un análisis de varianza para variables paramétricas del software estadístico R (10). Con el mismo paquete estadístico, se procedió a comparar los promedios mediante el análisis de medias de DUNCAN con 5% de confianza en caso de haber sido encontrado efecto significativo entre tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta del tiempo de refrigeración sobre la cuantificación de anticuerpos del virus para la enfermedad de New Castle en suero sanguíneo de pollos de 4 semanas de vida, no mostró diferencias entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), quiere decir que los exámenes serológicos realizados hasta el día 11 de evaluación almacenados en refrigeración 4°C no altera los valores de cuantificación de anticuerpos para el virus de la enfermedad de New Castle en pollos de engorde.

Como esta evidenciado en la literatura, el suero sanguíneo puede ser almacenado a temperatura de 2°C hasta 6°C ya que las moléculas presentes como electrólitos, proteínas y albuminas son moléculas que permanecen estables cuando se almacenan en el rango de tales temperatura (11). Cabe recordar que la desnaturalización de las inmunoglobulinas esta dada por procesos que afectan sus propiedades de plegamiento (12). Por otra parte, investigaciones anteriores han demostrado que la integridad estructural y la estabilidad de las moléculas de inmunoglobulinas IgG son alteradas a altas temperaturas, entre 60 y 70°C, y son sensibles cuando estas se someten a niveles bajos de pH (13), así como cuando actúan agentes orgánicos y químicos (14,15).

Para la inmunoglobulina A, secretado en la saliva, existió disminución de la concentración cuando estas fueron almacenadas a temperaturas bajas de -20°C y -80°C, por un tiempo de 15 días (16). Investigaciones de proteómica demostraron que algunas proteínas de suero sanguíneo humano sufren alteración con respecto a temperatura de almacenamiento, cuando estas fueron almacenadas a 4°C y a -20°C por mas de 7 días (6). Los autores concluyen que es mejor almacenar a -80°C para tiempos prolongados.

Se demostró también que la estabilidad de la hormona polipeptídica insulina compuesta por

aminoácidos en suero sanguíneo se mantiene inalterada cuando esta es almacenada en refrigeración a 4°C por un tiempo de hasta de 2 semanas (17).

Estudios con canes sobre la influencia del tiempo de almacenamiento de las células de defensa como los leucocitos, neutrófilos y linfocitos no presentaron diferencia ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes días de evaluación cuando estas fueron almacenadas a 4°C hasta 96 horas (18). Por otro lado investigaciones sobre los valores bioquímicos de suero sanguíneo en canes para la enzima alanina-transferasa, no presentaron diferencias cuantitativas ( $p > 0,05$ ) entre los momentos de evaluación, donde se concluye que las muestras pueden ser almacenadas hasta 60 días a 4°C (19) así como fue demostrado en otros estudios con urea y creatinina (20), investigación que difiere con resultados de estudios anteriores (21) donde se encontró que los compuestos presentes en el suero sanguíneo de humano, como la glucosa y creatinina, pueden cambiar pasando las 24 horas al ser almacenados de 3°C a 5°C.

Ya en suero sanguíneo de bovinos, el tiempo de almacenamiento para moléculas como triglicéridos, albumina, proteínas totales y  $\gamma$ -glutamyl-transferasa (GGT) no presentaron diferencia cuando fueron comparados los diferentes momentos de análisis, hasta 24 horas cuando fueron almacenadas en las condiciones de 4 a 6°C (22).

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio son solo validos para la enfermedad de New Castle, en tal sentido es recomendado investigar la cuantificación de anticuerpos por mas tiempo, así como determinar si existen cambios serológicos para los anticuerpos asociados a tal enfermedad. Por lo tanto, hacer evaluaciones serológicas para el virus de New Castle, es valido hasta los 11 días de almacenamiento a 4°C en pollos de engorde.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Agriculture and Consumer Protection Department. Poultry development review. 2013.
2. Brentano L, Silva BG, Sayd S, Flores SW. Antibodies to Chicken Anemia Virus (CAV) in Broiler Breeder Flocks in Brazil. Rev Bras Ciênc Avícola. 2000 Aug;2(2):163-75.

3. Butcher GD. Factors to Consider in Serologic Testing for *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS). *Univ Fla.* 2002;2.
4. Lebacqz-Verheyden A-M, Vaerman JP, Heremans JF. Immunohistologic Distribution of the Chicken Immunoglobulins. *J Immunol.* 1972 Sep 1;109(3):652-4.
5. Silva PL. Transferência de anticorpos maternos da galinha para a progênie. *Ver. Bras. Cienc. Avic. (Campinas)*; 2009;9.
6. Lee K, Lillehoj HS, Siragusa GR. Direct-Fed Microbials and Their Impact on the Intestinal Microflora and Immune System of Chickens. *J Poult Sci.* 2010 Mar 25;47(2):106-14.
7. Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases: -EN- -FR- Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses -ES- Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev Sci Tech OIE.* 1998 Aug 1;17(2):469-526.
8. Kelly LM, Alworth LC. Techniques for collecting blood from the domestic chicken. *Lab Anim.* 2013 Oct;42(10):359-61.
9. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech-Off Int Epizoot.* 2000;19(2):443-455.
10. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2017. Available from: <https://www.R-project.org/>
11. Mvere D, Weltgesundheitsorganisation, editors. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. Geneva; 2005. 92 p. (Safe blood and blood products).
12. Madigan MT. *Brock Biology of Microorganisms.* Pearson/Benjamin Cummings; 2009. 1178 p.
13. Vermeer AWP, Norde W. The Thermal Stability of Immunoglobulin: Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein. *Biophys J.* 2000 Jan;78(1):394-404.
14. Freire AL, Ramos CL, de Almeida EG, Duarte WF, Schwan RF. Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of yakupa, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014 Feb;30(2):567-77.
15. Sinha R, Khare SK. Structural Changes in Halophilic and Non-halophilic Proteases in Response to Chaotropic Reagents. *Protein J.* 2014 Aug;33(4):394-402.
16. Presser E, Simuyandi M, Brown J. The effects of storage time and temperature on recovery of salivary secretory immunoglobulin A. *Am J Hum Biol.* 2014;26(3):417-20.
17. Kubasik NP, Ricotta M, Hunter T, Sine HE. Effect of Duration and Temperature of Storage on Serum Analyte Stability: Examination of 14 Selected Radioimmunoassay Procedures. 1982;2.
18. Coelho PS. Influência do tempo, temperatura e recipiente de estocagem nas características do hemograma de cães adultos hípidos [Internet] [Dissertation]. JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL: Universidade Estadual Paulista (SP); 2006. Disponível em: <http://javali.fcav.unesp.br/sgcd/Home/download/pgtrabs/pan/m/2580.pdf>
19. Silva ÉP da, Torres M de M, Cruz TPPS da, Mendonça AJ. Influência da temperatura e do tempo de armazenamento sobre amostras de soro e plasma caninos na análise da enzima alanina aminotransferase (alt) [Internet]. *Ciênc Anim Bras*; 2017 [Consultado el 3 de mayo de 2019];18. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1809-68912017000100317&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1809-68912017000100317&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)
20. Fernandes ST, Teixeira MN, Santos ES. Influência da temperatura e do tempo de armazenamento nas dosagens bioquímicas de uréia e creatinina em soro ou plasma caninos. *Arq Bras Med Veterinária E Zootec.* 2001 Dec;53(6):648-51.
21. Marjani A. Effect of Storage Time and Temperature on Serum Analytes. *Am J Appl Sci.* 2008 Aug 1;5(8):1047-51.

22. Ehsani A, Afshari A, Bahadori H, Mohri M, Seifi HA. Serum constituents analyses in dairy cows: Effects of duration and temperature of the storage of clotted blood. Res Vet Sci. 2008 Dec 1;85(3):473-5.