

DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE INFLUENZA AVIAR POR MEDIO DE UNA TECNICA DE MICROINMUNODIFUSION (MIDG) EN AGAR^a

Elizabeth Loza Rubio^b
Fernando Diosdado Vargas^b
Alejandro Hernández Magdaleno^b
Víctor Manuel Banda Ruíz^b
Antonio Morilla González^b
Juan García García^b

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una técnica de microinmunodifusión en gel (MIDG) para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza aviar. El antígeno que se empleó para las técnicas de Inmunodifusión en gel (IDG) y MIDG, se elaboró a partir de membranas corioalantoideas (MCA), infectadas con el virus A/Ck/Puebla/1485-622/94H5N2. Mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) que es la técnica de referencia en México; se titularon 238 sueros, 75 de los cuales se obtuvieron de pollos libres de patógenos específicos (SPF) y fueron negativos a las tres pruebas diagnósticas, los restantes 163 sueros provenían de aves inmunizadas con vacuna inactivada y emulsionada, y presentaron títulos por IH desde 1:10 hasta 1:1280. Con IDG y MIDG los mejores resultados de positividad se obtuvieron a partir de títulos IH de 1:320 a 1:1280. La sensibilidad de IDG y MIDG contra IH fue de 43%, mientras que esta misma entre ambas pruebas de precipitación en gel fue de 98%. Se concluye que las pruebas de precipitación en gel, sobretodo la MIDG es útil para determinar parvadas con títulos de anticuerpos por IH iguales o mayores a 1:320, además tiene la ventaja que emplea poco antígeno y reactivos, lo que la hace económica, siendo además fácil de ejecutar, permitiendo probar un gran número de sueros, pudiendo ser adaptada a laboratorios con poca infraestructura.

PALABRAS CLAVE: Influenza Aviar, Serología, Inmunodifusión en gel, Microinmunodifusión, Inhibición de la hemoaglutinación.

Téc. Pecu. Méx. Vol. 35 No. 3 (1997)

La infección de las aves domésticas con el virus de la influenza aviar (VIA) produce manifestaciones clínicas variadas, dependiendo sin son de baja o de alta patogenicidad; causan disminución en la conversión alimenticia, baja en la producción de huevo y/o mortalidad elevada (1).

El diagnóstico de la Influenza Aviar se efectúa por medio de la caracterización de los signos clínicos y la detección de anticuerpos en el suero (1,2). El diagnóstico definitivo es por el aislamiento del virus.

El diagnóstico serológico de VIA se basa principalmente en pruebas como la seroneutralización viral (SNV), la fijación de complemento (FC), la inhibición de la neuraminidasa (IN), la inhibición de la hemoaglutinación (IH) y la inmunodifusión en gel (IDG) (2,3,4).

^a Recibido para su publicación el 13 de Mayo de 1996.

^b Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria. INIFAP-SAGAR. Carretera México Toluca Km 15.5, Col. Palo Alto, CP 05110. México D.F.
C. electrónico. manban@data.nef.mx

En México, antes de 1994, la influenza aviar era una enfermedad exótica, al introducirse al país, fue necesario estandarizar técnicas de diagnóstico; una de las más usadas en algunos países donde esta enfermedad es endémica es la IH, debido a que reconoce la hemoaglutinina (H), que es específica para cada subtipo y que no presenta reacciones cruzadas (5,6). Otra prueba que se ha empleado ha sido la inmunodifusión doble en gel (IDG), en la que el antígeno es la nucleoproteína del virus, por lo cual se reconocen anticuerpos circulantes contra todos los subtipos de influenza tipo A (1,7). La IDG se está utilizando en otros países para detectar parvadas infectadas con el virus de IA sin importar el subtipo (7), pero tiene el inconveniente que emplea una considerable cantidad de reactivos, y cuando se muestrea una gran cantidad de aves se eleva el costo del diagnóstico. Este estudio se hizo con el objeto de estandarizar la técnica de IDG y,

posteriormente reducir el costo de la misma adaptándola a una MIDG que utiliza una reducida cantidad de anticuerpos y reactivos. Como antígeno se empleó la cepa de influenza tipo A, A/Ck/ Puebla/14585-622/94 (H5N2), con la que se inocularon embriones de pollo de 9 días de edad, con 0.1 ml de un fluido alantoideo, y con título de 1280 unidades hemaglutinantes (UHA) por ml.

Después de 48 horas de incubación se obtuvieron las membranas coriolantoideas y se congelaron a -70C hasta su uso. Para preparar el antígeno, las membranas se congelaron y se molieron en un homogenizador Virtis, durante dos ciclos de dos minutos cada uno, en baño de hielo. La suspensión se centrifugó a 2000 g por min y al sobrenadante se le agregó azida de sodio al 1% v/v. Por cada 10 ml de sedimento se adicionó 1 ml de glicina-sarkosyl (3g de glicina, 2.5g de sarkosyl, pH 9), se empleó un sonicador MSD, durante dos ciclos de 4 min cada uno. Se agregó solución salina amortiguadora de fosfato (SSAF) ph 7.2, posteriormente se centrifugó a 2000 g durante 10 min. Al sobrenadante y al sedimento se les adicionó azida de sodio al 1% y se almacenaron a -70C. Como antígenos de referencia se utilizaron el del Laboratorio Nacional de Servicios de Ames, Iowa y el de la Compañía Productora de Antígenos y Pruebas Diagnósticas (SPAFAS) Gainesville, ambos en Estados Unidos de América.

Se obtuvieron 238 sueros de aves, 75 de los cuales provenían de aves libres de patógenos específicos (SPF) adquiridos en la Compañía Alpes (Tehuacán, Puebla) y 163 que se eligieron al azar dentro de un grupo de sueros previamente probados por IH, cuyos títulos variaban entre 1:10 y 1:1280, estos provenían de aves a las que se les había inmunizado con la vacuna oficial contra influenza aviar inactivada y emulsionada en aceite, elaborada con la cepa A/chicken/México/CPA232/94 (H5N2) contra influenza

aviar, vía subcutánea, los sueros se obtuvieron al día 28, en que se titularon por IH. Se utilizaron dos sueros de referencia positivos y negativos de las compañías estadounidenses ya mencionadas.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) fue llevada a cabo siguiendo la técnica de Alexander y Allan, 1982 (8) usando cuatro unidades de virus de influenza H5N2 y 0.5% de eritocitos de pollo. Los títulos fueron expresados como la dilución más alta de suero que inhibía completamente la hemoaglutinación viral.

Para estandarizar la técnica de IDG se tomó como base la metodología descrita por Beard (7), salvo las modificaciones siguientes: se empleó un homogenizador Virtis, en vez de Lourdes, la diferencia es el tamaño de las cuchillas siendo las de este último más largas. Se dieron dos ciclos de sonicación (sonicador MSD) de cuatro min cada uno, en vez de uno de cinco min). Se preparó agar (Difco) al 0.9% en SSAF con 8% de cloruro de sodio, y se agregaron 5 ml a cada caja de Petri de 4.7 cms. de diámetro. Para hacer las perforaciones se utilizó un molde de pozos de 5.3 mm de diámetro con separación entre cada pozo de 2.4 mm. En el pozo central se adicionaron 50 µl, de antígeno y en los seis pozos periféricos se pusieron los sueros problema. La caja de Petri fue incubada a temperatura ambiente en cámara húmeda por 18 hrs. Las líneas de precipitación se identificaron mediante el uso de luz incidente.

Para MIDG se preparó agar al 0.9% de la forma descrita anteriormente y se agregaron 3 ml en portaobjetos desengrasados con anterioridad de 7.5 x 2.6 cms. Se utilizó un molde de pozos de 4.0 mm de diámetro y de 4.5 mm de separación entre cada uno. En el pozo central se adicionaron 18 µl de antígeno y en los pozos periféricos se pusieron los sueros. Los portaobjetos se inocularon de manera semejante que en la IDG. Los resultados para las pruebas de precipitación se determinaron positivos

cuando existieron líneas de identidad y negativos cuando éstas no fueron visibles. La sensibilidad y especificidad se calculó comparando la prueba de IH contra IDG, y luego IH contra MIDG respectivamente, empleando las fórmulas indicadas por Schwabe W, 1984 (9) y Méndez y cols, 1990 (10).

Con los antígenos se produjeron líneas de identidad nítidas, es decir los resultados

fueron positivos al emplear tanto IDG como MIDG con el antígeno elaborado en el laboratorio, el de Ames y el de SPAFAS, usando un suero de referencia (Ames, Iowa) (cuyo título fue de 1280 UHA), con el testigo. (SSAF) en ninguna ocasión se presentaron bandas de precipitación. Por otro lado, los 75 sueros provenientes de las aves SPF fueron negativos al IH, IDG y MIDG.

CUADRO 1. RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LAS PRUEBAS DE IH, IDG Y MIDG PARA INFLUENZA AVIAR EN SUEROS DE AVES.

TITULOS POR IH

	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	TOTAL POSITIVOS
IH	11*	18*	23*	30*	19*	26*	18*	18*	163
IDG	1(43)**	NP	2(43)	NP	10(43)	24(43)	17(43)	16(43)	70(43)
MIDG	NP	NP	2(43)(98)***	1(43)(98)	10(43)(98)	22(43)(98)	17(43)(98)	16(43)(98)	70(43)(98)

* Los números corresponden al número de muestras positivas en cada una de las diluciones.

** Los números entre paréntesis representan la sensibilidad (%) entre la IDG o la MIDG con respecto a la IH.

*** Los números del segundo paréntesis representan la sensibilidad (%) de la MIDG con respecto a la IDG.

NP No se presentaron líneas de identidad.

En el Cuadro 1, se observan los diferentes títulos que por IH presentaron cada uno de los 163 sueros de los animales inmunizados, asimismo el número de sueros positivos al IDG fueron 70 y a MIDG 69, el resto de los sueros (93 y 94 respectivamente) fueron negativos a las pruebas de precipitación en gel. En los sueros con títulos IH de 1:10 hasta 1:80 se detectaron cuatro positivos a IDG y a MIDG; de 19 sueros con títulos de 1:160, 10 resultados positivos a las técnicas de precipitación en gel, y de 62 sueros que presentaron títulos IH de 1:320 a 1:1280, 57 produjeron líneas de precipitación siendo este grupo donde mejores resultados hubieron en cuanto a positivos por IDG y MIDG.

En cuanto a la sensibilidad y a la especificidad de las técnicas de IDG y MIDG

contra la IH, fue de 43% y 100% respectivamente; mientras que cuando se compararon las técnicas de precipitación en gel, la sensibilidad fue de 98% y la especificidad de 100%. Esto puede deberse a que en IH la proteína que se detecta es la hemoaglutina (H), que es específica para cada subtipo (5,6), mientras que las pruebas de precipitación en gel detectan principalmente la neuroaminidasa (N) (17), que reconocen a cualquier subtipo del virus de influenza tipo A, es por ello que la IDG ha sido usada con éxito, pues detecta anticuerpos contra todos los subtipos de IA (1,4,7,11); se ha empleado para evaluar la eficiencia de vacunas de influenza para pavos (12) y para la caracterización antigénica de la proteína N (13). Asimismo, se ha sugerido que títulos altos por IH (más de 1:320 UHA)

y resultados positivos por IDG facilitan el diagnóstico de la infección en parvadas durante brotes (14).

En los Estados Unidos y otros países se han empleado para establecer la vigilancia epidemiológica para IA, pues resulta menos costosa emplearla en parvadas que la IH, la que sólo usan durante brotes (15,17).

En México, el antígeno de origen nacional, ya ha sido probado en varios estudios experimentales para detectar anticuerpos contra influenza en aves (18) e incluso en porcinos (19).

Con base a los resultados se concluye que las técnicas de precipitación en gel (IDG y MIDG), a pesar de su baja sensibilidad, son útiles para detectar parvadas infectadas con virus que induzcan títulos de anticuerpos por IH iguales o mayores a 1:320. Debido a que en general las vacunas inducen bajos títulos de anticuerpos, es necesario realizar estudios para reconocer si mediante esta prueba sería posible diferenciar parvadas vacunales de infectadas naturalmente. Se tiene así estandarizada una técnica fácil, que permite probar un gran número de sueros en poco tiempo, usando menos reactivos (40%), siendo por ende económica, relativamente rápida, y que puede ser de utilidad en laboratorios donde se cuenta con una infraestructura simple.

Por otro lado se recomienda continuar con la implementación de técnicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que podrían ser más sensibles.

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA, USING A MICROIMMUNODIFFUSION TEST IN AGAR.

SUMMARY

The purpose of this study was to develop a microimmunodiffusion test in gel (MIDG), to detect antibodies against type A of avian influenza virus in chicken serum. An antigen was prepared from chorioallantoic membranes

infected with the avian influenza virus strain (A/CK/Puebla/14585-622/94H5N2). Microimmunodiffusion test in gel (MIDG) was compared with immunodiffusion test in agar (IDA), and Hemagglutination inhibition test (HI) which is the reference technique. Seventy five serum samples were obtained from specific pathogen free chicken, which resulted negative by the three assays. 163 serum samples were obtained from vaccinated poultry with HI titers from 1:10 to 1:1280. The sensitivity of these two agar gel precipitin tests was relatively low (43%) in comparison with HI. It was found that sensitivity of MIDG was identical to IDG (98%), and both were positives from HI titers of 1:320 and above. We conclude that IDA and MIDG are very useful in detecting infected poultry with virus that produce HI titers from 1:320 to 1:1280. Both, can be used in laboratories with a reduced infrastructure, besides, MIDG has the advantage of making possible the analysis a great quantity of samples at low cost.

KEY WORDS: Avian influenza, Serology, Immunodiffusion test in gel, Microimmunodiffusion test in gel, Hemagglutination inhibition test.

REFERENCIAS

1. Fenner F, Bachman AP, Gibbs JP, Murphy JM, White OD. *Virología Veterinaria España; Acribia*, 1992:245.
2. Samadieh B, Kargar-Moakhar R, Afnan M. Demonstration of avian influenza A virus in Iran by immunodiffusion. *Avian Dis.* 1975; 19(4):689.
3. Dinter Z. *Diagnostic Virology*. Ed: Moreno López, Sweden: National Veterinary Institute, 1989:17.
4. Gillespie JH, Timoney JF. *Enfermedades Infecciosas de los Animales. Domésticos 4a. ed.* México: La Prensa Médica Mexicana, 1983: 785.
5. Lucio Rosales G. Seminario sobre influenza aviar. México: A.N.E.C.A. 1984: 1-97.
6. Arenas A, Carranza J, Perea AA, Miranda A, Maldonado A, Hermoso M. Type A Influenza viruses in birds in Southern Spain: serological survey by enzyme immunosorbent assay and haemmagglutination inhibition test. *Avian Pathol.* 1990; 19(3) 539.
7. Beard CW Demonstration of type specific influenza antibody detection by immunodiffusion. *Avian Dis.* 1970; 14: 337.
8. Alexander DJ, Ailan HW. Avian influenza in turkeys: a survey of farms in eastern England 1979/1980 *Br. Vet. J.* 1982;138: 479.
9. Schwabe W. *Veterinary Epidemiology*, U.S.A. Lea Febiger. 1984: 303.
10. Méndez RI, Namihira GD AL, Sosa MC. *El Protocolo de la Investigación*. 2a. ed. México: Trillas, 1990:210.
11. Lucio DE, Barrón FL, Toscano A. Resultados serológicos obtenidos en el laboratorio a partir de muestras de campo empleando las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH) y precipitación en gel de agar. *Memorias. II Curso de actualización sobre Influenza Aviar. ANECA, México D:F.* 1994: 23-26.
12. Abraham A, Sivandan V, Karunakaran D, Halvorson DA, Newman JA. Comparative serological evaluation of avian influenza vaccine in turkeys. *Avian Dis.* 1988; 32 (4) 659.
13. Ishida M, Nerome K, Oya A. Antigenic characterization of haemmagglutinin-neuramidase (HN) protein of avian paramyxoviruses by specific antisera to isolated NH subunits. *Arch. Virol.* 1985; 83 (3) 229.
14. Beard CW, Schiltziein WM, Tripathy DN. Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Dis.* 1991; 35: 356.

15. Cuetos R. Mesa redonda sobre influenza aviar. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. 4a. Reunión del CONASA. 14-17 Noviembre. 1996. México, D.F.
16. Suss J, Schafer J, Sinnecker H, Webster RG. Influenza virus subtypes in aquatic birds of Eastern Germany. Arch. Virol. 1994; 135(1):101.
17. Shieh HK, Huang, Shien JH, Chiu SY, Lee LF, YS. Studies of avian influenza in Taiwan, R.O.C. III. Isolation, identification, and pathogenicity test on the viruses isolated from breeding chickens. Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husb. 1992; 59:45.
18. Rodríguez VH, Cerón HM, Palacios MR, García LD, Mickle RT, Montiel NE, Tinoco JH, García GJ. Estudios de evaluación de una vacuna recombinante para prevenir la influenza aviar. I. Inducción de anticuerpos y protección al desafío. Memorias Reunión Nacional de Investigación Morelos, México, 1996: 101.
19. Diosdado VF, Loza RE, Socci EG, Morilla GA. Frecuencia de anticuerpos contra el virus de influenza A en cerdos de granjas de ciclo completo. Vet. Mex. Memorias Reunión Anual de Investigación Pecuaria. 1995; 26 (2) 127.