

## VI DISCUSION

La mayoría de los arbovirus especialmente en los Bunyavirus son aislados mediante cultivos celulares debido a su gran afinidad por éstos; algunas literaturas mencionan la afinidad del virus *Phlebotomus fever* por las líneas Vero y BHK-21(19, 27), pero no mencionan la afinidad con la línea celular C6-36; por lo que se realizó una prueba con las líneas celulares de Vero y C6-36 dando mejores resultados con Vero. El efecto citopático producido en las líneas celulares Vero E-6 y BHK-21 indican su afinidad por éstas.

La preparación del antígeno viral para la prueba de ELISA es un proceso complejo porque involucra determinar en qué línea celular se adapta mejor y en qué tiempo se debe cosechar para obtener una buena cantidad de antígeno, esto significa conocer su efecto citopático óptimo para su procesamiento.

El ELISA tiene que realizarse bajo las mismas condiciones de temperatura de incubación ( 37°C), número de lavados (5 veces por ciclo) y tiempo de desarrollo del color antes de la lectura (30 min), para garantizar la reproducibilidad de la prueba. Una incubación prolongada, una elevada temperatura, un menor número de lavados, afectaría los resultados de O.D. dando valores más altos de los reales. En condiciones opuestas a lo anterior darán como resultado una disminución en los valores de O.D.

Los resultados de especificidad y sensibilidad en relación con la prueba de PRNT fueron mayores a 80%, indicando una buena elaboración y estandarización de esta prueba. Purificando el antígeno mejoraremos la unión específica del anticuerpo IgG al antígeno viral y aumentaremos los valores antes mencionados.

Con la prueba inmunoenzimática se obtuvo una seroprevalencia de 16.25% para el virus *Phlebotomus fever*. Estos datos no pueden ser comparados con trabajos anteriores debido a que no hay estudios previos que demuestren la seroprevalencia de la infección.

En la estandarización de la prueba de PRNT, para la titulación se ensayo con la semilla viral obtenida en cerebro de ratones lactantes y con la obtenida en la línea celular Vero; notándose una gran diferencia en el título viral entre ambas semillas, dando mejor resultado la semilla viral de Vero E-6. Esto puede ser debido a que el virus *Phlebotomus fever*, no presenta una buena afinidad frente a las células de cerebro de ratón.

Debido a que crecieron muy pocas placas en la semilla obtenida en ratones lactantes, es necesario realizar pasajes sucesivos para incrementar el título del virus. En algunos trabajos se menciona más de veinte pasajes en ratones lactantes para utilizar la semilla viral en la prueba de PRNT (1.) estos pasajes sucesivos permiten que el virus en estudio logre adaptarse mejor en éste tipo de células.

En la determinación de la dilución óptima de trabajo para el virus en la prueba de PRNT, es de vital importancia realizar diluciones máximas, ya que pueden aparecer placas superpuestas y contarlas como una, por efecto de “over lap”. Para esto, en todas las pruebas de PRNT se incluyen dos diluciones, 1:10 y 1:100 de la dilución de trabajo; con el fin de demostrar que no hay “over lap” y que la dilución de trabajo es la correcta.