

76  
2ej



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**IMPLEMENTACION DE LA PRUEBA DE ELISA, PARA EL  
SERODIAGNOSTICO DE OJO AZUL EN CERDOS.**

## **Tesis Profesional**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :  
MANUEL J. GAY GUTIERREZ

### ASESORES:

FAROUK HAMDY DVM, PHD.  
MVZ. AURORA VELAZQUEZ ECHEGARAY  
MVZ. ALBERTO STEPHANO HORNEDO

**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.

## **CONTENIDO**

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>2</b>
<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>9</b>
<b>DISCUSION</b> .....	<b>18</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>19</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>20</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo se implementó la técnica indirecta de ELISA para la detección de inmunoglobulinas contra el paramixovirus productor de Ojo Azul en cerdos (POA) y se efectuó un análisis comparativo de los resultados con las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH) y seroneutralización en cultivos celulares de línea PK15 (SN). Ojo Azul es una nueva enfermedad en esta especie caracterizada por encefalitis en lechones y cerdos destatados, falla reproductiva, opacidad de la córnea, morbilidad del 20 al 50% y mortalidad cercana al 100%. Para lograr el objetivo se aisló el virus en células PK15 a partir del cerebro de un lechón que mostró signos clínicos característicos de la enfermedad, el virus se identificó por estudios en microscopía electrónica; por pruebas de inmunofluorescencia directa (IF), de inhibición de la hemoaglutinación (IH) y de seroneutralización en cultivos celulares de línea PK15 (SN) con conjugado y sueros específicos al POA. Con el virus que se identificó se elaboraron los antígenos para las tres pruebas. La prueba de ELISA se llevó a cabo en microplacas de poliestireno de 96 pozos empleando conjugado anti-IgG porcino peroxidasa, 2 sueros específicos contra POA, un suero negativo de referencia, 61 sueros de campo, como sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.04% adicionado de o-phenylenediamine al 0.04% como indicador de la reacción enzimática. La prueba de ELISA resultó 9.3 veces más sensible que la de IH, 5.9 veces más que SN y tuvo una relación de acuerdo al número de sueros positivos y negativos detectados de 98.4% con estas mismas pruebas. Los resultados señalan que la prueba de ELISA es una excelente opción para la detección de inmunoglobulinas contra el POA debido a su especificidad, alta sensibilidad, fácil realización e interpretación objetiva.

## I N T R O D U C C I O N

La enfermedad denominada "Ojo Azul" en cerdos, es un padecimiento de etiología viral, que se observó por primera vez en la República Mexicana a principios de 1980 en granjas de la Piedad, Michoacán (5,21,22); en el mismo año se presentaron múltiples brotes en Jalisco y Guanajuato; en 1982 en el Estado de México; en 1983 en el Distrito Federal, Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Yucatán, Tabasco y Querétaro; en 1984 en Tamaulipas; en 1986 cobró características epizooticas, en los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato; actualmente la Piedad, Mich. sigue siendo el principal foco de infección y la enfermedad se presenta año con año en diversos estados de la República (15). Hasta donde se conoce, no se ha informado del padecimiento en otros países.

Clinicamente se caracteriza por producir encefalitis en lechones y cerdos destetados, con morbilidad del 20 al 50% y mortalidad cercana al 100% (17,21,22). Afecta principalmente a lechones menores de 10 días de edad, sin embargo, en 1984 se observó en la Piedad, Mich. por primera vez, un número considerable de cerdos de hasta 45 kg. de peso, con signos nerviosos y mortalidad del 30% en algunas granjas con deficiencias sanitarias o de manejo (16). Los signos nerviosos son progresivos: incoordinación, espasmos musculares, rigidez de miembros posteriores, marcha y postura anormal, postración, hipersensibilidad, movimiento de carrera, ceguera, nistagmus y muerte entre las 30 y 48 h después de la postración; estos signos van precedidos de fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado y estreñimiento (17,21,22).

Un signo clínico característico del padecimiento, debido al cual el mal recibe el nombre de "Ojo Azul", es la opacidad de la córnea en el 1 al 30% de los animales afectados, comunmente unilateral pero en ocasiones bilateral (15,21,22). Finalmente y de acuerdo al análisis de los parámetros productivos de granjas que han sufrido brotes de la enfermedad, se deduce que el virus produce trastornos reproductivos; incrementa el número de cerdas que retornan al estro, baja la fertilidad entre 15 y 20%, aumenta del 2 al 24% el número de lechones nacidos muertos y del 1 al 5% el de momificados (18).

Los estudios posmortem de lechones afectados natural y experimentalmente, señalan que las lesiones macroscópicas son ocasionales y ligeras, observándose fundamentalmente congestión meníngea, atrofia serosa de la grasa coronaria, vejiga y estómago repletos de contenido, hepatización del vértice del lóbulo apical y cardíaco del pulmón y opacidad de la córnea. Las lesiones microscópicas corresponden a una encefalitis no supurativa, neumonía intersticial, uveítis anterior y edema corneal (11,21,22).

Una investigación serológica llevada a cabo en 2 granjas de ciclo completo mediante la prueba de IH, mostró que hay persistencia de anticuerpos en los cerdos hasta 15 meses después del brote. En este mismo estudio, a los 11 y 18 meses posteriores al brote, se introdujeron a la granja cerdos de diferentes edades, provenientes de explotaciones sin antecedentes de haber sufrido la enfermedad, y serológicamente negativos al POA, ninguno manifestó signos clínicos, ni desarrolló inmunoglobulinas contra el POA en 3 muestreos repetidos a intervalos de 30 días, mencionando por consiguiente que la enfermedad se autolimitó (14).

Si bien es cierto que la enfermedad puede autolimitarse, también es claro que el problema sigue vigente en la actualidad, observándose con mayor frecuencia entre Abril y Julio, jugando un papel importante en la permanencia y diseminación de la infección la insalubridad, el mal manejo de algunas granjas, la movilización no controlada de cerdos de áreas afectadas y la introducción de éstos a granjas con poblaciones altamente susceptibles (13,15).

Para el diagnóstico de laboratorio se utilizan a la fecha las pruebas de inmunofluorescencia, inhibición de la hemoaglutinación (IH) y seroneutralización (SN) en cultivos celulares (15,19).

Es conocido el hecho de que para el éxito en la erradicación o control de las enfermedades, contribuye de manera importante la aplicación de pruebas de laboratorio seguras, rápidas, sensibles y específicas. En los últimos años ha adquirido gran importancia en el diagnóstico de las enfermedades infectocontagiosas, el ensayo inmunoenzimático o "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), considerada como una prueba de muy alta sensibilidad, específica, de lectura objetiva, de bajo costo y sus reactivos de vida media larga (25).

Tomando en consideración que la enfermedad denominada "Ojo Azul" en cerdos, es un padecimiento nuevo en esta especie, señalado como causa considerable de pérdidas económicas a la industria porcícola, es necesario contar con todos los elementos que permitan su control o posible erradicación. Dentro de éstos, un diagnóstico de laboratorio rápido, seguro y confiable, permitirá combatir eficazmente esta nueva enfermedad en cerdos.

## H I P O T E S I S

La aplicación de la prueba de ELISA para el serodiagnóstico de "Ojo Azul" en cerdos, permitirá detectar rápida y eficazmente inmunoglobulinas contra esta enfermedad.

## O B J E T I V O

El presente trabajo tiene como primer objetivo desarrollar la prueba de ELISA para el diagnóstico serológico de "Ojo Azul" en cerdos y como segundo, comparar los resultados de esta prueba con las de inhibición de la hemaglutinación (IH) y seroneutralización en cultivos celulares de línea PK15 (SN).

## MATERIAL Y METODOS

**Aislamiento e identificación del virus.**- De una granja de la Piedad, Mich. que presentó un brote de encefalitis en lechones y opacidad de la córnea en el 8% del total de los cerdos, se seleccionó un lechón con signos nerviosos, se sacrificó y a la necropsia se obtuvo el encéfalo, de éste se prepararon improntas en portaobjetos y se efectuó la prueba de inmunofluorescencia directa (IF) frente a un conjugado específico contra el POAX (6), posteriormente con fragmentos de la corteza cerebral (porción anterior y media del cerebro), se preparó una suspensión al 10% en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, adicionada de antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 0.001 g/ml de estreptomycin). Con la suspensión se inocularon monoestratos confluentes de células PK15 contenidos en botellas de plástico de 25 cm<sup>2</sup> de superficie para crecimiento y tubos leighton con laminillas de vidrio de 7 cm<sup>2</sup> (1).

A las 24, 48, 72, 96 y 120 h postinoculación, se obtuvieron laminillas de los tubos leighton, para realizar pruebas de inmunofluorescencia directa con conjugado contra POAX (6) y tinciones con colorantes de Giemsa (4). El medio de cultivo sobrenadante de células infectadas, se examinó en un microscopio electrónico Jeol 100 B, mediante la preparación de tinciones negativas según métodos descritos por Gibbs y colaboradores (2). A la vez el mismo sobrenadante se empleó en pruebas de SN en cultivos celulares e IH, frente a un suero específico contra el POAX (3,6).

**Preparación de antígenos para IH y SN.**- Monoestratos confluentes de células PK15 crecidos en botellas de plástico de 75 cm<sup>2</sup> se infectaron con 10,000 dósis infectantes cultivo celular (DICC) 50% del POA (1). Después del periodo de incubación los cultivos celulares se congelaron a -70 C, se descongelaron y congelaron 2 veces más, para permitir la liberación del virus de las células. La suspensión se centrifugó en frío (4 C) a 15 000 g 10 min. y el sobrenadante se almacenó hasta su uso a -70 C en ampollitas de vidrio con 0.5 ml cada una.

**Preparación de antígeno para la prueba de ELISA.**- Tomando en consideración que muchas vacunas empleadas en cerdos son elaboradas en cultivos celulares de origen porcino y con el objeto de evitar posibles reacciones inespecíficas, el antígeno se elaboró en células de línea de riñón de mono (VERO). Se inocularon con 10,000 DICC 50% monoestratos celulares contenidos en 10 botellas de plástico de 75 cm<sup>2</sup>, después del periodo de adsorción (1 h a 37 C) se realizaron 3 lavados con medio de cultivo (Medio Esencial Mínimo de Eagle) sin suero, finalmente se agregó a cada botella 5 ml del mismo medio y se colocaron a 37 C.

Cuando se observo efecto citopatogenico (ECP) en el 100% del monostrato celular (96 h postinoculacion) las células se desprendieron de la superficie para crecimiento con una varilla de vidrio con punta de hueso y la suspensión se centrifugó a 1000 g 5 min; el paquete celular resultante se resuspendió en 5 ml del medio sobrenadante, se congeló a -70 C y se descongeló, este proceso se repitió 2 veces más. La suspensión se sonicó a 18 000 ciclos 30 seg., se centrifugó en frío (4 C) a 15 000 g 15 min y el sobrenadante se congeló a -70 C en empollatas de vidrio con 0.3 ml cada una. El antígeno negativo se elaboró de igual forma con cultivos celulares VERO no infectados.

Sueros.- Se examinaron por las 3 pruebas (ID, SN y ELISA) 31 sueros sanguíneos de cerdo procedentes de una granja en la que no se había presentado la enfermedad (G1), 31 sueros más de una granja de la Piedad, Mich., con antecedentes de haber padecido "Ojo Azul" (G2), un suero de referencia negativoXX y 2 antisueros de referencia contra POAX y XX.

Seroneutralización (SN).- La prueba se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Haiung (3). Se emplearon células PK15 y microplacas de plástico de 96 pozos. Se prepararon diluciones dobles seriadas, siendo la inicial 1:16 y la final 1:512 para el suero negativo y los procedentes de las dos granjas, y para los antisueros específicos al POA la dilución final fue 1:32,728. Estas diluciones se enfrentaron a un volumen igual (50 µl) de medio de cultivo con 100 DICC 50% de POA, después de incubar las mezclas virus-suero a 37 C 1 h se adicionó a cada pozo 50 µl de medio con 400,000 células/ml, se sellaron las microplacas y se colocaron a 37 C. La lectura se llevó a cabo a las 48 h, mediante la prueba de hemoadsorción con eritrocitos de pollo al 2% (8). El título correspondió a la dilución más alta capaz de evitar la hemoadsorción de eritrocitos en el 100% del monostrato celular.

Inhibición de la hemaglutinación.- Se siguió la técnica descrita por Lennette y otros para Encefalitis Equina (6). Se utilizó como diluyente solución amortiguadora (VERONAL) pH 7.2, eritrocitos de pollo al 0.5%, microplacas de plástico fondo U de 96 pozos y diluciones dobles seriadas de los sueros, las mismas que se emplearon en la prueba de seroneutralización, estas se enfrentaron a un volumen igual 25 µl de VERONAL con 4 UHA (unidades hemaglutinantes) de POA. El título correspondió a la dilución mayor de suero capaz de inhibir al 100% la hemaglutinación de las 4 UHA.

X Depto. de Virología e Inmunología de la FMVZ de la UNAN. El suero hiperinmune fue elaborado en un cerdo serológicamente negativo al POA.

XX National Veterinary Services Laboratories, USDA, APHIS, VS. Ames, Iowa. El suero hiperinmune fue elaborado en un cerdo BPP con virus de Ojo Azul aislado en México (X).

**ELISA.** - La técnica indirecta de ELISA, se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones de Voller y colaboradores (25). Los antígenos positivos y negativos, los sueros hiperinmunes contra POA y el conjugado anti-IgG porcino peroxidasa, se titularon previamente y se determinó la dilución óptima para su uso. La prueba se efectuó en microplacas de 96 pozos, se agregaron 100 microlitros de solución amortiguadora de fosfatos Tween 20 pH 7.4 (SAP Tween) a los 36 pozos de la periferia (8,10). Los 60 pozos interiores se recubrieron con 100 microlitros de los antígenos diluidos en solución de recubrimiento pH 9.6, intercalando una hilera de 10 pozos con antígeno positivo y una con el negativo, se dejó adsorber durante 24 h a 4 C en cámara húmeda. El lavado entre cada incubación se efectuó con SAP Tween durante 3 minutos 3 veces. Después del primer lavado se agregaron diluciones semilogarítmicas de los sueros de 2.0 a 5.0 log.10 diluidos en SAP Tween adicionada de 1% de albúmina de huevo, esta última se adicionó con el objeto de recubrir zonas de la superficie de los pozos no cubiertas por el antígeno evitando reacciones inespecíficas, se incubaron a 37 C 1 h, se lavó y adicionó la dilución del conjugado anti-IgG porcino peroxidasa y se incubó a 37 C 1 h, finalmente se lavó y adicionó el sustrato que consistió de H2 O2 al 0.04% adicionado de o-phenylenediamine al 0.04% como indicador de la actividad enzimática, la reacción se detuvo a los 7 min. adicionando 50 µl. de una solución 2.5 N de H2 SO4. Los resultados se interpretaron en forma visual y mediante el uso de un lector de ELISA con filtro de 490 de longitud de onda (8,10,25).

## RESULTADOS

**Aislamiento e identificación del virus.**— Las improntas de cerebro fueron positivas en la prueba de IF (foto 1). Los cultivos celulares PK15 infectados con la suspensión de fragmentos de corteza cerebral, presentaron efecto citopatogénico (ECP) caracterizado por desprendimiento de gran cantidad de células que enturbian el medio de cultivo a partir de las 48 h postinoculación y por fusiones celulares representadas por células gigantes que mostraron de 5 hasta más de 20 núcleos, observándose en mayor número a las 96 h (foto 2). La fluorescencia específica se observó en el citoplasma de varios grupos de células a las 24 h y se generalizó a todo el monoestrato celular a las 48 h (foto 3).

Las tinciones negativas mostraron al microscopio electrónico partículas virales de 130 a 300 nm, los viriones pleomórficos con espículas en la superficie y las nucleocápsides de partículas virales rotas de 20 nm de ancho y longitud hasta de 1200 nm (foto 4).

El suero específico contra el POAX fue capaz de neutralizar a 100 DICC 50% del virus aislado hasta la dilución 1:16384 y en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación el suero inhibió a 4 UHA hasta la dilución 1:4096 (Cuadro 2 y Gráfica 3).

Las titulaciones de conjugado anti-IgG porcino peroxidasa y de antígeno positivo se muestran en las lecturas 1 y 2, en el caso del conjugado se determinó utilizarlo diluido 1:400 y el antígeno 1:200, con el propósito de obtener resultados claros y economizar reactivos.

Los resultados obtenidos en la prueba de ELISA se resumen en el cuadro 1 y gráfica 1, en éstos se aprecia que la relación diferencial entre los sueros positivos y el negativo fue mayor en la dilución 2.5 log.10 (Gráfica 1).

El análisis comparativo de los resultados de la prueba de ELISA con las de IH y SN se resumen en el cuadro 2 y gráficas 2 y 3, donde se observa que los títulos obtenidos por la prueba de ELISA fueron mayores en aproximadamente 0.5 a 1.0 de log.10 en relación a los de IH y SN, de tal manera que al obtener la  $\bar{X}$  de los títulos de los sueros, se observó que la prueba de ELISA fué 9.3 veces más sensible que IH y 5.9 veces más que SN (Cuadro 2). Asimismo se advierte que la interpretación visual de la prueba de ELISA corresponde en la mayoría de los sueros a la lectura espectrofotométrica, siendo en algunos menor la visual en 0.5 de log.10. La relación de la prueba de ELISA con las de IH y SN de acuerdo al número de sueros positivos y negativos detectados, fué de 98.4%, el 1.6% restante correspondió al suero 27 que resultó positivo en la prueba de ELISA en la dilución 2.0 log.10. (Cuadro 1).

## LECTURA 1

Titulación de conjugado anti-IgG porcino peroxidasa.

SINGLE MODE REF FILTER \* TEST FILTER 3 THRESHOLD = 1.00 CALIBRATION = 1.00

(8490)

PLATE ID: TITULACION DE CONJUGADO ANTI-PORCINO DATE: 19-ENE-88 OPERATOR: H. GAY

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	0.001	0.001	0.002	0.000	-0.001	-0.003	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001
B	100 0.001	1.415	1.308	1.213	1.078	1.351	1.372	1.128	1.033	-0.001	0.009	-0.003
C	200 0.002	1.233	1.241	1.192	1.055	1.255	1.197	1.033	0.977	-0.009	-0.005	-0.003
D	400 0.001	1.145	1.096	0.952	1.016	1.062	1.067	0.942	0.885	-0.005	-0.001	-0.004
E	800 0.002	1.060	0.957	0.991	0.860	1.004	0.957	0.729	0.753	-0.001	-0.001	-0.002
F	1600 0.002	0.750	0.778	0.679	0.755	0.798	0.702	0.501	0.525	-0.002	-0.004	-0.004
G	3200 0.001	0.731	0.620	0.440	0.529	0.561	0.580	0.298	0.280	-0.004	-0.002	-0.004
H	0.015	-0.001	-0.001	-0.002	-0.002	-0.001	-0.003	-0.003	-0.001	-0.004	0.000	0.005

## LECTURA 2

Titulación de antígeno del POA

SINGLE MODE REF FILTER \* TEST FILTER 3 THRESHOLD = 1.00 CALIBRATION = 1.00

(E490)

PLATE ID: TITULACION DE Ag DA<sup>10</sup> CEROI DATE: 23-ECO-88 OPERATOR: GAY H.

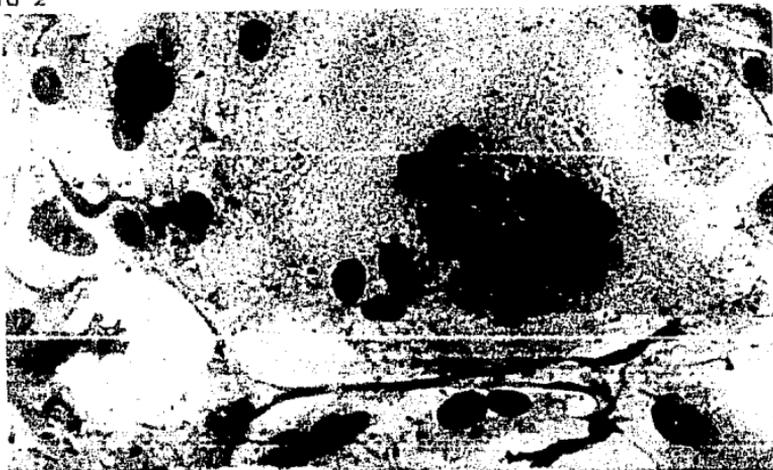
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	0.003	0.003	0.003	0.002	0.004	0.008	0.006	0.009	0.007	0.005	0.006
B	50 0.001	0.970	1.063	0.930	0.957	0.017	0.013	0.076	0.089	0.037	0.046	0.007
C	100 0.001	0.878	0.863	0.846	0.846	0.006	0.009	0.057	0.068	0.023	0.024	0.008
D	200 0.000	0.702	0.658	0.587	0.531	0.005	0.006	0.042	0.045	0.017	0.018	0.009
E	400 0.004	0.410	0.430	0.377	0.347	0.001	0.002	0.030	0.037	0.011	0.017	0.009
F	800 0.003	0.218	0.246	0.206	0.228	0.004	-0.001	0.026	0.028	0.016	0.012	0.009
G	1600 0.003	0.125	0.125	0.104	0.112	0.005	0.005	0.019	0.026	0.014	0.016	0.009
H	-0.002	0.002	-0.001	0.005	0.001	0.004	0.003	0.002	0.008	0.007	0.010	0.009

FOTO 1



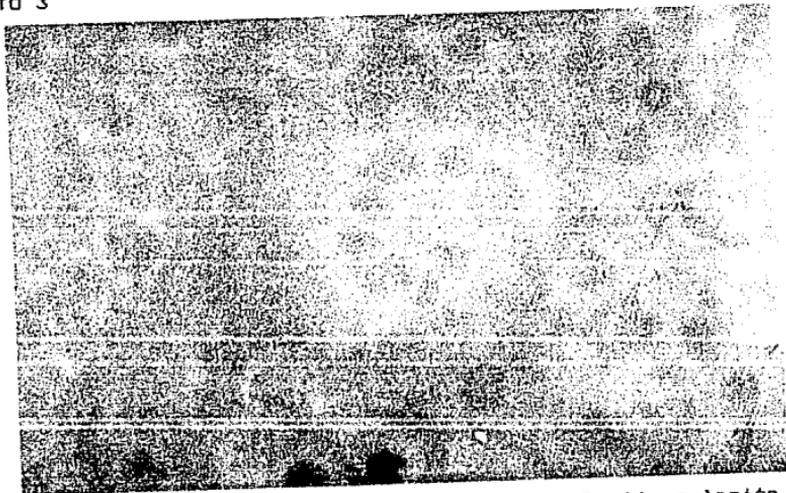
Impronta de cerebro positiva por IF con conjugado específico contra PDA, la fluorescencia se observa en el citoplasma de la neurona (X 500).

FOTO 2



ECP en células PK15, 96 h. postinoculación, célula gigante multinucleada, Tinción GIEMSA (X 500).

FOTO 3



Immunofluorescencia de células PK15 72 h. Postinoculación y célula gigante multinucleada con fluorescencia en citoplasma (X 500).

FOTO 4



Partícula típica de Paramixovirus con proyecciones en la superficie. Tinción Negativa de medio de cultivo sobrenadante de células PK15 infectadas (X 108,000).

CUADRO 1 RESULTADOS DE LOS SUEROS ENFRENTADOS AL ANTIGENO DE POA EN LA PRUEBA DE ELISA.

(DILUCION DE SUEROS EN EXPONENTES DE LOGARITMO BASE 10)															
MOUESTRA	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	MOUESTRA	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
1 (G1)	1.3	1.3	---	---	---	---	---	34 (G2)	1.9	1.6	1.4	1.3	1.1	1.0	0.8
2 (G2)	1.6	1.2	1.1	0.9	1.0	1.0	1.0	35 (G1)	1.9	1.7	---	---	---	---	---
3 (G1)	1.8	1.5	---	---	---	---	---	36 (G1)	1.4	1.3	---	---	---	---	---
4 (G2)	2.4	2.0	1.8	1.1	1.0	0.9	1.0	37 (G1)	1.1	1.0	---	---	---	---	---
5 (G2)	0.7	0.9	0.3	5.6	2.2	1.6	1.2	38 (G1)	1.3	1.1	---	---	---	---	---
6 (G2)	5.2	5.4	4.0	1.9	1.7	1.4	1.1	39 (G2)	2.0	2.0	1.3	0.9	1.1	1.1	1.0
7 (G1)	1.5	1.3	---	---	---	---	---	40 (G2)	3.0	4.9	1.9	1.6	1.0	1.2	1.1
8 (G1)	1.1	1.0	---	---	---	---	---	41 (G2)	1.7	1.6	1.3	1.1	0.9	1.0	1.0
9 (G1)	1.0	1.2	---	---	---	---	---	42 (G2)	0.0	0.1	0.3	0.5	3.3	1.0	1.2
10 (G1)	1.5	1.3	---	---	---	---	---	43 (G1)	1.2	1.0	---	---	---	---	---
11 (G2)	7.2	7.5	6.4	4.0	1.0	1.3	1.0	44 (G2)	0.4	0.0	7.2	5.4	2.0	1.6	1.4
12 (G1)	1.5	1.2	---	---	---	---	---	45 (G2)	4.5	2.1	1.0	0.0	1.3	1.1	1.0
13 (G1)	1.1	1.0	---	---	---	---	---	46 (G2)	1.2	1.3	1.2	1.0	1.1	1.0	1.1
14 (G1)	1.2	1.0	---	---	---	---	---	47 (G1)	1.7	1.5	---	---	---	---	---
15 (G1)	1.5	1.3	---	---	---	---	---	48 (G2)	5.2	4.6	2.0	1.0	1.1	1.2	1.0
16 (G2)	4.0	5.2	1.9	1.0	1.3	1.4	1.1	49 (G1)	1.1	1.0	---	---	---	---	---
17 (G2)	4.4	3.5	2.2	1.8	1.0	1.0	0.0	50 (G2)	7.3	7.0	0.2	4.3	1.0	1.7	1.0
18 (G2)	4.0	5.2	1.9	1.3	1.4	1.1	1.0	51 (G1)	1.0	1.3	---	---	---	---	---
19 (G1)	1.6	1.4	---	---	---	---	---	52 (G1)	1.2	1.0	---	---	---	---	---
20 (G2)	7.0	0.2	5.3	1.0	1.4	1.1	0.9	53 (G1)	1.4	1.5	---	---	---	---	---
21 (G2)	5.1	5.2	3.9	1.0	1.0	1.7	1.1	54 (G1)	1.0	1.6	---	---	---	---	---
22 (G2)	1.4	1.0	0.0	1.0	1.1	1.0	1.2	55 (G2)	7.3	0.5	6.9	5.6	4.3	1.0	1.2
23 (G2)	2.0	2.3	1.4	0.9	1.1	1.0	1.1	56 (G1)	1.0	1.3	---	---	---	---	---
24 (G2)	5.3	5.6	3.0	1.9	1.3	0.9	1.2	57 (G2)	5.0	5.0	2.0	1.0	1.3	1.5	1.1
25 (G1)	1.0	1.6	---	---	---	---	---	58 (G1)	1.2	1.1	---	---	---	---	---
26 (G1)	1.1	0.9	---	---	---	---	---	59 (G1)	1.5	1.4	---	---	---	---	---
27 (G2)	2.0	1.0	1.3	1.0	1.1	1.2	1.0	60 (G1)	1.1	1.3	---	---	---	---	---
28 (G2)	3.5	3.0	1.8	1.2	1.4	1.0	1.1	61 (G2)	5.7	6.3	3.9	1.0	1.1	1.2	1.0
29 (G2)	1.5	1.2	1.3	1.1	1.2	1.0	1.1	62 (G1)	1.7	1.6	---	---	---	---	---
30 (G1)	1.1	1.0	---	---	---	---	---	ANES	0.0	0.7	0.3	5.2	2.1	1.0	1.4
31 (G2)	7.0	0.5	6.0	3.2	1.7	1.1	1.1	URAN	11.2	12.3	10.5	0.0	7.2	4.3	2.0
32 (G1)	1.4	1.1	---	---	---	---	---								
33 (G2)	1.6	1.3	1.4	1.1	0.0	1.0	1.0								

UNA RELACION: 0 x 2.0 SE CONSIDERO COMO POSITIVO  
 (---) = NO SE ANALIZARON POR Bajas DILUCIONES  
 (G1) = GRUJA SIN ANTECEDENTES DE "OJO AZUL"  
 (G2) = GRUJA CON ANTECEDENTES DE "OJO AZUL"

ANES = SUERO POSITIVO DE ANES  
 URAN = SUERO POSITIVO DE LA URAN

(RELACION: VALOR DE ASORRENCIA DEL SUERO SUSPECHOSO)  
 VALOR DE ASORRENCIA DEL SUERO NEGATIVO

CUADRO # 2 TITULOS DE INMUNOGLOBULINAS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACION (SN) INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IH) Y ENSAYO INMUNOELECTROFORÉTICO (ELISA) PARA EL POA

MOESTRA	IH	SN	ELISA (VISUAL)	ELISA (E.490)	MOESTRA	IH	SN	ELISA (VISUAL)	ELISA (E.490)
1	(G1)	0	0	0	34	(G2)	0	0	0
2	(G2)	0	0	0	35	(G1)	0	0	0
3	(G1)	0	0	0	36	(G1)	0	0	0
4	(G2)	2.1	2.4	2.5(+)	37	(G1)	0	0	0
5	(G2)	2.4	2.7	3.5(++)	38	(G1)	0	0	0
6	(G2)	2.4	2.4	3.0(+)	39	(G2)	1.2	1.5	2.5(+)
7	(G1)	0	0	0	40	(G2)	1.8	2.1	2.5(++)
8	(G1)	0	0	0	41	(G2)	0	0	0
9	(G1)	0	0	0	42	(G2)	2.7	3.01	4.0(++)
10	(G1)	0	0	0	43	(G1)	0	0	0
11	(G2)	2.4	2.4	3.0(++)	44	(G2)	2.7	3.01	4.0(++)
12	(G1)	0	0	0	45	(G2)	1.5	1.5	2.5(+)
13	(G1)	0	0	0	46	(G2)	0	0	0
14	(G1)	0	0	0	47	(G1)	0	0	0
15	(G1)	0	0	0	48	(G2)	1.0	2.1	3.0(++)
16	(G2)	1.0	2.1	2.5(+)	49	(G1)	0	0	0
17	(G2)	2.1	2.4	3.0(+)	50	(G2)	2.1	2.4	3.5(+)
18	(G2)	2.1	2.1	2.5(++)	51	(G1)	0	0	0
19	(G1)	0	0	0	52	(G1)	0	0	0
20	(G2)	2.4	2.4	3.0(++)	53	(G1)	0	0	0
21	(G2)	2.1	2.1	2.5(++)	54	(G1)	0	0	0
22	(G2)	0	0	0	55	(G2)	2.7	3.01	4.0(+)
23	(G2)	1.5	1.0	2.5(+)	56	(G1)	0	0	0
24	(G2)	1.0	1.0	2.5(++)	57	(G2)	2.1	1.0	2.5(++)
25	(G1)	0	0	0	58	(G1)	0	0	0
26	(G1)	0	0	0	59	(G1)	0	0	0
27	(G2)	0	0	2.0(+)	60	(G1)	0	0	0
28	(G2)	1.0	1.0	2.5(+)	61	(G2)	1.0	2.4	2.5(++)
29	(G2)	0	0	0	62	(G1)	0	0	0
30	(G1)	0	0	0					
31	(G2)	2.1	2.1	3.5(+)	ANRS	3.01	3.6	3.5(++)	4.0
32	(G1)	0	0	0	OHAN	3.6	4.2	4.5(++)	5.0
33	(G2)	0	0	0	NEGATIVO	0	0	0	0

I IH= 2.16 LOG.10

I SN= 2.36 LOG.10

I ELISA= 3.13 LOG.10

3.13-2.16= 0.97 LOG.10= 9.34 TITROS MAS SENSIBLE QUE IH

3.13-2.36= 0.77 LOG.10= 5.89 TITROS MAS SENSIBLE QUE SN

LOS VALORES ANTERIORES, SON EXPONENTES DE LOGARITMO DE BASE 10 Y REPRESENTA LOS TITULOS OBTENIDOS POR ESA TECNICA.

G1 = GANJA SIN ANTECEDENTES DE OJO AIZL

G2 = GANJA QUE PRESENTA UN BOTO DE OJO AIZL

E.490 = LONGITUD DE ONDA EMPLEADA PARA LA LECTURA DE ELISA

0 = RESULTADO NEGATIVO

+ = REACCION VISUAL DEBIL (ELISA)

++ = REACCION VISUAL FUERTE

ANRS = SUERO POSITIVO DE ANRS

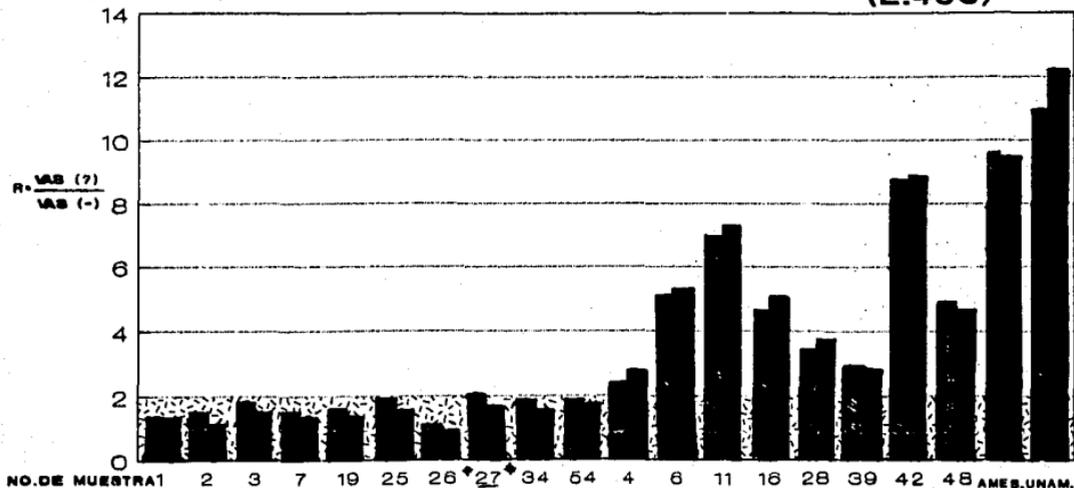
OHAN = SUERO POSITIVO DE LA OHAN

NEGATIVO = SUERO DE REFERENCIA NEGATIVO DE ANRS

# GRAFICA 1

ANÁLISIS COMPARATIVOS DE 10 SUEROS NEGATIVOS Y 10 POSITIVOS DILUIDOS 1:100 Y 1:320 POR LA PRUEBA DE ELISA FRENTE AL ANTÍGENO DEL POA

(E.490)



NO. DE MUESTRA 1 2 3 7 19 25 26 27 34 64 4 6 11 16 28 39 42 48 AMES, UNAM.

ABSORBANCIA DEL SUERO  
SOSPECHOSO

■ DILUCION DE SUERO 1:100 o 2.0 LOG.10

R+ / R- = RELACION =  
ABSORBANCIA DEL SUERO  
NEGATIVO

■ DILUCION DE SUERO 1:320 o 2.6 LOG.10

■ AREA DE NEGATIVIDAD

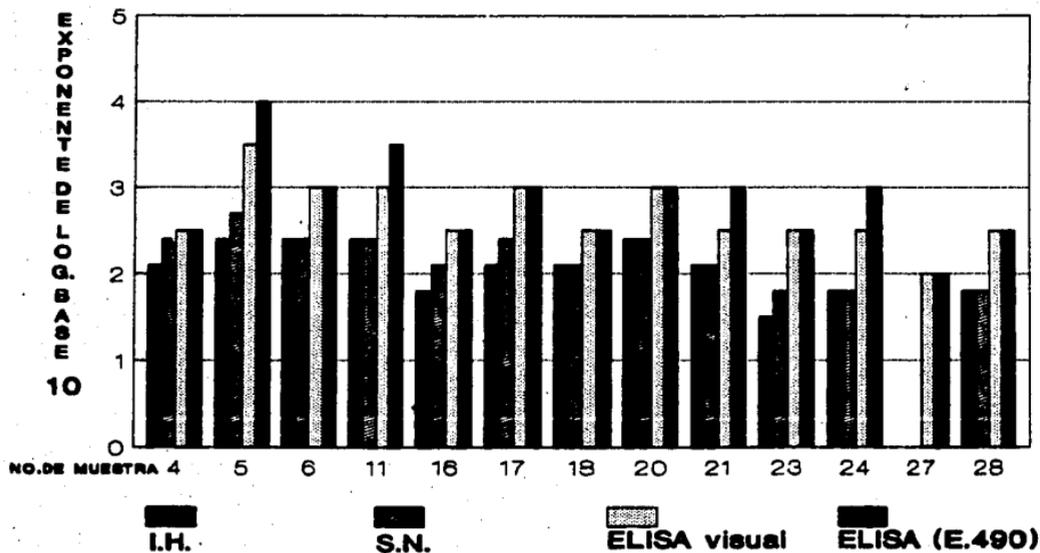
AMES = SUERO POSITIVO DE AMES

□ AREA DE POSITIVIDAD

UNAM = SUERO POSITIVO DE LA UNAM

## GRAFICA 2

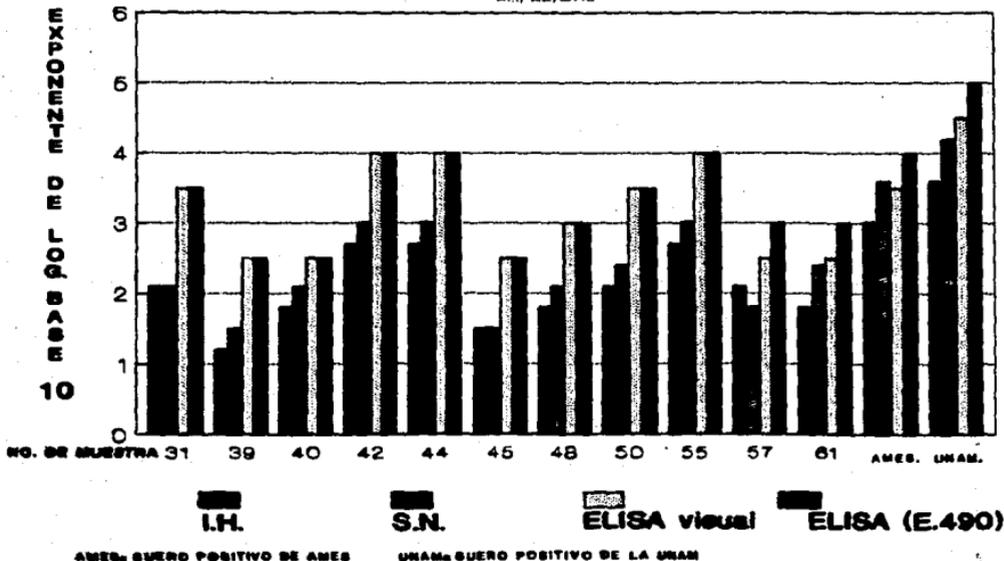
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS SUEROS POSITIVOS AL POA DE LA GRANJA 2 POR LAS TRES TÉCNICAS EMPLEADAS



### GRAFICA 3

(CONTINUACIÓN GRÁFICA 2)

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS SUEROS POSITIVOS AL POA DE LA GRANJA 2 POR LAS TRES TÉCNICAS EMPLEADAS



## DISCUSION

Los estudios al microscopio electrónico del virus aislado en células PK15 y las pruebas de IF, IH y SN efectuados con el mismo virus frente al conjugado y sueros específicos contra el POA, permitieron la identificación del agente etiológico productor de Ojo Azul en cerdo (7,18,19) y justificaron su uso en la elaboración de antígenos para IH, SN y ELISA.

En el presente trabajo se emplearon 3 diferentes técnicas de detección de anticuerpos contra el POA, observándose que la prueba de ELISA permitió detectar anticuerpos en los sueros sanguíneos porcinos al igual que las de IH y SN, a excepción del suero 27 que resulto positivo por la prueba de ELISA en la dilución 2.0 log.10, sin embargo podemos señalar en el aspecto cualitativo que la especificidad fue similar en las tres pruebas. En cuanto a la sensibilidad la prueba de ELISA mostró ser 9.3 veces más sensible que la de IH y 5.9 veces más que la de SN (Cuadro 2), resultados similares a los reportados por autores que han realizado análisis comparativos de ELISA con IH (9,23,24) y con SN (12,23) empleadas en la detección de anticuerpos contra enfermedades virales que afectan al ser humano o a los animales.

Cabe señalar que el antígeno empleado para la prueba de ELISA no fue altamente purificado, sin embargo la especificidad y sensibilidad obtenidas, nos permite presumir que fueron satisfactorias, tomando en consideración que la relación con las pruebas de IH y SN fue de 98.4%, correspondiente a lo observado en otros trabajos (12,23). Es importante indicar que en gran medida las reacciones inespecíficas se evitaron debido al uso de albumina de huevo, la cual bloquea las superficies de los pozos no cubiertas por antígeno con mayor eficacia que la albumina de bovino. Por otra parte la relación contemplada entre los sueros positivos y el negativo de referencia, que fue mayor en la dilución 2.5 log.10, puede deberse a que en esta se disminuyen los factores inespecíficos del suero evidentes en la dilución 2.0 log.10; no obstante para trabajar todos los sueros a una misma dilución es necesario realizar un mayor número de pruebas con diluciones intermedias entre las diluciones 2.0 y 2.5 log.10, para reducir el riesgo de obtener resultados falsos negativos o positivos. Además no se debe descartar que la purificación del antígeno sin duda permitirá mejorar la calidad de la prueba.

Aún se desconoce muchos aspectos de esta nueva enfermedad en cerdos que año con año produce brotes en diferentes estados de la República (15), siendo por lo mismo relevante realizar mayores estudios y valerse de lo aprendido para combatirla. Consideramos que la prueba de ELISA puede brindar grandes beneficios para el control de Ojo Azul en cerdos.

### CONCLUSIONES

Los estudios serológicos realizados, indicaron que la prueba de ELISA permitió detectar eficazmente inmunoglobulinas contra el POA en sueros sanguíneos de cerdos, demostrando ser una excelente opción para el diagnóstico serológico de Ojo Azul, debido a su especificidad, alta sensibilidad, interpretación objetiva de resultados y rápida realización.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## LITERATURA CITADA

1. Fenner, F. and David, O.W.: Medical Virology. 2 th ed. New York. Academic Press. (1976).
2. Gibbs, E.P.J., Smale, C.J. and Voyle, C.A.: Electron microscopic examination of pelleted negatively stained tissue culture supernatant samples. Vet Rec., 106: 448 (1980).
3. Hsiung, G.D. and Henderson, J.R.: Diagnostic Virology. New Haven and London. Yale University Press. (1964).
4. Lee, G.L.: Manual of histologic staining method of the armed forces Institute of Patology. 3 th ed. McGraw Hill Book Company, N.Y. U.S.A. (1968).
5. Leman, A.D., Glock, R.D., Mengeling, W.L. and Penny, R.H.: Diseases of Swine. 6 th ed. Ames, Iowa State University Press. (1986).
6. Lennette, H.E. and Schmidt, J.N.: Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases. 6 th ed. American Public Health. INC. (1979).
7. López, M.J., Correa, G.P., Martínez, A. and Ericsson.: Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the Brain of a Piglet in Mexico. Arch. Virol., 91: 221-231 (1986).
8. Louborg, U.: Guide to Solid Phase Immuno Assays. Nunc, Denmark. (1984)
9. Matthyssen, L., Schonherr, O. and Van Weemen, B.: Rapid screening for Rubella antibodies by enzyme-immunoassay. Int. Virology IV Abstracts. 626. (1978).
10. Oliver, D.G., Sanders, A.H., Hogg, D. and Words J.: Edge Effect in MicroWell ELISA. J. Immunol.Meth. 42, 195-201. (1981).
11. Ramirez, T.C.A. y Stephano, H.A.: Histological central nervous system lesions produced by an hemoagglutinating virus in naturally infected piglets. Proceedings International Pig Veterinary Society Congress. Centro Médico Nacional, México, 1982. 153 IPVS. México, D.F. (1982).
12. Saunders, G.C., Clinard, E.H., Bartlett, M.L. and Sanders, W.M.: Application of the indirect enzyme-labelled antibody microtest to the detection and surveillance of animal disease. J. infect. Dis. 136, (Supplement) S258-266. (1978).

13. Stephano, H.A. y Doporto, D.J.M.: Control y erradicación del síndrome del ojo azul. Síntesis Porcina, 5 (12): 49-52 (1986).
14. Stephano, H.A. y Doporto, D.J.M.: Gay, G.M.: Análisis seroepidemiológico en dos granjas afectadas por el Síndrome del Ojo Azul. Memorias de la XX Reunión Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mérida, Yucatán, México, 1985. 79-82. AMVEC. México, D.F. (1985).
15. Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Encefalitis, trastornos reproductivos y opacidad de la córnea en cerdos (síndrome del ojo azul) asociados a un paramixovirus, Estudio Cronológico. Medicina Veterinaria, 3 (7-8); 359-362 (1986).
16. Stephano, H.A. y Gay, G.M.: El Síndrome del Ojo Azul en cerdos en granjas engordadoras. Memorias de la XX Reunión Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mérida, Yucatán, México, 1985. 71-74. AMVEC. México, D.F. (1985).
17. Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Experimental studies on a New viral Syndrome in Pigs called "Blue Eye", characterized by encephalitis and corneal opacity. Proceedings International Pig Veterinary Society Congress. Ghent, Belgium, 1984. 71 IPVS Ghent, Belgium. (1984).
18. Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Efecto del virus del Ojo Azul en la reproducción de la cerda. Memorias del XIX Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mazatlán, Sinaloa, México, 1984. 83. AMVEC. México, D.F. (1984).
19. Stephano, H.A. y Gay, G.M.: El Síndrome del Ojo Azul. Síntesis Porcina, 4: 9-14. (1985).
20. Stephano, H.A., Gay, G.M. y Kreese: Properties of a paramixovirus associates to a new syndrome (Blue Eye Syndrome), characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proceedings International Pig Veterinary Society. Congress. Barcelona, Spain, 1986. 159 IPVS. Barcelona, Spain (1986).
21. Stephano, H.A., Gay, G.M. and Ramirez, T.C.A.: Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet Rec, 122 : 6-10 (1988).

22. Stephano, H.A., Gay, G.M., Ramirez, T.C.A. y Maqueda, J.J.: Estudio de un brote de encefalitis y opacidad de la córnea en lechones. Memorias del XVII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Iztapa, Zihuatanejo, México 1981. 43. AMVEC. México, D.F. (1981).
23. Toma, B., Moutou, F. and Fortier, B.: Application of ELISA for diagnosis of Aujeszky's disease in Swine. Proc. 5th World IPVS, Zagreb. Abstract. 34. (1978).
24. Voller, A. : in: Biomedical Application of Immobilized enzymes and proteins. Ed. Chang, T. Plenum Press 119. (1977).
25. Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A.: The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Nuffield Laboratories of Comparative Medicine, The Zoological Society of London. (1979).
26. Ziegelmaier, R., Schneider, H., Hilfenhaus, J., thierfelder, H., Behrens, F. and Luthardt, Th.: Determination of antibodies to Cytomegalovirus (CMV), Varicella/Zoster Virus (VZV) and Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) by the ELISA. Frezenius Z. Anal. Chem. 290, 100-101. (1978).