



INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION DEL PARAMIXOVIRUS DE OJO AZUL CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIGENO

Ramírez., Mercado G.C., Rodríguez T.J., González C.T.,
Stephano H.A., López, M.J.

INTRODUCCION

La prueba que más frecuentemente se utiliza para detectar anticuerpos contra el paramixovirus de ojo azul (POA) es la de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) debido a que no se requiere de mucho equipo es fácil de realizar y no se necesita esterilidad, la lectura de los resultados se puede hacer el mismo día. Esto no sucede con la prueba de sueroneutralización la cual es mucho más tardada, costosa y se requiere esterilidad en los sueros pero la sensibilidad es mejor. (2).

La sensibilidad de las pruebas serológicas para detectar POA para el diagnóstico ha quedado de manifiesto en los trabajos realizados por Gay en donde la prueba inmunoenzimática es 9.3 veces más sensibles que la inhibición de la hemoaglutinación y 5.9 más que la sueroneutralización (2).

En las investigaciones realizadas en torno al paramixovirus se ha utilizado la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación en forma rutinaria, en el contenido de material y métodos de estas investigaciones en ocasiones no se indica tiempo de incubación, las soluciones salinas, tiempo de lectura, concentración o tipo de glóbulos rojos, variando la técnica de autor a autor (5,6). La técnica se ha realizado con glóbulos rojos de gallo al 0.5% y la lectura se hace a los 120 min. a temperatura ambiente (). También se realiza la reacción antígeno anticuerpo en volúmenes de .025 ml., agregando eritrocitos de gallo al 0.5% en un volumen de .050 ml. e incubación a temperatura del laboratorio durante 30 min. (4).

Otro autor utiliza globulos rojos de cuye al 1% con 8 unidades de hemoaglutinantes (UHA) e incubación de 1 hr. a 37 C.(1).

OBJETIVO

Evaluar los niveles de anticuerpos contra para mixovirus porcino a travez de algunas modificaciones empleadas en la prueba de IHA.

MATERIAL Y METODOS

- Preparación del antígeno (Ag) en monoestratos celulares.

Se inocularon monoestratos de células P: 15 y cornete de bovino (BT) para obtener el antígeno., cuando se presentó el efecto citopático se congelaron las botellas a - 70 C para después descongelar, centrifugar envasar en volúmenes de 1 ml. Una parte de este antígeno se dializó también se hicieron alicuatas de 1 ml.

- Preparación del antígeno en embrión.

En base a lo realizado por Stephano y Gay (6.) se inocularon embriones de 9 días de edad vía cavidad alantoidea se obtuvo el antígeno a partir de líquido alantoideo, este se centrifugó y se congeló, se descongeló y se envazó en alicuotas de 1 ml.

- Manejo del suero problema.

El suero fué inactivado a 56 grados C durante 30 min.

Se adsorbió por 30 min. con globulos rojos al 50% de cuye y caolin en volúmenes de 1 ml. de globulos rojos con 0.1 g de caolin.

Las diluciones de los sueros fueron desde 1: 2 hasta 1:4096.

Considerando que con globulos rojos de cuye y ave se obtienen los títulos hemoaglutinantes más altos, y son los dos tipos de eritrocitos que más frecuentemente se han utilizado en la prueba de (IHA); se realizó el siguiente esquema de combinaciones cuando se utilizó Ag obtenido a partir de cultivos celulares, tomando en cuenta que la incubación de Ag-Ac se hizo a temp. ambiente. (25 C) durante 1 hora.

		4 UHA
	eritocitos a	8 UHA
	25 C	20 UHA
Globulos rojos		4 UHA
de ave al 5%	eritocitos a	8 UHA
	37 C	20 UHA
Antígeno obtenido		
a partir del cultivo		4 UHA
Celular	eritocitos a	8 UHA
	Gobulos rojos 25 C	20 UHA
	de cuye al .75%	
		4 UHA
	eritocitos a	8 UHA
	37 C	20 UHA

Se utilizaron eritrocitos de ave al .5 % debido a que la sedimentación es evidente a los 30 min. Y la hemoaglutinación es mejor comparada con .75 % o al 1 %. En el caso de eritrocitos de cuye la sedimentación al .75 % se observa a partir de hora y la aglutinación se observa mejor que el 1%.

Se usaron 6 sueros positivos uno negativo para cada

una de las combinaciones se obtuvo un promedio y una desviación standar de estos; se determinó tiempo de sedimentación de los eritrocitos.

Cuando el antígeno se obtuvo a partir del embrión las combinaciones fueron las siguientes.

		4 UHA
	eritrocitos a 8 UHA	
	25 C	20 UHA
Globulos rojos		4 UHA
de ave al .5%	eritrocitos a 8 UHA	
	37 C	20 UHA
Antígeno obtenido		
a partir de embrión		4 UHA
de pollo	eritrocitos a 8 UHA	
Globulos rojos	25 C	20 UHA
de cuye al .75%		4 UHA
	eritrocitos a 8 UHA	
	37 C	20 UHA

Para cada una de las combinaciones se obtuvo un valor de referencia siendo este el promedio de los 6 sueros con eritrocitos de cuye al .75% con 8 UHA leídos a los 60 min. a temp. ambiente.

Después de las 2 hrs. las placas fueron colocadas a 4 C° y leídas a las 24 hrs.

Para facilitar los calculos, los resultados están expresados en log. base 2.

RESULTADOS

Cuando se empleo Ag a partir de cultivo celular con globulos rojos de ave al .5% se obtuvo una mayor titulación de los sueros con 4 UHA que con 8 y 20 UHA. (cuadro 1 y II).

- El título a un mayor cuando los eritrocitos se colocaron a 37 C.

- El título fue más estable entre los 60 - 120 min. a 25 C que a 37 C en cada una de 3 diferentes concentraciones de antígeno.

- Se obtuvieron títulos altos del suero negativo en 4 y 8 UHA tanto a 25 C como a 37 C siendo el mayor con 4 UHA y a 37 C.

- El valor que más se aproximó al título de referencia (x 5,1) fué el de 20 UHA a 25 C.

- La sedimentación de los eritrocitos se observó a partir de los 30 min.

- Cuando de utilizó antígeno a partir de cultivo celular con globulos rojos de cuye al .75% con diferentes concentraciones de antígeno y temperatura se observó los

siguiente (cuadro III y IV)

- El título más alto se observó al emplear 4 UHA a 37 C
- La sedimentación de los eritrocitos se observó a partir de los 45 min. a 25 C y a los 30 min. a 37 C
- En todas las combinaciones el suero negativo siempre se comportó como tal.

- Al emplear 20 UHA los resultados obtenidos siempre son inferiores al promedio de sueros denominado "Título de referencias ".

- A partir de 1 hr. con 45 min. no es factible realizar la lectura a 37 C con tres diferentes concentraciones de antígeno al observarse grumos de globulos rojos idénticos en toda la placa.

- Cuando se utilizó antígeno a partir de embrión de pollo con globulos rojos de ave la .5% con diferentes concentraciones de antígeno y temperatura se obtuvo lo siguiente. Cuadro (V y VI).

- Los títulos más altos se obtienen con 4 UHA

- En términos general los títulos son estables tanto a 25 C como a 37 C siendo aún más estables a 25 C desde los 45 min. hasta las 24 hrs.

- Al comparar los resultados con el título promedio de referencia (X 4.5 0.5) se observa que en todas estas combinaciones siempre se obtuvo un título más alto siendo los más extremos a los de 4 UHA.

- El suero negativo tuvo un título de $\log = 3$ a 37 C con 8 UHA y de $\log = 4$ a 24 C con 4 UHA y de $\log = 7$ a 37 C con 4 UHA.

- La sedimentación de los eritrocitos se observa desde los 30 min.

- Cuando se utilizó Ag a partir de embrión de pollo con Gr de cuye al .75% con diferentes concentraciones de antígeno temperatura se obtuvo lo siguiente (cuadro VII y VIII).

- Los títulos más altos se obtuvieron con 4 UHA.

- Si la lectura se realiza a la hora se tienen valores que oscilan desde el $\log 2 = 3.6$ con 20 UHA a 25 C hasta $\log 2 = 7.3$ con 4 UHA a 37 C.

- Los valores que más se aproximan al título de referencia (X 4.3 .74) son sueros que contenían 20 UHA a como a 37 C.

- El suero negativo nunca rebasó el $\log. 2 = 2$.

- Los títulos permanecen estables desde los 45 min hasta las 24 hrs tanto en 25 C como en 37 C.

CONCLUSIONES

Se pueden obtener sueros falsos positivos:

Al emplear altas concentraciones de globulos rojos

El usar Gr. de ave sobre todo con baja concentración de antígeno o alta concentración de eritrocitos.

Al hacer las lecturas después de 2 hrs. sobre todo cuando se utilizan globulos rojos de cuye.

Al usar baja concentración de antígeno.

Al colocar la placa a 37 C sobre todo después de 90 min.

El usar antígeno proveniente de embrión de pollo.

RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA PRUEBA DE IHA

- Es conveniente realizar la reacción antígeno anticuerpo entre 20-37 C.

- Al agregar los globulos rojos colocar las placas a 4 C y hacer la lectura a las 4 hrs o colocarlas a 25 C entre 1 hr 30 min nunca a 37 C al utilizar eritrocitos de cuye, y cuando se utilizan globulos rojos de ave hacer la lectura entre 30-60 min a 25 C.

- Utilizar concentraciones de globulos rojos de cuye al 75 % con placas con fondo en "V".

Se obtienen buenos resultados al utilizar los eritrocitos al .5% para otras especies y con placas con fondo en "U". No descartar los eritrocitos de bovino.

Usar por lo menos 8-10 unidades hemoaglutinantes, sobre todo cuando se utiliza antígeno de embrión de pollo. No emplear 20 UHA cuando se utiliza eritrocitos de cuye. Se obtienen títulos altos con 4 UHA pero esto puede dar positivo a un animal que no lo es.

- No utilizar concentraciones de globulos rojos al 1% a pesar de que se pueda tener proporcionalmente las unidades hemoaglutinantes del virus, sobre todo cuando se agregan eritrocitos de ave.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1.- Carreón, N.R.: Frecuencia de anticuerpos contra el paramyxovirus de ojo azul en cerdos del Altiplano y norte de México. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional de México.(1989)

2.- Gay, G.M.J. : implementación de la prueba de ELISA para el serodiagnóstico de ojo azul en cerdos. Vet. Méx. 21:325 (1990)

3.- Martínez, L.A., Correa G.P. Rosales E. F. Vazquez P.C. y Garibay S.M.: respuestas de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) contra el paramixvirus porcino de la Piedad Mich. (LPM) en cerdos de diferentes edades XXI reunión nacional de AMVEC p 102 (1986)

4.- Rosales, E. J. A. F.: Estudio retrospectivo de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el paramixovirus porcino de la Piedad Mich.(LPM) aparentemente asociado con el síndrome de ojo azul, en sueros de cerdos colectados de 1972-1986. Tesis de Licenciatura .F.E S. "Cuautitlán". Universidad Nacional Autónoma de Mexico (1987).

5.- Stephano H.A. Doporto J.M. y Gay M.: Estudio epidemiológico en 2 granjas afectadas por el síndrome de ojo azul. International Pig. Veterinary Society Congress (IPVS) .p 456 (1986).

6.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.J. : Síndrome de ojo azul en cerdos. Avances en enfermedades del cerdo. Ed. Morilla. Correa, Stephano p 299-311. (1985)