

MAZATLAN, SIN, JULIO 11 AL 14 DE 1984

INTERACCION VIRUS BACTERIA EN LAS NEUMONIAS DEL CERDO
(CONACYT: PCAFBNA-020316).TITULO II. TECNICA DE INMUNOELECTROFORESIS (IOEP) PARA LA DETECCION DE
AC EN CUERO CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY.AUTOR (es) Badiola Saiz, J.J.* Pujols Romeu J.* Aguilar Setién A.***
Hernández Baumgarten E.**

INSTITUCION * Generalitat de Catalunya (España)

** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM)

AREA *** Departamento de Inmunología, Centro Médico Nacional

SANIDAD

INTRODUCCION

Pocas son las técnicas serológicas que sean de fácil estandarización, economía, sencillez y que al procesar gran número de muestras se tengan resultados en poco tiempo. De las técnicas inmunológicas disponibles que se ajustan más a estas cualidades se encuentran la doble inmunodifusión, inmunoelectroosmoforesis (IEOP) y ELISA, tal vez sea la IEOP la que ocupe el primer lugar.

OBJETIVOS

Obtener un antígeno adecuado de Aujeszky y estandarizar los parámetros, que influyen en la resolución de la IEOP al detectar anticuerpos de Aujeszky.

MATERIAL Y METODOS

- Células: cultivos confluentes de PK-15 en botellas de Roux.
- Virus: los cultivos de PK-15 se infectaron con el virus de Aujeszky VAC-1 (Virus Aujeszky Cuautitlán 1), aislado de conejo inoculado con una muestra procedente de un foco y pasado 7 veces en células PK-15.
- Infección celular: las botellas de Roux con cultivo confluyente de PK-15 se infectaron con 10 UFP/Célula de VAC-1. Se dejó adsorber durante 60 minutos a 37°C y se añadieron 20 ml. de MEM Earle, sin suero, más penicilina-streptomicina (2x). Se incubó en un agitador orbital (New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison Nd. USA) a 30 rpm., 37°C, hasta que el efecto citopático (ECP) fué casi completo.
- Obtención del antígeno viral:
 - Técnica del Tween 80 y Sulfato de Amonio ($SO_4(NH_4)_2$) (Antígeno 1)

Tras la aparición del E.C.P. casi completo se añadió a cada botella de Roux - Tween 80 (3% v/v) y se mantuvo en agitación, esta vez a 130 r.p.m., durante 4 horas a 37°C. Posteriormente se añadieron 42.5 gr. de $SO_4(NH_4)_2$ por cada 100 ml. de medio. Se colectó el contenido de las botellas de Roux en tubos de centrifuga y después de 30 minutos a 3000 g. (4°C), la fracción cremosa sobrenadante se disolvió en 20 ml. de Sol. Buffer de Fosfatos (PBS) a pH 7.2. Se dializó frente a RBS durante 24 horas de buffer.
 - Técnica del $SO_4(NH_4)_2$ (Antígeno 3)

Los cultivos con un E.C.P. casi completo se sometieron a tres ciclos de congelación (-70°C) -descongelación (37°C), después de desprender el tapiz con un raspador de silicona. Posteriormente centrifugar lo cosechado a 2000 g. - (4°C) durante 15 minutos, se precipitaron las proteínas contenidas en el sobrenadante con 42.5 gr/100 ml. de $SO_4(NH_4)_2$. Se dejó a 4°C toda la noche y el precipitado se empastilló centrifugado a 1500 g. (4°C) durante 40 minutos. El "pellet" se resuspendió en PBS y se dializó frente a PBS como en el caso anterior.
- Antígenos negativos: estos se obtuvieron procesando de igual forma, que en las técnicas 1 y 2 del apartado anterior, cultivos de PK-15 no infectados.

- f) Sueros controles positivos y negativos; estos fueron cedidos amablemente por el Departamento de Epizootiología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Palo Alto.
- g) Inmunolectroosmoforesis (IEOP); para su realización se empleo un aparato LKB--2117 Multiphor (LKB BROMMA, SWEDEN) y las variables que se probaron fueron las siguientes:

- 1) Geles - agar noble al 1%
Agarosa- al 0.69%
- 2) Tres buffer de veronal con molaridades de 0,111, 0.165 y 0,222, el primero de ellos con 0,12 M de NaCl, A todos ellos se les añadió un 0,025% de azida de sodio,
- 3) Los antígenos antes dichos
- 4) Dos distancias entre pocillo (5 y 10 mm)
- 5) Tres tiempo de corrida; 30, 60 y 90 minutos,
- 6) Tres intensidades por cada tres placas en la cámara de electrofóresis; 13, 17 y 50 mA, a corriente fija de 200 V,

RESULTADOS

Los mejores resultados se obtuvieron con gel de agarosa al 0.69% en buffer veronal 0.165 M y veronal 0.111 M + 0.12 M de ClNa en la cámara de electrofóresis. La distancia entre pocillos de 5 mm, el tiempo de corrida de 60 minutos y una intensidad de corriente, a 200 V, de 50 mA. El mejor antígeno fué el obtenido por la técnica del Tween 80 y $SO_4(NH_4)_2$ (ver cuadro 1),

Dilución de Ag	Ag	SUERO 1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	SUERO (-)
1/1	1	+	+	+/-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-
1/2	1	+	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-
1/4	1	+	+	+	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-
1/8	1	+	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
1/16	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-

CUADRO 1. RESULTADOS OBTENIDOS CON DIFERENTES DILUCIONES DE Ag y suero en la IEOP con las condiciones óptimas de corrida.