

## " XXI REUNION NACIONAL DE AMVEC 86 "

**Título:** ESTUDIO SEROLOGICO DE PARVOVIRUS PORCINO POR LA TECNICA DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION EMPLEANDO SUERO Y SANGRE ABSORBIDA EN PAPEL FILTRO

**Autor (es):** Rodríguez, M.; Lara, V.; Ciprián, A.; Camacho, J.

**Institución (es):** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM

**Area:** Sanidad Animal

### RESUMEN

Se realizó un estudio serológico en 135 cerdas para determinar los niveles de anticuerpos contra PPV; utilizando suero de sangre completa obtenido por extracción venosa y suero a partir de sangre absorbida en papel filtro obtenida por punción venosa, con lo cual se eliminan al máximo los estados de tensión en el animal. Haciendo un estudio de análisis estadístico, se determinó que el método de papel filtro funciona adecuadamente y se recomienda para la realización de estudios serológicos de este tipo.

### INTRODUCCION

El parvovirus porcino ha sido aislado en diferentes países a partir de diversos órganos de fetos momificados. En México el virus fue identificado en 1982 por Ciprián y Cois. Sin embargo, hasta el momento no existen datos precisos sobre el perfil inmunológico de la enfermedad en granjas.

Debido al gran problema que implica tomar muestras de sangre en cerdos, se pensó en un método fácil que elimine al máximo el manejo de los animales y se eviten estados de tensión. Tomando una pequeña cantidad de sangre en papel filtro es posible titular niveles de anticuerpos por la prueba de IHA. Este método fue utilizado con buenos resultados en una investigación de toxoplasmosis viendo las ventajas que presenta se pensó que para el estudio de PPV sería de gran utilidad.

El estudio se llevó a cabo con 135 hembras, tomando sangre completa por extracción venosa y sangre obtenida en papel filtro, siendo ambas muestras probadas por IHA posteriormente se realizó un estudio de regresión y correlación lineal en la cual mostró la efectividad de este método.

### MATERIAL Y METODOS

**Origen de sueros:** Se tomaron muestras de sangre completa obtenida por extracción venosa y sangre absorbida en papel filtro, obteniéndose 2 muestras por cada cerda. Se trabajaron en total 135 cerdas de 2 granjas (35 y 100 respectivamente), con problemas reproductivos, de diversas edades y estados reproductivos.

**Papel filtro:** Las tiritas de papel filtro poseen dos zonas: de absorción, donde la sangre es absorbida y la zona de difusión donde queda el exceso de sangre. La zona de absorción mide 1,5 x 5 cm, con capacidad de 0.25 ml. de sangre. La muestra se tomó por punción en la oreja y se impregnó el papel filtro, posteriormente se dejó secar a la sombra y se congelaron a -70°C hasta su utilización. La zona de absorción se cortó en pedazos y se rehidrató con 0.75 ml. de PBS pH 7.2 en placas con fondo en "U" 1 hora a temperatura ambiente o 3 horas a 4°C; el líquido sobrenadante se consideró suero diluido 1:4.

**Tratamiento del suero:** Debido a la gran cantidad de inhibidores inespecíficos que posee el suero porcino, todos los sueros fueron tratados por inactivación con calor, 30 minutos a 56°C, posteriormente fueron absorbidos con kaolín al

25% y eritrocitos de cobayo al 50%, obteniéndose finalmente una dilución 1:10 para los sueros obtenidos de sangre completa por extracción venosa y 1:40 para los sueros obtenidos en papel filtro.

#### INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION

Suero positivo con título 1:512 y suero negativo donados por H.S. Joo (Universidad de Minnesota, U.S.A.).

Antígeno: Obtenido en el laboratorio a partir de líquido sobrenadante de macerado de hígado y pulmón de un feto momificado obtenido en rastro. Ambos órganos fueron positivos a IHA, con título de 1:32,768 en hígado y 1:4,096 en pulmón, positivos a IHA, resistentes a éter y cloroformo y cuando fueron observados por microscopía electrónica mostraron la morfología característica. Para realizar la IHA el antígeno fué diluido conteniendo 4 UHA.

ERITROCITOS : Provenientes de cobayos, obtenidos por punción intracardiaca en solución de Alsever's, lavados con PBS y suspendidos al 0.5% en PBS más 0.1% de fracción V de albúmina bovina. En esta concentración se considera que existen  $25 \times 10^6$  eritrocitos por ml.

La técnica de IHA fué realizada en microplacas con fondo en "U", utilizando - PBS más 0.1% de fracción V de albúmina bovina.

Las diluciones dobles del suero fueron desde 1:20 hasta 1:10,240 y para el suero obtenido de papel filtro de 1:80 hasta 1:40,960. Después de una hora de -- contacto del suero con el antígeno a temperatura ambiente, se añadieron los eritrocitos de cobayo suspendido en PBS más albúmina. Las microplacas se reposaron a 4°C durante 12 horas y la lectura se efectuó. El título de IHA es expresado por la más alta dilución en que se presente la inhibición total de la HA. Se considera que títulos a partir de 1:320 son positivos.

#### RESULTADOS

En la primera granja donde se muestrearon 35 cerdas, los títulos de IHA en suero fueron de 0 a 10,240, siendo 5 cerdas negativas (14,28%) y 30 cerdas positivas (85,71%). Los títulos en papel variaron ampliamente ya que las muestras se utilizaron para estandarizar la técnica. Puesto que no se sabía con exactitud de que manera tratarlos, las muestras fueron sometidas a diversos tratamientos: con y sin calor, con y sin adsorción con kaolín y eritrocitos y sin ningún tratamiento; en base a los resultados obtenidos se consideró que el mejor método era tratarlos con temperatura 56°C 30 minutos y adsorción con kaolín y eritrocitos, al igual que los sueros obtenidos de -- sangre completa por extracción venosa.

En la segunda granja donde se muestrearon 100 cerdas, se obtuvieron títulos de IHA tanto en suero como en papel que van de 0 a 1:1,280, siendo 42% cerdas positivas y 58% negativas. En esta granja se realizó un análisis de regresión y correlación lineal, para determinar si ambos métodos (suero y papel) correlacionaban con mismos títulos de anticuerpos, obteniéndose los siguientes resultados: coeficiente de correlación = 0,86,  $r^2 = 0,72$ , ecuación de la recta  $y = 0.63 X + 74,53$  (gráfica 1).

#### DISCUSION-CONCLUSION

Con respecto al papel filtro el análisis estadístico reveló que el método de papel filtro y suero tuvieron una relación lineal cuya gráfica e intervalo para los promedios con 95% de confianza se representan en la gráfica. El valor de  $r$  indicó que existe un 74% de variación explicada por el experimento, lo cual fué buen indicio de la relación entre los métodos de muestreo y el diseño experimental efectuado. Por lo tanto, se puede decir que el método en papel es confiable, pudiéndose estimar niveles de anticuerpos en sangre a partir de muestras en papel, utilizando la ecuación de la recta. Es importante señalar que nunca se obtuvieron títulos positivos en suero y negativos en

papel o viceversa, con lo que se logró apreciar la sensibilidad de este método.

Por lo resultados obtenidos y la facilidad de manejo el papel filtro es un método que permite realizar pruebas de IHA, sin embargo, se sugiere realizar más estudios para conocer si funciona adecuadamente en otras pruebas serológicas.

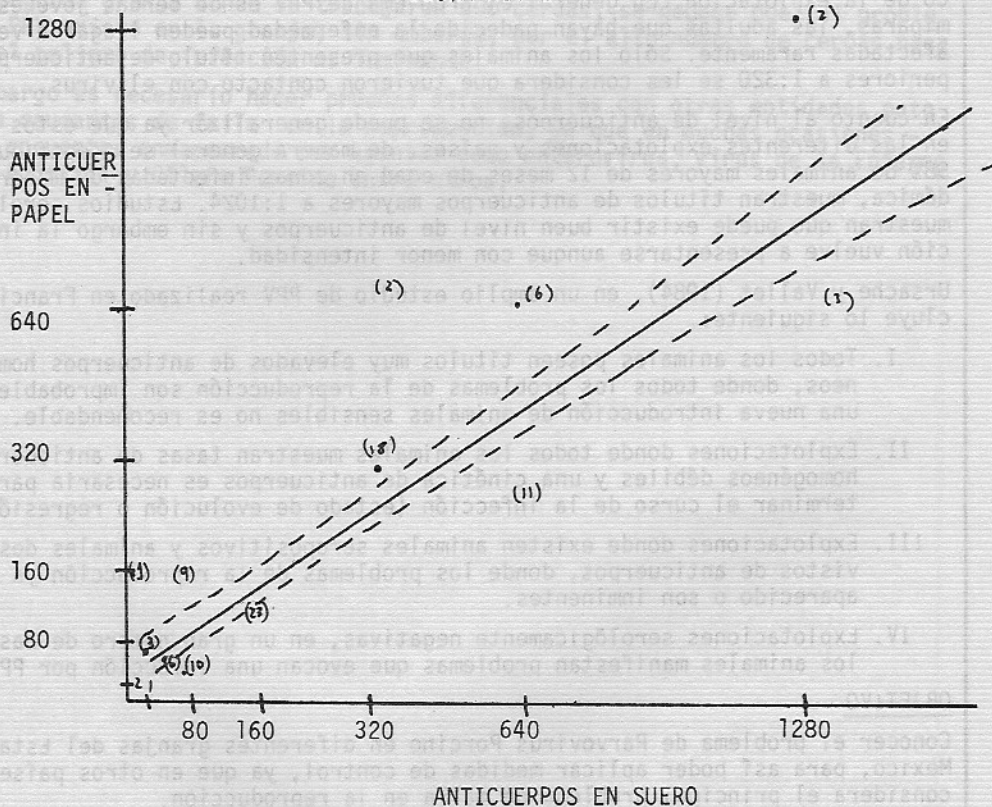
Aunque el estudio realizado es muy pequeño, los resultados obtenidos señalan claramente que la infección por PPV existe en granjas porcinas en México, siendo la primera vez que se hace un estudio serológico del virus en el país.

De acuerdo a los títulos referidos por Ursache y Vallet (1984)

En la primera granja la infección existe de manera endémica y el estado inmune de las madres es adecuado.

En la segunda granja el número de animales negativos es muy alto (58%) y el peligro de infección es inminente, por lo que se deben efectuar medidas de control adecuadas.

FIGURA NO. I



( ) Número de repeticiones