

EFICACIA DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DEL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EN CEREBRO DE RATONES LACTANTES

Efficacy of the Indirect Immunofluorescent Test for Early Detection of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in Suckling Mice Brain Tissue

Francis Aranguren^{*}, César Obando^{**}, Nelson Pérez^{**} y Mayra Hidalgo^{**},¹

^{*} Programa de Maestría de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. ^{**} Sanidad Animal CENIAP-INIA. Maracay, 2101A Apartado 70. Estado Aragua, Venezuela.

Correo-E: mhidalgo@inia.gob.ve

RECIBIDO: 22/01/07 - APROBADO: 21/03/07

RESUMEN

El objeto del trabajo fue estandarizar y evaluar la eficacia de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar en forma temprana, antígeno del Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) en cerebro de ratón lactante, utilizando la Fijación de Complemento (FC) como prueba de comparación. En principio, por IFI se detectó antígeno viral a las 10, 12 y 26 horas post inoculación (hpi) para las cepas P676, Lara 95 y TC-83, respectivamente. La sensibilidad de esta prueba para la cepa Lara-95, fue de 89% a las 24 hpi (período asintomático), en comparación con 32% para FC, indicando que la escasa cantidad de antígeno viral en las fases iniciales de la enfermedad se evidencia por la primera técnica. Además, la sensibilidad de ambas técnicas, en comparación con la prueba biológica, fue de 86% y 29% respectivamente. A las 36 horas post inoculación, en ratones con síntomas nerviosos evidentes, la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas fue de 100%. Estos resultados indican que la inmunofluorescencia indirecta es una alternativa válida y eficiente para la evaluación de focos de Encefalitis Equina Venezolana, contribuyendo de esta manera con la vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

(Palabras clave: Virus, Encefalitis Equina Venezolana, inmunofluorescencia, diagnóstico de laboratorio)

ABSTRACT

The aim of this study was to standardize and evaluate the efficacy of the indirect immunofluorescent technique (IIFT) for early detection of Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV) antigen in the brain of suckling mice, using

the Complement Fixation Test (CFT) as a comparison. Viral antigen TC-83 was detected at 10, 12 and 26 hours post-inoculation (hpi), for P-676, Lara-95 and TC-83 strains, respectively. The sensitivity of IIFT for Lara-95 strain, was 89% at 24 hpi (non symptomatic period), when compared to 32% for CFT, indicating that the low concentration of viral antigen during the early phases of the disease, can be detected with IIFT. The sensitivity of both techniques compared to the biological assay was 86% and 29% for IIFT and CFT, respectively. At 36 hpi in mice with evident symptomatology, the sensitivity and specificity of both test was 100%. These results indicate that the IIFT is a valid and efficient test to evaluate out breaks of Venezuelan Equine Encephalitis, in order to contributing to epidemiological surveillance of the disease.

(Key words: Virus, Venezuelan Equine Encephalitis, immunofluorescence, laboratory diagnosis)

INTRODUCCIÓN

La Encefalitis Equina Venezolana es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, que se transmite por picaduras de mosquitos a équidos y humanos. El agente causal es el virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), que pertenece al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae* (Calisher y Karabatos, 1988). El VEEV produce enfermedad aguda en équidos y humanos, afectando el Sistema Nervioso Central y tejidos extraneurales, con síntomas que varían desde resfriado ligero hasta encefalitis y/o muerte (Jhonston y Peters, 1996). Los VEEV están distribuidos en todo el continente americano, a excepción de Canadá, presentando dos ciclos de transmisión: a) un ciclo enzoótico, discreto y estable, que se presenta en zonas selváticas donde circula principalmente en roedores, es poco patógeno para équidos y produce brotes esporádicos en humanos y, b) un ciclo epizoótico/epidémico, transitorio, que se presenta en una gran variedad de nichos ecológicos, involucrando diferentes vertebrados, con alta morbilidad y mortalidad en équidos y humanos (Weaver *et al.*, 1992). En materia de diagnóstico de laboratorio, varios investigadores han señalado que es posible demostrar la presencia del VEEV en el bulbo olfatorio del cerebro de ratones lactantes, entre 18 y 24 horas post-inoculación del cojinete plantar (Ryshikov *et al.*, 1995). Para apoyar estos hallazgos se han empleado técnicas diagnósticas que incluyen titulación viral, hibridación *in situ* de ácidos nucleicos (Charles *et al.*, 1995) e inmunohistoquímica (Grieder *et al.*, 1995), las cuales son laboriosas y de cierta complejidad. Por el contrario, la inmunofluorescencia indirecta es una prueba de fácil y rápida aplicación técnica para la detección de infección por el VEEV. El propósito de este trabajo consistió en demostrar la eficacia que tiene esta prueba para el diagnóstico temprano de la enfermedad mediante la detección del antígeno del VEEV en el cerebro de ratones lactantes en fase pre-clínica y clínica de la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas virales

Se utilizaron 3 cepas virales pertenecientes al Complejo de Encefalitis Equina Venezolana: la cepa de referencia Trinidad Donkey-83 (TC-83), variante IAB; la cepa Lara-95, variante IC, aislada de un equino en Venezuela en el año 1995; la cepa P676, variante IC, aislada de un mosquito en Venezuela en el año 1976 (Kinney *et al.*, 1992).

Cepas de ratones

Se utilizaron las cepas de ratones *Navy Medical Research Institute* (NMRI) e Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INH). (Festing, 1980, The NIHGR, 1981).

Estandarización de la prueba de inmunofluorescencia indirecta

a) Preparación de suero hiperinmune contra el virus de la Encefalitis Equina Venezolana.

Para la preparación del suero hiperinmune (SH) contra el VEEV, se siguió el protocolo descrito por Harlow y Lane (1988). Brevemente se utilizó como antígeno la cepa de EEV de referencia Trinidad Donkey 83 (TC-83), la cual se amplificó en células Vero. La suspensión viral se clarificó por centrifugación y el antígeno se precipitó con polietilenglicol al 7,7% de NaCl al 2,2%. La concentración de antígeno se realizó por centrifugación, sobre colchón de sacarosa a 10.000 g por 4 horas a 4°C, en una ultracentrífuga *Beckman modelo L8-70*. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Harlow y Lane, 1988). Se expusieron dos conejos jóvenes de la raza New Zealand, a tres dosis del antígeno elaborado administrado por vía subcutánea cada 21 días. La primera dosis con adyuvante completo de Freund y las otras dos, con adyuvante incompleto de Freund. Además, se aplicaron dos dosis adicionales, utilizando como antígeno una vacuna inactivada contra VEEV de *The Salk Institute* (USA), a razón de 500 µl/conejo, por vía subcutánea, con intervalos de 21 días entre ellos. A los 21 días del último reto, los conejos se sangraron por punción cardíaca, recolectándose la sangre en tubos vacutainer, los cuales se colocaron en posición inclinada durante 3 horas, al cabo de las cuales se desprendieron los coágulos sanguíneos y se recolectó el suero hiperinmune (SH) en viales de 2 ml, almacenándose a -20°C hasta su uso.

b) Determinación de diluciones óptimas de suero hiperinmune contra EEV y conjugado específico anti-especie para la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Se probaron 4 diluciones de SH (1/100, 1/300, 1/500 y 1/1000), una dilución 1/500 de suero pre-inmune (SP) y dos diluciones de inmunoglobulina anti-conejo (1/300 y 1/500), elaborada en cabra, conjugada con isotiocianato de fluoresceína (*goat anti-rabbit IgG Whole molecule FITC conjugate, Sigma Immunochemicals*). Todas las diluciones de los reactivos para la IFI se hicieron con PBS pH 7,4. Se utilizaron láminas portaobjeto cubiertas con teflón, de 10 pozos cada una (10 pozos 5 mm *HTC Autoclavable Black, Cel-Line Associates, Inc. USA*). Para cada dilución a probar se realizaron improntas por duplicado

de 3 cerebros de ratones lactantes cepa NMRI, inoculados por vía intracraneal (IC) con $100DL_{50}/0,025mL$ de la cepa TC-83 y cosechados, con síntomas evidentes de la enfermedad a las 48 hpi, consistentes en temblores, dificultad de movimiento y parálisis. Igualmente, para los controles negativos y por cada dilución de reactivos, se realizaron improntas por duplicado de 2 cerebros de ratones lactantes, inoculados con buffer fosfato salino-albúmina bovina 7,5% (PBS-AB), los cuales se cosecharon paralelamente a los animales enfermos. Las láminas se fijaron en acetona por 20 minutos a $-20^{\circ}C$ y transcurrido este tiempo, se dejaron secar a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se colocó una gota de SH o SP a las diluciones pre-establecidas. Se incubaron por una hora en cámara húmeda a $37^{\circ}C$. Seguidamente, las láminas se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua destilada y se dejaron secar a TA. Se les colocó una gota del conjugado anti-conejo y se incubaron nuevamente por una hora en cámara húmeda a $37^{\circ}C$. Las láminas se lavaron como se describió anteriormente y se dejaron secar a TA. Para la observación a cada lámina se le colocó una gota de glicerina tamponada (10% en PBS) y una laminilla cubreobjeto. Se utilizó un microscopio de fluorescencia marca Zeiss con objetivo 40X. Una vez estandarizados los reactivos, se evaluó su estabilidad y la repetibilidad del ensayo, mediante el análisis por duplicado de improntas de 27 cerebros de ratones infectados con $100DL_{50}/0,025mL$ IC y con síntomas nerviosos, y 16 cerebros de animales controles negativos, los cuales se cosecharon paralelamente a los animales enfermos, a las 48 hpi.

d) Criterios para la evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

Se siguieron los siguientes criterios de evaluación (Larghi, 1975): intensidad de la tinción (T), cantidad de antígeno (C) y presencia y cantidad de fondo o tinción inespecífica (P). Los valores se asignan en cruces: 0+ (ausencia de coloración específica, CE), 1+ (1-25% células/campo con CE), 2+ (25-50% células/campo con CE), 3+ (50-75% células/campo con CE), 4+ (más del 75% células/campo con CE).

Detección temprana de VEEV por IFI en cerebro de ratones lactantes

Cada una de las cepas virales, TC-83, Lara 95 y P676, fue inoculada a razón de $100DL_{50}/0,025ml$, a camadas de ratones lactantes de 3 días de edad (con 8 animales cada una), por vía intracraneal. Cada 2 h, a partir del momento de la inoculación y hasta la aparición de los síntomas clínicos evidentes de la enfermedad (temblores, incoordinación y postración), se recolectaron 3 ratones lactantes para cosechar los cerebros y realizar la tinción por IFI. Para el sacrificio de los animales, éstos se colocaron en bolsas plásticas transparentes conteniendo un algodón impregnado en cloroformo. Se hicieron improntas por duplicado de los cerebros infectados y recolectados cada 2 h. Igualmente se colocaron duplicados de cerebros controles positivos, representados por ratones lactantes inoculados con 100 DL_{50} de la cepa TC-83 y cosechados con síntomas nerviosos evidentes. De la misma manera, se colocaron duplicados de control negativo, representados por improntas de cerebro de ratones lactantes inoculados con PBS-AB.

Prueba de fijación de complemento

A fin de corroborar la presencia del antígeno de la EEV, en los cerebros teñidos por IFI, se realizó la prueba de fijación del complemento (FC) a cerebros de ratones con síntomas nerviosos, recolectados de las titulaciones simultáneas, siguiendo el protocolo de Sever (1962).

Comparación de la prueba de IFI y FC a las 24 y 36 hpi.

Para cumplir con este objetivo se seleccionó la cepa viral Lara-95, por haber ocasionado, después de varios pasajes sucesivos en cerebro de ratón lactante, signos clínicos a las 36 hpi, indicando una mayor patogenicidad. En consecuencia, se establecieron para los experimentos que a continuación se señalan, los siguientes tiempos de recolección: 24 hpi (período en el cual no hay presencia de síntomas clínicos) y 36 hpi (período en el cual hay signos nerviosos evidentes: temblores, incoordinación, postración). Se dividieron 100 ratones lactantes de 3 días de edad cepa NMRI en 2 grupos, con 50 animales cada uno. El grupo A se inoculó con 100 DLRL₅₀/ 0,025 mL de la cepa Lara-95, y el B con 0,025 mL de buffer PBS (vía intracraneal). Se sacrificaron 20 ratones de cada grupo(A y B) a las 24 hpi y 36 hpi y sus cerebros fueron analizados simultáneamente por IFI y FC. Los 10 animales restantes de cada grupo se observaron diariamente hasta su muerte, para comprobar la capacidad infecciosa de la cepa.

Comparación entre las pruebas de IFI y FC para detección de antígeno de VEEV a las 24 hpi, con la prueba biológica (golden test) en ratones confirmados infectados

A objeto de realizar este estudio, 14 cerebros de los 20 ratones inoculados con virus y recolectados a las 24 hpi (un ratón murió a las 6 hpi y 5 muestras se agotaron) se reinocularon en igual número de camadas de ratones de 3 días de edad (prueba biológica) y se observaron para registrar aparición de signos nerviosos, que se interpretaron como presencia de VEEV y se confirmaron adicionalmente por FC.

Análisis estadístico

En cada comparación de técnicas de cada ensayo, la validez y seguridad de las pruebas se determinó por Sensibilidad/especificidad y valores predictivos positivo/negativo (VPP/VPN) (Altman y Bland, 1994; 1994a)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de inmunofluorescencia se utiliza ampliamente en investigación y diagnóstico de una variedad de agentes virales, tanto en humanos como en animales (De Mattos *et al.*, 1999; Dar *et al.*, 1998; Fredriksen *et al.*, 1999). Los resultados de los ensayos de detección temprana de virus de la EEV se muestran en la Tabla 1 y Figuras 1, 2 y 3. Por IFI fue posible detectar antígeno viral de la cepa TC-83 a partir de las 26 hpi, con 1 DL₅₀, en animales sin síntomas nerviosos (fase preclínica de la enfermedad), lo cual sugiere la

posibilidad de detectar el virus antes de las 26 hpi al utilizar dosis superiores, demostrándose la sensibilidad de la IFI, haciéndose la tinción y la cantidad de antígeno más evidentes a medida que transcurrían las hpi. Para la cepa Lara-95, se detectó antígeno viral a partir de las 12 hpi, en animales que no presentaban síntomas nerviosos para el momento de la recolección de la muestra. Con la cepa P676, se logró observar antígeno viral tan temprano como a las 10 hpi en animales sin síntomas nerviosos. Las diferencias en el tiempo de detección para cada cepa, pueden ser debidas a características individuales de adaptación y virulencia de las mismas para el tejido cerebral murino (Steele *et al.*, 1998). En este trabajo se logró detectar antígeno de VEEV, tan temprano como a las 10 hpi directamente de cerebros de ratones lactantes.

Partiendo de que la FC es una prueba cuantitativa, que necesita la presencia de grandes cantidades de virus en sistemas de amplificación viral para obtener resultados veraces, el criterio utilizado en la comparación de IFI y FC fue medir la eficacia de ambas en la detección de VEEV, en ausencia de signos neurológicos en ratones inoculados con éste.

A las 24 hpi cuando no eran evidentes los signos nerviosos, se recolectaron cerebros de 19 ratones inoculados con el virus (grupo A) y de 19 ratones inoculados con el buffer de dilución (grupo B) para ser procesados por ambas técnicas. Diecisiete muestras procesadas del grupo A, resultaron positivas por IFI y sólo 6 de éstas también lo fueron por FC. Las 19 muestras del grupo B resultaron negativas por IFI y FC. En este análisis, se observa claramente que la IFI es una prueba mucho más sensible que la FC para la detección temprana (fase asintomática) de VEEV con sensibilidad de 89% y especificidad de 100%, mostrando además un VPN superior, en comparación con la FC, que tuvo una sensibilidad de 32% (Tabla 2). Estos resultados pueden deberse a escasa cantidad de antígeno viral en las fases iniciales de la enfermedad, que no se detecta por la técnica de FC, pero sí por IFI, lo que sugiere una mayor sensibilidad de esta última para detectar antígeno en muestras con escasa multiplicación viral. Se repitió el experimento anterior, a las 36 hpi, cuando la cantidad de antígeno viral era mayor y los síntomas nerviosos eran evidentes (fase clínica), recolectándose 19 animales para el grupo A (inoculados con VEEV) y 19 para el grupo B (inoculados con PBS). Los resultados mostraron que ambas pruebas presentan igual sensibilidad y especificidad (100%) (Tabla 3). En este análisis, la IFI y la FC tienen la misma validez y seguridad como pruebas diagnósticas de infección por el VEEV, corroborando que la FC requiere una mayor cantidad de antígeno en el tejido para poder ser detectado.

Además, para confirmar que los ratones inoculados con el virus estaban verdaderamente infectados a las 24 hpi, se realizó un ensayo de detección de antígeno por prueba biológica, con 14 de las muestras de cerebro de los ratones inoculados con el virus (grupo A), recolectados a en ese período de tiempo y sin signos nerviosos, mediante su reinoculación en cerebros de ratones lactantes. En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos. De las 14 muestras positivas por prueba biológica, la IFI detectó 12, con una sensibilidad de 86% y la FC solo pudo detectar 4 (29%), indicando una mayor sensibilidad de la primera prueba para detectar antígeno en tejidos con escasa multiplicación viral.

CONCLUSIONES

La prueba de IFI utilizada en este estudio se considera una alternativa válida, eficiente y de fácil aplicación para la evaluación y diagnóstico de focos de EEV, ya que demuestra una sensibilidad importante para la detección temprana de la infección en individuos asintomáticos, lo que la convierte en herramienta diagnóstica de gran utilidad, contribuyendo de esta manera con la vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada en parte por FUNDACITE Aragua, a través del proyecto DLAG 0069 y por el programa de maestría de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela.

REFERENCIAS

1. Altman DG.; Bland JM. 1994. Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMJ.*, 308:1552.
2. Altman DG.; Bland JM. 1994a. Diagnostic tests 2: predictive values. *BMJ.*, 309:102.
3. Calisher, C.H.; Karabatos, N. 1988. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. En: Monath TP ed. *The Arboviruses: epidemiology and ecology*. Vol IV. Boca Ratón, FL: CRC Press. pp. 19-57.
4. Charles P.; Walters E.; Margolis F.; Johnston R. 1995. Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in the mouse. *Virology*. 208:662-271.
5. Dar A.; Kapil S.; Goyal S. 1998. Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:152-157.
6. De Mattos C.C.; de Mattos C.A.; Loza-Rubio E.; Aguilar-Setién A.; Orciari L.; Smith J. 1999. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmission dynamics and human risk. *Am. Trop. Med. Hyg.*, 61:587-597
7. Festing, M.F.W. 1980. *International Index of Laboratory Animals*. 4th. Edition, p.34.
8. Fredriksen B.; Press C.; Loken T.; Odegaard S. 1999. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, 64:109-122.
9. Grieder F.; Davis N.; Aronson J.; Charles P.; Sellon D.; Suzuki K.; Johnston R. 1995. Specific restrictions in the progression of Venezuelan encephalitis virus-induced disease resulting from single aminoacid changes in the glycoproteins. *Virology*. 206:994-1006.
10. Harlow E.; Lane D. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 726 p.

11. Johnston, R.R.; Peters, C.J. 1996. Alphavirus. En: *Fields Virology*. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley eds. Raven Publishers, Philadelphia. Chap. 28:843-898.
12. Kinney R.; Tsuchuba K.; Snider J.; Trent D. 1992. Genetic evidence that epizootic Venezuelan Equine Encephalitis (VEE) viruses may have evolved from enzootic VEE subtype I-D virus. *Virology*. 191:569-580.
13. Larghi O. 1975. Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Nota Técnica N° 8. *Centro Panamericano de Zoonosis. Oficina Sanitaria Panamericana. Organización Mundial de la Salud*. 24 pp.
14. Ryshikov A.; Ryabchicova E.; Sergeev A.; Tkacheva N. 1995. Spread of Venezuelan Equine Encephalitis (VEE) virus and damage of the central nervous system (CNS) in mice olfactory tract. *Arch. Virol.*, 140:2243-2254.
15. Sever, J. 1962. Application of microtechniques to viral serological investigations. *J. Immunol.* 88:320-329.
16. Steele K.E.; Davis K.L.; Stephan K.; Kill W.; Vognel P.; Hart MK. 1998. Comparative neurovirulence and tissue tropism of wild-type and attenuated strains of Venezuelan equine encephalitis virus administered by aerosol in C3H/HEN and BALB/C mice. *Vet. Pathol.*, 35:386-397.
17. The National Institute of Health 1981. The *NIH Genetic Resource (NIHGR) Publication*. N° 81-606 p.
18. Weaver S.; Rico-Hesse R.; Scott W. 1992. Genetic diversity and slow rates of evolution in New World alphaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 176:99-115.

Figuras

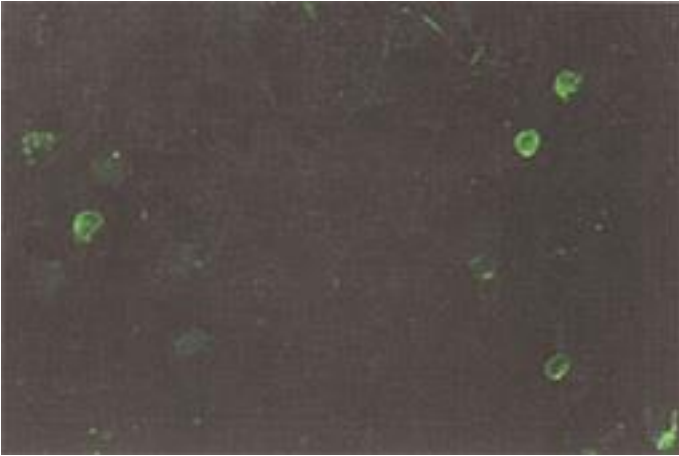


Figura 1. Detección de antígeno de VEEV cepa TC-83 en impronta de cerebro de ratón lactante aparentemente sano, recolectado a las 26 hpi y teñido por inmunofluorescencia indirecta con suero hiperinmune elaborado en conejo. Se observa el antígeno de color verde manzana brillante. Aumento 40X

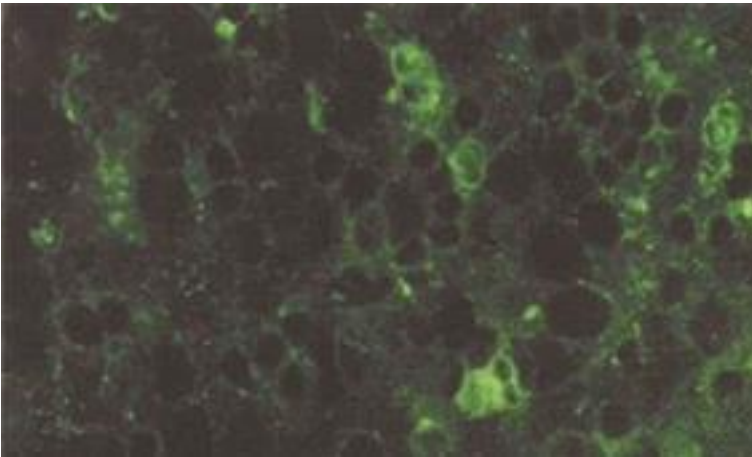


Figura 2. Detección de antígeno de VEEV cepa Lara 95 en muestra de cerebro de ratón lactante aparentemente sano, recolectado a las 12 hpi y teñido por inmunofluorescencia indirecta con suero hiperinmune elaborado en conejo. Se observa el antígeno de color verde manzana brillante. Aumento 40X

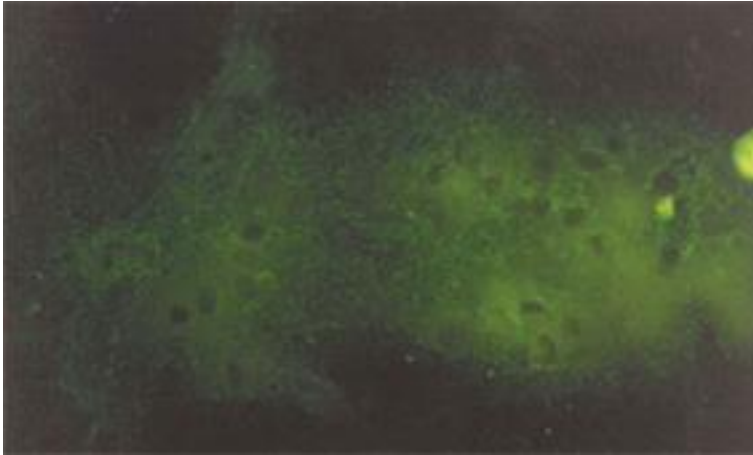


Figura 3. Detección de antígeno de VEEV cepa P676 en muestra de cerebro de ratón lactante aparentemente sano, recolectado a las 10 h.p.i. y teñido por inmunofluorescencia indirecta con suero hiperinmune elaborado en conejo. Se observa el antígeno de color verde manzana brillante. Aumento 40X

Tablas

Tabla 1. Detección de antígeno de Encefalitis Equina Venezolana en cerebros de ratones lactantes por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Cepa viral	Título DL ₅₀ /0,025mL RLIC	DL ₅₀ inoculada s	Detección viral por IFI h.p.i	Aparición de síntomas *
TC-83	10 ^{7,3}	1	26	48 h.p.i.
LARA-95	10 ^{7,19}	100	12	48 h.p.i.
P676	10 ^{8,5}	100	10	48 h.p.i.

DL₅₀/0,025mLRLIC : dosis letal₅₀/0,025 mL en cerebro de ratón lactante por vía intracraneal.
h.p.i.: horas post-inoculación. *: Incoordinación parálisis, postración.

Tabla 2. Comparación de la técnica IFI con FC para detección de antígeno de VEEV en cerebro de ratones lactantes sin signos nerviosos (fase asintomática) a las 24 hpi.

IFI	Ratones inoculados con		FC	Ratones inoculados con	
	Lara-95 Grupo A	PBS Grupo B		Lara-95 Grupo A	PBS Grupo B
Positivo	17	0	Positivo	6	0
Negativo	2	19	Negativo	13	19
Sensibilidad:	89%		Sensibilidad:	32%	
Especificidad:	100%		Especificidad:	100%	
VPP:	100%		VPP:	100%	
VPN:	90%		VPN:	59%	

VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo

Tabla 3. Comparación de la técnica IFI con FC para detección de antígeno de VEEV en cerebro de ratones lactantes con signos nerviosos (fase clínica), a las 36 h.p.i.

IFI	Ratones inoculados con		FC	Ratones inoculados con	
	Lara-95 Grupo A	PBS Grupo B		Lara-95 Grupo A	PBS Grupo B
Positivo	19	0	Positivo	19	0
Negativo	0	19	Negativo	0	19
Sensibilidad:	100%		Sensibilidad:	100%	
Especificidad:	100%		Especificidad:	100%	
VPP:	100%		VPP:	100%	
VPN:	100%		VPN:	100%	

VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo

