

II A.L.V.E.C.  
XXII A.M.V.E.C.  
III U.N.P.C.

TITULO : PRODUCCION Y EVALUACION DE UN CONJUGADO PARA EL DIAGNOSTICO DEL COLERA PORCINO UTILIZANDO SUERO HIPERINMUNE CONGELADO DURANTE 12 AÑOS.  
AUTOR (ES) : Correa G., P.; Anaya E., A.M.; Coba A., M.A., Arriaga D., C.

INSTITUCION (ES) : Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), SARH.

### Resumen

**INTRODUCCION.**— En la actualidad, el Cólera Porcino (CP) es una enfermedad importante para la porcicultura nacional. Hasta ahora, uno de los métodos de diagnóstico del CP más utilizado, es la prueba directa de anticuerpos fluorescentes; debido a su alta sensibilidad, especificidad y al corto tiempo necesario para obtener el resultado (1). El conjugado para el CP, además de emplearse para el diagnóstico de la enfermedad, sirve para la titulación de la vacuna CP-PAV-250 (2), titulación de anticuerpos en los sueros comerciales contra el CP; y además se emplea en los diversos trabajos de investigación serológica del CP, que se realizan en este Instituto, en los cuales se utiliza la prueba de sueroneutralización por reducción de focos fluorescentes (3).

**OBJETIVOS.**— 1) Contar con un conjugado altamente específico para la detección del antígeno del virus del CP y para emplearlo en las pruebas de sueroneutralización; 2) Investigar si se pierde su título y su especificidad al preparar un nuevo lote con el mismo suero, después de que éste fue mantenido 12 años en congelación.

**MATERIALES Y METODOS.**— En 1975, se produjo un suero hiperinmune, hiperimmunizando un cerdo sin anticuerpos contra CP, de la manera siguiente: se vacunó el cerdo contra el CP, con la vacuna PAV-250; a los 14 días se expuso con 2ml. de la cepa Ames de CP. Después se le inoculó 1 ml de cepa Ames semanalmente, por 6 ocasiones. Siete meses después, se le aplicaron por vía intravenosa 1,700 ml (5 ml por libra de peso) de sangre de cerdos con signos clínicos de Cólera Porcino, previamente inoculados con la cepa Ames; 14 días después se hizo el sangrado total, obteniéndose así el suero. El suero hiperinmune fue mantenido a -20 y -70 °C durante 10 y 2 años, respectivamente. En 1977, el suero se conjugó con isotiocianato de fluoresceína, siguiendo la técnica proporcionada por el National Veterinary Services Laboratory, U.S.D.A., de Ames, Iowa (4) y se comprobó que el conjugado daba tinción específica a la dilución 1:300; y a la dilución 1:200 no tiñó a los virus porcinos: Adenovirus, Virus Hemoaglutinante de la Encefalomielitis, Parvovirus, Pseudorrabia, Reovirus, Influenza, Gastroenteritis Transmisible y Enterovirus (Grupos 1 y 3); y sí tiñó al virus de la Diarrea Viral Bovina, con poca intensidad, debido a la inmunidad cruzada existente entre ambos (5). En 1987, nuevamente se conjugaron 40 ml del suero hiperinmune elaborado en 1975. Para ello, se centrifugó el suero a 2,500 rpm. Se precipitaron las gamaglobulinas con solución saturada de sulfato de amonio (vol x vol) en refrigeración. Se centrifugó a 3,000 rpm

durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en agua destilada, utilizando la mitad de agua con respecto al volumen original del suero. Se precipitaron nuevamente las gamaglobulinas con solución saturada de sulfato de amonio (vol. x 1/4 vol., respectivamente). Se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante, desechándolo; y se disolvió el precipitado con agua destilada, utilizando 1/4 parte de agua con respecto al volumen original del suero. Se dializó durante 2 horas en agua destilada en refrigeración y posteriormente en solución de cloruro de sodio al 0.85% a 4°C, durante 36 horas, con agitación ligera y cambio de solución salina cada 12 horas. Se centrifugó a 3,000 rpm, durante 15 minutos a 4°C y se desechó el sedimento. Se determinó la concentración de proteína por los métodos de Lowry y Biuret. Se tiñeron las gamaglobulinas con isotiocianato de fluoresceína, utilizando 0.025 mg x mg de proteína; se ajustó el pH a 9.5. Se centrifugó el conjugado a 3,000 rpm a 4°C y se eliminaron los precipitados. Se pasó por una columna de Sephadex G-25, posteriormente se dializó en solución salina amortiguadora de fosfatos a 4°C, durante 48 horas y se centrifugó a 4,000 rpm a 4°C, para eliminar posibles bacterias y grumos, y se procedió a titularlo.

RESULTADOS.- El conjugado resultó satisfactorio al ser diluido de 1:10 hasta 1:100.

CONCLUSIONES.- Se puede concluir que después de 10 años de conservarse el suero hiperinmune a -20°C, y 2 años a -70°C, el suero conjugado, mostró un título específico hasta de 1:100, en lugar de su título inicial de 1:300; este último título fue obtenido con suero conjugado, siguiendo la Técnica del U.S.D.A.(4) y con otro lote preparado con otra técnica semejante (5). El Título de 1:100 es todavía muy aceptable, ya que aún permite hacer un gran número de tinciones con anticuerpos fluorescentes, por ml de conjugado.

#### LITERATURA CITADA

- 1.- Aiken J. M., K.H. Hoopes, E.L. Stair, M.B. Rhodes, 1964. Rapid Diagnosis of Hog Cholera: Tissue-Impression Fluorescent - Antibody Technique. J.Am. Vet. Med. Assoc. 144 (12); pp. 1395-1397.
- 2.- Correa Girón, P.; Baker, J.A.; Sheffy, B.E.; Ochoa, M. del C.; Mancisidor. N. Una nueva vacuna mejorada para controlar el cólera del cerdo. Técnica Pecuaria en México, No. 29, pp. 34-40, Julio-Diciembre, 1975.

3.- Snyder, M.L.; Eernisse, K.A.; Erickson, G.A. Fluorescent Antibody Neutralization Test for the detection of Hog Cholera (HC) and Bovine Viral Diarrhea (BVD) Antibodies. In: Serologic Microtitration Techniques. U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services. National Veterinary Services Laboratories. Ames, Iowa, June, 1981, pp. 40-42.

4.- Snyder, M.L. 1977. Preparation of a Fluorescent Antibody Conjugate. National Veterinary Services Laboratory, U.S.D.A., Ames, Iowa. Mimeograph publication.

5.- Díaz G., A.; Ochoa, M. del C.; Mancisidor, N.; Snyder, M.L.; Correa G., P., - 1977. Producción y evaluación de un conjugado para detectar virus de Cólera Porcino. I Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en Cerdos. XIII Convención AMVEC. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco. México, D.F. del 6 al 10 de Sep.

6.- Morilla G., A.; Bautista G., C., 1981. Conjugación de Anticuerpos con Isotiocianato de Fluoresceína. En: Inmunología Veterinaria. Manual de Laboratorio. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C.