

**TITULO:** DOT-BLOT: PRUEBA TAMIZ SENSIBLE Y FACIL PARA REALIZAR DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY.

**AUTORES:** Cuevas R.S., De Paz V.O., Colmenares V.G.

**INSTITUCION:** SARH, INIFAP, CENTRO Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología. Proyecto Enfermedad de Aujeszky.

## INTRODUCCION

La técnica de Dot-Blot, fué descrita por Hawke et. al. (1982), se basa en la propiedad de mantener total o parcialmente las propiedades antigénicas de las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa; en la actualidad esta siendo muy utilizada para la detección de niveles bajos de proteína (gershoni y palade, 1983). La facilidad del manejo de la técnica, así como el alto grado de conservación de los reactivos, ha propiciado su aplicación para estudios antigenicos y de la respuesta inmune (Hawkes r., et al. 1982)

Todas las pruebas de ELISA requieren de sueros de buena calidad, (Dinter 1989) y en las granjas, el sangrado de los animales puede ser en algunos casos algo laborioso y complicado, por lo cual los estudios serológicos en las granjas se limitan a un muestro de unos pocos animales y es difícil realizar un censo para conocer el status de la granja con respecto a esta enfermedad, por ello en nuestro laboratorio se ha adaptado para cerdos el método de toma de sangre de la oreja con papel filtro descrito por Eliot y Toma (1987); Gay y Hamdy (1989) lo cual nos permite obtener un mejor muestreo. Sin embargo, este método requiere de la dilución del suero antes de realizar la prueba de ELISA.

El objetivo de este trabajo es diseñar una prueba tamiz para detectar anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky mediante Dot-Blot, tomando la muestra directamente de la vena marginal de la oreja del cerdo.

## MATERIAL Y METODOS

La técnica de Dot-Blot, se comparó con los métodos de virus neutralización en cultivo de tejidos y con la técnica de ELISA en placa empleando sueros de cerdos SPF tanto libres de la enfermedad como experimentalmente infectados con el virus de la enfermedad de Aujeszky además de sueros de casos clínicos pertenecientes a la colección del proyecto. Se comparó la hemoadsorsión de las membranas con la realizada en tiras de papel filtro PC No. 917 de poro mediano.

Los sueros utilizados para estandarizar el método, fueron de animales SPF experimentalmente inmunizados y desafiados con el VEA. De los cuales tambien fueron

colectadas muestras en tiras de papel filtro estandarizado y en las membranas antigenadas.

1.-**ANTIGENO.** Con un Biorreactor NUNC se proliferó la cepa de campo "Teoloyucan", de virus de la Enfermedad de Aujeszky, en la línea celular PK-15, la cosecha viral se fijo en membranas de nitrocelulosa con un aparato de microfiltración Bio-Dot marca BIO-RAD.

2.- Una vez fijado el antígeno se bloqueó la membrana con una solución de caseína al 1% diluida en Buffer de fosfatos (PBS) durante 60 min.

3.- Posteriormente se lavo la membrana con PBS + tween 20 al 0.01% (solución de lavado), 3 veces durante 3 min. cada una, se deja secar, las zonas antigenadas se cortan y adhieren a un soporte plástico en forma de tira, las tiras se consevan en refrigeración.

4.- Las tiras se aplicaron sobre la sangre que fluía de la punción de una vena marginal de la oreja del cerdo, se dejó secar. Para realizar la prueba inicialmente se eliminó la hemoglobina con buffer de acetatos y se lavó 3 veces con solución de lavado, la tira se incubo en 1 ml de PBS + 0.01% de tween 20 + 0.5% caseína durante 30 min.

5.- Cuando se utilizaron tiras de papel hemoadsorbido, a cada tira se le adicionó un disco de 3 mm de diámetro y se incubó en 1 ml de PBS + 0.1% de tween 20 + 0.5% caseína; cuando se emplearon sueros, se adicionaron 200 ml del suero porcino diluido 1:8 por tira. En ambos casos se incubó la fuente de globulinas con la tira durante 90 min.

6.- Se lavó 3 veces con la solución de lavado.

7.- Se agregaron 200 ml de anti IgG de cerdo conjugada con peroxidasa (marca KPL diluida 1:1000) y se encubó durante 60 min.

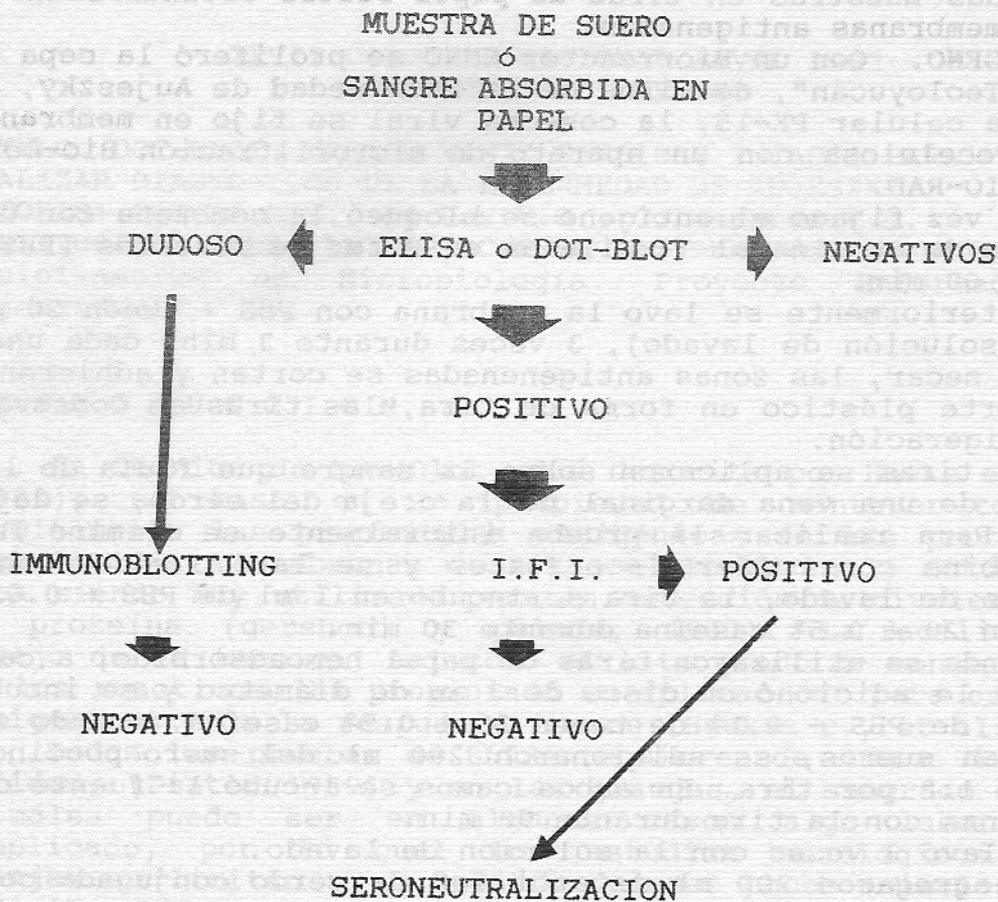
8.- Se lavó nuevamenta con la solución de lavado 3 veces, y con PBS otras 2 veces.

9.- Se revelaron con 1 ml de la solución formada con 30 mg de O-Cloronaftol diluido en buffer de tris PH 7.6, adicionado (en el instante que se va ha utilizar) con 5 ml de H2O2 concentrado. La reacción positiva se manifestó por la aparición de un color violeta en la zona antigenada dentro de los 10 minutos iniciada la reacción.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se compararon 32 sueros probados por seroneutralización y Dot-Blot y se observo que 4 sueros negativos por seroneutralización a la dilución 1:2, fueron detectados positiva por Doc-blot y por ELISA. Todos los controles negativos que se incubaron con estas pruebas no dieron coloración en Dot-Blot por lo que la prueba de Dot-Blot mostró una alta especificidad. De 32 sueros probados 22 fueron positivos a la prueba de virus neutralización, 26 fueron positivos por ELISA y 27 fueron sueros positivos por Dot-Blot mostrando esta última mayor sensibilidad que las anteriores.

Cuando las tiras reactivas son incubadas con suero, éste



#### BIBLIOGRAFIA:

1. Dinter Zvonimir. in **Diagnostic Virology** J. Moreno-López ED. Swedish University of Agricultural Sciences, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden and Swedish International Developing Authority (1989)
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, pag. 292.
3. 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 1989, pag. 89.
4. Gershoni J. M. and Palade G. E. (1983). Protein blotting: principles and applications **Anal. Biochem.** 131, 1-15.
5. Hawkes R. Niday E., and Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Anal Biochem.** 119, pag. 142-147 (1982).

debera estar sin hemolizar ya que la hemólisis interfiere en la prueba. Si la fuente de globulinas es el papel hemoadsorbido no se presenta ninguna interferencia. Observamos que el amortiguador de acetatos empleado para lavar las tiras no realiza una eficiente limpieza de la hemoglobina, por lo que actualmente se trabaja en aumentarla.

La aplicación de esta técnica como prueba tamiz para diagnostico de la enfermedad ayudará al Veterinario en la aplicación de las medidas de control sanitario y manejo de la granja. Con la puesta a punto de esta técnica se podrá validar mediante un estudio de campo. Se propone que los sueros sean analizados de la siguiente manera:

#### B I B L I O G R A F I A

- 1.- Dinter Zvonimir. in **Diagnostic Virology** J. Moreno-López ED. Swedish University of Agricultural Sciences, National Veterinary Institute, Uppsala Sweden and Swedish International Developing Authority (1989)
- 2.- Eliot, M. and Toma, B. Use of blood dried filter papers applied to the sceening of pseudorrabies virus infected herds XXIII World veterinary Congress, Montreal, 1987. pag 292
- 3.- Gay G.M. y Hamdy, M.F. prueba de inhibición de la hemoaglutación 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 1989, pag 89
- 4.- Gershoni J.M. and Palade G.E. (1983). Protein blotting: prinisples and aplicaciones Anal. Biochem. 131, 1-15
- 5.- Hawks R. Niday E. and gordon J. A dot-immunobinding assay for monocloal and other antibodies. Anal Biochem 199 pag 142-147 (1982).