

ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2), EN CERDOS

Puentes M.,^{(1)(*)} Johnson J.,⁽²⁾ Molina R.,⁽¹⁾ Munguía J.,⁽¹⁾ Hernández J.,⁽¹⁾

¹- Instituto Tecnológico de Sonora ²- Iowa State University

mepuentes00@hotmail.com

Introducción.

En México, se ha determinado la presencia de circovirus porcino tipo 2 mediante la prueba de inmunoperoxidasa sobre monocapa de cultivo celular; sin embargo, no hay reportes de estudios realizados para evaluar la respuesta inmune humoral hacia las vacunas de circovirus porcino tipo 2 utilizando una técnica de ELISA. Este proyecto, utilizó un ensayo por inmutadsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecta basada en una proteína recombinante de ORF2 gentilmente con una sensibilidad y especificidad mayor del 90% y no muestra reacciones cruzadas con otros agentes comunes que afectan a los cerdos⁽⁴⁾.

Materiales y métodos.

a) *Estandarización de la prueba.* Para la estandarización de la prueba se utilizaron muestras de estatus conocido y antígenos de ORF2 y WT gentilmente donados por el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Estatal de Iowa. La concentración óptima de cada antígeno para tapizar las placas para la prueba de ELISA, se determinó utilizando el método de titulación de tablero de ajedrez.

El desarrollo de la prueba de ELISA se basó en método desarrollado por Nawagitgul *et al.*, 2002. Para evaluar la concordancia entre las réplicas (repetitividad) se analizaron 17 muestras en 10 repeticiones en diferentes posiciones de la placa y en diferentes lotes de placas.⁽³⁾ Se realizaron gráficos de control de calidad al 95% de confianza para evaluar el comportamiento. La sensibilidad y especificidad al punto de corte se hizo mediante estimación de curvas de receptor-operador características (ROC) y diagrama interactivo entre puntos usando el programa MedCalc a un punto de corte de 0.3⁽²⁾.

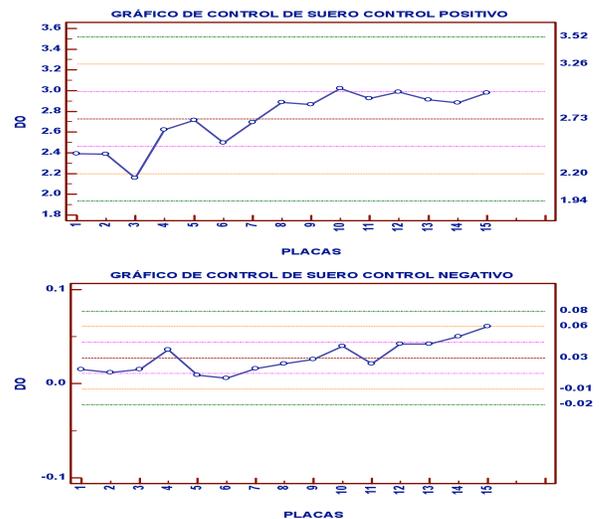
Resultados.

La concentración de los antígenos fue estimada en 1.68 mg/ml para el antígeno ORF2 y en 1.24 mg/ml para el antígeno WT respectivamente. La dilución óptima de los antígenos ORF2 y WT fue utilizar 0.10 µg/ml con una dilución de conjugado de 1:4000 para ambos antígenos. Se seleccionó un punto de corte de ≥ 0.3 , evaluándose la variabilidad de los resultados mediante gráficos de control de variables para los controles positivo y negativo en cada antígeno (ORF2 y WT), observándose las variaciones dentro de los límites esperados, con las medias muestrales dentro de los límites de control. La repetitividad de la prueba mostró coeficientes de variación de las absorbancias menores a 20%. La sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA al

punto de corte de 0.3 mostró valores de 100% y 94.4 respectivamente.

Discusión y Conclusión

Todas las combinaciones hechas con las diluciones de ambos antígenos y conjugado mostraron una reacción altamente específica de los anticuerpos presentes en el suero, concordando con las recomendaciones del Alfonso y Noda 2010, pero el hecho de que a una dilución de 0.10 µg/ml en ORF2 y WT y de 1:4000 en el conjugado, la diferencia entre las absorbancias del control negativo en ORF2 y WT sea muy baja, maximiza la especificidad de la reacción. Los coeficientes de variación de las absorbancias de sueros positivos y negativos son menores del 20% lo que indica una repetitividad apropiada según lo reportado en el manual de la OIE 2008. La sensibilidad de 100% y una especificidad del 94.4%, obtenida en esta prueba de ELISA para PCV2 mediante un diagrama interactivo curva receptor-operador al punto de corte de 0.3, concuerda con lo previamente publicado⁽⁴⁾.



Referencias.

- 1.-Alfonso A., Noda J., 2010. *REDVET* 11:6
- 2.-Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D., 2000. *Preventive Veterinary Medicine* 45: 23-41.
- 3.-Jacobson R. (1996). *Office International des Epizooties Standards Commission (ed.), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines (Office International des Epizooties, Paris, France)*, 3rd ed. pp 8-15.
- 4.-Nawagitgul P., Harms P., Morozov I., Thacker B., Sorden S., Lekcharoensuk C., Paul P., 2002. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9: 33-40.