

53 2-jun.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
CUAUTITLAN

Estudio Comparativo de la Sensibilidad de dos Pruebas de Laboratorio para el Diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky en Cerdos.

T E S I S

Que para obtener el Título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

VICTOR MANUEL SUZAN MARTINEZ

DIRECTOR:

MVZ. MSC. PHD. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

C O N T E N I D O

- I INTRODUCCION
- II MATERIAL Y METODOS
- III LISTA DE LABORATORIOS
- IV RESULTADOS
- V DISCUSION
- VI BIBLIOGRAFIA

I INTRODUCCION

Fue en el año de 1902 cuando el Dr. Aujeszky publicó el primer artículo acerca de la pseudorabia, realizando la descripción de la enfermedad al observarla en bovinos afectados en Hungría, su país natal. Las investigaciones realizadas por Aujeszky al reproducir la enfermedad en ovinos, perros y gatos, y al adaptar el agente causal al conejo, lo llevaron a demostrar la sintomatología diferencial entre este padecimiento y la rabia, enfermedad viral ya conocida y descrita por Pasteur (7 y 15).

Actualmente la enfermedad de Aujeszky se encuentra ampliamente distribuida en el continente europeo, ocasionando, en algunos países, graves pérdidas económicas (15 y 17).

En América fue notificada inicialmente por Shope en 1931, aunque existen pruebas de su presencia en los Estados Unidos por lo menos desde 1813, en donde era conocida con la sinominia de "comezón loca" (mad itch) (15).

Los primeros reportes sobre la enfermedad de Aujeszky en México son realizados por Bachtold en 1945, describiendo la sintomatología clásica del padecimiento en bovinos de los Estados de Aguascalientes y Guanajuato (8 y 17). Debido a que la pseudorabia es terminal en el bovino, no se reportó nuevamente la enfermedad en los siguientes 25 años, hasta que ocurrió un brote en bovinos del Estado de Guerrero en 1971 (8).

En 1973 se notificó un brote serio de Aujeszky en cerdos, presentándose en una granja del Estado de Jalisco que frecuentemente importaba animales para pie de cría de los Estados Unidos. Durante ese año y el siguiente la enfermedad prevaleció en la zona provocando la muerte de 3,500 lechones (17).

La pseudorrabia se extendió en los primeros meses de 1975 a los Estados de Guanajuato y Michoacán afectando porcinos y perros. En meses posteriores del mismo año se notificó en granjas del Estado de Guanajuato una alta mortalidad de lechones después de la llegada de un verraco procedente de Iowa, Estados Unidos. Se tomaron algunas medidas para evitar su diseminación, pero para entonces ya había penetrado a la mayor área porcícola de México, infectando a 37,000 hembras y causando la pérdida de 20,000 lechones (17).

En 1976 la región continuó sufriendo la enfermedad de Aujeszky, pero la repercusión económica para los poricultores fue menor debido a una población parcialmente inmune. (17).

Al año siguiente se reportan casos en los Estados de México, San Luis Potosí y Oaxaca. Para 1978 y 1979 se forma una clara zona enzoótica en el Bajío, donde probablemente la vacunación ha colaborado a reducir las pérdidas (*).

En 1980 se presentó un brote en el Estado de Nuevo León y fue notificada nuevamente la enfermedad en el Estado de México (*).

(*). Notas no publicadas.

En la mayoría de las especies afectadas como bovinos, ovinos, perros, gatos, zorras, conejos, etc., la seudorrabia se caracteriza por presentar - - trastornos nerviosos, prurito intenso que llega a provocar la automutilación y curso inevitablemente fatal (2, 15 y 17). En el ganado porcino la gravedad clínica de la enfermedad es muy variable, siendo en ocasiones desde muy severa (convulsiones, coma y muerte en 24 horas) en animales de pocos días de edad, hasta inaparentemente o subclínica en cerdos adultos, manteniéndose - estos últimos como portadores asintomáticos y representando la fuente potencial de infección para otros cerdos y para las demás especies susceptibles - - (1, 6, 8, 15 y 17).

Entre los principales problemas que causa la enfermedad de Aujeszky en cerdos se encuentra una baja capacidad de muchas hembras para quedar gestantes, aumento de mortinatos y/o momificados y la frecuente reducción del número de lechones al nacimiento, que aunado al retraso en el crecimiento de los animales recuperados y a la muerte de un alto porcentaje de lechones, - hacen de la seudorrabia uno de los principales enemigos de la industria porcícola (6, 7, 15 y 17).

Tomando en cuenta la variabilidad de los signos clínicos y que los cambios anatomopatológicos se consideran netamente microscópicos (15), es necesario recurrir a las técnicas de laboratorio como inmunofluorescencia, sero-

neutralización, histopatología, inoculación al conejo e inmunodifusión para corroborar la presencia de la enfermedad en una explotación.

En el presente estudio se analizó la sensibilidad y especificidad de la Inmunodifusión (ID), comparando los resultados con la prueba de referencia que es la Seroneutralización (SN), al trabajar con ambas técnicas un mismo suero problema (4).

El término "sensibilidad de una prueba serológica" se define como la capacidad que tiene ésta para detectar individuos positivos a una enfermedad dentro de una población analizada. "Especificidad de una prueba serológica" es la capacidad que tiene ésta para dar por negativos a los individuos que se encuentren libres a una enfermedad dentro de una población analizada (18).

Los aspectos anteriores adquieren gran importancia puesto que un elevado porcentaje de sueros enviados al laboratorio presentan condiciones de toxicidad y contaminación. Dichos factores en un momento dado, pueden provocar diagnósticos falsos por interferir con la prueba de SN, en la que se emplean cultivos celulares.

La creciente incidencia de la enfermedad de Aujeszky en nuestro país hace necesaria la implementación a nivel regional de técnicas de diagnóstico que reúnan las características de seguridad, rapidez, economía y sencillez, con el fin de tomar las medidas adecuadas que eviten una mayor diseminación del padecimiento y las repercusiones económicas que ello implica.

II MATERIAL Y METODOS

I. - Virus: Se trabajó con la cepa Shope de la enfermedad de Aujeszky adaptada a cultivo celular como antígeno en la prueba SN.

II. - Células: Se empleó la línea celular "PK 15" en la prueba de SN.

III. - Medios: III i) El medio de cultivo celular estuvo constituido por Medio Esencial Mínimo F 15 (MEM) (a), 10% de Caldo de Triptosa Fosfato (b), 10% de Suero Fetal Bovino (1), 1% de Vitaminas (a), 1% de Aminoácidos no esenciales (1), 1% de Piruvato de Sodio (1), 1.5% de Bicarbonato de Sodio (c), 1% de una mezcla Penicilina-Estreptomicina (d) y 1% de Fungisona (a).

III ii) El medio empleado en la prueba de ID se preparó disolviendo 0.69% de Agarosa (e) en Tris Buffer al 0.05 Molar y con un pH de 7.2; se adicionó 0.025% de Azida de Sodio (f) para evitar contaminaciones durante el tiempo que duró la prueba. La mezcla fue envasada y esterilizada por autoclave manteniendo 10 libras de presión durante 7 minutos, conservándose a 4°C hasta su uso.

IV. - Sueros: Se colectaron 200 sueros de cerdo en granjas de los Estados de Michoacán y Guanajuato, los animales muestreados tenían diferentes edades. El sangrado se realizó de tres maneras: Punción en vena yugular (160 sueros), punción en vena auricular externa (20 sueros)

e incisión en oreja (20 sueros), con el fin de observar la influencia de la toma de muestras sobre el diagnóstico. - Se aguardó la retracción del coágulo y se obtuvo el suero en la misma forma para las 200 muestras (decantación). Los sueros fueron transportados en refrigeración y ya en el laboratorio se inactivaron en baño maría a 56°C durante 30 minutos, dividiéndose posteriormente en alícuotas de 2 ml. cada uno; se numeraron en orden progresivo y fueron almacenados a - 20°C hasta su uso posterior.

V. - Antígeno y Antisuero. - El antígeno y antisuero utilizados como controles positivos en la prueba de ID son producidos comercialmente (g).

VI. - Prueba de Seroneutralización (SN). Se realizó empleando microplacas estériles (h) que fueron divididas trazando con lápiz una línea horizontal entre las fosas G y H con el fin de tener controles de los sueros por analizar. También se trazaron cinco líneas verticales (una cada dos fosas) que permitieron trabajar seis sueros por microplaca (Figura 1). Se colocó 0.025 ml. de MEM con antibióticos a cada una de las 96 fosas utilizando una pipeta gotero estéril (i). Se procedió a adicionar 0.025 ml. de suero problema en las 4 primeras fosas, utilizando diferente pipeta para cada suero. Con los microdilutores (j) se hicieron diluciones dobles de cada suero, partiendo de 1:2 hasta 1:128.

Se colocó 0.025 ml. de una suspensión viral conteniendo de 100 a 300 unidades infectantes de cultivo de tejidos (UICT) a todas las fosas excepto a las de la primera línea, que sirvieron como control de sueros. La mezcla antígeno-anticuerpo fue agitada e incubada a 37°C durante 60 minutos en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂.

Los monoestratos del cultivo celular "TK 15" contenidos en botellas de Roux fueron tripsinizados y suspendidos en medio de cultivo para adicionar 0.15 ml. a todas las fosas. El número de células por cada 0.15 ml. fue de 400,000 aproximadamente.

Las microplacas fueron cubiertas con cinta selladora e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda y con CO₂ de 48 a 72 horas.

En una de las microplacas se incluyeron controles del virus, colocando en 3 diferentes hileras de fosas 0.025 ml. de diluciones del antígeno - - (de 10⁻¹ a 10⁻³). Las diluciones se realizaron a partir de la concentración de virus que contuvo de 100 a 300 UICT, y posteriormente se adicio nó 0.15 ml. de la suspensión celular.

También fueron incluidos controles de suero positivo y negativo (2 hileras de fosas por cada uno), así como control de células (sin virus ni sue ro problema) (Figura 2).

FIGURA 1

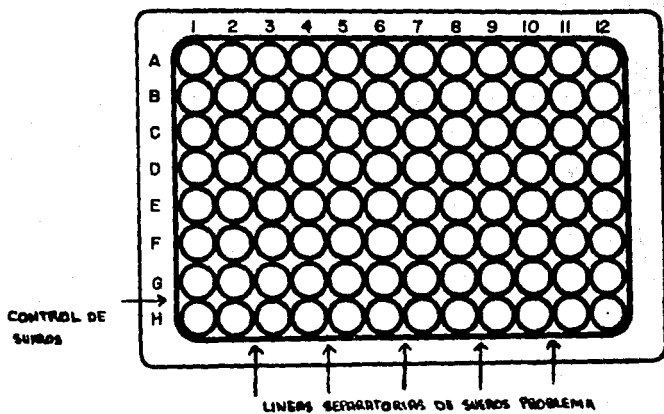
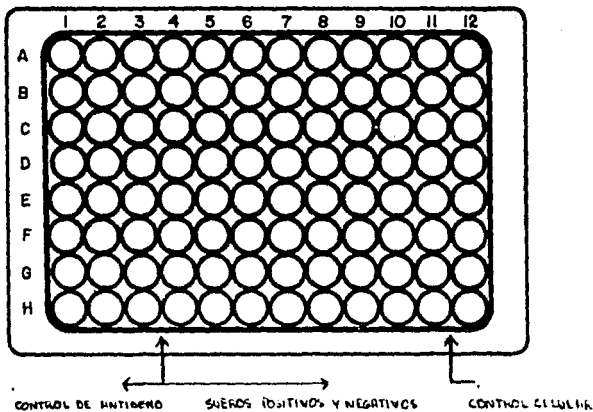


FIGURA 2

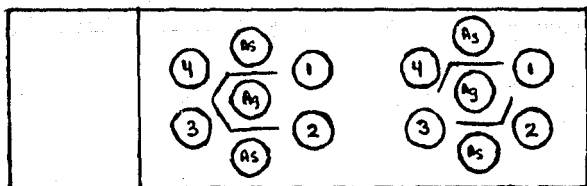


La lectura final se realizó en las 72 horas. El título del suero se basó en la dilución más alta de este, en que se observó la inhibición total - del efecto citopático (4, 5, 9, 11, 12 y 13). Debido a la posibilidad de trabajar sueros provenientes de animales vacunados, solo se consideró positivo todo suero que presentó un título mayor de 1:4.

VIII. - Prueba de Inmunodifusión (ID). Para la realización de esta prueba se utilizaron portaobjetos de cristal perfectamente limpios y secos. Se trazó con lápiz grueso una línea a lo ancho y en uno de los extremos - de la laminilla con el objeto de delimitar la zona en que fue colocado el medio. Cada laminilla se cubrió con una capa de 2.5 ml. de gel. Una vez solidificado el medio, se procedió a realizar 7 perforaciones (una central y seis periféricas); el diámetro de las perforaciones fue de 4 mm. y la distancia entre cada una de 2.5 mm. Con una pipeta Pasteur estéril se colocó en la fosa central el antígeno, en la superior e inferior los antisueros controles y en las restantes los sueros problema, utilizando diferente pipeta para cada uno. El volumen de antígeno y de sueros de 0.02 ml. aproximadamente (4). (Figura 3).

Las laminillas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en una caja de petri cerrada, se realizó una observación preliminar y posteriormente fueron incubadas en una cámara húmeda a 25°C de 24 a 48 horas.

FIGURA 3



DISEÑO DE LA PRUEBA DE IMMUNODIFUSION

La lectura final de la prueba se llevó a cabo a las 48 horas, empleando para su realización una fuente de luz.

Se consideró positivo todo suero que mostró una nítida línea de precipitación, comparando su claridad y posición con las líneas de los sueros positivos conocidos, de acuerdo a lo indicado en la literatura (3, 4, 10 y 12).

VIII. - La evaluación de la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas se realizó de acuerdo a la literatura revisada (18).

IX. - Los resultados finales obtenidos en ambas pruebas se expresan en porcentajes de correlación (4 y 18).

III LISTA DE LABORATORIOS

- (a) Producidos por GIBCO.
- (b) Producidos por Laboratorios DIFCO
- (c) Producido por Laboratorios J. T. BAKER
- (d) Producidos por Laboratorios Lakeside Farmacéuticos
- (e) Producida por Laboratorios MCT Biomedical
- (f) Producido por Laboratorios MERCK
- (g) Producidos por Laboratorios SALSBURY
- (h) Fabricados por Limbro Scientific Inc.
- (i) Fabricados por Dynarech Laboratories Incorporated
- (j) Fabricados por Flogw Laboratorios

IV RESULTADOS

Observamos que cuando no se adicionaba Piruvato de Sodio al medio de cultivo celular, la formación de monoestratos completos se retrasó hasta 48 - horas con respecto a controles con Piruvato.

A las 72 horas después de realizada la siembra celular se formaba un monoestrato completo en las fosas controles de células, lo que permitió realizar la lectura de la SN a este tiempo.

De 48 a 72 horas después de adicionar la suspensión celular, la cepa Shope había actuado completamente, manifestándose un claro efecto citopático.

El título de los sueros problema no varió 24 y 48 horas después del tiempo estipulado para realizar la lectura final.

Haciendo una dilución original de la cepa Shope de 10^{-2} obteníamos de 100 a 300 UICT por cada 0.025 ml. de suspensión viral, y a partir de esta dilución observamos de un 50 a un 80% de efecto citopático en las dos siguientes. (controles del antígeno).

Se observó que 0.69% es la concentración óptima de agarosa en el medio para la prueba de ID, ya que en ésta se manifestaron más claramente las líneas de precipitación.

Observamos que 0.025% de Azida de Sodio en el medio de ID es suficiente para evitar contaminaciones en el gel durante el tiempo que dura la prueba.

A las 48 horas después de colocar el antígeno y sueros en las fosas correspondientes se formaron líneas de precipitación bastante claras, lo que permitió realizar la lectura final de la ID en este tiempo.

Se observó que los sueros negativos al momento de realizar la lectura final de la ID no presentaron línea de precipitación a las 24 y 48 horas después de realizada ésta.

Se pudo comprobar que el antígeno y antisuero comerciales para la prueba de ID deben ser diluidos en un volumen menor al estipulado en las indicaciones del laboratorio productor.

De los 200 sueros trabajados en la prueba de SN, 101 resultaron positivos con un título mayor de 1:4 (Cuadro 1).

Al trabajar los 200 sueros en la prueba de ID se observó que 88 de los 101 positivos en SN presentaron línea de precipitación clara (Cuadro 2).

De los 40 sueros obtenidos en forma poco aseptica, 20 resultaron contaminados y 10 tóxicos, lo que provocó que no se emitiera resultado de los mismos en la prueba SN (Cuadro 1).

De los 30 sueros que quedaron sin resultado en la prueba de SN, 11 mostraron línea de precipitación, por lo que se consideraron positivos a ID (Cuadro 3).

De los 69 sueros considerados negativos en la prueba de SN, 17 tuvieron un título de 1:4 de estos 2 resultaron positivos a ID; 18 sueros tuvieron un título de 1:2 en SN y de estos 1 resultó positivo a ID (Cuadro 2).

Ninguno de los 34 sueros negativos en la prueba de SN fue positivo en ID, mostrando ambas pruebas una correlación de especificidad del 100% en estos casos (Cuadro 2).

De acuerdo al patrón establecido (Cuadro 4), la prueba de SN mostró una sensibilidad de 97.1% y una especificidad de 83.5% (Cuadro 5).

La prueba de ID mostró una sensibilidad de 87.1% y una especificidad de 97.1% (Cuadro 6).

Los 67 sueros con título igual o mayor a 1:16 en la prueba de SN resultaron todos positivos en la prueba de ID, mostrando ambas pruebas una correlación del 100% en estos casos (Cuadro 7).

De los 34 sueros con título de 1:8 en la prueba de SN, 21 resultaron positivos en la prueba de ID, mostrando una correlación del 61.7% (Cuadro 7).

RESULTADOS FINALES OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE SN e ID

<u>Suero No.</u>	<u>Título SN</u>	<u>Resultado ID</u>	<u>Vía de Sangrado</u>
1	8	-	py (*)
2	8	+	py
3	8	+	py
4	16	+	py
5	8	+	py
6	8	-	py
7	4	-	py
8	contaminado	-	io (**)
9	contaminado	-	io
10	contaminado	-	io
11	8	+	io
12	8	+	py
13	16	+	py
14	-	-	py
15	4	-	py
16	2	-	py
17	4	-	py
18	16	+	py
19	8	+	py
20	-	-	py
21	-	-	py
22	8	+	py
23	8	+	py
24	-	-	py
25	-	-	py
26	2	-	py
27	2	-	py
28	contaminado	-	io
29	contaminado	++	io
30	4	-	io
31	4	-	py

(*) Punción en Yugular

(**) Incisión en Oreja

<u>Suero No.</u>	<u>Título SN</u>	<u>Resultado ID</u>	<u>Vía de Sangrado</u>
32	-	-	py
33	8	+	py
34	8	+	py
35	-	-	py
36	8	+	py
37	4	-	py
38	2	-	py
39	4	"+"	py
40	16	+	py
41	8	+	py
42	64	+	py
43	64	+	py
44	64	+	py
45	8	+	py
46	8	+	py
47	8	+	py
48	-	-	py
49	2	-	py
50	-	-	py
51	8	-	py
52	2	+	py
53	8	+	py
54	128	+	py
55	128	+	py
56	64	+	py
57	128	+	py
58	128	+	py
59	128	+	py
60	64	+	py
61	16	+	py
62	32	+	py
63	32	+	py
64	32	+	py
65	16	+	py
66	16	+	py
67	32	+	py
68	32	+	py
69	32	+	py
70	32	+	py

<u>Suero No.</u>	<u>Título SN</u>	<u>Resultado ID</u>	<u>Vía de Sangrado</u>
71	contaminado	-	lo
72	contaminado	"+"	lo
73	contaminado	"+"	lo
74	contaminado	-	pa (***)
75	contaminado	"+"	pa
76	32	+	py
77	128	+	py
78	64	+	py
79	64	+	py
80	64	+	py
81	64	+	py
82	16	+	py
83	32	+	py
84	32	+	py
85	16	+	py
86	32	+	py
87	16	+	py
88	16	+	py
89	16	+	py
90	16	+	py
91	16	+	py
92	-	-	py
93	-	-	py
94	-	-	py
95	-	-	py
96	-	-	py
97	-	-	py
98	-	-	py
99	-	-	py
100	4	+	py
101	8	-	py
102	16	+	py
103	4	-	py
104	2	-	py
105	8	-	py
106	4	-	py
107	contaminado	-	lo
108	contaminado	"+"	lo
109	-	-	py
110	-	-	py

(***) Punción en Vena Auricular

<u>Suero No.</u>	<u>Título SN</u>	<u>Resultado ID</u>	<u>Vía de Sangrado</u>
111	-	-	py
112	-	-	py
113	-	-	py
114	-	-	py
115	2	-	py
116	4	-	py
117	2	-	py
118	4	-	py
119	-	-	py
120	8	-	py
121	16	+	py
122	4	-	py
123	tóxico	"+"	io
124	tóxico	-	io
125	tóxico	-	io
126	tóxico	-	pa
127	tóxico	"+"	pa
128	tóxico	"+"	pa
129	16	+	py
130	16	+	py
131	8	-	py
132	2	-	py
133	16	+	py
134	4	-	py
135	-	-	py
136	-	-	py
137	8	+	py
138	8	-	py
139	-	-	py
140	16	+	py
141	16	+	py
142	32	+	py
143	2	-	py
144	contaminado	"+"	pa
145	contaminado	-	pa
146	contaminado	-	pa
147	contaminado	"+"	pa
148	contaminado	-	pa
149	8	+	py
150	16	+	py
151	16	+	py
152	2	-	py
153	8	+	py
154	2	-	py

<u>Suero No.</u>	<u>Título SN</u>	<u>Resultado ID</u>	<u>Vía de Sangrado</u>
155	16	+	py
156	8	+	py
157	16	+	py
158	2	-	py
159	2	-	py
160	8	+	py
161	16	+	py
162	16	+	py
163	tóxico	-	pa
164	tóxico	-	io
165	tóxico	"+"	pa
166	tóxico	"+"	io
167	contaminado	-	io
168	contaminado	-	pa
169	64	+	pa
170	8	-	pa
171	-	-	py
172	16	+	pa
173	8	-	pa
174	2	-	io
175	2	-	io
176	-	-	pa
177	-	-	pa
178	-	-	py
179	-	-	py
180	-	-	py
181	-	-	py
182	16	+	py
183	16	-	py
184	64	+	py
185	32	+	py
186	32	+	py
187	16	+	py
188	16	+	py
189	64	+	py
190	32	+	py
191	8	-	py
192	8	-	py
193	4	-	py
194	8	-	py
195	16	+	py

<u>Suero No.</u>	<u>Título SN</u>	<u>Resultado ID</u>	<u>Vía de Sangrado</u>
196	16	+	py
197	contaminado	"+"	pa
198	4	-	py
199	4	-	py
200	2	-	py

CUADRO 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SN

Número de Sueros	Titulo
6	128
12	64
15	32
34	16
34	8
----- (*)	
17	4
18	2
34	0
30	Sin Resultado (**)
Total 200	

(*) Los Sueros que aparecen abajo de la línea punteada se consideraron negativos en la prueba.

(**) Sueros que mostraron toxicidad o contaminación en la prueba.

CUADRO 2

CUADRO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN AMBAS PRUEBAS

Título en SN	No. de Sueros Positivos en la prueba de SN	No. de Sueros Positivos en la Prueba de ID
128	6	6
64	12	12
32	15	15
16	34	34
8	34	21
----- (*)		
4	17	2
2	18	1
----- (**)		
0	34	34

(*) Los Sueros que aparecen abajo de la línea punteada se consideran negativos en ambas pruebas.

(**) Abajo de la línea continua aparecen los 34 Sueros que resultaron negativos en la prueba de SN, mismos que fueron negativos también a ID, por lo que la correlación de especificidad es del 100% en estos casos.

CUADRO 3

**RESULTADOS DE AMBAS PRUEBAS AL TRABAJAR LOS SUEROS OBTE-
NIDOS EN FORMA POCO ASEPTICA**

Número de Sueros sin Diag-
nóstico en la prueba de SN

30

Número de Sueros
Positivos en la prue-
ba de ID

11

% de Sensibili-
dad Favorable
a ID en estos -
casos.

36.6

CUADRO 4

PATRON PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE
AMBAS PRUEBAS

	Diagnóstico		TOTAL
	Enfermos	No Enfermos	
Positivos - - - - -	a	b	a + b
Negativos - - - - -	c	d	c + d
Total - - - - -	a + c	b + d	a + b + c + d

Nota: a = animales enfermos detectados en la prueba
 b = falsos positivos en la prueba
 c = falsos negativos en la prueba
 d = animales no enfermos detectados en la prueba

Fórmulas: Sensibilidad = $\frac{a}{a + c} \times 100$

Especificidad = $\frac{d}{b + d} \times 100$

CUADRO 5

DATOS PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD EN LA
SN

	Diagnóstico		TOTAL
	Enfermos	No Enfermos	
Positivos - - - - -	101	13	114
Negativos - - - - -	3	66	69
Total - - - - -	104	79	183

$$\text{Sensibilidad} = \frac{101}{101 + 3} \times 100 = 97.1\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{66}{13 + 66} \times 100 = 83.5\%$$

CUADRO 6

DATOS PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA
ID

	Diagnóstico		TOTAL
	Enfermos	No Enfermos	
Positivos - - -	88	3	91
Negativos - - -	13	66	79
Total - - -	101	69	170

$$\text{Sensibilidad} = \frac{88}{88 + 13} \times 100 = 87.1\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{66}{66 + 3} \times 100 = 97.1\%$$

CUADRO 7

PORCENTAJES DE CORRELACION ENTRE AMBAS PRUEBAS, BASADOS
EN LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Título en SN	Relación entre Sueros Po- sitivos Detectados en Am- bas pruebas SN/ID	% de Correlación
128	6/6	100
64	12/12	100
32	15/15	100
16	34/34	100
8	34/21	61.7

V DISCUSION

Se observó que la línea celular "PK 15" al ser incubada a 37°C y con medio de cultivo adecuado presenta monoestratos completos en un tiempo -- aproximado de 60 horas, factor que aunado a su alta susceptibilidad al virus de la seudorrabia, la hacen muy apropiada para la realización de la - prueba de SN, coincidiendo con estudios anteriores (4 y 13).

Observamos que la cepa Shope adaptada a cultivo de tejidos mostró una buena concentración, ya que al ser diluida 10^{-2} obtuvimos un mínimo de 100 - unidades infectantes de cultivo de tejidos, título recomendado para la reali zación de la prueba SN (4). Partiendo de 10^{-2} se realizaron 3 diluciones logarítmicas, y en las dos primeras observamos de un 50 a un 80% de efecto citopático, lo que reiteró las buenas condiciones del virus.

Pudimos comprobar la viabilidad de la cepa Shope, ya que de 48 a 72 horas después de adicionar la suspensión celular se manifestó un claro efecto citopático, que permitió realizar el diagnóstico de la prueba de SN en el - - tiempo estipulado.

Después de probar diferentes concentraciones de Agarosa para el medio - de ID, comprobamos que para el lote trabajado la concentración óptima fue de 0.69%, ya que las líneas de precipitación fueron bastante claras y se pre

sentó una buena capacidad gelificante. Las observaciones anteriores coinciden con estudios previos al respecto (4, 10 y 12).

Podemos suponer que la dilución en un volumen menor del antígeno y anti-suero comerciales utilizados en la prueba de ID se debe a que éstos presentan una dilución crítica, situación que se ve alterada al manejarse inadecuadamente durante su transporte, y que al final provoca una disminución en el título del producto.

En la realización de la prueba ID pudimos observar que a las 48 horas se formaron líneas de precipitación fácilmente observables, por lo que consideramos que este tiempo es el adecuado para realizar la lectura en la prueba, mismo que coincide con reportes anteriores (4, 10 y 12).

La obtención séptica de sueros demostró la importancia de un buen procedimiento para la toma de muestras, ya que de los 40 sueros obtenidos por punción en la vena auricular externa y por incisión en la oreja, 30 no permitieron obtener resultado en la prueba de SN, por contaminación bacteriana y/o micótica, o bien por la citotoxicidad de los sueros hemolizados.

Los sueros con títulos iguales o inferiores a 1:4 pueden provenir de animales vacunados o bien de animales que padecieron la enfermedad de Aujeszky mucho tiempo atrás y que no quedaron como portadores, por lo que el título de anticuerpos neutralizantes es bajo.

De los sueros que fueron considerados negativos en la prueba de SN (título 1:4 o inferior), 3 fueron positivos en la prueba de ID, con lo cual suponemos que pudiera tratarse de animales que sufrieron la enfermedad hace tiempo y se recuperaron sin quedar como portadores, ya que su nivel de anticuerpos neutralizantes decayó, pero conservaron una baja tasa de anticuerpos precipitantes.

Los sueros tóxicos o contaminados que no fue posible analizar en la prueba de SN arrojaron datos que consideramos válidos en cuanto a que la ID no requiere de células para proporcionar un diagnóstico.

Al observar los resultados obtenidos es evidente la alta incidencia de la enfermedad de Aujeszky en la región del Bajío, ya que más del 50% de los sueros trabajados resultaron positivos con diferentes títulos en la prueba de SN, y la mayoría de estos mostró línea de precipitación en la prueba de ID.

La prueba de SN mostró una sensibilidad del 97.1% y una especificidad de 83.5%, lo que hace de esta técnica una de las pruebas más sensibles en la realización de campañas serológicas, pero presenta algunos inconvenientes como el requerir de laboratorios con instalaciones y equipo adecuados para la producción de cultivos celulares, así como de técnicos especializados; además tiene una alta susceptibilidad a las contaminaciones y un elevado costo.

La prueba de ID presentó una sensibilidad de 87.1% y una especificidad de 97.1% factores adecuados para colocar a esta técnica dentro de las idóneas para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky, presentando -- además otras ventajas como son su sencillez, economía, seguridad y rapidez.

Observamos que en sueros con títulos iguales o mayores de 1:16 en SN la correlación entre ambas pruebas es del 100% y en sueros que tuvieron título de 1:8 la correlación fue de 61.7%, resultados que permiten asegurar que la ID es una prueba apta para ser estandarizada a nivel de laboratorios regionales y permitir un diagnóstico rápido y seguro de la enfermedad de Aujeszky.

Podemos recomendar la realización en forma rutinaria de la prueba de ID en todos los sueros recibidos por el laboratorio y la SN podría ser aplicada solo en los sueros que resultaran negativos en la primera técnica y que no presentaran condiciones de toxicidad y contaminación.

VI BIBLIOGRAFIA

1. - Andries, K., Effect of Experimental Infection with Pseudorabies (Aujeszky Disease) Virus on Pigs with Maternal Immunity from Vaccinated Sows. American Journal of Veterinary Research, Vol. 39 No. 8, p.p. 1282 -1285
2. - Armbrecht, P.J., Pseudorabies in Cattle. Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician, Agri-Practice, 1977 (October), p.p. 1619-1621.
3. - Bazilev, P.M., Diagnostic de la Maladie d'Aujeszky par la reaction de precipitation et de Diffusion en Gelose. Veterinariya, Moscou 1965.
4. - Conferencia sobre detección de Pseudorabia. 1976. Universidad de Ames, Iowa, U.S.A.
5. - Gutekunst, D.E., Development and Evaluation of a Microimmunodiffusion Test for Detection of Antibodies to Pseudorabies Virus in Swine Serum. American Journal of Veterinary Research, 1978 (February), Vol. 39 No. 2 p.p. 207-120.
6. - Kelling, C.L., Indirect Solid Phase Microradioimmunoassay for Detection of Pseudorabies Virus Antibody in Swine Sera. American Journal of Veterinary Research, 1978 (December), Vol. 39 No. 12, p.p. 1955-1957.

7. - Kirkbride, C.A., Infectious Agents Associated with Fetal and Early Neonatal Death and Abortion in Swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1978 (February), Vol. 172 No. 4, p.p. 480-483.
8. - Mare, J., Pseudorabies (Aujeszky's Disease) in Swine. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician, Agric-Practice*, 1977 (May), p.p. 915-918.
9. - Martell, D.M., Aislamiento y caracterización del virus de la enfermedad de Aujeszky o Pseudorrabia en México, *Técnica Pecuaria en México*, 1971 (Julio), p.p. 27-31.
10. - Medina y Correa, Presencia de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en sueros de cerdos de diferente procedencia. *Técnica Pecuaria en México*, 1977, Vol. 32, p.p. 93-96.
11. - Metianu, T., Etude sur la Precipitation en Melieu Gelifie du Virus d'Aujeszky. *Revue D'Immunologie*, tome 33, 1969, No. 6, p.p. 323-334.
12. - Moutou, F., Application of an Enzyme Linked Immunosorbent assay for Diagnosis of Aujeszky's Disease in Swines. *Veterinary Record*, 1978, Vol. 102, p.p. 264.

13. - Pette, J., Procédes Modernes de Diagnostic de la Maladie d'Aujeszky. Bull. Off. Int. Epiz., 1965, 63 (H-12), p.p. 1835-1851.
14. - Pirtle, E.C., Virus Isolation and Immune Responses in Susceptible Swine Exposed with Pseudorabies Virus (Shope Strain). American Journal Veterinary Research, 1978 (August), Vol. 38 No. 8, p.p. 1367-1368.
15. - Roszkowsky, J., Use of Immunoenzyme Technique for Detection of Aujeszky's Disease Virus in Cell Culture. Veterinary Record, Vol. 102, 1978, p.p. 462-463.
16. - Shope, R.E., Pseudorabies, in Diseases of Swine, 1964, chapter 14, second edition, edited by Howard W. Dunne, the Iowa State University press, Ames, Iowa, USA, p.p. 273-283.
17. - Thorner, M.R., Principles and Procedures in the Evaluation of Screening for Disease. Public Health Service Publication, 1961 Public Health Monograph No. 67, USA.
18. - Wohlgenuth, K., Pseudorabies Virus Associated with abortion in Swine. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1978 (February), Vol. 172 No. 4 p.p. 478-479.