

PROPUESTA PARA LA ESTANDARIZACION DEL SERODIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL POR LAS PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACION Y DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION.

Martínez L, A*, Pérez S., J., Correa-Girón P., Coba A. M.A., Córdova L., D.; CENID-MV, INIFAP, SAGAR; A.P. 41-682, CP 11001, México, D.F.

INTRODUCCION.

Para el diagnóstico serológico de la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) se han utilizado, entre otras, las pruebas de sueroneutralización (SN) e inhibición de la hemaglutinación (IH); sin embargo, recientemente se ha creado cierta confusión acerca de los diferentes procedimientos para la realización e interpretación de dichas pruebas, ya que no están totalmente estandarizados, comparativamente, entre los diferentes laboratorios en los que se hacen estas pruebas y esto ha sido manifestado en algunos foros (1). En el CENID-MV, la prueba de IH en microplacas se ha estado realizando, desde 1986 (3); y desde 1987 se ha trabajado con la prueba de SN en microplacas. Esta prueba se ha mejorado y a partir de 1994, Martínez *et al*, han utilizando un nuevo procedimiento de lectura; Hernández, J. *et al* (1990) y Ramírez *et al*, (1996), han propuesto la estandarización de estas pruebas; sin embargo, el punto de corte que ambos han establecido para considerar un suero como positivo a la EOA no es homogéneo. A la fecha, la sensibilidad y especificidad de las pruebas de IH y SN utilizando como antígeno al Paramixovirus Porcino (PMVP/LPM) (Rubulavirus Porcino) (RVP), no se ha establecido con claridad. Los objetivos de este trabajo son: a) determinar la sensibilidad, especificidad y concordancia de las pruebas de SN, utilizando 2 títulos virales infectantes diferentes del RVP-LPM; b) determinar la sensibilidad, y especificidad de la prueba de IH y su concordancia con respecto a la prueba de SN; c) y con base en las pruebas anteriores, determinar la prevalencia de anticuerpos IH y SN, en una granja con un brote activo de la EOA.

MATERIAL Y METODOS.

SUEROS.- Para a) y b) se emplearon: 52 sueros negativos al RVP, de cerdos sin antecedentes ni signos clínicos de la EOA, procedentes de una granja libre de la enfermedad, que importó su pie de cría directamente de Canadá, y que fueron mantenidos en unidades de aislamiento; 64 sueros positivos de cerdos que fueron vacunados y desafiados experimentalmente con el RVP/LPM. Para c) se emplearon 91 sueros de cerdos de una granja con un brote activo de la EOA. PRUEBA DE SN.- De cada suero se hicieron 3 alícuotas, con 2 de ellas se hicieron simultáneamente 2 pruebas de SN, bajo el sistema de microtitulación, de acuerdo al procedimiento siguiente: i) con una alícuota se emplearon 150 Dosis Infectantes para Cultivos Celulares 50% (DICC $_{50\%}$) del LPM; ii) con la segunda alícuota se utilizaron 300 (DICC $_{50\%}$). En ambas pruebas los sueros se probaron por duplicado en un esquema de dilución de 1:2 hasta 1:2048. A cada pocito se le agregaron 0.1 ml de una suspensión de células Pk-15 en crecimiento, que contenía 3.3×10^5 células viables por 1 ml. Las microplacas, de poliestireno, de fondo plano, con 96 pocitos, en donde se hicieron las pruebas, se incubaron durante 6 días a 37 C en un ambiente humidificado y con CO $_2$. Las lecturas se hicieron en un microscopio invertido y fueron confirmadas mediante una prueba de HA empleando microplacas de 96 pocitos de fondo en forma de U. PRUEBA DE IH.- Con la tercera alícuota se hizo la prueba de IH, con los sueros previamente inactivados a 56 C y adsorbidos en caolín y eritrocitos de pollo (EP) de 14 semanas de edad. En la prueba de IH se emplearon 4 unidades de hemaglutinantes. Los puntos de corte para considerar a un suero como positivo a la SN y a la IH fueron de 1:4 y 1:5, respectivamente. ANALISIS DE LOS DATOS. A nivel de laboratorio, la sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas fue establecida en relación al "status" (conocido) de cada uno de los sueros, ya que los sueros negativos procedían de cerdos controlados en condiciones de aislamiento y los sueros positivos procedían asimismo de animales controlados que fueron previamente vacunados con una vacuna inactivada experimental vs la EOA y posteriormente desafiados con el RVP/LPM. Se calculó la sensibilidad y la especificidad, y posteriormente se calculó la concordancia entre las dos pruebas, mediante el valor de kappa. Los datos obtenidos en el laboratorio, fueron utilizados

como fundamento para el análisis de un brote natural; calculando la prevalencia con cada una de las pruebas serodiagnósticas utilizadas; y comparando posteriormente éstas con base en la sensibilidad y especificidad observadas. Así mismo, con los datos correspondientes a los sueros del brote, nuevamente se calcularon los valores de kappa (concordancia) de una prueba con otra.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Los títulos encontrados por SN e IH oscilaron entre 1:4 a 1:2048 y de 1:5 hasta 1:160, respectivamente; la sensibilidad se ubicó en el intervalo de 0.89 a 0.953, (Cuadro No 1) correspondiendo los valores más altos a las pruebas de SN. La especificidad encontrada bajo las condiciones establecidas fue de 1.0 para las tres pruebas (dos pruebas de SN y una de IH). En cuanto a la concordancia, éstas dos pruebas se ubicaron en el rango de 0.93 a 0.965. Los resultados obtenidos al analizar la información del brote, permiten ubicar la prevalencia, con cada una de las pruebas, en el intervalo de 57.29 a 51.04, correspondiendo la menor a la prueba de IH. La concordancia de las pruebas con lo encontrado durante el brote varió en el intervalo de 79.1% al 91.4%, llamando la atención que en este caso, la concordancia entre SN utilizando 150 DICC e IH fue la menor.

Se propone la utilización de los procedimientos mencionados para las pruebas de IH y SN en el diagnóstico de la EOA. También se pone a disposición de los laboratorios de diagnóstico, interesados en participar en la estandarización de estas pruebas, sueros de referencia positivos y negativos a anticuerpos vs la EOA.

CUADRO No 1

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS DE SN E IH USADAS EN EL DIAGNOSTICO DE LA EOA.

Prueba diagnóstica	Sensibilidad	Especificidad
SN150 DICC	0.953	1.0
SN300 DICC	0.921	1.0
IH	0.89	1.0

LITERATURA CITADA.

- 1.- CONASA, DGSA, 1996, Reunión Anual, Centro Médico, México, D.F.
- 2.- Hernández-Jáuregui, *et al*, 1990 Mem. XXV Cong, Nal. AMVEC, pp. 57-60.
- 3.- Martínez L., A. *et al* 1986. Mem. XXI R. Nal. AMVEC pp. 101-103.
- 4.- Martínez L., A. *et al*, 1994. In: First International Symposium upon Pig Paramixovirus, Puebla, Pue., México. p. 4.
- 5.- Ramírez M., H. *et al*, 1996. XXXI Cong. Nal. AMVEC, p 53.