

TITULO: PROPUESTA COMO METODO OFICIAL PARA CONTROL DE LA PSEUDORRABIA: ADAPTACION DEL PAPEL FILTRO HEMOADSORBENTE A LA TECNICA DE ELISA EMPLEANDO VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY CON GENOMA COMPLETO.

AUTORES: Cuevas R. S., De Paz V. O., Colmenares V. G., Ciprián C. A.

INSTITUCIONES: Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología INIFAP SARH. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

AREA: SANIDAD ANIMAL

INTRODUCCION

La técnica inmunoenzimática de ELISA es un método ampliamente utilizado para el diagnóstico serológico de distintas enfermedades. Se caracteriza por ser una técnica altamente sensible y de gran especificidad que permite realizar en un corto espacio de tiempo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica. Fue inicialmente descrita en 1971 por Avrameas y Guilbert; Engvall y Perlmann 1971; Van Weemen y Shuurs 1971 y ha sido ampliamente aplicada en todo el mundo, siendo hoy en día la técnica utilizada para el diagnóstico serológico de muchas enfermedades virales. Desde entonces diversos métodos de ELISA han sido reportados para el análisis serológico. De tal forma que en la actualidad para el diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Aujeszky se encuentran disponibles en el mercado internacional una serie de vacunas que incluyen un kit diagnóstico basado en la prueba de ELISA empleando como antígeno virus con delección en el genoma (en gX, en gI o Tk). Sin embargo, el empleo de ELISA con virus completo, es el método de elección para llevar a cabo los estudios epizootiológicos y de control de movilización de los cerdos.

En base a investigaciones previas reportadas por los franceses Eliot y Toma (1987) y las experiencias realizadas en México por Gay y Hamdy (1989) en conejos y Rodríguez-Villela et. al (1988) en cerdos y como apoyo a la campaña de erradicación de la enfermedad de Aujeszky, se ha adaptado para cerdos la técnica de colección de sueros por hemoadsorción en papel filtro, mediante punción de la vena marginal de la oreja.

Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue el de implementar la técnica de sangrado para cerdos y acoplarla a una prueba de ELISA clásica con virus de genoma completo para proponer su aplicación en las medidas sanitaria de control de la Enfermedad de Aujeszky, así como en la evaluación para la importación y movilización de cerdos.

MATERIALES Y METODOS

Para la hemoadsorción se utilizaron papeles Wathman No. 1, 3 y 41; papel filtro de Proveedor Científico, PC No. 917 de poro mediano y papeles filtro Evans Adlard & Co. No 663 de 12 y 28 lb. Se probaron varios tipos de lancetas y agujas hipodérmicas para realizar la punción de la vena marginal de la oreja. Los cerdos que se emplearon fueron SPF experimentalmente desafiados con virus de Aujeszky. Se empleó como antígeno, la cepa de campo Teoloyucan del virus de la Enfermedad de Aujeszky, adaptada a la línea celular PK-15. Para la prueba de ELISA se emplearon las siguientes soluciones y reactivos: solución de lavado PBS/Tween-20 al 0.05% se conservo a 4 C. Solución bloqueadora (pH 7), (solución de

lavado adicionada con 3% de Albúmina bovina fracción V). Conjugado Anti IgG de cerdo conjugado con peroxidasa (KPL). El sustrato para 10 placas fué: Acido Cítrico 0.1 M (25 ml) + Fosfato de Sodio dibásico 0.2 M (25 ml), aforado a 100 ml de agua destilada (pH 4.5), adicionado con 11 mg de ABTS; utilizando por placa 10 ml de ABTS + 5 μ l de Perhidrol (H_2O_2 al 30 % Merck) Esta mezcla se realizó justo en el momento de su utilización. Se empleo Acido sulfúrico 3N para detener la reacción del sustrato. En la antigenación se emplearon placas de 96 pozos de fondo plano marca NUNC Cat. No. 1-67008; se diluyó el antígeno Cepa Teoloyucan en amortiguador de fosfatos (4 C) hasta la dilución óptima. Se añadieron 100 μ l de esta dilución por pocillo y las placas se incubaron a 4 C toda la noche. Cada placa se escurrió y lavó 3 veces con solución de lavado, se escurrió la placa y se repitió la operación 3 veces. Las placas se almacenaron a -20 C. Cuando las placas iban a ser utilizadas, se descongelaron y se espero hasta que alcanzaran la temperatura ambiente, posteriormente se adicionó la solución bloqueadora e incubó durante 2 h a temperatura ambiente, nuevamente se lavaron 3 veces. De los sueros control y los sueros problema, se tomaron círculos de 3 mm de diámetro del papel hemoadsorbido y se eluyó con 100 μ l de buffer de fosfatos. Se añadieron 50 μ l de cada suero diluido por duplicado a cada pocillo. Se incubaron durante 90 min. a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas 4 veces con solución de lavado, como se explicó anteriormente y se añadieron 50 μ l/pocillo del conjugado Anti IgG de cerdo-Peroxidasa previamente diluido en solución bloqueadora a la dilución óptima recomendada por los fabricantes (1/100 en este caso). Se incubó durante una hora a 37 C. Al finalizar la incubación se lavaron las placas 4 veces con solución de lavado y se adicionó el sustrato ABTS más el perhidrol según se describió anteriormente. Se añadieron 200 μ l/pocillo de la solución de sustrato recién preparada. Se incubaron aproximadamente 30 min a temperatura ambiente, hasta observar que los pocillos de los controles positivos comenzaron a tomar color. Se frenó la reacción añadiendo 50 μ l/pocillo de la solución de ácido sulfúrico 3 N. y se procedió a la lectura de la placa. Los resultados se obtuvieron por lectura colorimétrica utilizando un espectrofotómetro para lectura de placas, a una longitud de onda de 410 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

De todos los papeles probados, sólo el papel filtro No. 917 fue adecuado para realizar una buena hemoadsorción y poder después eluir el suero para la prueba de ELISA, ninguna de las lancetas diseñadas para humanos que se probaron son adecuadas para puncionar la oreja del cerdo, mejores resultados se obtienen con agujas hipodérmicas desechables del No. 22. Los papeles hemoadsorbidos si no se secan bien se contaminan y no funciona adecuadamente con ELISA. Dado que la intensidad del color en ELISA es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos unidos al antígeno se observó al trabajar sueros pareados con muestras en papel que la elusión del suero no es completa por lo que existe una dilución que deberá calcularse para cada lote de tiras de papel filtro, en nuestro caso corresponde a la dilución 1:8. Los valores de los sueros positivos suelen oscilar entre 0.32 y 1.0 de densidad óptica

(D.O.) y de los sueros negativos entre 0.02 y 0.28 D.O. Para proceder a interpretar los resultados obtenidos en el ELISA, se realizó el cálculo del "punto de corte" a partir del cual se definirán que sueros son negativos, dudosos o positivos. Cálculo del "punto de corte" (CUT OFF): se aplicó la siguiente fórmula:

$CUT\ OFF = \text{valor medio D. O. del suero negativo} \times 1 + \text{valor medio D. O. del suero positivo} \times 0.2$

en nuestro caso el valor medio de los sueros negativos = 0.20 y el valor medio de los sueros positivos = 0.57 por lo que el punto de corte es = 0.31. Por lo que todos los sueros con valores de absorbancia por DEBAJO del CUT OFF (0.31) se considerarán sueros negativos; todos los sueros con valores de absorbancia comprendidos entre el CUT OFF y $CUT\ OFF + 0.02$ (entre 0.31 y $0.31 + 0.02$) se considerarán sueros dudosos, por lo que deberá utilizarse una segunda técnica para su confirmación, por ejemplo inmunofluorescencia indirecta o Dot-blot. Todos los sueros con valores de absorbancia por encima de $0.31 + 0.02$ se consideraron sueros positivos. De 100 sueros probados por seroneutralización se encontró 96 % de correlación. Las placas de otra marca diferente a la citadas antes deberán ser sometidas previamente al protocolo de lavado y dejarlas secar completamente antes de antigenar. Aún así no todas las marcas de placas sirven adecuadamente para ELISA. Las placas antigenadas, no funcionan bien después de guardarse a 4 C durante más de 2 días pero si se conservan siempre a -20 C funcionan durante varios meses. El uso de muestras para ELISA empleando tiras de papel filtro estandarizado permitirá facilitar el diagnóstico en masa de la enfermedad de Aujeszky por la reducción del costo de muestreo.

BIBLIOGRAFIA.

1. Avrameas S, Guilbert B. (1971) Dosage enzymo-immunologique de protéines à l'aide d'immunoabsorbants et d'antigènes marqués aux enzymes. C. R. Acad. Sci. Paris 273, 2705-2707.
2. Eliot, M. and Toma, B. Use of blood dried filter papers applied to the screening of pseudorabies virus infected herds. XXIII World Veterinary Congress, Montreal, (1987), 292.
3. Engvall E, Perlmann P. 1971 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem 8, 871-874.
4. Gay G. M. y Hamdy, M. F. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación en microtecnica con muestras de sangre obtenidas con papel filtro para el diagnóstico de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria en México 1989, pag 89.
5. Rodríguez-Villela M., Lara-Sagahon V., Camacho Machín J., Aguilar Setién A., Ciprián Carrasco A (1988). Detection chez la truie d'anticorps dirigés contre le parvovirus porcin par inhibition de l'hémagglutination à partir de sang adsorbé sur papier buvard. Ann Med Vet. 132 pag 687-692.
6. Van Weemen B.K., Schuurs A. H.W.M. (1971). Immunoassay using antigens-enzyme conjugates. FEBS Lett 15, 232-236.