



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Estandarización de prueba ELISA de captura para la
detección del Herpesvirus de Delfín.

GUZMÁN CASTAÑO BERTHA SOFÍA

N° de cuenta: 304809615

Correo electrónico: sophcastanio@gmail.com

Asesor: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2016



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.

ÍNDICE

	Página
Agradecimientos	3
Resumen	4
Introducción	4
Antecedentes	6
Justificación	7
Objetivos generales	7
Objetivos particulares	7
Metodología	8
Metodología del Objetivo 1	8
Metodología del Objetivo 2	8
Metodología del Objetivo 3-A	9
Metodología del Objetivo 3-B	21
Metodología del Objetivo 3-C	24
Metodología del Objetivo 4	32
Conclusiones generales	34
Anexo de materiales y soluciones	35
Bibliografía	37

AGRADECIMIENTOS.

El trabajo fue realizado con el apoyo de los PROYECTOS PAPIIT:

Proyecto PAPIIT : IT224311-3 “Desarrollo de técnicas de diagnóstico para problemas reproductivos y hepáticos en delfines (*Tursiops*) mantenidos en cautiverio en México”.

Proyecto PAPIIT: IT-202114 “Evaluación de la enfermedad de herpesvirus canino en México y Desarrollo de posibles medidas para su control y prevención.

Se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación multidisciplinaria de la FESC.

Agradezco en primer lugar a mi mentor, maestro y asesor, el Dr. Guillermo Valdivia Anda. Gracias por todo lo que me enseñó, por el apoyo y la paciencia (sobre todo la paciencia). Por ayudarme a entender y por entenderme. Por asesorarme a cada paso, tanto en proyectos de tesis como en proyectos de vida. Mil veces gracias.

Al Laboratorio DIVET por el uso de instalaciones y equipo para realizar algunas de las Técnicas empleadas en el trabajo y el mantenimiento de los animales empleados.

A mis compañeros y amigos en el Laboratorio DIVET por todo su apoyo y por hacer los días de trabajo muy alegres. Ángela, Lulú, Toño, Alfredo, doctora Elena y Cynthia, ¡Muchas gracias!

A quienes me acompañaron en cada experimento. ¡Gracias Jessy por la lata!

Gracias Monse por toda tu ayuda y tu apoyo, por mantener mi trabajo y mi cabeza en orden (por recordarme la ortografía de “absorbancia”) Contigo todo fue más fácil. Gracias de verdad.

Agradezco a mi compañero y amigo, Guillermo “Memo” Valdivia Lara, por todas sus asesorías; las de entonces, las de ahora y las de siempre. ¡Gracias amigo!

Al M en C César Cuenca Verde por el apoyo técnico y la asesoría en realizar algunas de las pruebas del trabajo, por brindar una mano cuando se le necesita.

Gracias a mis amigas de la vida, Alejandra Legaria y Alejandra Linares, por alentarme a terminar este trabajo de una vez por todas. Y gracias dobles a mi amiga Estefanía Landa, por tus palabras, tus puntos y comas, y por darle el último empujón a este trabajo. ¡Gracias amigas!

Agradezco a mis amigas de la carrera por acompañarme en el difícil pero hermoso camino de la Medicina Veterinaria y más allá. Alhelí Peña, “Daya” Solís e Ivonne Sandoval. ¡Gracias chicas!

Por último y más importante, dedico este trabajo a mis padres, Bertha Castaño y Rafael Guzmán. Gracias por todo lo que me han enseñado, por motivarme y apoyarme. Lo que soy se lo debo a ustedes. Gracias por siempre. “Hasta la galaxia Andrómeda y de regreso.”

RESUMEN

En este trabajo se buscó realizar una prueba de ELISA con el propósito de detectarla presencia del Herpesvirus de delfín (DHV) en muestras de tejidos de delfines. Para lograrlo primero se obtuvieron sueros hiperinmunes de ovino y de conejo contra HVD. Para ello se realizaron inmunizaciones periódicas en ovino y en conejo usando DHV aislado en México en el laboratorio DIVET, para después obtener el suero al procesar sus muestras de sangre. Después se experimentaron diferentes concentraciones del suero de conejo contra diferentes concentraciones del conjugado enzimático para estandarizar la concentración ideal a usar del conjugado. Posteriormente se realizó la prueba de ELISA de captura probando diferentes concentraciones de virus purificado contra diferentes concentraciones del suero de conejo como suero de identificación y usando el suero de ovino como suero de captura. Los resultados arrojaron que el conjugado anti-conejo tiene reacción cruzada con los anticuerpos de ovino, obteniendo lecturas más altas en muestras sólo con suero de ovino que aquellas muestras donde se hizo la prueba completa. Se concluye repetir el experimento pero usando una especie diferente para obtener el suero de captura.

INTRODUCCIÓN

Herpesvirus en delfines

Los herpesvirus están ampliamente diseminados en la naturaleza. Los estudios han descubierto que la mayoría de las especies son huéspedes de al menos uno o varios tipos de herpesvirus y los delfines no son la excepción. En delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) se ha detectado la presencia de ADN de Herpesvirus en lesiones en piel, mucosa oral y genital. (Cornelis E. et. Al., 2009)

El análisis de la secuencia de ADN por pruebas de PCR muestran que el herpesvirus de delfín (DHV) tiene gran similitud a los virus del género Varicellovirus de la subfamilia a-herpesvirinae y en particular al herpesvirus canino (Dierauf, L.A. y Gulland, F. M. D., 2001) y 98% de similitud con herpesvirus humano tipo 1 (Esperón, F., 2008)

Entre los signos producidos se encuentran desde lesiones en piel, alrededor de la boca y en mucosa genital con centro necrótico, hasta dermatitis generalizada y úlceras esofágicas; afecta al cerebro provocando encefalitis no supurativa. Puede afectar sistema respiratorio provocando inflamación de la mucosa; también puede provocar diarrea y fiebre. En etapa tardía de infecciones fatales ocurren anorexia y letargia. Las glándulas adrenales y el hígado son los órganos blanco, provocando hepatomegalia y zonas de necrosis. Se ha asociado al herpesvirus de delfín como etiología de aborto. (Van Elk, C.E., et. al., 2009)

Afecta generalmente a individuos en etapa juvenil. Infecciones fatales ocurren sólo en neonatos. Las infecciones en cetáceos probablemente aumentan con la edad y se vuelven latentes, similar a las infecciones por a-herpesvirus en otras especies. . (Dierauf, L.A. y Gulland, F. M. D., 2001)

Diagnóstico de Herpesvirus

La mayoría de los diagnósticos están basados en la detección de partículas características de herpesvirus por medio de microscopía electrónica y tinción por técnica inmunohistoquímica. (Cornelis E. et. Al.2009) Se han visto dos tipos de partículas virales de herpesvirus en cetáceos, una es de 60 a 110 nm de diámetro y sin nucleocápside. La otra es una partícula envuelta en nucleocápside con diámetro de 115 a 250 nm encontrado en citoplasma. También es usada la prueba de PCR para detectar la secuencia de ADN del herpesvirus en el tejido; así como la inmunofluorescencia en tejidos fijados de cetáceos usando anticuerpos contra herpesvirus humano y herpesvirus bovino (ambos de tipo α -herpesvirus)

Como auxiliar en pruebas de diagnóstico, se observa marcada linfopenia en etapas tardías y la química sanguínea tiende a estar en rangos normales. . (Dierauf, L.A. y Gulland, F. M. D., 2001)

Prueba de ELISA

La prueba de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA) es una técnica de inmunoensayo que detecta la presencia de anticuerpos contra un antígeno determinado o un antígeno específico mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un cambio o presencia de color. El cambio de color es medible cualitativamente por medio de la vista y cuantitativamente por medio de un espectrofotómetro. (Crowther, J.R., 1995)

El procedimiento involucra un gran número de variables, como selección de reactivo, temperatura, medición de volumen y tiempo de incubación, según el tipo de prueba que se quiera realizar. (Dierauf, L.A. y Gulland, F. M. D., 2001)

Existen 4 tipos de pruebas de ELISA:

ELISA DIRECTA.- Primero se adhiere el antígeno a la placa, posteriormente se agregan los anticuerpos que reconocen al antígeno con la enzima antes mencionada previamente ligada a ellos. . (Crowther, J.R., 2001)

ELISA INDIRECTA .- Primero se adhiere el antígeno a la placa, luego se agregan anticuerpos que reconocen a ese antígeno y por último se agregan los anti-anticuerpos con enzima ligada. (IBIDEM)

ELISA DE CAPTURA DIRECTA (también llamada “de sándwich”) Primero se adhieren a la placa anticuerpos contra el antígeno que se agrega en la segunda etapa, después de éste, se agrega otro anticuerpo que reconoce al mismo anticuerpo pero éste con la enzima ligada. (IBIDEM)

En pruebas ELISA DE CAPTURA INDIRECTA - Primero se adhieren a la placa anticuerpos contra el antígeno a detectar, después se agrega el antígeno u posteriormente se agregan anticuerpos contra el mismo antígeno pero de diferente especie. Por último se agrega un anti-antígeno con la enzima ligada, un anticuerpo primario o de captura que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario o de identificación y por último un anti-anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar color.(IBIDEM)

ANTECEDENTES

La prueba de ELISA se ha utilizado para diagnosticar herpesvirus en humanos y en otras especies animales por medio de la detección de anticuerpos en el suero. Diagnóstico que se realiza utilizando el método de ELISA Indirecta; esto es, colocando en la placa primero el antígeno (Herpesvirus), después la muestra del suero en el que queremos detectar los anticuerpos y por último un conjugado de anticuerpos de otra especie ligados a una enzima que reconocen los anticuerpos contra herpesvirus. (Ternyick, 1989)

Se han realizado pruebas de ELISA como auxiliar en el diagnóstico de herpesvirus en delfines detectando anticuerpos específicos contra herpesvirus en el suero. La obtención de un resultado positivo en esta prueba demuestra que el paciente tuvo contacto con el virus y generó inmunidad, mas no que tenga infección. . (Beineke, 2010)

La detección de las partículas virales es el diagnóstico más específico, puede ser realizada por microscopía electrónica, cultivo, inmunofluorescencia y por ELISA de captura. En los delfines se han usado las dos primeras únicamente. (Dierauf, 2001)

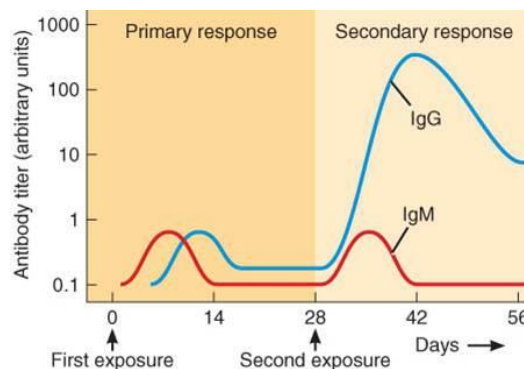
En un trabajo previo fueron aisladas varias cepas de herpesvirus de delfín de vida libre. (Valdivia y

Inmunología. La respuesta humoral, el principio de la prueba de ELISA

La inmunidad humoral es aquella que se da principalmente por la producción de inmunoglobulinas (Igs) secretadas por las células plasmáticas. Cada inmunoglobulina (Ig) está dirigida a actuar contra un antígeno en específico. Cada clon de célula plasmática puede producir Igs específicas para un mismo antígeno pero de diferentes isótopos. Así es que, las células plasmáticas inmaduras producen Ig de tipo IgM en una respuesta primaria, y al recibir un nuevo estímulo del mismo antígeno cambian a producir IgG, IgA e IgE, en una respuesta secundaria. (Pathak, S., 2005)

La respuesta primaria es cuando se activa un Linfocito tipo B que no ha tenido contacto con un Ag. Después de 7 a 10 días de recibido el estímulo, este linfocito, ahora célula plasmática, inicia la producción de Ig tipo IgM de especificidad baja. Esta respuesta suele ser pasajera y sólo durar unas semanas. (Rojas, W., 2012)

La respuesta secundaria es cuando la célula plasmática se encuentra con el mismo Ag que la generó. Esta respuesta es más rápida, ente 24 a 72 horas posteriores al estímulo, y genera Igdiferentes a las IgM (IgG, IgA e IgE) y con mayor especificidad por el Ag. La respuesta secundaria produce cantidades mayores de Igs y por un periodo más prolongado. (IBIDEM)



JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no existe un método de diagnóstico estandarizado basado en la técnica de ELISA para detectar herpesvirus en los animales de fauna silvestre. Para establecer el papel de Herpesvirus en los delfines de vida libre, es necesario tener técnicas para evaluar la presencia del virus que sean rápidas y fáciles de realizar en las costas de México.

OBJETIVO GENERAL.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar Herpesvirus de Delfín.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener suero hiperinmune en ovino contra Herpesvirus de Delfín.
- 2.- Obtener suero hiperinmune en conejo contra Herpesvirus de Delfín.
- 3.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar el virus
 - A) Empleando suero de conejo como suero de identificación
 - b) Empleando suero de ovino como suero de captura.
 - c) Empleando suero de conejo como suero de captura.
- 4.- Determinar la especificidad y sensibilidad de la prueba en tejidos de delfín inoculados experimentalmente.

METODOLOGÍA

1.- Obtención de suero hiperinmune en ovino.

- Se utilizó un ovino, el cual fue mantenido en las instalaciones del bioterio del Laboratorio DIVET®, se alimentó con alimento comercial (Purina®) y avena achicalada de acuerdo a las normas de nutrición recomendadas por el NRC. El animal se mantuvo en un corral elevado y todo el manejo de este animal se realizó de acuerdo a la Norma NOM-062, para el cuidado y uso de los animales en experimentación.

- Se preparó un inóculo estéril a partir de 1ml de herpesvirus de delfín de vida libre aislado en un trabajo previo en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC (Proyecto PAPIIT IT 224311) e inactivado con luz UV, con un título de 10^5 UFPL/ml. A este mililitro de virus se le agregó 0.1 ml de adyuvante de Freund incompleto para la primer aplicación. Para las siguientes aplicaciones se usó adyuvante de Freund completo. Se almacenó a 4°C hasta su utilización.

- El inóculo de Herpesvirus de delfín se administró, vía subcutánea en el área del dorso, a un ovino hembra, de raza mestiza, de 4 años de edad. El primer día de inoculación se toma como día 0. Se repitió la aplicación del inóculo los días 7, 14, 21 y 28. (Harlow, E. y Lane, D. 1988)

- Se obtuvieron muestras de sangre del ovino los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35. La muestra se obtuvo de la vena yugular. Se obtuvieron alrededor de 15 ml de sangre en cada ocasión, colocándose en tubos sin anticoagulante. (IBIDEM)

- Se procesaron las muestras para obtener suero, incubándolas 30 minutos a temperatura ambiente hasta que se forma el coágulo de sangre. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo la fase líquida (el suero) y se almacenó la muestra, propiamente identificada, a -20°C hasta su utilización.

- El suero obtenido se utilizó en la prueba de ELISA de captura (Prueba B.1, que se menciona más adelante en el trabajo) para determinar, de manera indirecta, la cantidad de inmunoglobulinas existentes contra Herpesvirus de delfín (HVD).

2.- Obtención de suero hiperinmune en conejo.

- Se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelanda los cuales fueron mantenidos en las instalaciones del bioterio del Laboratorio DIVET®, se alimentaron con alimento comercial (Purina®) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los animales se mantuvieron en jaulas para conejos estándar de bioterio, todo el manejo de los animales se realizó de acuerdo a la Norma NOM 062, para el cuidado y uso de los animales en experimentación.

- Se preparó un inóculo como se describió en el inciso 1.

- El inóculo de Herpesvirus de delfín se administró, vía subcutánea en el área del dorso, a un grupo de 3 conejos hembras, de raza Nueva Zelanda, de 2 meses de edad. Se identificaron los 3 animales como conejo A, conejo B y conejo C. El primer

día de inoculación se tomó como día 0. Se repitió la aplicación del inóculo los días 7, 14, 21 y 28. (Harlow, E. y Lane, D. 1988)

- Se obtuvieron muestras de sangre de los 3 conejos los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35. La muestra se obtuvo de la vena yugular. Se obtuvieron alrededor de 6 ml de sangre en cada ocasión, colocándose en tubos sin anticoagulante. (IBIDEM)

- El día 42 los conejos fueron sacrificados por método de sangrado intracardiaco. Se obtuvieron alrededor de 60 ml de muestra sanguínea de cada individuo.

- Se procesaron las muestras para obtener suero, dejándolas incubar 30 minutos a temperatura ambiente hasta que se forme el coágulo. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo la parte líquida (el suero) y se almacenó la muestra, propiamente etiquetada, a -20°C hasta su utilización.

- Al suero obtenido se le realizó la siguiente prueba de ELISA (Prueba 1) para determinar la cantidad de inmunoglobulinas existentes contra DHV.

3.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar el virus

A) Empleando suero de conejo como suero de identificación

Prueba 1) Determinación de la cantidad de Inmunoglobulinas IgG existentes en el suero de conejo inoculado, comparándolo contra suero de conejo no inoculado.

Se realizó una mezcla con los sueros hiperinmunes de los conejos A, B, y C en partes iguales. Posteriormente esta mezcla se diluyó en solución reguladora de fosfatos (PBS) a razón de 1:20, 1:40 y 1:80. También se prepararon las mismas diluciones con el suero de conejo negativo

- Sensibilización de la placa:
- Se utilizaron microplacas de poliestireno, con fondo plano, de 96 pozos.
- Como primer sustrato se agregaron a cada pozo 50 µl de suero de conejo en sus diferentes diluciones, alternando filas entre el suero hiperinmune de conejo contra herpesvirus de delfín y el suero de conejo negativo. Los sueros y sus respectivas diluciones se colocaron como se muestra en la tabla 5. De tal manera que de cada dilución de suero y su negativo queden 4 repeticiones.

	1	2	3	4	5	6
A	Conejo (+) 1:20	Conejo (+) 1:40	Conejo (+) 1:40	Conejo (+) 1:80	Conejo (+) 1:80	Conejo (+) 1:80
B	Conejo (-) 1:20	Conejo (-) 1:40	Conejo (-) 1:40	Conejo (-) 1:80	Conejo (-) 1:80	Conejo (-) 1:80
C	Conejo (+) 1:20	Conejo (+) 1:40	Conejo (+) 1:40	Conejo (+) 1:80	Conejo (+) 1:80	Conejo (+) 1:80
D	Conejo (-) 1:20	Conejo (-) 1:40	Conejo (-) 1:40	Conejo (-) 1:80	Conejo (-) 1:80	Conejo (-) 1:80
E	Conejo (+) 1:20	Conejo (+) 1:40	Conejo (+) 1:40	Conejo (+) 1:80	Conejo (+) 1:80	Conejo (+) 1:80
F	Conejo (-) 1:20	Conejo (-) 1:40	Conejo (-) 1:40	Conejo (-) 1:80	Conejo (-) 1:80	Conejo (-) 1:80
G	Conejo (+) 1:20	Conejo (+) 1:40	Conejo (+) 1:40	Conejo (+) 1:80	Conejo (+) 1:80	Conejo (+) 1:80

H	Conejo (-) 1:20	Conejo (-) 1:40	Conejo (-) 1:80
---	-----------------	-----------------	-----------------

Tabla 1 - Sensibilización de placa prueba 1 -

- Se agregaron todos los pozos 50 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH de 9.2. Se dejó incubar a 4°C en cámara húmeda durante 16 – 18 horas.

- Bloqueo de la placa:

- Se realizó el lavado de la placa retirando el excedente y agregando 300 µl de solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2 y solución Tween-20 al 0.05%) a cada pozo y dejando incubar por 5 minutos. Se repitió el procedimiento una vez más con solución de lavado y otra con solución buffer PBS. Cuando la placa estuvo seca, se agregaron a todos los pozos 150 µl de solución de bloqueo (Leche descremada en polvo al 10%) y 150 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH 9.2. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas. Posteriormente se realizó el lavado de la placa en las mismas condiciones que las antes mencionadas.

- Desarrollo de la prueba:

- Se agregaron 100 µl de conjugado anti-IgG de conejo diluido en solución reguladora de citratos a dilución de 1:4000 en cada pozo de las hileras A, B, C, y D. A cada pozo de las hileras A, B, C, y D. Y se agregaron 100 µl de conjugado diluido en solución reguladora de citratos a dilución 1:8000 en cada pozo de las hileras E, F, G y H. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante una hora. Se repitió el lavado de la placa como se mencionó anteriormente. Posteriormente se agregaron 100 µl de solución desarrolladora de color. Se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. Por último, se agregaron 50 µl de solución de Paro. Se realizó la lectura de la placa a longitud de onda de 490 nm con un lector automático de ELISA. Los resultados fueron los siguientes:

	Dilución de suero 1:20	Dilución de suero 1:40	Dilución de suero 1:80				
Conejo (+)	1.357	1.460	1.536	1.413	2.071	1.979	Conjugado anticonejo 1:4000
Conejo (-)	0.960	0.984	1.178	1.099	0.963	0.863	
Conejo (+)	1.613	1.506	1.447	1.514	1.988	1.895	
Conejo (-)	0.943	0.831	1.136	1.029	0.900	0.900	Conjugado anticonejo 1:8000
Conejo (+)	1.142	1.033	0.920	0.950	1.391	1.259	
Conejo (-)	0.709	0.567	0.737	0.760	0.637	0.607	
Conejo (+)	0.993	0.910	0.998	1.006	1.284	1.232	Conjugado anticonejo 1:8000
Conejo (-)	0.638	0.639	0.855	0.810	0.705	0.629	

Tabla 2 - Resultados prueba 1

Se encuentran subrayados en rojo los valores más altos y en azul los valores más bajos.

Se obtuvieron las medias de los resultados de aquellas muestras en condiciones idénticas. Obteniendo los siguientes datos:

	Promedios			
	Suero 1:20	Suero 1:40	Suero 1:80	
Conejo (+)	1.484	1.478	1.983	Anticonejo
Conejo (-)	0.930	1.111	0.907	C= 1:4000
Conejo (+)	1.020	0.969	1.292	Anticonejo
Conejo (-)	0.638	0.791	0.645	C= 1:8000

Tabla 3 – Promedios de resultados prueba 1

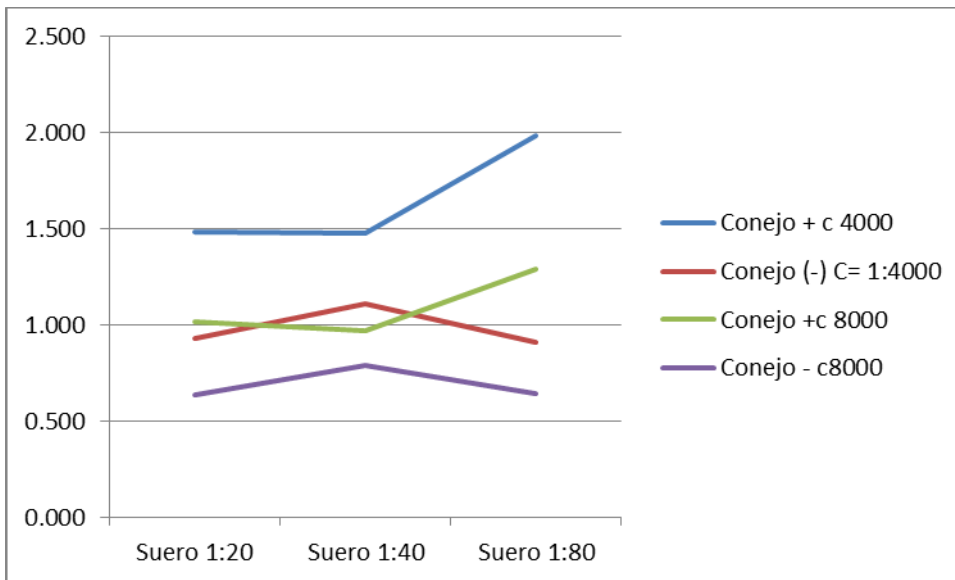


Gráfico 1 - Resultados prueba 1– Se observa diferencia entre suero de conejo (+) contra el suero de conejo (-). Diferencia que aumenta en la dilución 1:80.

Se compararon las muestras de suero de conejo hiperinmune con las muestras de suero de conejo negativo bajo las mismas condiciones. Se restaron las diferencias de absorbancias obteniendo los siguientes datos:

Diferencias de absorbancias: Suero (+) vs (-)			
	Suero 1:20	Suero 1:40	Suero 1:80
Conjugado anticonejo 1:4000	0.397	0.358	1.108
	0.476	0.314	1.116
	0.670	0.311	1.088
	0.675	0.485	0.995
Conjugado anticonejo 1:8000	0.433	0.183	0.754
	0.466	0.190	0.652
	0.355	0.143	0.579
	0.271	0.196	0.603

Tabla 4- Diferencias de absorbancia prueba 1

Se obtuvieron las medias de las repeticiones de las muestras con las mismas condiciones.

	Medias de diferencia de absorbancia		
	Suero 1:20	Suero 1:40	Suero 1:80
C= 1:4000	0.555	0.367	1.077
C=1:8000	0.381	0.178	0.647

Tabla 5- Promedio de las diferencias de absorbancia prueba 1

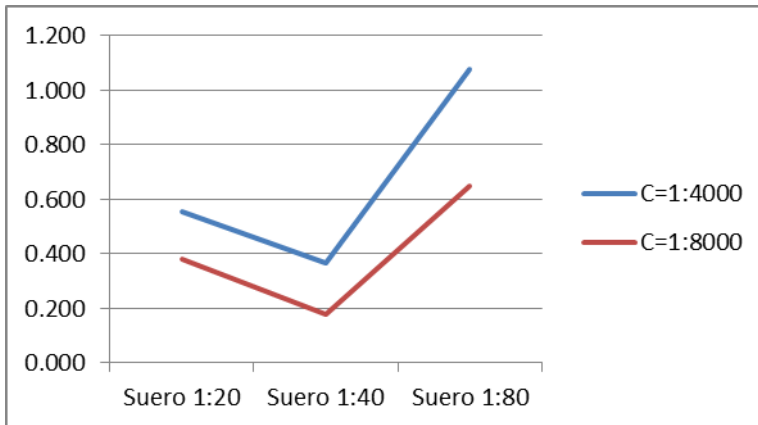


Gráfico 2 - Resultados prueba 1 – Diferencias de absorbancia entre suero (+) y suero (-). Ambos muestran una diferencia significativa entre suero (+) y (-), diferencia que es mayor en dilución 1:80. En azul el conjugado a dilución. 1:400 En rojo el conjugado a dilución 1:8000.

Discusión de resultados prueba 1:

Se obtuvieron diferencias de absorbancia considerables entre las muestras de suero hiperinmune y las muestras de suero de conejo no inoculado. Esto comprueba la producción de altas cantidades de IgG en los sueros la mezcla de los conejos A, B y C, lo que prueba que el suero es apto como reactivo para realizar la prueba de ELISA. Sin embargo, esta prueba detectó todas las Inmunoglobulinas tipo IgG existentes en el suero. Para detectar las IgG específicas contra DHV es necesario hacer una prueba de ELISA colocando el virus DHV en la fase de sensibilización.

Como es de esperarse los valores más altos se obtuvieron utilizando conjugado a dilución 1:4000, pues al estar más concentrado hay mayor reacción. Sin embargo también ofrece mayor ruido de fondo. Para fines de estandarización de la prueba de ELISA es más conveniente usar el conjugado a dilución 1:8000 para obtener resultados más precisos. Además los resultados más significativos se obtuvieron en las muestras bajo condiciones de conjugado a dilución 1:8000 y suero a dilución 1:80.

Conclusión prueba 1:

La mezcla de suero hiperinmune de los conejos A, B y C contiene una diferencia considerablemente mayor de IgG contra HVD que el suero de conejo no inoculado, por lo que es un reactivo adecuado para realizar la prueba de ELISA.

Probar las diluciones de suero de conejo a 1:80 contra otras diluciones en futuras pruebas, así como confirmar la dilución a utilizar del conjugado anti-conejo.

3.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar el virus

A) Empleando suero de conejo como suero de identificación

A.1) Determinación de la dilución a utilizar para el suero hiperinmune de conejo y la dilución a utilizar del conjugado anti-IgG de conejo.

- Se utilizó una mezcla de los sueros hiperinmunes de los conejos A, B y C en partes iguales.
- Primero, se prepararon diluciones del suero hiperinmune de conejo en solución reguladora de fosfatos (PBS) a razón de 1:5, 1:10 1:20, 1:40 y 1:80.
- Sensibilización de la placa:
- Se utilizaron microplacas de poliestireno (COSTAR®), con fondo plano, de 96 pozos.
- Como primer sustrato se agregaron a cada pozo 50 µl de suero hiperinmune de conejo contra herpesvirus de delfín, ya sea directo y en diluciones, de la manera como se muestra en la tabla 1, para que de cada dilución queden 4 repeticiones.

	1	2	3	4	5	6
A	Suero (+) directo	Suero (+) 1:5	Suero (+) 1:10	Suero (+) 1:20	Suero (+) 1:40	Suero (+) 1:80
B	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
C	Suero (+) directo	Suero (+) 1:5	Suero (+) 1:10	Suero (+) 1:20	Suero (+) 1:40	Suero (+) 1:80
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E	Suero (+) directo	Suero (+) 1:5	Suero (+) 1:10	Suero (+) 1:20	Suero (+) 1:40	Suero (+) 1:80
F	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	Suero (+) directo	Suero (+) 1:5	Suero (+) 1:10	Suero (+) 1:20	Suero (+) 1:40	Suero (+) 1:80
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Tabla 6 - Sensibilización de placa prueba A.1

- Para sensibilizar las placas se agregaron 50 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH de 9.2 a todos los pozos, posteriormente se dejó incubar a 4°C en cámara húmeda durante 16 – 18 horas.

Bloqueo de la placa:

- Se realizó el lavado de la placa retirando el excedente y agregando 300 µl de solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2 y solución Tween-20 al 0.05%) a cada pozo y dejando incubar por 5 minutos Se repitió el procedimiento una vez más con solución de lavado y otra con solución buffer PBS. Cuando la placa estuvo seca, se agregaron a todos los pozos 150 µl de solución de bloqueo (Leche descremada en polvo

al 10%) y 150 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH 9.2. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas. Posteriormente se realizó el lavado de la placa en las mismas condiciones que las antes mencionadas.

Desarrollo de la prueba:

- Se agregaron 100 µl de conjugado anti-IgG de conejo diluido en solución reguladora de citratos a dilución de 1:2000 a cada pozo de las hileras A y B. Se agregaron 100 µl de conjugado diluido en solución reguladora de citratos a dilución 1:4000 a cada pozo de las hileras C y D. Se agregaron 100 µl de conjugado diluido en solución reguladora de citratos a dilución 1:8000 a cada pozo de las hileras E y F. Y se agregaron 100 µl de conjugado anticonejo en dilución 1:10000 a cada pozo de las hileras G y H. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante una hora y se repitió el lavado de la placa como se mencionó anteriormente.

- Se agregaron 100 µl de solución desarrolladora de color para después incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Agregar 50 µl de solución de Paro. Se realizó la lectura de la placa a longitud de onda de 490 nm con un lector automático de ELISA (Labsystem™)

- RESULTADOS A.1

	Suero directo	suero 1:5	suero 1:10	suero 1:20	Suero 1:40	suero 1:80	
Suero	0.669	0.867	1.222	1.135	2.002	2.162	Conjugado
PBS	0.287	0.486	0.582	0.615	0.351	0.196	1:2000
Suero	0.580	0.725	0.865	1.257	1.536	1.667	Conjugado
PBS	0.131	0.211	0.288	0.262	0.170	0.161	1:4000
Suero	0.552	0.531	0.633	0.911	0.983	1.249	Conjugado
PBS	0.113	0.096	0.102	0.133	0.100	0.091	1:8000
Suero	0.345	0.438	0.546	0.718	0.843	1.076	Conjugado
PBS	0.160	0.588	0.113	0.095	0.087	0.092	1:10000

Tabla 7 - Resultados prueba A.1

Se hizo una resta entre las lecturas de las muestras con suero y los pozos usados como blancos comparativos usando PBS y se obtuvieron las siguientes diferencias de absorbancia:

	Suero directo	Suero 1:5	Suero 1:10	Suero 1:20	Suero 1:40	Suero 1:80
c = 1:2000	0.382	0.381	0.640	0.520	1.651	1.966
c= 1:4000	0.449	0.514	0.577	0.995	1.366	1.506
c=1:8000	0.439	0.435	0.531	0.778	0.883	1.158
C= 1:10000	0.185	-0.150	0.433	0.623	0.756	0.984

Tabla 8- Diferencias de absorbancia prueba A.1

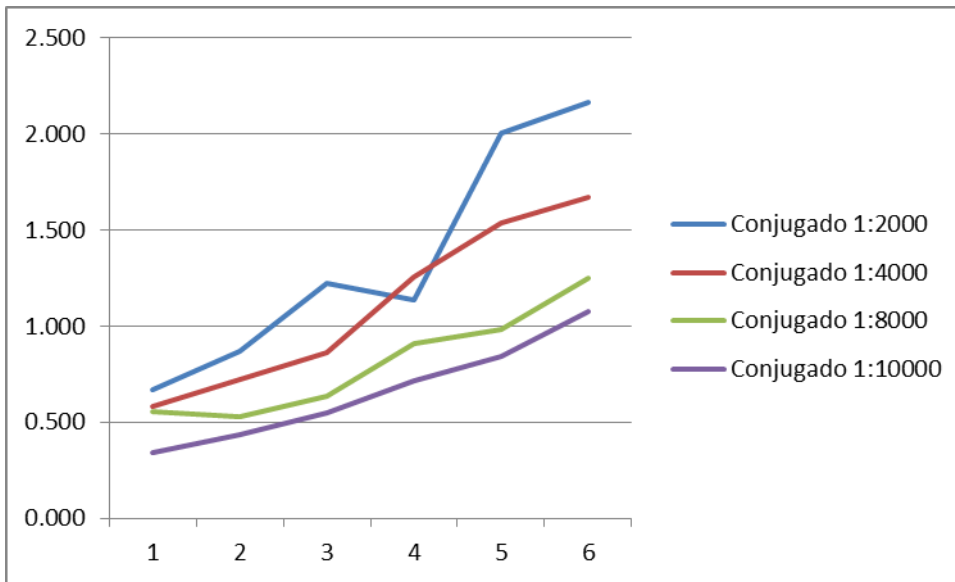


Gráfico 3 – Diferencias de absorbancia prueba A.1 – Se observa que a mayor dilución del suero, mayor diferencia de absorbancia. Las diluciones de conjugado 1:8000 y 1:10000 (línea verde y línea morada respectivamente) muestran un aumento más estable que las diluciones de conjugado 1:2000 y 1:4000 (línea azul y línea roja respectivamente)

Discusión prueba A.1:

De los primeros pasos a realizar en la estandarización de una prueba de ELISA es obtener lecturas cercanas a cero en los pozos blanco. Esto se logró utilizando una dilución del conjugado de 1:8000. Con esta dilución también se obtuvieron resultados representativos en los pozos muestra y la mayor diferencia de absorbancia.

También se buscan tener los resultados más altos en los pozos muestra. Estos números se obtuvieron al usar el suero a dilución 1:80. El contar con los mejores resultados a esta dilución sugiere una alta concentración de Inmunoglobulinas tipo IgM en el suero, ya que las IgM, al no ser reconocidas por el conjugado, interfieren los enlaces entre conjugado y las inmunoglobulinas de tipo IgG. Al diluir el suero también se diluyen las IgM y hay mayor espacio para que reaccionen las IgM.

Conclusión prueba A.1

La dilución a utilizar para el conjugado enzimático anti-conejo es de 1:8000.

La dilución a utilizar para el suero de conejo es 1:80.

El suero de conejo contiene altas concentraciones tanto de IgG como de IgM.

3.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar el virus

A) Empleando suero de conejo como suero de identificación

A.2) Detectar los anticuerpos tipo IgG específicos contra DHV en el suero hiperinmune de conejo.

Sensibilización con virus y células a diluciones decimales.

- Primero se hicieron diluciones del herpesvirus de delfín (DHV) con concentración original de 1×10^4 utilizando solución reguladora de fosfatos (PBS) a razón de 1:10 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000. También se hicieron las mismas diluciones en PBS de las células MDBK.

Sensibilización de la placa:

- Se utilizaron microplacas de poliestireno, con fondo plano, de 96 pozos.
- Se agregaron, 50 μ l de DHV directo y en sus diferentes diluciones a su respectivo pozo de la hilera A. También se agregaron 50 μ l de células MBDK directa y en sus diferentes diluciones en su respectivo pozo de la hilera B. La sensibilización con virus y células quedó como se muestra en la tabla 9:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Virus directo	Virus 1:10	Virus 1:100	Virus 1:1000	Virus 1:10000	Virus 1:100000	Virus 1:1000000	X
B	MDBK directo	MDBK 1:10	MDBK 1:100	MDBK 1:1000	MDBK 1:10000	MDBK 1:100000	MDBK 1:1000000	X

Tabla 1 - Sensibilización de prueba A.2

- Se agregaron a todos los pozos 50 μ l de solución carbonato-bicarbonato con pH de 9.2. Dejar incubar a 4°C en cámara húmeda durante 16 – 18 horas.

Bloqueo de la placa:

- Primero, se realizó el lavado de la placa retirando el excedente y agregando 300 μ l de solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2 y solución Tween-20 al 0.05%) a cada pozo y dejando incubar por 5 minutos Se repitió el procedimiento una vez más con solución de lavado y otra con solución buffer PBS, se agregaron a todos los pozos 150 μ l de solución de bloqueo (Leche descremada en polvo al 10%) y 150 μ l de solución carbonato-bicarbonato con pH 9.2. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas. Posteriormente se realizó el lavado de la placa en las mismas condiciones que las antes mencionadas.

Desarrollo de la prueba:

- A todos los pozos se agregaron 100 μ l suero hiperinmune de conejo contra DHV a dilución 1:80 en PBS. Se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Y se repitió el lavado en las mismas condiciones que como se menciona anteriormente.

- Después se agregaron 100 μ l de conjugado anti-IgG de conejo diluido en solución reguladora de citratos a dilución de 1:8000. Se dejó incubar a 37°C en cámara

húmeda durante una hora. Posteriormente se repitió el lavado de la placa como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 µl de solución desarrolladora de color. Se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. Por último, se agregaron 50 µl de solución de Paro. Se realizó la lectura de la placa a longitud de onda de 490 nm con un lector automático de ELISA. Los resultados fueron los que se muestran en la Tabla 10:

Diluciones	Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000	Controles	
Virus	0.890	0.738	0.351	0.268	0.222	0.185	0.219	0.126	sólo conjugado
Células	0.836	0.582	0.353	0.389	0.344	0.280	0.150	0.080	sólo sol. De color

Tabla 2 - Resultados prueba A.2

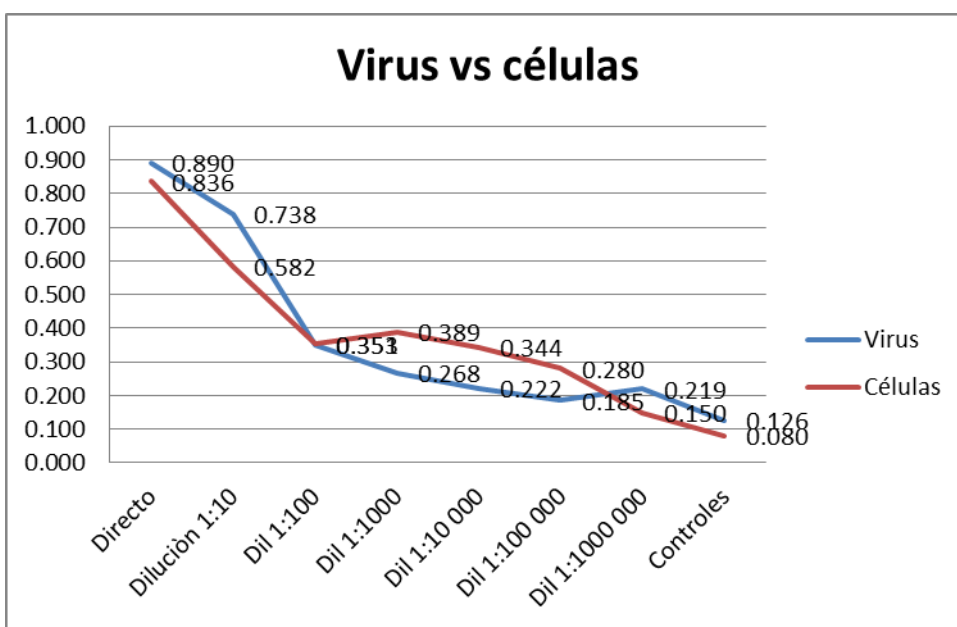


Gráfico 1- Resultados de prueba A.2 – Los resultados obtenidos con los pozos virus (línea azul) y los pozos blanco con células MDBK (línea roja) no muestran diferencias significativas. A mayor dilución de ambos menor es la respuesta.

Se obtuvieron las diferencias de absorbancia entre lo obtenido con las muestras con virus y células MBDK contra las muestras que contenían únicamente MBDK.

Diferencias de absorbancia							
Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000	Controles
0.054	0.156	-0.002	-0.121	-0.122	-0.095	0.069	0.046

Tabla 3 - Diferencias de absorbancia prueba A.2

Discusión prueba A.2:

Los resultados obtenidos en los pozos blanco, con sólo células MDBK, fueron similares a los resultados de los pozos muestra, con células MDBK y virus DHV. Esto sucedió porque

el inóculo con el que fueron inmunizados contenía proteínas de las células MDBK en las que fue cultivado el virus, provocando así que se produjeran anticuerpos contra las proteínas de las células MDBK al igual que se produjeron anticuerpos contra el virus DHV.

La mayor diferencia de absorbancia se dio utilizando la dilución 1:10 del virus y en diluciones mayores los resultados de los pozos blanco fueron más altos a los pozos muestra con DHV, determinando que a diluciones del virus de 1:100 o mayores ya no hay virus suficiente para ser detectado en la prueba.

Conclusiones prueba A.2:

Probar un método para retirar los anticuerpos contra las células MDBK y ponerlo a prueba repitiendo la prueba de ELISA.

Probar las mismas diluciones del virus usando el suero reducido en anticuerpos contra células MDBK.

3.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar el virus

A) Empleando suero de conejo como suero de identificación

A.2.1)Detectar los anticuerpos tipo IgG específicos contra DHV en el suero hiperinmune de conejo, reduciendo los anticuerpos IgG específicos contra células MDBK

- Con esta prueba se buscó aumentar la diferencia de absorbancia entre los pozos con virus y células MBDK y los pozos con puras células MDBK al adsorber los anticuerpos específicos contra MBDK al pasar el suero por un cultivo celular de MDBK.

- Adsorción de anticuerpos contra células MDBK:

- Primero se decantaron 5 ml de suero de conejo hiperinmune contra DHV en botellas Falcon de 20ml conteniendo un cultivo celular de células MDBK a una confluencia de 100%.

- La caja se mantuvo cerrada y a 37°C durante una hora. En ese intervalo se agitó suavemente cada 10 minutos para asegurar que todo el suero tenga contacto con las células. Se recuperó el suero y se decantó en una botella Falcon con cultivo celular de células MDBK en las mismas condiciones, repitiendo una vez más el proceso anterior, recuperando el suero al final.

- Por otro lado, se hicieron diluciones del virus aislado en células MDBK y de las células MDBK solas utilizando solución reguladora de fosfatos (PBS) a razón de 1:10 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000.

- Sensibilización de la placa:

- Se utilizaron microplacas de poliestireno, con fondo plano, de 96 pozos.
- Se sensibilizaron como en el experimento anterior, agregando, 50 µl de células MDBK con virus DHV directo y en sus diferentes diluciones a su respectivo pozo de la hilera A. También se agregaron 50 µl de células MBDK directa y en sus diferentes diluciones en su respectivo pozo de la hilera B. La sensibilización con virus y células quedó como se muestra en la tabla 12:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Virus directo	Virus 1:10	Virus 1:100	Virus 1:1000	Virus 1:10000	Virus 1:100000	Virus 1:1000000	X
B	MDBK directo	MDBK 1:10	MDBK 1:100	MDBK 1:1000	MDBK 1:10000	MDBK 1:100000	MDBK 1:1000000	X

Tabla 12 - Sensibilización de prueba A.2.1

- Después se agregaron, a todos los pozos, 50 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH de 9.2. Se dejó incubar a 4°C en cámara húmeda durante 16 – 18 horas.

- Bloqueo de la placa:

- Previamente se realizó el lavado de la placa retirando el excedente y agregando 300 µl de solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2 y solución Tween-20 al 0.05%) a cada pozo y dejando incubar por 5 minutos. Se repitió el procedimiento una vez más con solución de lavado y otra con solución buffer PBS. Posteriormente, cuando la placa estuvo seca, se agregaron a todos los pozos 150 µl de solución de bloqueo (Leche descremada en polvo al 10%) y 150 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH 9.2. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas. Posteriormente se realizó el lavado de la placa en las mismas condiciones que las antes mencionadas.

- Desarrollo de la prueba: Se agregaron, 100 µl de suero de conejo hiperinmune contra DHV, previamente adsorbido en cultivo celular, a concentración 1:80 en todos los pozos a utilizar, excepto en los pozos de la columna 8 destinados como controles. Se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Y se repitió el lavado en las mismas condiciones que como se menciona anteriormente.

- Después se agregaron 100 µl de conjugado anti-IgG de conejo diluido en solución reguladora de citratos a dilución de 1:8000 a todos los pozos excepto al segundo pozo de la columna 8. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante una hora. Posteriormente se repitió el lavado de la placa como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 µl de solución desarrolladora de color. Se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. Por último, se agregaron 50 µl de solución de Paro. Se realizó la lectura de la placa a longitud de onda de 490 nm con un lector automático de ELISA. Los resultados fueron los que se muestran en la Tabla 13:

Diluciones	Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000	Controles
Virus	1.260	0.945	0.571	0.803	0.591	0.645	0.590	0.655 sólo conjugado
Células	0.961	0.830	0.846	0.709	0.619	0.663	0.606	0.066 sólo sol. De color

Tabla 13- Resultados Prueba A.2.1

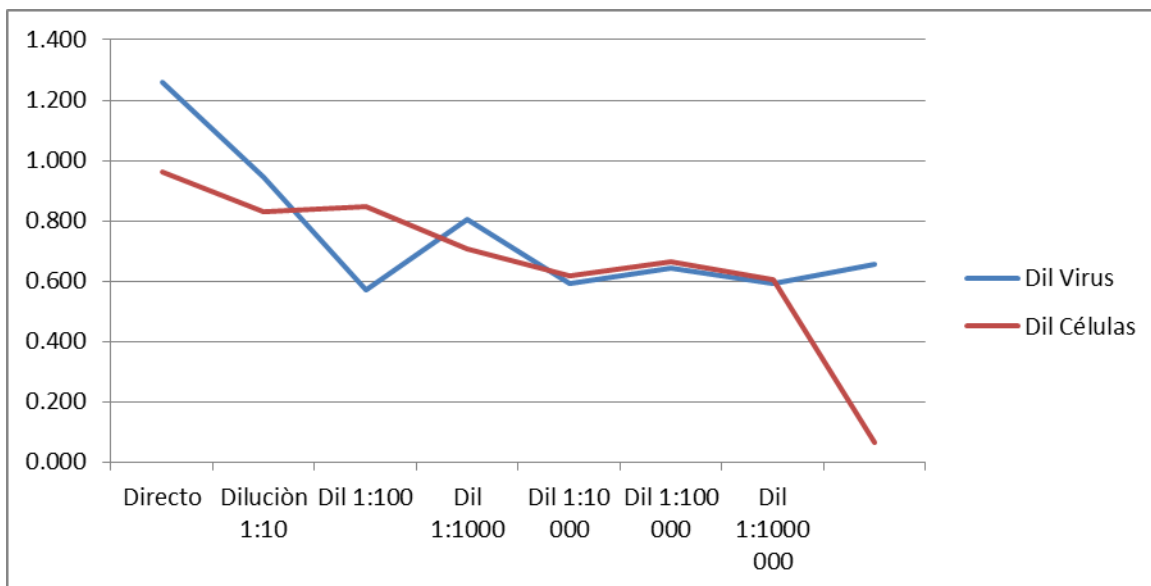


Gráfico 5 - Resultados de la Prueba A.2.1 – Existe diferencias significativas entre las muestras con virus (línea azul) y las muestras con células MDBK (línea roja) e las diluciones directa y 1:10. Los resultados de las diluciones 1:100 y mayores no son significativos.

A los resultados obtenidos en las muestras con virus + células se le restaron los resultados obtenidos en las muestras con sólo células, obteniendo las diferencias de absorbancia que se muestran en la tabla 14:

Diferencias de absorbancia							
Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10000	Dil 1:100000	Dil 1:1000000	Controles
0.299	0.115	-0.275	0.094	-0.028	-0.018	-0.016	0.589

Tabla 14 - Diferencias de absorbancia de Prueba A.2.1

Discusión prueba A.2.1:

Aumentó la diferencia de absorbancia entre las muestras de células MDBK con virus y de células MDBK solas en las diluciones directas y 1:10, respecto al experimento anterior; obteniendo esta vez resultados positivos. Esto demuestra que funcionó el método utilizado para reducir la cantidad de anticuerpos contra células MDBK en el suero.

Tanto los pozos de virus con células MDBK como las células MDBK solas presentaron resultados menores al control en las diluciones de 1:10000 y mayores, sugiriendo que a estas diluciones ya no hay ni virus ni proteínas detectables por la prueba.

Conclusiones prueba A.2.1:

Se obtuvo resultado positivo en el pozo usando el virus de manera directa y resultado sospechoso al usar el virus diluido a 1:10.

Proseguir a realizar la prueba de ELISA de captura utilizando el suero hiperinmune de ovino como suero de identificación.

3.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar el virus

B) Empleando suero de ovino como suero de captura

B.1)Prueba de ELISA de captura utilizando suero hiperimmune de ovino como primer sustrato.

- Se hicieron diluciones del virus DHV purificado utilizando solución reguladora de fosfatos (PBS) a razón de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000.

- Sensibilización de la placa:
- Se utilizaron microplacas de poliestireno, con fondo plano, de 96 pozos.
- Como primer sustrato se agregaron, 50 µl de suero de ovino hiperimmune contra DHV a concentración directa en todos los pozos de la placa
- Se agregaron a todos los pozos a 50 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH de 9.2. y se dejó incubar a 4°C en cámara húmeda durante 16 – 18 horas.

- Bloqueo de la placa:
- Primero se realizó el lavado de la placa retirando el excedente y agregando 300 µl de solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2 y solución Tween-20 al 0.05%) a cada pozo y dejando incubar por 5 minutos Se repitió el procedimiento una vez más con solución de lavado y otra con solución buffer PBS. Posteriormente, cuando la placa estuvo seca, se agregaron a todos los pozos 150 µl de solución de bloqueo (Leche descremada en polvo al 10%) y 150 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH 9.2. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas. Se repitió el lavado de la placa en las mismas condiciones que las antes mencionadas.

- Desarrollo de la prueba:
- A cada pozo sensibilizado se agregaron 100 µl de Virus DHV purificado. Se agregó a cada fila una dilución de virus purificado diferente. La fila H permaneció sin virus. La distribución del virus quedó como se muestran en la tabla 15 :

Desarrollo de prueba: Virus													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A						Virus 1:5							
B						Virus 1:10							
C						Virus 1:20							
D						Virus 1:40							
E						Virus 1:80							
F						Virus 1:160							
G						Virus 1:320							
H						s/virus, c/suero							

Tabla 15 - Desarrollo de la prueba B.1. Distribución del virus purificado DHV

- La placa se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda. En seguida se realizó el lavado de la placa en las mismas condiciones que como se menciona anteriormente.

- Se agregaron 100 µl de suero de conejo hiperinmune contra DHV. Se agregó a cada columna una de las siguientes diluciones: Directo, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80. Las columnas 6 y 12 permanecieron sin suero de identificación., quedando dos repeticiones de la prueba con las mismas condiciones como se muestra en la tabla 16:

Desarrollo de prueba: Suero												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	D					s c	D					s c
B	i					/ /	i					/ /
C	r	D 1	D 1	D 1	D 1	s v	r	D 1	D 1	D 1	D 1	s v
D	e	i : 1	i : 2	i : 4	i : 8	u i	e	i : 1	i : 2	i : 4	i : 8	u i
E	c	l 0	l 0	l 0	l 0	e r	c	l 0	l 0	l 0	l 0	e r
F	t					r u	t					r u
G	o					o s	o					o s
H												
	Prueba 1					Repetición						

Tabla 16 - Desarrollo de prueba B.1 Distribución del suero de captura

- La placa se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Se realizó el lavado en condiciones idénticas a las antes mencionadas.

- Se agregaron 100 µl de conjugado anti-IgG de conejo diluido en solución reguladora de citratos a dilución de 1:8000 a todos los pozos. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante una hora. Se repitió el lavado de la placa como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 µl de solución desarrolladora de color a todos los pozos. Se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. Se agregaron 50 µl de solución de Paro. Se realizó la lectura de la placa a longitud de onda de 490 nm con un lector automático de ELISA. Los resultados fueron los que se muestran en las tablas 17 y 18:

		Diluciones de suero de captura de conejo					
		Directo	Dilución 1:10	Dil 1:20	Dil 1:40	Dil 1:80	s/suero, c/virus
Diluciones del virus HVD	Virus 1:5	0.433	0.463	0.404	0.248	0.315	0.224
	Virus 1:10	0.440	0.395	0.389	0.400	0.344	0.169
	Virus 1:20	0.393	0.306	0.450	0.385	0.367	0.258
	Virus 1:40	0.399	0.431	0.307	0.337	0.370	0.223
	Virus 1:80	0.216	0.488	0.355	0.308	0.302	0.233
	Virus 1:160	0.366	0.404	0.256	0.253	0.282	0.196
	Virus 1:320	0.488	0.515	0.318	0.371	0.376	0.179
s/virus, c/suero		0.507	0.503	0.426	0.399	0.424	0.192
PRUEBA							

Tabla 17 - Resultados prueba B.1

		Diluciones de suero de captura de conejo					
		Directo	Dilución 1:10	Dil 1:20	Dil 1:40	Dil 1:80	s/suero, c/virus
Diluciones del virus HVD	Virus 1:5	0.426	0.462	0.474	0.424	0.443	0.165
	Virus 1:10	0.377	0.487	0.485	0.320	0.400	0.325
	Virus 1:20	0.403	0.513	0.462	0.556	0.375	0.222
	Virus 1:40	0.390	0.468	0.531	0.448	0.426	0.211
	Virus 1:80	0.470	0.458	0.467	0.371	0.409	0.168
	Virus 1:160	0.443	0.417	0.457	0.360	0.349	0.249
	Virus 1:320	0.447	0.521	0.473	0.427	0.385	0.211
s/virus, c/suero		0.407	0.343	0.510	0.507	0.365	0.221
REPETICIÓN							

Tabla 18- Resultados repetición prueba B.1

Se promediaron los resultados de los pozos en condiciones idénticas de la prueba B.1 y su repetición obteniendo los siguientes resultados:

		Diluciones de suero de captura de conejo					
		Directo	Dilución 1:10	Dil 1:20	Dil 1:40	Dil 1:80	s/suero, c/virus
Diluciones del virus HVD	Virus 1:5	0.430	0.463	0.439	0.336	0.379	0.195
	Virus 1:10	0.409	0.441	0.437	0.360	0.372	0.247
	Virus 1:20	0.398	0.410	0.456	0.471	0.371	0.240
	Virus 1:40	0.395	0.450	0.419	0.393	0.398	0.217
	Virus 1:80	0.343	0.473	0.411	0.340	0.356	0.201
	Virus 1:160	0.405	0.411	0.357	0.307	0.316	0.223
	Virus 1:320	0.468	0.518	0.396	0.399	0.381	0.195
s/virus, c/suero		0.457	0.423	0.468	0.453	0.395	0.207
PROMEDIO DE PRUEBA Y REPETICIÓN							

Tabla 19- Promedio entre prueba B.1 y su repetición

Discusión prueba B.1:

La lectura del pozo doble negativo (H6 – Sin virus DHV y sin suero de captura de conejo) presentó una lectura muy alta, sugiriendo la reacción cruzada del suero ovino de captura y el conjugado anti-conejo.

Las lecturas de los pozos control sin virus y con suero de conejo de captura (fila H) presentaron lecturas mayores a aquellos pozos con la prueba completa, confirmando la interacción entre los anticuerpos de conejo y los anticuerpos de ovino. Esta reacción cruzada entre los anticuerpos de estas especies hace que la prueba sea inválida. Se sugiere realizar la prueba de ELISA utilizando otra especie para la obtención del suero de captura.

Conclusión prueba B.1:

Resultados más altos en las lecturas del grupo control que en las lecturas de la prueba hacen que la prueba sea inválida.

Utilizar una especie diferente a la ovina para obtener el suero de captura.

Realizar la prueba de ELISA utilizando el suero de conejo de manera directa como suero de captura.

3.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar el virus

C) Empleando suero de conejo como captura

C.1) Realizar una prueba de captura de ELISA utilizando suero de conejo como suero de captura y realizar dos repeticiones en condiciones idénticas buscando reproducir los resultados obtenidos en la prueba.

- Se utilizó el suero de conejo hiperinmune contra DHV previamente adsorbido en el cultivo celular de células MDBK como se describió en la prueba anterior.

- Se hicieron diluciones del virus DHV aislado en células MDBK y de las células MDBK solas utilizando solución reguladora de fosfatos (PBS) a razón de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000.

- Sensibilización de la placa:

- Se utilizaron microplacas de poliestireno, con fondo plano, de 96 pozos.

- Como primer sustrato se agregaron, 50 µl de suero de conejo hiperinmune contra DHV a concentración directa en todos los pozos a utilizar, excepto en los pozos de la columna 8 destinados como controles.

- Agregar a cada pozo 50 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH de 9.2. Dejar incubar a 4°C en cámara húmeda durante 16 – 18 horas.

- Bloqueo de la placa:

- Se realizó el lavado de la placa retirando el excedente y agregando 300 µl de solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2 y solución Tween-20 al 0.05%) a cada pozo y dejando incubar por 5 minutos Se repitió el procedimiento una vez más con

solución de lavado y otra con solución buffer PBS. Posteriormente, cuando la placa estuvo seca, se agregaron a todos los pozos 150 µl de solución de bloqueo (Leche descremada en polvo al 10%) y 150 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH 9.2. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas. Posteriormente se realizó el lavado de la placa en las mismas condiciones que las antes mencionadas.

- Desarrollo de la prueba:

- Se agregaron 100 µl de Virus DHV con título de 10^4 con células MDBK en sus diferentes diluciones en las filas A, C y E. Aparte se agregaron células MDBK solas en diferentes diluciones en las filas B, D y F. Las muestras quedaron colocadas como se muestra en la tabla 20:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Virus + MDBK directo	Virus + MDBK 1:10	Virus + MDBK 1:100	Virus + MDBK 1:1000	Virus + MDBK 1:10000	Virus + MDBK 1:100000	Virus + MDBK 1:1000000	X
B	MDBK directo	MDBK 1:10	MDBK 1:100	MDBK 1:1000	MDBK 1:10000	MDBK 1:100000	MDBK 1:1000000	X
C	Virus + MDBK directo	Virus + MDBK 1:10	Virus + MDBK 1:100	Virus + MDBK 1:1000	Virus + MDBK 1:10000	Virus + MDBK 1:100000	Virus + MDBK 1:1000000	X
D	MDBK directo	MDBK 1:10	MDBK 1:100	MDBK 1:1000	MDBK 1:10000	MDBK 1:100000	MDBK 1:1000000	X
E	Virus + MDBK directo	Virus + MDBK 1:10	Virus + MDBK 1:100	Virus + MDBK 1:1000	Virus + MDBK 1:10000	Virus + MDBK 1:100000	Virus + MDBK 1:1000000	X
F	MDBK directo	MDBK 1:10	MDBK 1:100	MDBK 1:1000	MDBK 1:10000	MDBK 1:100000	MDBK 1:1000000	X

Tabla 20 - Desarrollo de la prueba C.1

- La placa se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda y se repitió el lavado en las mismas condiciones que como se menciona anteriormente.

- Se agregaron 100 µl de suero de conejo hiperinmune contra DHV a dilución de 1:80 en todos los pozos, excepto los de la columna 8. Se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se realizó el lavado de la placa en condiciones idénticas a las antes mencionadas.

- Se agregaron 100 µl de conjugado anti-IgG de conejo diluido en solución reguladora de citratos a dilución de 1:8000 a todos los pozos. La placa se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante una hora. Se repitió el lavado de la placa como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 µl de solución desarrolladora de color. Se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se agregaron 50 µl de solución de Paro. Se realizó la lectura de la placa a longitud de onda de 490 nm con un lector automático de ELISA. Los resultados fueron los que se muestran en la tabla 21:

Diluciones	Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000	Controles	
Virus	1.094	0.956	0.894	0.858	0.783	0.725	0.656	0.880	sólo conjugado
Células	0.999	0.884	0.780	0.806	0.742	0.789	0.739	0.066	sólo sol. De color
Virus	1.149	0.885	0.917	0.862	0.776	0.723	0.605	0.714	sólo conjugado
Células	1.052	0.854	0.691	0.670	0.658	0.590	0.668	0.061	sólo sol. De color
Virus	1.146	0.991	0.746	0.909	0.773	0.717	0.646	0.819	sólo conjugado
Células	0.914	0.823	0.706	0.704	0.738	0.623	0.652	0.063	sólo sol. De color

Tabla 21 - Resultados de prueba C.1

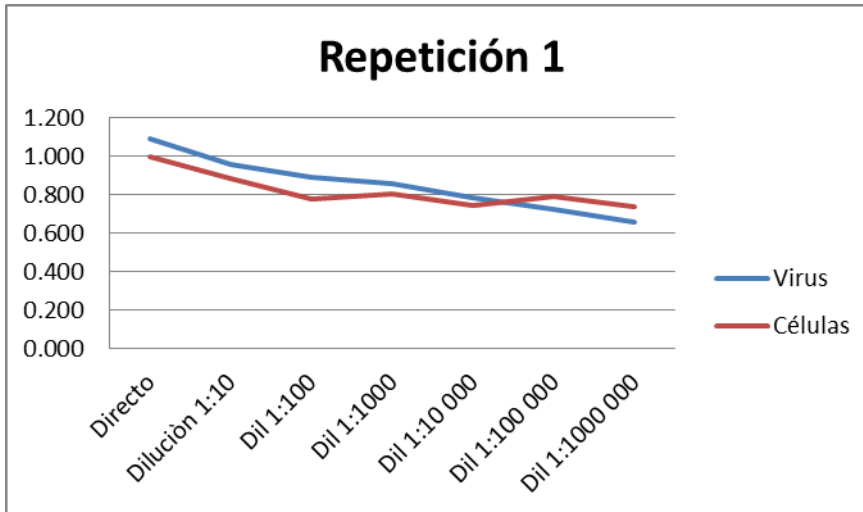


Gráfico 6 - Resultados de Repetición 1 (Filas A vs B) de prueba C.1 – Los resultados arrojan una línea decreciente correspondiente al aumento en las diluciones. Línea azul: muestras de pozos con virus y células MDBK. Línea roja: muestras con células MDBK.

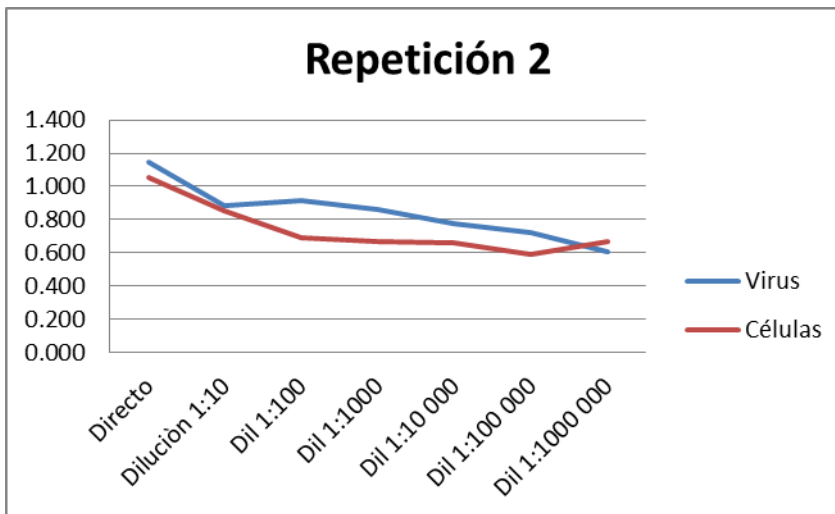


Gráfico 7 - Resultados de Repetición 2 (Filas C vs D) de prueba C.1 - Los resultados arrojan una línea decreciente correspondiente al aumento en las diluciones. Línea azul: muestras de pozos con virus y células MDBK. Línea roja: muestras con células MDBK.

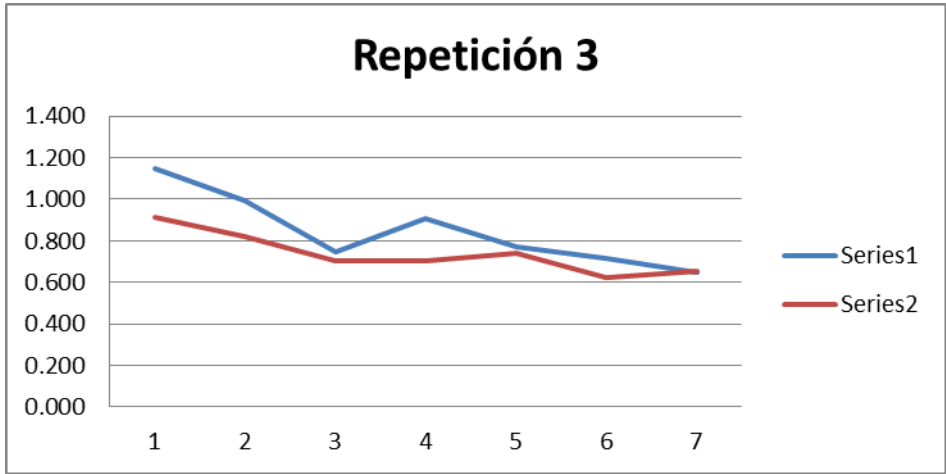


Gráfico 8 - Resultados de Repetición 3 (Filas E vs F) de prueba C.1 - Los resultados arrojan una línea decreciente correspondiente al aumento en las diluciones. Línea azul: muestras de pozos con virus y células MDBK. Línea roja: muestras con células MDBK.

Se calcularon los promedios de las muestras en condiciones idénticas, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 22:

Diluciones	Promedio							Controles
	Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000	
Virus	1.130	0.944	0.852	0.876	0.777	0.722	0.636	0.804
Células	0.988	0.854	0.726	0.727	0.713	0.667	0.686	0.063

Tabla 22 – Promedios de las 3 repeticiones de la prueba C.1

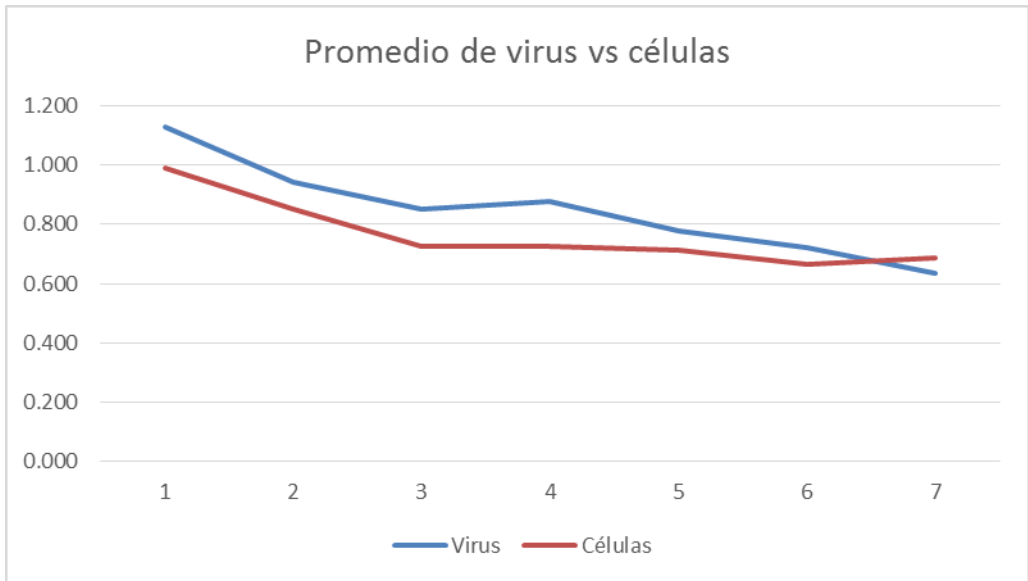


Gráfico 9 - Promedio de las 3 repeticiones de la prueba C.1 - Los resultados arrojan una línea decreciente correspondiente al aumento en las diluciones. El promedio de las muestras bajo las mismas condiciones arrojan un gráfico más estable.

Se restaron los resultados obtenidos de las muestras con sólo células a los resultados de las muestras de virus con células, obteniendo las diferencias de absorbancia que se muestran en la tabla 23:

Diferencias de absorbancia								
Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000	Controles	
0.095	0.072	0.114	0.052	0.041	-0.064	-0.083	0.814	
0.097	0.031	0.226	0.192	0.118	0.133	-0.063	0.653	
0.232	0.168	0.040	0.205	0.035	0.094	-0.006	0.756	

Tabla 23 - Diferencias de absorbancia de cada repetición de la prueba C.1

Se calcularon los promedios de las diferencias de absorbancia de las muestras bajo las mismas condiciones, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 24:

Promedio de diferencias de absorbancia								
Diluciones	Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000	Controles
	0.141	0.090	0.127	0.150	0.065	0.054	-0.051	0.741

Tabla 24 - Promedios de las diferencias de absorbancia de todas las repeticiones en la prueba C.1

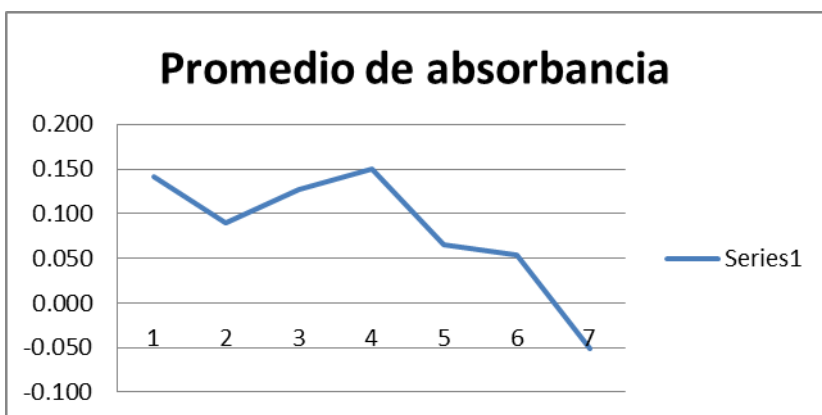


Gráfico 10 - Promedios de las diferencias de absorbancia de todas las repeticiones en la prueba C.1

Discusión prueba C.1:

Todas las repeticiones presentaron una gráfica lineal decreciente correspondiente al aumento en las diluciones del virus y las células.

Las diluciones de 1:10000 y mayores dieron resultado negativo, indicando que la cantidad de virus ya no es detectable por la prueba.

Las diferencias de absorbancia se mantienen en cantidades alrededor de 0.1 lo que en prueba de ELISA se interpreta como "Sospechoso". Para aumentar la diferencia de absorbancia se sugiere realizar la prueba con virus purificado para eliminar las proteínas de células MDBK que interfieran con los resultados.

Conclusión prueba C.1:

A mayor dilución del virus menos es la lectura obtenida en la prueba.

El virus DHV en título 10^4 no es detectable en diluciones de 1:10000 y mayores.

Realizar la prueba utilizando virus purificado.

3.- Estandarizar una prueba de ELISA de captura para detectar el virus

C) Empleando suero de conejo como captura

C.2) Repetición de la prueba A.3 pero utilizando diluciones de virus purificado en lugar de virus con células MDBK.

- Se hicieron diluciones del virus DHV purificado utilizando solución reguladora de fosfatos (PBS) a razón de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000.

- Sensibilización de la placa:
 - Se utilizaron microplacas de poliestireno, con fondo plano, de 96 pozos.
 - Como primer sustrato se agregaron, 50 μ l de suero de conejo hiperinmune contra DHV a concentración directa en los pozos 1 a 7 de las filas A y B. Los pozos de la columna 8 se dejaron vacíos para ser destinados como controles.
 - Se agregaron a todos los pozos a 50 μ l de solución carbonato-bicarbonato con pH de 9.2. y se dejó incubar a 4°C en cámara húmeda durante 16 – 18 horas.

- Bloqueo de la placa:
 - Primero se realizó el lavado de la placa retirando el excedente y agregando 300 μ l de solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2 y solución Tween-20 al 0.05%) a cada pozo y dejando incubar por 5 minutos Se repitió el procedimiento una vez más con solución de lavado y otra con solución buffer PBS. Posteriormente, cuando la placa estuvo seca, se agregaron a todos los pozos 150 μ l de solución de bloqueo (Leche descremada en polvo al 10%) y 150 μ l de solución carbonato-bicarbonato con pH 9.2. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas. Se repitió el lavado de la placa en las mismas condiciones que las antes mencionadas.

- Desarrollo de la prueba:
 - A cada pozo sensibilizado se agregaron 100 μ l de Virus DHV purificado a diferentes diluciones, quedando dos repeticiones, como se muestran en la tabla 25:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Virus DHV directo	Virus DHV 1:10	Virus DHV 1:100	Virus DHV 1:1000	Virus DHV 1:10000	Virus DHV 1:100000	Virus DHV 1:1000000	X
B	Virus DHV directo	Virus DHV 1:10	Virus DHV 1:100	Virus DHV 1:1000	Virus DHV 1:10000	Virus DHV 1:100000	Virus DHV 1:1000000	X

Tabla 25 - Desarrollo de la prueba C.2

- La placa se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda. En seguida se realizó el lavado de la placa en las mismas condiciones que como se menciona anteriormente.

- Se agregaron 100 µl de suero de conejo hiperimmune contra DHV a dilución de 1:80, a todos los pozos excepto los de la columna 8. Se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Se realizó el lavado en condiciones idénticas a las antes mencionadas.

- Se agregaron 100 µl de conjugado anti-IgG de conejo diluido en solución reguladora de citratos a dilución de 1:8000 a todos los pozos excepto al pozo B8. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante una hora. Se repitió el lavado de la placa como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 µl de solución desarrolladora de color a todos los pozos. Se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. Se agregaron 50 µl de solución de Paro. Se realizó la lectura de la placa a longitud de onda de 490 nm con un lector automático de ELISA. Los resultados fueron los que se muestran en la tabla 26:

Diluciones	Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000	Controles	
Virus	2.718	1.541	1.871	1.913	1.208	1.539	1.610	1.304	sólo conjugado
Repetición	1.861	2.112	1.909	1.889	1.984	2.030	1.781	0.073	sólo sol. De color

Tabla 26 - Resultados prueba C.2

Se promediaron los resultados de ambas repeticiones obteniendo lo que se muestra en la tabla 27:

	Directo	Dilución 1:10	Dil 1:100	Dil 1:1000	Dil 1:10 000	Dil 1:100 000	Dil 1:1000 000
Media	2.290	1.827	1.890	1.901	1.596	1.785	1.696

Tabla 27 - Promedio de ambas repeticiones de prueba C.2

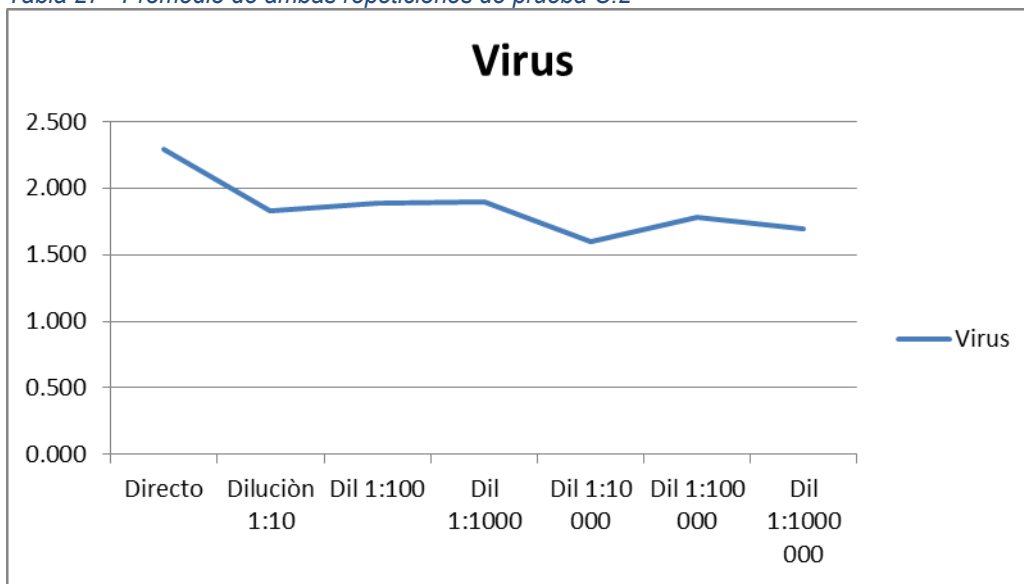


Gráfico 12 - Promedio de ambas repeticiones de prueba C.2 – Los resultados muestran una línea decreciente acorde al aumento de diluciones del virus.

Discusión de resultados prueba C.2:

Los resultados del promedio de ambas repeticiones muestran una línea decreciente como se esperaba al aumentar las diluciones del virus de manera lineal.

Se obtuvo una diferencia media de 0.4 entre el pozo con virus utilizado de manera directa y el pozo con virus diluido 1:10, resultado que indica que la prueba funciona bien bajo estas concentraciones. Sin embargo, las diferencias entre los resultados correspondientes a una dilución y otra no resultaron con las diferencias esperadas entre sí. Esto, sumado a que el grupo control sin virus y con conjugado anti-conejo dio un resultado alto, sugiere que el conjugado pueda reaccionar tanto con los anticuerpos de identificación ligados al virus como con los anticuerpos de captura que hayan quedado libres al fondo del pozo.

Se sugiere realizar la prueba de ELISA utilizando suero de otra especie como suero de captura, para evitar el ruido de fondo que provoca el conjugado anti-conejo al reaccionar con el suero de captura y para obtener resultados más exactos.

Conclusión prueba C.2:

El ruido de fondo producido por la reacción del conjugado anti-conejo con los anticuerpos del suero de captura no permiten que las diferencias entre los pozos muestra sean muy diferentes entre sí, así como también origina una lectura muy alta en el pozo control.

Utilizar una especie diferente a la de conejo y ovino para obtener el suero de captura.

Objetivo 4.- Determinar sensibilidad de la prueba en tejidos de delfín inoculados experimentalmente.

Prueba 4.1 – Comparar los resultados obtenidos utilizando diluciones 1:100 de virus HVD purificado, hígado de delfín sólo e hígado de delfín inoculado experimentalmente con virus HVD purificado.

- Primero se tomó 1 cm² de una muestra de hígado de delfín congelado, tomada de un varamiento de delfín en vida libre, se maceró y se diluyó en 6 ml de PBS estéril. A continuación, la muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se desechó la pastilla.

- Se repitió el proceso con hígado de pollo libre de patógenos.

- Se prepararon las siguientes diluciones: Virus DHV purificado utilizando solución reguladora de fosfatos (PBS) a razón 1:100 y virus DHV en hígado de delfín a razón de 1:100.

- Sensibilización de la placa:

- Se utilizaron microplacas de poliestireno, con fondo plano, de 96 pozos.

- Se sensibilizó con 50 µl de suero de conejo hiperinmune contra DHV a concentración directa en los pozos 1, 2 y 3 de las filas A y B.

- Se agregaron 50 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH de 9.2 a cada pozo. Se dejó incubar a 4°C en cámara húmeda durante 16 – 18 horas.

- Bloqueo de la placa:

- Primero se realizó el lavado de la placa retirando el excedente y agregando 300 µl de solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2 y solución Tween-20 al 0.05%) a cada pozo y dejando incubar por 5 minutos antes de volver a decantar la placa. Se repitió el procedimiento una vez más con solución de lavado y otra con solución buffer PBS. Posteriormente, cuando la placa estuvo seca, se agregaron a todos los pozos 150 µl de solución de bloqueo (Leche descremada en polvo al 10%) y 150 µl de solución carbonato-bicarbonato con pH 9.2. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas. Por último, se realizó el lavado de la placa en las mismas condiciones que las antes mencionadas.

- Desarrollo de la prueba:

- Se agregaron 100 µl de Virus DHV purificado a dilución 1:100 en los pozos A1 y B1; 100 µl de Virus DHV purificado diluido 1:100 en hígado de delfín en los pozos A2 y B2; 100 µl de hígado de delfín diluido 1:100 en PBS estéril en los pozos A3 y B3 (Muestra); y 100 µl de hígado de pollo libre de patógenos (LDP) en los pozos A4 y B4. La placa quedó como se muestra en la tabla 28:

	1	2	3	4	5
A	DHV en PBS 1:100	DHV en Hígado Delfín 1:100	Hígado Delfín Directo (Muestra)	Hígado Pollo LDP	X

B	DHV en PBS 1:100	DHV en Hígado Delfín 1:100	Hígado Delfín Directo (Muestra)	Hígado pollo LDP	X
---	------------------	----------------------------	----------------------------------	------------------	---

Tabla 28 - Desarrollo de la prueba 4.1

- La placa se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Se repitió el lavado en las mismas condiciones que como se menciona anteriormente.

- Se agregaron 100 µl de suero de conejo hiperinmune contra DHV a dilución de 1:80 a todos los pozos de las columnas 1, 2 y 3. Se dejó incubar durante una hora a 37°C en cámara húmeda y se realizó el lavado en condiciones idénticas a las antes mencionadas.

- Se agregaron 100 µl de conjugado anti-IgG de conejo diluido en solución reguladora de citratos a dilución de 1:8000 a todos los pozos excepto el pozo B4. Se dejó incubar a 37°C en cámara húmeda durante una hora. Se repitió el lavado de la placa como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 µl de solución desarrolladora de color a todos los pozos. La placa se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se agregaron 50 µl de solución de Paro. Se realizó la lectura de la placa a longitud de onda de 490 nm con un lector automático de ELISA. Los resultados fueron los que se muestran en la tabla 29:

Tipo de Muestra	Virus en PBS 1:100	Virus en hígado 1:100	Muestra	Hígado pollo LDP	Controles	
Prueba	1.114	1.241	1.261	1.001	0.889	sólo conjugado
Repetición	1.149	1.265	1.158	0.944	0.093	sólo sol. De color
	Virus en PBS 1:100	Virus en hígado 1:100	Muestra	Hígado pollo LDP		
Media	1.132	1.253	1.210	0.973		

Tabla 29 - Resultados de prueba 4.1

Diferencias de absorbancia	
Entre virus en PBS y virus en Hígado	0.122
Entre virus en hígado y la muestra	0.044
Entre muestra e hígado de pollo	0.237

Tabla 30 - Comparación de diferencias de absorbancia entre muestras de prueba 4.1

Discusión prueba 4.1:

Las lecturas de los pozos Muestra son mayores a las que se obtuvieron en los pozos control.

Los pozos que contienen virus, hígado con virus y la muestra obtuvieron resultados mayores a los de los pozos con hígado de pollo libre de patógenos. Sin embargo, la diferencia de absorbancia entre los resultados no son mayores a 0.2 (cantidad que denota sólo ser sospechoso) Esto puede deberse a la reacción cruzada entre el conjugado anti-conejo y los anticuerpos de conejo en la capa de sensibilización.

La diferencia entre el hígado en su estado natural y el hígado inoculado experimentalmente con virus DHV purificado no es representativa, lo que sugiere que la muestra de hígado utilizada sea positiva a DHV.

Conclusión prueba 4.1:

La prueba detecta virus DHV diluido en proteínas de hígado.

La muestra de hígado de delfín utilizado fue positivo a presencia de DHV.

CONCLUSIONES GENERALES:

La prueba de ELISA de captura no puede ser sensibilizada con suero de ovino si se usa conjugado anti-conejo. El conjugado anti-conejo reacciona contra el suero ovino pudiendo dar falsos positivos. Se sugiere realizar pruebas de reacción cruzada para determinar una especie más adecuada para obtener el suero para sensibilizar.

Aunque la prueba de ELISA de captura usando suero de conejo para sensibilizar y como suero de identificación arroja resultados positivos y negativos, no es una prueba de confianza. Ya que el conjugado puede reaccionar tanto con los anticuerpos de identificación como con los anticuerpos de sensibilización que se quedaron sin ocupar. Esto causa que los resultados positivos sólo lleguen a valores de “sospechoso”, con diferencias de 0.1-0.3 entre muestras positivas y sus controles. Lo que lleva a la misma sugerencia que en el punto anterior.

ANEXO DE MATERIALES Y SOLUCIONES

Placa poliestireno de 96 pozos con fondo plano de alta adherencia marca Costar

MATERIALES

- Para Sensibilización de la placa
 - Herpesvirus de Delfín aislado en México en cultivo celular de células MBDK
 - Células cepa MBDK
 - Solución Carbonato/Bicarbonato al 0.05 M y p.H. de 9.6

- Para preparar Solución Carbonato/Bicarbonato 0.05
 - Carbonato de sodio 1.5 gramos
 - Bicarbonato de sodio 2.93 gramos
 - Agua destilada c.b.p. 1000 ml
 - Neutralizar el p.H. a 9.6 con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.
 - Mantener en refrigeración.

- Para realizar el lavado de la placa
 - Solución buffer de lavado para ELISA
 - Solución reguladora de fosfatos con p.H. 7.2 (PBS 1x)

- Para preparar Solución buffer de lavado para ELISA
 - Solución reguladora de fosfatos a 10x (PBS 10x) 100 ml
 - Twen 20 0.5 ml
 - Agua destilada 900 ml

- Para preparar solución reguladora de fosfatos 10x (PBS 10x)
 - Cloruro de sodio 8 gramos
 - Cloruro de potasio 0.2 gramos
 - Fosfato de sodio dibásico 1.44 gramos
 - Fosfato de potasio monobásico 0.24 gramos
 - Para preparar Solución Reguladora de Fosfatos 1x (PBS 1x) se diluyen 100 ml de PBS 10 x con 900 ml de agua destilada.

- Para el Bloqueo de la Placa
 - Solución de leche descremada al 10%
 - Solución carbonato/bicarbonato

- Para preparar Solución de leche descremada al 10%
 - Leche descremada y deslactosada en polvo 10 gramos
 - Agua destilada 100 ml

- Para el desarrollo de la Prueba
 - Conjugado anti-anticuerpos de conejo IgG a dilución 1:8000 en solución reguladora de citratos.
 - Solución desarrolladora de color
 - Solución de Paro

- Para preparar solución reguladora de Citratos
 - Ácido cítrico al 0.1 M 24.3 ml
 - Fosfatos de sodio dibásico al 0.2 M 25.7 ml
 - Agua destilada 50 ml
 - Mantener en refrigeración.

- Para preparar ácido cítrico al 0.1 M
 - Ácido cítrico 2.1 gramos
 - Agua destilada 100 ml
 - Mantener en refrigeración

- Para preparar Fosfato de sodio dibásico al 0.2 M
 - Fosfato de sodio dibásico 5.36 gramos
 - Agua destilada 100 ml
 - Mantener en refrigeración.

- Para preparar Solución de Color
 - Solución Reguladora de Citratos 2.5 ml
 - OPD (O-phenylenediamine) 5mg
 - Peróxido de hidrógeno concentrado 20 μ l
 - La solución se prepara al momento de su uso. La concentración del Peróxido de Hidrógeno debe ser mayor al 30%

- Para preparar Solución de Paro
 - Ácido orthofosfórico 0.6 ml
 - Agua destilada 10 ml
 - Mantener en refrigeración

**BIBLIOGRAFÍA INCLUIR LAS DOS CITAS DE PÁGINAS WEB ADECUADAMENTE,
LEER EN VETERINARIA MÉXICO COMO SE CITAN.**

- 1) Crowther, J.R., (2001) THE ELISA GUIDEBOOK, Methods in Molecular Biology, Volumen 149, Ed. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, Estados Unidos.
- 2) Dierauf, L.A. y Gulland, F. M. D., (2001) CRC HANDBOOK OF MARINE MAMMAL MEDICINE, Ed. CRC Press, 2ª edición, Estados Unidos.
- 3) Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K., (1996) IMMUNOASSAY, Ed. Academic Press, Nueva York, Estados Unidos.
- 4) Crowther, J.R., (1995) ELISA, THEORY AND PRACTICE, Methods in Molecular Biology, Volumen 42, , Ed. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, Estados Unidos.
- 5) Ternyick, T. y Avrameas, S., (1989) TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS, Ed. Grupo Editorial Iberoamérica, México, D.F.
- 6) Van Elk, C.E., et. al., (2009) GENITAL HERPESVIRUS IN BOTTLENOSE DOLPHINS TURSIOPS TRUNCATUS CULTIVATION, EPIDEMIOLOGY, AND ASSOCIATED PATHOLOGY, Revista Journal of Wildlife Diseases, Volumen 45(4), pp. 895–906, Wildlife Disease Association.
- 7) Rehtanz, M., et. Al., (2009) BOTTLENOSE DOLPHIN (TURSIOPS TRUNCATUS) PAPILLOMAVIRUSES: VACCINE ANTIGEN CANDIDATES AND SCREENING TEST DEVELOPMENT. Elsevier: Veterinary Microbiology, Volumen 133, pp. 43-53
- 8) Rehtanz, M., et. Al., (2012) PAPILLOMAVIRUSES AND HERPESVIRUSES: WHO IS WHO IN GENITAL TUMOR DEVELOPMENT OF FREE-RANGING ATLANTIC BOTTLENOSE DOLPHINS (TURSIOPS TRUNCATUS)?, Elsevier: Veterinary Microbiology, Volumen 160, pp. 297-304.
- 9) Beineke, A., (2010) IMMUNOLOGY OF WHALES AND DOLPHINS, Elsevier, Veterinary Immunology and Immunopathology, Volumen 133, pp. 81–94
- 10) Esperón, F., (2008) Herpes simplex-like infection in a bottlenose dolphin stranded in the Canary Islands, Diseases of Aquatic Organisms, Vol. 81: 73–76.
- 11) Harlow, E. y Lane, D. (1988), ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, Estados Unidos.
- 12) Pathak, S., y Palan, U., (2005) IMMUNOLOGY: ESSENTIAL AND FUNDAMENTAL, 2º ed., Ed. Science Publishers, Inc., New Hampshire, Estados Unidos.
- 13) Rojas, W. et. al., (2012) INMUNOLOGÍA DE ROJAS, 16º ed., Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.
- 14) Cornelis E. et. Al. (2009) GENITAL HERPESVIRUS IN BOTTLENOSE DOLPHINS (TURSIOPS TRUNCATUS): CULTIVATION, EPIDEMIOLOGY, AND ASSOCIATED PATHOLOGY, Journal of Wildlife Diseases, 45(4):895-906, Wildlife Disease Association