

10



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Desarrollo de una prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos de la clase IgG en suero de bovinos .”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

MARIA DEL ROSARIO ARVIZU VENEGAS

ASESOR: Dr. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

Cuautitlán Izcalli, Edo de México 2002

**TESIS CON
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 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.



ACADEMIA NACIONAL
DE VETERINARIA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: G. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estandarización de una prueba de ELISA indirecta para la detección
de anticuerpos de la clase IgG en suero de bovinos".

que presenta la pasante: María del Rosario Arvizu Venegas
con número de cuenta: 8706091-9 para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 3 de Septiembre de 2002

PRESIDENTE	<u>M.C. Raúl Mar Cruz</u>	
VOCAL	<u>MZ. Jorge Luis Rico Pérez</u>	
SECRETARIO	<u>MZ. Guillermo Valdivia Anda</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MZ. Rodolfo Córdoba Ponce</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra</u>	

Gracias a Dios por la vida que tengo y por permitirme terminar una carrera profesional .

Dedico esta tesis a mi padre , madre y hermanas por saberme guiar y apoyarme incondicionalmente y por creer que yo podía ser una profesionista valiosa.

A mi pareja y dos hijos por ser la inspiración para cerrar este capítulo de mi vida y seguir adelante con mucho amor.

Agradezco al Dr. Guillermo Valdivia Anda,
por la fé, la paciencia y el interés puestos
para la culminación de este trabajo.

**Agradezco a la Química Gloria Elena Lara
Reyes , a Patricia Parra Guerrero, y a Lourdes
Trejo, personal del laboratorio DIVET Y VALAR
en los años 1994-1996 por su contribución
desinteresada en el presente trabajo .**

Gracias, a mis amigas Norabel Perez Conde y
Elizabeth Sánchez Escalona que con su sincera
amistad han logrado la transformación de mi vida
y mi carrera estando siempre a mi lado.

**Gracias a la Facultad de Estudios
Superiores Cuautitlán, a sus profesores
Y a mis compañeros de generación (1990-1994)
Por formar parte de mi vida y por que siempre
Tendrán un lugar importante en mi corazón.**

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MATERIAL Y METODO	3
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIONES	29
7. APÉNDICE	30
8. BIBLIOGRAFÍA	33

HIPÓTESIS

ES POSIBLE DESARROLLAR UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE LA CLASE IgG EN SUERO DE BOVINOS.

OBJETIVOS

- 1. Estandarización de la prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR.)**
- 2.- Evaluación de los anticuerpos contra IBR en 50 sueros de bovinos procedentes de varios hatos mediante la técnica de ELISA indirecta.**
- 3. Correlacionar los títulos obtenidos mediante la prueba de ELISA con la prueba de virusneutralización**

RESUMEN

La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina es una enfermedad viral causada por un herpes virus tipo 1 que puede causar serias pérdidas económicas y que está asociada a lesiones genitales, abortos y cuadros respiratorios entre otros. Debido a sus largos periodos de latencia es difícil su detección antes de que se transmita entre varios miembros del hato. El control de esta enfermedad, sólo puede consistir en atacar directamente las complicaciones presentadas en el curso y para prevenirla sólo existe la vacunación. En el presente trabajo se elaboró una técnica rápida y de fácil realización para un diagnóstico oportuno.

A partir de cultivos de células de riñón de cerdo (SKL) se replicó el herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1) hasta obtener un abasto viral y celular adecuado para la estandarización de una prueba de ELISA indirecta empleada para la evaluación de anticuerpos en sueros de bovino. Al mismo tiempo se optimizó la dilución de todas las partes integrantes de la prueba como son: antígeno sensibilizante, dilución óptima de suero, de conjugado antibovino, así como el desarrollador de color y la solución de paro. También se estandarizaron los tiempos de incubación para cada fase de la prueba y el método de lavado de las placas de poliestireno, donde se desarrolló la prueba.

Por otro lado se recolectaron 200 sueros de animales incluyendo los que presentaron signos de IBR y de hatos sin signos. Fueron ensayados mediante la prueba de virusneutralización en el Centro Nacional de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) para su comparación con la prueba de ELISA.

Se implementaron tres tratamientos que se aplicaron al antígeno sensibilizante para aumentar la especificidad y sensibilidad de la prueba.

Se observó que el título viral obtenido fue mayor al reportado en trabajos anteriores, también se obtuvo una buena sensibilidad y especificidad mostrando una prueba rápida, confiable y con mínima inversión para el diagnóstico de anticuerpos contra el virus de IBR. Con todo y esto no se descartó la posibilidad de mejorar la especificidad de la prueba dando el tratamiento adecuado al antígeno sensibilizante.

INTRODUCCIÓN.

La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina comúnmente conocida por sus siglas en inglés "infectious bovine rhinotracheitis" (IBR) o nariz roja (15, 22) es una enfermedad respiratoria caracterizada por inflamación, edema, hemorragia y necrosis de las membranas mucosas del tracto respiratorio , así como lesiones pustulosas en los órganos genitales del macho y hembra provocadas por el herpes virus bovino tipo 1 (3,10) siendo reconocido por primera vez en Colorado a finales de 1940 y aislado en estados Unidos en 1956 por vez primera (6)

1. Etiología.

El virus de IBR es un virus de la familia Herpesviridae que pertenece a la subfamilia Alphaherpesvirinae. llamado herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1) (11,19). Los virus maduros observados al microscopio electrónico miden de 130 a 180 nanómetros (nm); algunos presentan una membrana doble (12).

Se trata de un virus con ácido desoxirribonucleico (DNA) lineal en doble tira (19). el cual posee simetría icosaédrica; una envoltura reviste el material genómico y una segunda envoltura sobre ésta. En el curso del ciclo de réplica salen viriones con capacidad infectante de las células hospederas (19). Tiene una densidad de 1.22 g/ml en gradiente de tartrato de potasio. El DNA tiene un contenido de guanina + citosina de 72 %. El virión contiene 18 proteínas estructurales con pesos moleculares que varían de 250.000 a 290.000 y 8 de ellas son glucosiladas (6) . Permanece activo durante 10 días a 37° C pero se inactiva a 21 minutos a 56° C (4, 10) se desnaturaliza por ebullición con 2 mercaptoetanol a los 5 minutos (9, 21) .

No existen variantes antigénicas pero si existen cepas con diferentes grados de virulencia. A través de las pruebas serológicas se ha encontrado relación antigénica entre el virus de IBR y el virus de Rinoneumonitis equina (9 , 10).

2. Epidemiología

El virus es capaz de producir enfermedad con una gran variedad de manifestaciones clínicas como : afecciones del aparato respiratorio, conjuntivitis , encefalitis, vaginitis, abortos y balanopostitis (10) así como necrosis del cuerpo lúteo (15) . Las manifestaciones de estas formas clínicas van a depender de diversos factores como son la cepa involucrada, dosis, edad y estado inmune de los animales entre otras (3, 4, 10). Son susceptibles los bovinos de todas las edades, pero afecta más a animales mayores de 6 meses de edad, quizá por hallarse más expuestos a la enfermedad y aunque rara vez se informa del padecimiento, pueden afectar cerdos, algunas especies de venados, cabras, antílopes (1, 5) , y el ñu de África, lo cuál sugiere que dicha fauna puede actuar como reservorio para el virus (1).

En el colegio de medicina veterinaria de la Universidad de Kansas se realizó un estudio probando la reacción cruzada entre 5 diferentes tipos de herpes virus : Alfa Herpes Virus bovino tipo 1 y 2, Herpes Virus de ciervo 2, Herpes Virus 2 de reno, Herpes Virus 1 y 2 de caprino , confirmando reportes previos que indicaban la relación serológica que existe entre bovino, caprino y ciervo así como entre ciervo, caprino y reno (9, 5). Esta enfermedad ha sido identificada en Estados Unidos, Canadá y en algunos países de Sudamérica así como en Nueva Zelanda, el Reino Unido, Sudáfrica, Zimbawe, Japón y Europa (9, 10).

El virus de IBR invade al organismo de los bovinos a través del tracto respiratoria ó genital (9, 12). La forma respiratoria se transmite mediante la exposición a los aerosoles, exudado nasal y posiblemente descargas vaginales (14). La forma genital es de origen venéreo (15). Se ha postulado que una vez que ha pasado la infección primaria en una población susceptible a IBR se establece el estado de portador latente y entonces el cuadro clínico ocurre solo bajo circunstancias predisponentes, situación que ha dificultado grandemente los estudios epidemiológicos (15).

El virus puede persistir en animales recuperados y ser eliminado intermitentemente hasta por 17 meses después de la infección pudiendo permanecer latente indefinidamente después de la infección natural (10, 11). Puede recrudecer su virulencia cuando se usan grandes dosis de corticosteroides que simulan el efecto del estrés (10).

Algunos animales que son portadores sanos, periódicamente sufren exacerbación de la enfermedad con excreción del virus (12). La placenta puede albergar al virus en estado latente durante incluso 90 días sin transmitirlo al feto. La introducción de animales nuevos a un hato precede con frecuencia a un brote. Sin embargo, pueden originarse simultáneamente en varias granjas lecheras en un área y diseminarse, desde ésta hacia las áreas vecinas (10,11).

3. Signos Clínicos

En los hatos afectados la enfermedad ocurre en forma de brote los 10 y 20 días después de la introducción del ganado susceptible, con cuadros repentinos de fiebre, anorexia, secreción nasal serosa, hipercitabilidad, dificultad respiratoria y postración final. Los casos fatales se deben a bronconeumonías secundarias. Puede producirse muerte súbita 24 horas después de la aparición de los primeros signos como consecuencia de la bronqueolitis obstructiva extensa (4, 10).

La forma nerviosa se caracteriza por los hallazgos postmortem de meningoencefalitis purulenta, ganglionitis trigémina y encefalitis con presencia de células inflamatorias y neurogliales : principalmente se presenta en animales jóvenes en los que hay ataxia , depresión , convulsiones y rechinar de dientes, espasmos, opistótonos. El curso es rápido y generalmente fatal (22). En becerros recién nacidos la forma sistémica de la enfermedad es por lo regular grave y mortal comenzando bruscamente con anorexia , fiebre hasta de 42° C, hiperemia intensa de mucosa nasal y muchos acúmulos de focos grisáceos de necrosis en la mucosa nasal (9, 10).

Originalmente se reconoció la vulvovaginitis pustulosa bajo el nombre de exantema vesicular coital aunque muchas veces no se forman vesículas y no se relacionaba directamente con el problema de inflamación por Herpes virus tipo 1. En este caso algunos de los signos son: elevación de la cola, micciones frecuentes, adherencias de pelo vulvar con exudado sanguinolento e inflamación edematosa de la vulva (22). El aborto es secuela común y aparece unas semanas después de iniciadas las manifestaciones clínicas o la vacunación de vacas preñadas no inmunes. Después del aborto no es rara la retención placentaria, pero carece de importancia la esterilidad residual. Sin embargo después de la inseminación con semen infectado puede producirse endometritis, dificultad para la concepción y ciclos cerrados (9, 10).

4. Prevención y control.

La única forma de prevenir esta enfermedad es por medio de la vacunación o mediante la adquisición de inmunidad después de la exposición natural. Por lo que han sido elaboradas una gran cantidad de vacunas a base de virus vivo que, por cierto al ser aplicadas en el ganado gestante pueden provocar aborto (20).

Existe otro tipo de vacunas denominadas TSV-2 contra IBR- Pi3 a la que apoyan varios trabajos de investigación por ser un producto eficaz e inoecu. Este es de aplicación intranasal y proporciona rápida protección e incrementa los niveles de inmunidad humoral y celular, no provoca abortos debido a que el virus no puede infectar al feto por no tener la capacidad de replicarse a temperaturas iguales a la del interior del cuerpo, no provoca reacciones postvacunales adversas ni secreción viral, pero el producto es de importación para México (20).

La eliminación de IBR de un hato, área geográfica ó un país es motivo de polémica y no se ha logrado evaluar la relación costo beneficio ni la factibilidad global de estos programas. Aparte de la latencia del virus en animales portadores y de los reservorios existe además el problema de supervivencia del germen en el medio. (15).

A pesar de estos inconvenientes se considera que la erradicación de la rinotraqueítis de un hato se puede lograr por la eliminación de animales serológicamente positivos y por la vacunación utilizando vacunas inactivas (15). Para el tratamiento, aunque la administración de antibióticos no tiene efecto alguno en el virus, evita las pérdidas provocadas por invasores bacterianos secundarios, debe identificarse al ganado enfermo también aislarse y observarse con frecuencia para dar tratamiento signológico aunque lo mas recomendable sea el sacrificio del animal (1, 9, 15).

5. Diagnóstico

El diagnóstico puede realizarse a la necropsia por las lesiones macroscópicas que quedan restringidas al hocio, cavidades nasales, faringe, laringe y tráquea para terminar en los grandes bronquios, puede comprobarse enfisema pulmonar y bronconeumonía secundaria pero en la mayoría de los casos los pulmones son normales (5, 20). Histológicamente se advierte inflamación catarral aguda de la mucosa (1).

Los fetos abortados muestran hepatitis necrótica focal, hemorragias en riñón y autólisis (9, 5). La encefalitis se caracteriza por lesiones típicas que se asientan en corteza cerebral y cápsula interna (1). Se debe diferenciar con la pasteurellosis neumónica, donde hay toxemia y buena respuesta al tratamiento, la difteria de los terneros puede semejarse, pero las lesiones orales y la laringe además de la toxemia son típicas (5).

La rinitis alérgica guarda alguna semejanza con IBR pero se manifiesta con estornudos y sibilancias con disnea, la temperatura suele permanecer normal y la secreción nasal es característicamente espesa. Normalmente resulta sencillo hacer el diagnóstico clínico de la forma conjuntival ó genital de IBR (1,5).

Puede ser difícil un diagnóstico clínico de las formas respiratorias, inductora de aborto y encefalítica, sin embargo es factible un diagnóstico para confirmación por el empleo de varias técnicas de laboratorio por ejemplo: Pruebas de aislamiento viral, de anticuerpos fluorescentes y de neutralización del virus (6).

El aislamiento del virus a partir de tejidos puede proporcionar la confirmación del diagnóstico clínico, sin embargo los procedimientos de laboratorio pueden ser muy entretenidos, costosos y generalmente tardíos para ser de algún valor en el control del brote (5, 10).

Debido a que las enfermedades causadas por el virus conducen a la formación de inmunidad celular inmediata los animales infectados pueden ser detectados también por una prueba intradérmica. Se puede apreciar la edematización de la piel en dos o tres días y hay una clara diferencia entre los animales seropositivos y seronegativos, sin embargo en experimentos realizados en bovinos con historia conocida, la prueba no solo detecta portadores del virus sino también bovinos inoculados subcutáneamente con vacuna inactivada o atenuada y en animales positivos tratados previamente con glucocorticoides no se observó reacción (14).

Como se mencionó anteriormente, existen también las pruebas serológicas tales como: la inmunofluorescencia indirecta con antiglobulina marcada con fluoresceína que ha resultado ser dos veces mas sensible a las técnicas directas para IBR. Pero ésta técnica ha sido mas empleada para la investigación que en diagnóstico rutinario (14). La inmunodifusión por ser mas complicada se ha empleado casi únicamente de manera experimental aunque también se ha sugerido como opción diagnóstico. (14)

La técnica de fijación de complemento se utiliza para demostrar la elevación de título de anticuerpos (12). En experimentos realizados en Rusia se encontró que de ésta prueba preparada con antígeno intracelular fue mas específica y sensible que la de seroneutralización y difusión en gel; sin embargo recientemente se ha demostrado que no todos los antígenos de este virus responden de manera uniforme a esta prueba (22).

La técnica de seroneutralización es la que comúnmente se utiliza como diagnóstico y la mas disponible para IBR. Tiene la desventaja de que requiere de grandes inversiones en instalaciones de laboratorio y equipo. Los títulos de virusneutralización bajos (1:2 a 1:10) pueden corresponder a vacunaciones recientes, pero también títulos de 1:32 . 1 : 64 pueden obedecer a la presencia del virus latente y coincidir con algunos casos leves como infertilidad y necrosis del cuerpo lúteo. La prueba de seroneutralización no es muy exacta para diagnósticos individuales pero es excelente para determinar si un hato está infectado (6, 10, 14). Sin embargo presenta la desventaja de que los sueros para la realización de esta prueba deben enviarse lo más rápido posible al laboratorio, en refrigeración, libre de contaminación y hemólisis (12).

Casi todos los reportes coinciden en que la prueba de ELISA es más sensible que la de neutralización del virus y es frecuente que se detecten casos positivos por ELISA que fueron negativos a sueroneutralización. La prueba de ELISA es más eficaz que la de anticuerpos fluorescentes (14). El nombre de ELISA se emplea actualmente para todas las técnicas que utilizan enzimas marcadas (19). Además de ser práctica y rápida esta prueba puede utilizarse para la detección de antígeno (ELISA DIRECTA) , o anticuerpos (ELISA INDIRECTA), esta prueba es una determinación inmunoenzimática en ella la intensidad del color se relaciona directamente con la cantidad de antígeno captado ó anticuerpo (6).

Debido a su simplicidad las pruebas de ELISA de tipo indirecto han sido muy utilizadas para establecer el diagnóstico inmunológico de muchas infecciones bacterianas, virales y parasitarias.

En la prueba de ELISA INDIRECTA para anticuerpos, se llenan pozos de poliestireno, con solución de antígenos, los antígenos proteínicos se unen con firmeza al poliestireno, así que después se extrae el antígeno no unido lavando energicamente y los pozos de las placas permanecen cubiertos con el antígeno. Esas placas así cubiertas pueden guardarse hasta el momento en que se necesiten. El suero que se va a probar se coloca dentro de los hoyuelos de manera que los anticuerpos específicos del suero pueden unirse al antígeno colocando en las paredes, después de la incubación y de un lavado la presencia de los anticuerpos se puede detectar agregando una antiglobulina químicamente unida a una enzima, este complejo se une a los anticuerpos y después de la incubación y el lavado se detecta y se mide con solo agregar el sustrato para la correspondiente enzima. La intensidad del color será proporcional a la enzima que se haya captado y se lee mediante la espectrofotometría (8).

Los métodos de ELISA permiten dosificar con una buena sensibilidad componentes de interés biológico. Esas técnicas se basan en dos tipos de procedimientos : 1) Se necesita una fase sólida para inmovilizar al antígeno o al anticuerpo asociado a la enzima y permitir así la evaluación del complejo antígeno-anticuerpo- enzima; son las dosificaciones de la fase heterogénea. 2) Un procedimiento en el que no se necesita separación porque las dosificaciones del complejo se efectúan directamente en la mezcla de reacción y es modificada su actividad según la extensión de la reacción antígeno-anticuerpo; son las dosificaciones en fase homogénea (19).

MATERIAL Y METODO

1. Obtención del abasto viral.

El herpes virus bovino tipo 1 utilizado para la estandarización de la prueba, se obtuvo a partir de cultivos celulares de la línea de riñón de cerdo (SKL) en el pase 116 donadas por el Centro Nacional de Diagnostico en Salud Animal (CENASA). Estas células se conservaron mediante subcultivos seriados con una confluencia del 90 % utilizando medio mínimo esencial con suero fetal bovino al 5% (ver apéndice), hasta obtener 500 ml de cultivo celular final, los cuales se encontraban almacenados en botellas para cultivo de 25 cm³.

Las botellas fueron inoculadas cada una con 1 ml de Herpes virus bovino tipo 1 con un título de 10⁴ ufp/ml y sin utilizar medio de cultivo se mezclaban cada 15 minutos durante 1 hora. Al pasar la hora se les adicionó medio de mantenimiento que contenía suero fetal bovino al 3 % y se reincubaban a 37 °C con atmósfera de CO₂. Pasando 24 horas se presentaba el efecto citopático y entonces los cultivos se congelaron a -70 °C y descongelaron en un baño María a 37 °C lo más rápido posible, 3 veces. Posteriormente se centrifugó el contenido a 3000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se almacenó en viales estériles de 25 ml cada uno con tapa y retapa en un ultracongelador (REVCO).

2. Sueros positivos y negativos.

Se usaron 10 sueros de bovinos que resultaron altamente positivos o negativos a I.B.R. probados previamente por la técnica de ELISA comercial ELI-VET (Laboratorio Beldico). De estos sueros se mezclaron los 5 positivos y por otro lado los 5 negativos, así se obtuvieron los controles para la estandarización de la prueba.

3. Conjugado antiovino.

Para la estandarización de la prueba se utilizó un conjugado anti IgG bovino comercial elaborado por Sigma Immunochemicals recomendando una dilución 1:2500 en solución reguladora de fosfatos para usarse en los inmunoensayos.

4. Desarrollador de color.

Se utilizó para el experimento la o-fenilendiamina (OPD) diluida en solución reguladora de citratos pH 5.0 (ver apéndice). De igual forma para detener la reacción se utilizó el ácido fósfórico 1M.

5.lectura de la prueba.

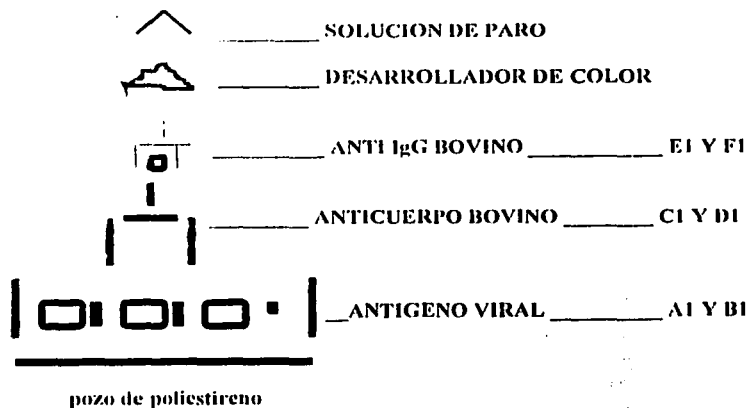
Para leer las placas se utilizo un lector de microplacas (Metrolab 970) utilizando un filtro de 590 nm. Este aparato se calentaba por lo menos 15 minutos antes de realizar la lectura y se calibró a 0.0 de absorbancia (Abs) con un pozo conteniendo 150 ul de agua bidestilada.

6. Controles de la microplaca

Para la estandarización de la prueba se utilizaron microplacas de media afinidad (COSTAR) de 96 pozos, donde la hilera 1 se utilizó como el control de la propia microplaca realizándose modificaciones en las cuáles se omitió alguno de los pasos de la técnica de ELISA indirecta como lo muestra la figura 1 .

FIGURA 1

PRUEBA DE ELISA INDIRECTA COMPLETA



NOTA:

-En la hilera de 1 se omitió el elemento correspondiente a ese pozo.

-  : Se refiere a la solución bloqueadora.

- Los pozos G1 y H1 se utilizaron como testigos negativos sensibilizándolos con células SKL sin infectar diluidas 1:10.

7. Selección de la solución bloqueadora

Se realizó un experimento donde se sensibilizó una microplaca con dos diluciones diferentes de células SK1, en solución de carbonato-bicarbonato pH 9,0 (apéndice), cada una de las hileras tenía su testigo negativo que se componía de solución de carbonato-bicarbonato, sin ninguna proteína, se tapó y se incubó toda la noche a 4 C después se lavó y se aplicaron 100 ul de las siguientes proteínas para realizar el bloqueo, lo que significa saturar los espacios que no ocupó el antígeno : gretina al 0,25 %, suero fetal bovino, suero de conejo, suero de cabra, leche descremada (Svelty). Estas proteínas se distribuyeron como lo muestra la figura 2 . Se tapó y se incubó a 37 C por dos horas, posteriormente se lavó, secó y se implementó el proceso normal de la prueba utilizando la mezcla de suero positivo. Posteriormente se realizó otra placa donde se bloqueó con gretina al 0,25 % y se incubó la mitad durante 1 hora y la otra mitad las dos horas establecidas anteriormente.

FIGURA 2.

SELECCIÓN DE LA SOLUCIÓN BLOQUEADORA

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I 10-1 I G	10-2 G										
II R	R			C	C	C	C	L	L		
I E	E	S	S	O	O	A	A	F	E		
II N	N			N	N	B	B	C	C		
I E	F	F	F	E	E	R	R	H	H		
II T	T			J	J	A	A	E	E		
I I	I	B	B	O	O						
II NA	NA										

I. POZO CON PROTEINA COMO BLOQUEADOR

II. SIN PROTEINAS DE BLOQUEO SOLO CON SOLUCIÓN DE CARBONATO-BICARBONATO

8. Optimización de la prueba

a. Determinación de la dilución óptima del virus

Para determinar la dilución óptima del antígeno sensibilizante se realizó un experimento en donde se sensibilizaron dos microplacas con 100 μ l de Herpes virus bovino tipo 1 en diluciones decimales comenzando en el pozo A2 con la dilución 1:10 hasta el pozo A12 como lo muestra la figura 3. se tapó y se incubó a 4 C durante toda la noche. Las diluciones del virus se realizaron en solución de carbonato-bicarbonato, una vez lavada y bloqueada se aplicaron diluciones dobles de la mezcla de sueros positivos diluyéndolo en el regulador de fosfatos (PBS) pH 7.0 (ver apéndice) comenzando en el pozo A2 hasta H 11 (ver figura 3). Este experimento se realizó por duplicado.

FIGURA 3
MICROPLACA DE 96 POZOS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10 0 1:4	10 -1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	10-10
B		1:8										
C		1:16										
D		1:32										
E		1:64										
F		1:128										
G		1:256										
H		1:512										

-La hilera 1 contenía los controles de la placa.

b) Antígeno sensibilizante.

Al virus y a las células testigo se les aplicaron tres tratamientos químicos diferentes (ver apéndice) y se preparó otra microplaca con virus y sus respectivos testigos con una dilución 1:100 probando 5 sueros positivos, 5 sospechosos y 5 negativos diluidos 1:100. el resto de la prueba se realizó de manera normal.

Al producto de los tratamientos 1, 2 y 3 (ver apéndice) se les realizó electroforesis en geles de polieramida en condiciones reductoras.

c. Estandarización del suero y conjugado bovino.

Se sensibilizaron 3 hileras de otra microplaca con la dilución de virus obtenida en el experimento anterior, con sus respectivos testigos negativos de cada pozo y los testigos de la placa y se les aplicó suero realizando diluciones dobles desde 1:100 hasta 1:800 y probando 3 diluciones diferentes de conjugado: 1:2500 como lo recomienda el productor, 1:5000 y 1:10000 distribuyéndolo como lo muestra la figura 4. Esta placa se realizó por duplicado utilizando el suero estándar positivo y otra para el negativo.

FIGURA 4
SUERO Y CONJUGADO ANTIBOVINO

	1	2	3	4
A		SUERO 1:100 CONJUGADO 1:2500	SUERO 1:100 CONJUGADO 1:5000	SUERO 1:100 CONJUGADO 1:10,000
B		TESTIGO NEGATIVO	TESTIGO NEGATIVO	TESTIGO NEGATIVO
C		SUERO 1:200	SUERO 1:200	SUERO 1:200
D		TESTIGO	TESTIGO	TESTIGO
E		SUERO 1:400	SUERO 1:400	SUERO 1:400
F		TESTIGO	TESTIGO	TESTIGO
G		SUERO 1:800	SUERO 1:800	SUERO 1:800
H		TESTIGO	TESTIGO	TESTIGO

-La hilera 1 son los testigos de la propia placa

-Se realizó el mismo esquema utilizando la mezcla de sueros positivo y negativo.

d. Estandarización de la concentración desarrolladora de color.

Se preparó otra microplaca con las condiciones de virus y suero ya establecidas de acuerdo a los resultados que se iban obteniendo y se usaron dos concentraciones diferentes de conjugado: 1:3200 y 1:4000. Por otro lado se probaron 3 concentraciones diferentes de OPD consistentes en: a) 5 mg de OPD diluidos en 5 ml de buffer de citratos y 10 ul de peróxido de hidrógeno.

B) 5 mg de OPD, en 10 ml de citrato y 10 ul de peróxido.

C) 5 mg de OPD en 15 ml de citrato y 10 ul de peróxido, incubando en oscuridad 15 minutos y parando la reacción con ácido fosfórico.

e. Prueba de elementos estandarizados

Una vez establecidos los parámetros se preparó otra microplaca y se aplicaron 30 sueros diferentes : 10 positivos, 10 negativos y 10 sospechosos clasificados así previamente por la prueba de VN . Los sueros fueron agregados en diluciones dobles de 1:8 hasta 1:64 por pozo. Una vez aplicado el suero se incubó a 37 C durante una hora y se agregó el conjugado en una dilución 1:64,000 despues de lavar la placa. El resto del ensayo se realizó de manera normal. Este experimento se hizo por duplicado, sólo que en la segunda placa se utilizaron los sueros diluidos 1 :200 y el conjugado diluido 1:2500, el resto de la prueba se implementó de manera rutinaria.

9. Determinación de anticuerpos contra I.B.R. mediante la técnica de ELISA indirecta.

De los 200 sueros recolectados de diferentes zonas como son : Chiapas, Cuauhtlán y Tizayuca (Estado de México) se tomaron al azar 50 con los cuales se implementó la prueba de ELISA estandarizada y posteriormente estos sueros fueron enviados al CENASA para correlacionar el resultado mediante la técnica de virus neutralización.

10. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de la ELISA estandarizada como de virus neutralización se conjuntaron para elaborar el análisis estadístico básico agrupando los resultados en grupos, en función de los títulos sugeridos por CENASA para la prueba de virus neutralización se determinó la correlación entre la prueba de ELISA estandarizada y la prueba de virus neutralización , se determinaron los parámetros de sensibilidad y especificidad por medio de una tabla binaria "2 por 2" por medio de los siguientes métodos:

Prueba de ELISA

Virus neutralización

Positivo

Negativo

A	B
C	D

Total de resultados: $A + B + C + D$

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{Resultados positivos verdaderos}}{\text{resultados positivos por ELISA}} = \frac{A}{A + C} \times 100 = \%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{Resultados negativos verdaderos}}{\text{Resultados negativos por ELISA}} = \frac{D}{b + d} \times 100 = \%$$

También se realizó la prueba estadística de análisis de correlación según Daniels .

RESULTADOS

1. Obtención del abasto viral.

Al ser infectados los cultivos celulares con el herpesvirus se presentó a las 24 horas el efecto citopático consistente en la formación de vacuolas intracitoplasmáticas, el cambio en la morfología celular que inicialmente eran poliédricas y posteriores al efecto se tornaban formas circular y algunas otras fusiformes, además de presentar un puntilleo oscuro refringente en el citoplasma y finalmente su desprendimiento. Al centrifugar el contenido de las botellas congeladas y descongeladas previamente, se desechó el sedimento y se almacenó el sobrenadante en el ultracongelador. De estos cultivos virales se obtuvieron 700 ml con un título 10^8 uspl / 100 ul.

2. Sueros positivos y negativos

Para la estandarización de la prueba se mezclaron los sueros que se muestran en la siguiente tabla 1:

TABLA 1

IDENTIFICACION	RESULTADO ELIVET
1043	POSITIVO +++++
111	POSITIVO +++++
283	POSITIVO +++++
1995	POSITIVO +++++
202	POSITIVO +++++
211	NEGATIVO -
383	NEGATIVO -
282	NEGATIVO -
1140	NEGATIVO -
102	NEGATIVO -

* Análisis realizado por laboratorio DIVET.

3. Eliminación del ruido de fondo mediante diversas soluciones bloqueadoras.

De las 5 proteínas probadas para seleccionar el mejor bloqueador se observaron los resultados que muestra la tabla 2.

TABLA 2
SOLUCIONES BLOQUEADORAS.

BLOQUEADO RES	EXPERIMEN TO A1	EXPERIMEN TO A2	EXPERIMEN TO B1	EXPERIMEN TO B2
GRENETINA 0.25 %	0	0	0	0
SUERO FETAL BOVINO	.062	.050	0	.001
SUERO CONEJO	.017	.012	.013	.011
SUERO DE CABRA	.005	.004	.004	.003
LECHE DESCREME - DA	.007	0	.002	.009

-Los resultados están expresados en diferencia de absorbancia (Abs células- Abs blanco) a 490 nm.

-Exp A1 y B1: experimentos realizados por duplicado con dilución de células 10 -1

-Exp A2 y B2: experimentos realizados por duplicado con dilución de células 10 -2

En cuanto a los dos tiempos de bloqueo que se ensayaron 30 minutos y una hora, no se observó diferencia utilizando grenetina al 0.25 % ni con leche al 0.10 % como bloqueadores.

4.Optimización de la prueba

a) Determinación de la dilución óptima de virus.

En el experimento donde se realizaron diluciones del antígeno contra diluciones de un suero positivo para elegir el óptimo del antígeno sensibilizante se observaron diferencias de Abs que se muestran en la tabla 3 .

TABLA 3
DETERMINACION DE LA DILUCION OPTIMA DEL VIRUS

DILUCION DEL VIRUS	DILUCION DEL SUERO 1:2	1 : 4	1 : 8	1:16	1:32	1 : 64	1 : 128	1:256
10 - 0	.092	.605	.201	.330	.149	.231	.291	.171
10 - 1	.015	.086	.082	.237	.137	.079	.018	.605
10 - 2	.159	.186	.182	.235	.237	.278	.318	.330
10 - 3	.164	.149	.152	.201	.278	.173	.205	.133
10 - 4	.007	.103	.002	0	0	.011	.016	0
10 - 5	0	0	.123	.111	.141	.150	.123	.209

-Los resultados están expresados en Abs .

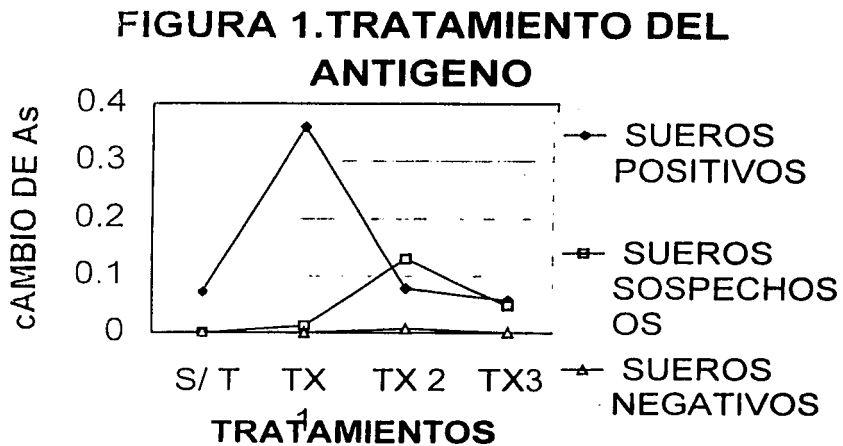
-Las diluciones decimales se refieren a las diluciones del antígeno en solución de carbonato-bicarbonato

A partir de las diluciones 10 -7 las absorbancias dan como resultado lecturas de 0.

b). Antígeno sensibilizante.

En los experimentos realizados para el virus en diferentes tratamientos no se apreció alguna diferencia importante utilizando los sueros diluidos 1:100. sin embargo en la figura 1 se muestran los resultados obtenidos del mismo experimentos pero diluyendo los sueros 1:200.

FIGURA 1



c) Estandarización del suero y conjugado antibovino.

En los experimentos realizados con el suero diluido 1:32 no se observaron variaciones entre las diferentes concentraciones del conjugado antibovino. La optimización del suero y conjugado a partir de las diluciones 1:100 se muestran en la figura 1 y 2.

FIGURA 1. OPTIMIZACION DEL SUERO Y CONJUGADO (SUERO POSITIVO)

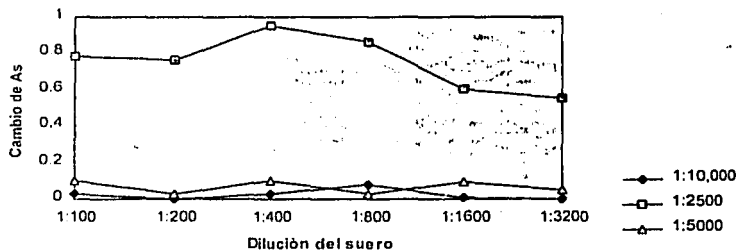
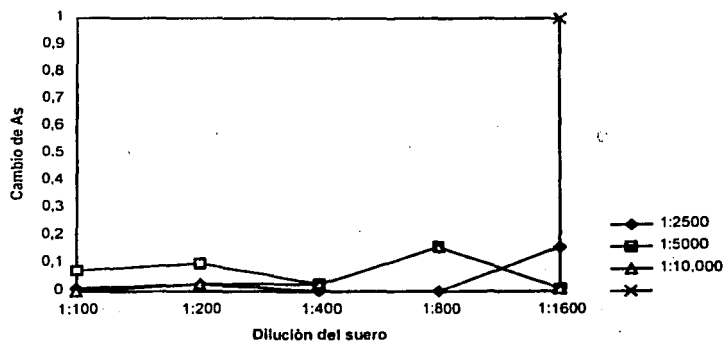


FIGURA 2. SUERO NEGATIVO



d) Estandarización de la solución desarrolladora de color.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos probando tres diferentes concentraciones de OPD con dos condiciones diferentes de conjugado.

TABLA 4
OPTIMIZACION DE LA SOLUCION DESARROLLADORA DE COLOR

	DESARROLLA- DOR 1	DESARROLLA- DOR 2	DESARROLLA- DOR 3
CONJUGADO DILUIDO 1:2500	.133	.084	.025
	.143	.030	0
CONJUGADO DILUIDO 1:4000	.093	.053	.062
	0	.062	.004

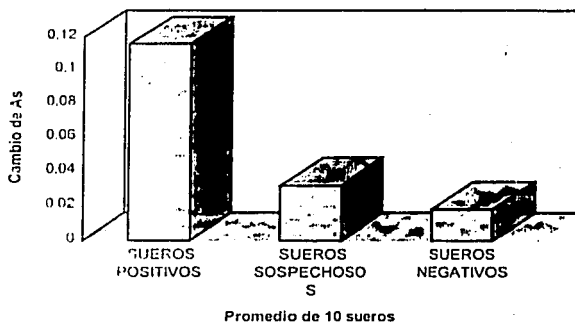
-Desarrollador 1, 2 y 3 (ver apéndice)

-Los resultados están expresados en diferencia de absorbancia y por duplicado.

e) Prueba de elementos estandarizados.

En este experimento diluyendo los sueros hasta 1 : 64 las diferencias no fueron significativas. Los resultados para los sueros diluidos 1 :200 y utilizando el conjugado 1:2500 se muestran en la figura 3 .

FIGURA 3. PRUEBA DE ELEMENTOS ESTANDARIZADOS



5. Determinación de anticuerpos contra IBR y correlación con la prueba de virus neutralización.

En el experimento donde se probaron 50 sueros elegidos aleatoriamente se obtuvieron los resultados expresados en las tablas 5.6 y 7.

TABLA 5
SUEROS NEGATIVOS PROBADOS POR VIRUS NEUTRALIZACION

IDENTIFICACION DEL SUERO	VIRUS NEUTRALIZACIÓN	ELISA INDIRECTA
512	NEGATIVO	0.000
546	NEGATIVO	0.012
762	NEGATIVO	0.000
963	NEGATIVO	0.000
800	NEGATIVO	0.033
93	NEGATIVO	0.039
21	NEGATIVO	0.051
209	NEGATIVO	0.000
55	NEGATIVO	0.055
10	NEGATIVO	0.018
214	NEGATIVO	0.110
65	NEGATIVO	0.237

157	NEGATIVO	0.120
215	NEGATIVO	0.000
218	NEGATIVO	0.032
120	NEGATIVO	0.000

TABLA 6
SUEROS SOSPECHOSOS POR VIRUS NEUTRALIZACION

IDENTIFICACION DE SUEROS	VIRUS NEUTRALIZACION	ELISA INDIRECTA
22	1:2	0.009
83	1:2	0.000
85	1:2	0.026
183	1:2	0.058
33	1:4	0.000
43	1:4	0.000
13	1:4	0.101
167	1:4	0.139
133	1:8	0.011
300	1:8	0.010
23	1:8	0.000
25	1:8	0.020
27	1:8	0.012
29	1:8	0.030
38	1:8	0.024
2000	1:8	0.034

TABLA 7
SUEROS POSITIVOS POR VIRUS NEUTRALIZACION

IDENTIFICACION DE SUEROS	VIRUS NEUTRALIZACION	ELISA INDIRECTA
183	1:16	0.065
100	1:32	0.000
214	1:32	0.109
155	1:32	0.116
6	1:32	0.118
48	1:32	0.164
541	1:64	0.110
433	1:64	0.124
58	1:64	0.527
130	1:128	0.100
1295	1:128	0.330
108	1:128	0.407
295	1:128	0.982
128	1:128	0.605
122	1:128	0.502
111	1:128	0.422
153	1:128	0.800
50	1:128	0.412

Tomando como parámetros de referencia los títulos de virus neutralización se realizó la tabla de contingencia para obtener la sensibilidad y especificidad de la prueba:

	ELISA POSITIVO	ELISA NEGATIVO
VIRUS NEUTRALIZACION POSITIVO	16/50	10/50
VIRUS NEUTRALIZACION NEGATIVO	5/50	19/50

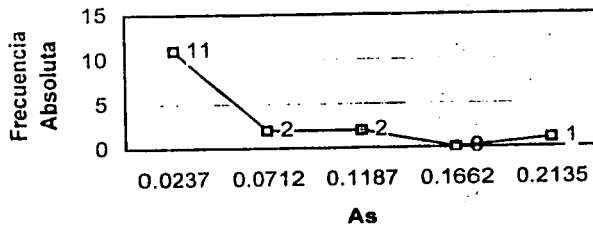
$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{A}{A + C} = 100\% = 76.1\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{D}{B + D} = 100\% = 65.5\%$$

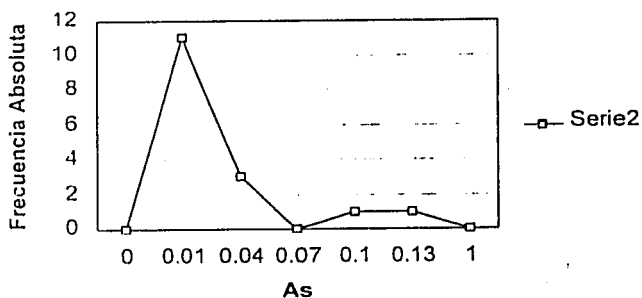
Tomando los mismo parámetros se obtuvo un índice de correlación con la prueba de virus neutralización de :

$$\text{CORRELACION} = 81.1\% \quad (0.811)$$

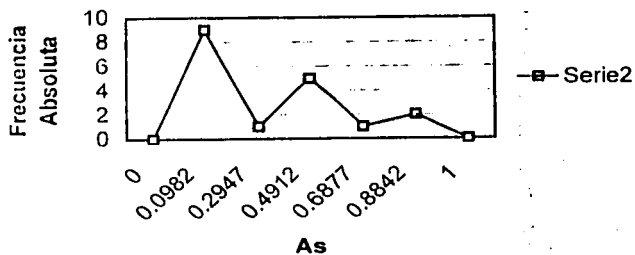
FRECUENCIAS DE SUEROS NEGATIVOS



FRECUENCIAS DE SUEROS SOSPECHOSOS



FRECUENCIAS DE SUEROS POSITIVOS



DISCUSION

El abasto de Herpes virus que se obtuvo para utilizarlo como antígeno sensibilizante presentó en los cultivos celulares la deformación de la célula, cambiandola de poliédrica a redonda (efecto citopático), así como el desprendimiento del 70 % de la monocapa a las 48 horas, y el desprendimiento total de la monocapa a las 72 horas, aunque algunos autores mencionan que prefieren utilizar el antígeno de 4 días de efecto citopático (19) y otros consideran el 50 % de desprendimiento de la monocapa como efecto total además de la deformación preliminar de las células (10). Ninguno de estos autores presentó un título mayor o igual a nuestro abasto obtenido que mostró un título de 10⁸ unidades formadoras de placa lítica (ufpl / 100 ul.) diferente a lo reportado en otros trabajos como 10^{5.8} ufpl/100 ul (1, 9), ó 10⁷ ufpl/ 100ul .

Una vez obtenido nuestro antígeno sensibilizante se procedió a elegir sueros altos positivos, sospechosos y negativos Por lo que de una recolección y evaluación mediante virus neutralización que se hizo de diferentes entidades: Tizayuca, Cuautitlán y Chiapas se tomaron sólo 5 sueros de cada uno y se realizó una mezcla positiva, una sospechosa y una negativa, obteniendo una volumen de 20 ml de cada uno , el que sirvió como sueros control para la estandarización de toda la técnica. Este paso se realizó para que todos los elementos de la técnica se establecieran bajo las mismas condiciones y no faltara suero al pasar de un experimento a otro, con la consiguiente variación de los resultados obtenidos.

En las tablas donde se exponen las diferencias de absorbancia de las 5 proteínas probadas para funcionar como bloqueadores, se puede apreciar que la grentina es el bloqueador que mejor funcionó y que presenta menor absorbancia aunque el cultivo celular sin virus con que se sensibilizó la placa se encontraba diluido 1:10 ó 1:100, le siguió el suero de cabra y la leche descremada sin embargo estos dos últimos son mas difíciles de conseguir y representan mayor costo ; en esta tesis se buscó estandarizar una prueba de ELISA rápida y que representara el menor costo posible por lo que se eligió la grentina al 0.25 % como bloqueador de nuestros experimentos; además existen autores que ya han reportado la utilización de esta proteína como bloqueador y han obtenido buenos resultados. (4,5). Existen otros estudios que reportan como mejor bloqueador para los ensayos de ELISA a la albúmina bovina (1,2,6) sin embargo también es muy costosa. En cuanto a los dos tiempos de bloqueo que se probaron a 37 C no existió diferencia alguna en las lecturas e incluso existe otra opción que mencionan algunos trabajos (5,6,14) y consiste en dejar dejar la placa con el bloqueador durante toda la noche pero a 4 C , condiciones que en nuestros experimentos funcionó muy parecido (resultados no mostrados) , además de que el método de bloqueo a 37 C ayuda también a la mejor organización del trabajo .

En muy pocos trabajos se menciona la dilución óptima de la solución sensibilizante . en la mayoría de los trabajos se realizó una titulación previa probando al virus contra otro elemento del ensayo; este paso se tomo como lo mencionaba la bibliografía y se probó al virus contra la dilución del suero utilizando un suero positivo para este fin y también como algunos autores lo mencionan .la mejor dilución para el virus fue 1 : 100 todavía pudiendo utilizarse la dilución de 1 : 1000 como alternativa . (19,21) .

, sin embargo, el resultado que se obtuvo fue contrario a lo que se esperaba ya que diluyendo el virus y el suero simultáneamente esperábamos encontrar una relación proporcional pero descendente, es decir, que a menor concentración de virus y suero la absorbancia (Abs) fuera menor. Sin embargo, lo que se apreció en estos resultados fue el efecto contrario, a mayor dilución de suero la Abs iba en aumento, esto siempre y cuando la dilución del virus fuera de 1:100, ya que no pasaba lo mismo con las diluciones siguientes. En éstas, como se aprecia en la tabla 2, las absorbancias no mostraban ninguna conducta ordenada. En la dilución 1:100 se apreció una uniformidad de las Abs, es decir de menor a mayor lectura y las mayores Abs nos puede indicar un aumento en el ruido de fondo debido a la mayor cantidad de enlaces inespecíficos a otros elementos proteínicos que no necesariamente son virus. Por otro lado, estos saltos también pueden deberse a la variable capacidad de absorción que hay entre un pozo y otro, de este modo obtenemos As como en la dilución 1:10,000 que presentó lecturas de 0. Por todas estas razones se eligió la dilución 1:100 de virus como antígeno sensibilizante.

En nuestros experimentos de dilución óptima de antígeno sensibilizante ya habíamos tenido indicios de que las mejores diluciones para el suero se encontraban después de 1:100 debido a que era cuando se aumentaban las lecturas hasta llegar a tener Abs de 0.300 lo que proporcionó una lectura aceptable para un suero positivo y nuevamente lo probamos al experimentar con el suero diluido hasta 1:32 probándolo contra el conjugado en varias diluciones, ya que no se apreciaban variaciones significativas, esto es que las lecturas fueron menores de 0.100 de cambio de Abs. En nuestros experimentos, para obtener la dilución óptima del suero y del conjugado diluyendo nuestro suero positivo de 1:100 en adelante se lograron alcanzar Cambios de Abs en un suero positivo hasta de 0.800, mientras que en el suero negativo las lecturas máximas eran de 0.160 de cambio de Abs como lo muestran las gráficas correspondientes (figura 1 y 2) además siguió presente el principio anterior donde a mayor dilución del suero y conjugado la lecturas se incrementaba y en el suero positivo llegaban a un límite, donde ya no continuaba el aumento: en las diluciones 1:1600 y 1:3200; Por otro lado también se apreció que diluyendo el conjugado 1:2500 se observa una mayor diferencia entre un suero positivo y uno negativo además de ser esta la dilución que sugiere el productor de conjugado antibovino. Tomando en cuenta que nuestra dilución óptima del conjugado diluido fue de 1:2500 no se eligió la dilución del suero de 1:400 aunque las diferencias de As que proporcionaba eran mayores debido a que las lecturas alcanzaban As de 1.700 y 1.800 y en el lector de ELISA que se utilizó este tipo de As hacía variar mucho la lectura al momento de leer la placa, por lo que se decidió utilizar la dilución anterior a 1:400 observando que ya desde la dilución 1:100 del suero la diferencia entre un suero positivo y uno negativo era muy aceptable siempre y cuando se utilizara el conjugado diluido 1:2500. Las siguientes diluciones del conjugado 1:5000 y 1:10,000 arrojaban lecturas muy bajas para un suero positivo (0.100 de cambio de As) mientras que los sueros negativos llegaban a tener cambios de As de 0.160, lo cual no permitía una buena diferenciación diagnóstica. Por todo esto, para nuestros experimentos se utilizó el suero diluido 1:200 y el conjugado 1:2500 a partir de ese momento.

Este resultado coincidió con algunos trabajos consultados donde se utiliza la misma dilución de conjugado (18) y la misma dilución del virus pero utilizando el conjugado 1:2000.(19).

Hasta este momento del trabajo se habían tenido problemas con los testigos de la placa ya que las As de estos testigos donde no se adicionaba suero ni conjugado daban lecturas por encima de 0.100 de As por lo que se buscó eliminar aún mas el ruido de fondo tratando de eliminar la peroxidasa endógena de la placa, para esto se probaron 2 reactivos que activaran a esta peroxidasa antes de iniciar la prueba y así evitar que la peroxidasa de la placa reaccionara al momento final de agregar el desarrollador de color, sin embargo se observó que utilizando la dilución de virus elegido (1:100) con la los sueros diluidos a partir de 1:100, los testigos sin inactivar presentaron una menor Abs que inactivándolos por lo que para los siguientes experimentos no se utilizó la inactivación de nuestros experimentos. (resultados no mostrados).

Una vez estandarizados todos los elementos de la prueba se realizó el corrimiento de 50 sueros tomados al azar y que previamente se habían probado mediante la prueba de virus neutralización (VN). Obteniendo resultados donde la media aritmética de los cambios de absorbancia que mostraron los sueros positivos por la prueba de virus neutralización dió 0.322 de cambio de As, mientras que para los sueros sospechosos fué de 0.029 de cambio de As y para los negativos de 0.047 de cambio de As como lo muestra la figura 4. Como se puede apreciar, el grupo de sueros sospechosos dió menor promedio de cambio de As que el grupo de los sueros negativos, tomando en cuenta que los sueros que se consideraron como positivos variaron en títulos de 1:32 hasta 1:128, mientras que los considerados como sospechosos son titulados por VN en 1:8 y 1:16 y los negativos son 1:4 o menores. lo que nos indica que sueros que son catalogados en VN como sospechosos ó negativos en la ELISA indirecta se consideran positivos así que como la literatura lo menciona la prueba de ELISA es menos que la prueba de virus neutralización (10,15,23), sin embargo los resultados de nuestra prueba presentaron una relación directa con la prueba de VN y una correlación del 8 % probablemente hubiera sido mas pequeña esta diferencia entre sueros sospechosos y negativos si se agruparan con intervalos de títulos mas bajos, estos es, agrupando los títulos de 1:4 por VN en sospechosos en vez, de ponerlos en el grupo de los negativos ya que debido a su alta sensibilidad la prueba de ELISA indirecta detecta cantidades muy bajas de IgG que no son detectadas por VN, mientras que por VN un suero titulado 1:2 ya se considera negativo en ELISA Indirecta todavia presenta cambios de absorbancia altos. Esto se puede explicar por que los antígenos que detecta la prueba de virus neutralización se dividen en IgA, IgM, IgD, IgE etc. mientras que en ELISA se detecta sólo IgG siendo por esta razón mas útil la técnica de ELISA para determinar infecciones tardías (pacientes que presentan latencia viral) mientras que virus neutralización es útil para cualquier fase exepcto para detectar estas fases tardías ya que los anticuerpos del tipo IgG se diluyen entre los demás isotipos siendo algunas veces no detectables.

Para aumentar la sensibilidad y/o especificidad de la prueba se trataron de fraccionar y exponer algunas proteínas del virus aplicando tres tratamientos ya utilizados en otros trabajos (10,18,27), en el tratamiento 1 se rompió la envoltura y con el tratamiento 2 se fraccionaba al virus por lo que sólo los anticuerpos más específicos de la enfermedad reaccionarían ante la presencia de estos antígenos.

En el tratamiento 3 se incluyó a los dos tratamientos anteriores en la misma muestra. Como se observó en los resultados obtenidos se logro aumentar la especificidad con el tratamiento 1 como lo muestra la figura 4 donde los cambios de As son mayores que en los otros 2 tratamientos con las mismas variables y para verificar que realmente se fraccionó el virus se le hizo corrimiento electroforético en gel mostrando efectivamente una diferencia en la cantidad de bandas observadas.

La sensibilidad fue de 76.1 % y la especificidad de la prueba fue de 65.5 % respectivamente, estos resultados se consideran moderadamente correlativos, y se puede explicar por :

1. La mayor sensibilidad de la prueba de sueroneutralización, comparada con ELISA (25).
2. La presencia de animales en estado de latencia (10.11.17)
3. La presencia de animales infectados que por efecto viral tienen cierto grado de inmunosupresión (3.4.10 y 30).
4. Existe información escasa sobre la generación de anticuerpos (y el isotipo) provocado por la administración de las vacunas.
5. En el presente trabajo no se correlacionó con el estatus inmune, sino con el perfil clínico de la explotación.

El aumento de la sensibilidad de la prueba, dado por el tratamiento del virus, nos demuestra que existen antígenos no superficiales que pueden ser mas inmunodominantes que los externos. Este camino pudiera ser empleado para tratar de diferenciar anticuerpos vacunales de infección sobre todo con la utilización de vacunas a virus inactivado (13).

El sistema usado en la prueba fue muy adecuado debido a que nos permitió diferenciar claramente entre positivos y negativos a la presencia de anticuerpos, los pocos animals que se encontraban en la zona en interfase entre las dos curvas, pueden corresponder principalmente a animales vacunados.

La ventaja de usar el isotipo IgG en la prueba radica en el que al ser anticuerpos generados como segunda fase de la presencia del antígeno en el organismo, despues de la IgM, en teoría no deben de ser generados por esquemas de vacunación ordinarios; sin embargo en la actualidad se cierran cada vez mas los esquemas realizando refuerzos incluso cada 3 meses, por lo que estos anticuerpos pueden ser de la clase IgG.

La prueba de ELISA desarrollada puede ser implementada como prueba de análisis para el estado inmune despues de la aplicación de vacunas, sin embargo esto no garantiza la protección de los animales, por lo que el perfil de anticuerpos obtenidos en la explotación sirve también para detectar los picos o aumentos que indicarian la entrada del virus silvestre a los animales (16).

CONCLUSIONES

- El Cambio de absorbancia para la prueba de ELISA desarrollada se interpretará como:

Menor de 0.1 = NEGATIVO

Mayor de 0.1 = POSITIVO

- La prueba se puede emplear para evaluar el estado inmunológico en un hato.
- El valor de corte en sueroneutralización deberá ser revisado considerando los estados de vacunación en los animales.
- La sensibilidad de 76.1% y la especificidad de 65.5% fueron bajas considerando a la prueba por su valor diagnóstico.
- El tratamiento del antígeno aumenta la sensibilidad de la placa.
- La prueba de sueroneutralización utilizada como estándar puede o no tener el 100% de sensibilidad.

APENDICE.

1. Solución reguladora de carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6

Carbonato de sodio (J.T. Baker)	1.5 g.
Bicarbonato de sodio (J.T. Baker)	2.93 g
Agua destilada	1000 ml

2. Solución reguladora de fosfatos 10 X

Cloruro de sodio (J.T. Baker)	8.0 g
Cloruro de potasio (J.T. Baker)	0.20 g
Fosfato ácido de sodio (J.T. Baker)	1.44 g
Fosfato ácido de potasio (J.T. Baker)	0.24 g
Agua destilada cbp	100 ml
Ajustar a pH 7.0	

3. Solución de grenetina al 0.25 %

Grenetina (Sigma chemical company)	0.25 g
Agua destilada	100 ml

4. Solución de lavado para ELISA

Solución reguladora de fosfatos 10 X	100 ml
Agua destilada	900 ml
Twen 20 (Sigma chemical company)	0.5 ml

5. Solución reguladora de citratos pH 5.0

Acido citrico 0.1 M	24.3 ml
Fosfato dibasico de sodio 0.2 M	25.7 ml
Agua bidestillada	50.0 ml

6. Acido citrico 0.1 M

Acido citrico	2.10 g
Agua bidestillada	100 ml

7. Fosfato dibasico de sodio 0.2 M

Fosfato dibasico de sodio	5.36 g
Agua destilada	100 ml

8. Tratamiento de antígeno No 1

Tris Hcl pH 7.4	50 mM
Cloruro de sodio	500 mM
EDTA	5 mM
Tritón X-100	1 %
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	0.1%
En baño de hielo	

9. Tratamiento de antígeno No 2

SDS	2 %
2 Mercaptoetanol	1 %
Glycerol	10 %
Tris Hcl	62.5 mM
Hervir por 5 minutos	

NOTA. El tratamiento No 3 consistió en aplicarle los dostratamientos anteriores a la misma muestra.

Soluciones utilizadas en cultivos celulares

A) Solución verseno al 0.05%

Versenato de sodio (EDTA)	0.5g
Solución Buffer fosfatos 10 X	50 ml
Agua destilada	950 ml
Ajustar a pH 7.6	

B) Solución tripsina al 5 %

Solución buffer fosfatos 10 X	100 ml
Agua destilada	900 ml
Tripsina 1:250	50 g
Ajustar a pH 7.8	

C) Medio de crecimiento

Agua desionizada estéril	90 ml	
Bicarbonato de sodio (J.T. Baker)	0.7 ml	
Penicilina- Estreptomicina (100,000 UI/ml y 100,000 mg/ml)		1 ml
Suero Fetal Bovino (In Vitro S.A.)	5 ml	
MEM-199 10 X	10 ml	

D) Solución de penicilina- estreptomina

Penicilina g (sal sódica)	1.000.000 UI/L
Sulfato de estreptomina	1.0g
Agua destilada	10 ml

E) Bicarbonato de sodio

Bicarbonato de sodio	2.5 g
Agua destilada	cbp 100 ml

BIBLIOGRAFIA.

1. Abdel M.O. Y., Orten D.J., Xue W., Blecha F. And Michoia H.C.: Anti-idiotypic to bicine herpesvirus - 1 inhibit virus infection in cell culture. Archives of virology 122 (1-2): 1992.
2. Afshar and Eaglesome M.D.: Viruses associated with bovine semen. Veterinary bolletin 60 (2): 1990.
3. Aguilar T. F., Castro M.E., Cedillo B.L. y col.: Manual de laboratorio de inmunología Instituto Politécnico Nal. México : 1994.
4. Akiyama K., Suggi S., and Hirota Y.: Development of enzyme-linked immunosorbent assays for conglutinin, mannanbinding protein, adn serum amyloid-P component in bovine sera. American J.Vet.Res. 53 (11) : 1992
5. Alvarado Y., Alvarado A.S, Mejia S.P., Villapán D.P. y Vilchis M.C.: Aislamiento y tipificación de una cepa del herpes virus bovino tipo 1 vulvovaginitis pustular infecciosa. Tec.Pec.Mex. Vol 3 No 2 . 1993
6. Avrameas S., Josiane G., y col.: Técnicas inmunoenzimáticas. Grupo editorial io, México 1989.
7. Barajas R. J.A., Riemman H.P. and Franti C.E.: Application of enzyme linked immunosorbent assay for epidemiologic studies od disease of levestock in the tropics of México. Rev.sci.tech. off. Int. Epiz. 12 (3) .: 1993.
8. Barron R.B., Cruz L.M. y col.: Manual de practicas de laboratorio de virología. Departamento de Microbiología IPN 1989.
9. Behymer D.E., Rlemann H.P., Eimi C.V. and Franti C.E.: Mass screening of cattle sera aganinst 14 infectious disease agents, using an ELISA system for minitoring health in livestock. American veterinary Jornal Research. 52 (10) : 1991.
10. Blodd D.C., Radostis O.M., Hendrson J.A., Arundel J.H. y Gay C.C.: Medicina Veterinaria . Editorial Iteramericana S.A: 6ª Edición, México. 1998.
11. Burdon R.H., P.H. van Kinippenberg.: Technique in biochemistry and molecular biology. Elsevier science publishers B.V. 8va Edición: 1993.
12. Caulss J.J., Dardin A.H., Ferris D.H., Gay J.G., Wilder F.W. y Mason J.: Manual Ilustrado para el diagnóstico y reconocimiento de ciertas enfermedades de los animales. Comisión México-América para la prevención de la Fiebre Aftosa. 1982.

13. Drunen V.S., Garzón S., Hurk V.D. y col. The Role of the major tegument protein VPS of bovine herpesvirus-1 in infection and immunity. Virology 206 (413-425) : 1995.
14. Durham J.H., Hassard E.L. and Donkergraaf: Serological studies of infectious bovine rhinotracheitis, Parainfluenza 3, Bovine respiratory syncytial viruses in calves following entry to a bull test station, Brief communications, Comunicaciones breves, Can.vet.J. 32 (427-429) .1991.
15. Eernisse K.A. and Erickson G.A. : Microtation serology methods for bovine virology.
16. Eskra L. And Splitter G.A. Bovine herpesviru – 1 infects activated CDA+ lymphocytes, Journal of General Virology, 78 (2159-2166): 1997
17. Hage J.J., Glas R.D. y col.: Reactivation of latent bovine herpesvirus 1 in cattle seronegative to glycoproteins IgB and IgE. Veterinary Microbiology, 60 (87-98):1998.
18. Kasuhiro Y. And Shuichi O.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bronchitis virus infection. Cornell veterinary 70 (77-95) 1980.
19. Lupton H.W., Barnes H.J. and Reed D.E.: Evaluation of the rabbit as laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. Cornell veterinary 70 (77-95). 1980.
20. Lyaku J.R.S., Nettleton P.F. and Mardsen H.: A comparison of serological relationship among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA Archives of virology, 124 (3): 1991.
21. Marschall R.L., Rodriguez L.L., Letch Worth G.J.: Caracterización of envelope proteins of infetios bovine rhinotracheitis viruses (Bovine herpes virus 1) by biochemical and immunological methods. Journal of virology, 57 (3) : 1986.
22. Meléndez M.V., Schuring G.G., Schudel A.A., Pocius D.J., y Dellers M.L. : Manual de Diagnóstico rapido de enfermedades virales de los animales utilizando métodos inmunoenzimáticos. IICA Publies científicas No 15: 1988.
23. Monroy B.J., Trigo T.F. y Escamilla G.R.M.: Estudios comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusion en el estudios de la leucosis enzootica bovina . Veterinaria México 24 (1) : 1993

24. Nagano H., Tsuchimoto M., Tamaka Y. And Yamagishi H.: Ezyme – linked immunosorbent assay for the detections of Infectious Bronchitis virus (IBV) Antigen with Monoclonal antibody. Research center for veterinary screenie of the Kitasato Institute. Jpn. J. Vet. Sci. 52 (3): 1990.
25. Nakajima N., Dishi E., Okabe T., Iwamoto Y., Arundel J.H., y Gay C.C.: Medicina Veterinaria. Editorial Interamericana S.A. de C.V. México . 1988.
26. Sashi B.M., y Sukanta K.D.: Virología Veterinaria. Editorial Interamericana S.A. de C.V. México. 1988.
27. Straub O.C. y Spiring C.: Rinotraqueítis Infecciosa. virología y diagnóstico. Avances en medicina veterinaria . México 1990.
28. Tizard Y.: Immunología Veterinaria. Editorial Interamericana S.A de C.V. México 1989.
29. Voller A., Bidwell J.D. y Bartlett A.: Manual de técnicas de diagnóstico virológico. pruebas inmunoenzimáticas (ELISA). Red de Cooperación Técnica entre Laboratorios de investigación y Diagnóstico Veterinario. Argentina . 1976.
30. Winkler M.T.C., Duster A. And Jones C.: Be Herpes virus 1 can infect CD4 +T lymphocytes and induce programmed cell Death during acute infection of cattle. Journal of virology Vol 73, No 10 (8657-8668):1999