

EXPLORACION PRELIMINAR PARA DETECTAR CERDOS POSITIVOS
Y NEGATIVOS A LA GLICOPROTEINA 1 DEL VIRUS DE AUJESZKY
MEDIANTE LA PRUEBA DE "ELISA"

¹ NORMA SIERRA ROMERO

² RAMIRO RAMIREZ NECOECHEA

¹PABLO CORREA GIRON

La "Enfermedad de Aujeszky", en este momento, se encuentra ampliamente difundida en el país (5 y 7). Desde el punto de vista económico, "Aujeszky" produce pérdidas equiparables a tres meses de la producción intensiva. Las pérdidas son la resultante de la suma de mortalidad en lactantes, engorda, abortos e infertilidad y retraso en cuanto al crecimiento de los sobrevivientes (Ramírez Necochea, 1984) (8).

La situación actual y de frente a los albores de una Campaña de Erradicación contra "Fiebre Porcina Clásica", que lleva aparejada una Campaña contra la "Enfermedad de Aujeszky", nos pone de manifiesto varios hechos críticos que es mencionar, para entender el sustento de este trabajo: 1) Las autoridades sanitarias desafortunadamente no tienen una información clara acerca de la difusión de la Enfermedad de Aujeszky; 2) parte de este desconocimiento se debe a la ausencia parcial de reporte de brotes; 3) otra parte del desconocimiento de la situación epizootiológica, está relacionada con la falta de utilización de las técnicas diagnósticas ya existentes que diferencian anticuerpos vacunales de aquellos producidos por el virus de campo (9,10) ; 4) se asume que la enfermedad no está difundida y que solo se vacuna en zonas autorizadas por Sanidad Animal, siendo ambos casos erróneos (7); 5) En A.M.V.E.C., se ha mencionado que la enfermedad está difundida en prácticamente todo el país, a excepción, tal vez, de los Estados del Norte (5); 6) que el peligro potencial para la introducción y reintroducción del virus de Aujeszky es permanente en virtud de las constantes importaciones de animales provenientes de zonas enzoóticas de los Estados Unidos (2,8); 7) que del cúmulo de técnicas diagnósticas para identificar anticuerpos contra "Aujeszky", la más confiable y disponible comercialmente es la técnica de "ELISA" para la identificación de fracciones proteicas (1,2,6,10); y 8) que las vacunas más comúnmente utilizadas en México son aquellas con delección genómica G1 (Ramírez Necochea, 1992).

La envoltura glicoproteica del virus de Aujeszky contiene glicoproteínas virales (G1, G2, G3, gp63, gp50, gx y gH) (3), las cuales ya se encuentran bien caracterizadas en la

¹ CENID-MICROBIOLOGIA-INIFAP-CARH.- Km. 15.5 Carr. México-Toluca, Palo Alto, c.p. 11001. México D.F., Tel. 570-3100 ext. 162

² A.T.E.V.S.A. (ESPECIALISTA) Ed. F - 33, Entrada 5 Dpto. 42, Lomas de Plateros, Mixcoac, México D.F., Tel. y Fax. 593-3531

actualidad y que por medio de técnicas de alta precisión, es posible eliminar un fragmento, como se ha hecho con la G1 (3,6,9). De esta forma, se procesa el virus para finalmente obtener una vacuna con deleción G1-. Los cerdos vacunados con esta misma vacuna producirán anticuerpos vacunales contra el virus vacunal excepto contra el fragmento que fué eliminado (G1-). Por otra parte, ese mismo fragmento es el que se utiliza para "pegarlo" en las placas de microtitulación y realizar la prueba de ELISA. Los cerdos vacunados con una vacuna G1-, no presentarán anticuerpos para el fragmento eliminado (G1); mientras que los cerdos vacunados con una vacuna preparada con virus completo sin deleción genómica, presentarán anticuerpos contra la fracción G1 (3,4,9,10).

OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es el de hacer una exploración preliminar para empezar a conocer los porcentajes de cerdos positivos y negativos a la glicoproteína 1 (G1) del virus de Aujeszky, mediante la utilización de la prueba de "ELISA".

MATERIAL Y METODOS:

Se colectaron sueros de cerdos de granjas tecnificadas ubicadas en diversas zonas del país y dando preferencia exclusiva a las clasificadas dentro de las siguientes categorías:

- a) Que estén cursando una enfermedad sospechosa de Aujeszky,
- b) Que hayan cursado la enfermedad habiendo sido confirmado el diagnóstico con pruebas específicas de laboratorio,
- c) Que hayan recibido animales provenientes de USA en el último año,
- d) Que tengan animales destinados a la inseminación artificial,
- e) Que se encuentren en una zona reconocida como enzoótica de Aujeszky,
- f) Que estén vendiendo animales para pie de cría,
- g) Que estén en áreas supuestamente libres de Aujeszky

*La mayor parte de los sueros provinieron de animales vacunados con vacuna con deleción genómica G1 y otros supuestamente sin vacuna y libres de la enfermedad.

Los sueros se trabajaron utilizando dos "Kits" (ELISA) para el diagnóstico de Aujeszky y que reconocen anticuerpos contra la glicoproteína G1. Los procedimientos para utilizar ambos "Kits" fueron similares, basados en una prueba de "ELISA-BLOQUEADORA" y los "Kits" diagnósticos utilizados fueron: a) INTERTEST de INTERVET; y b) CLIN-EASE de SMITHKINE BEECHAM.

El procedimiento general es el siguiente:

	INTERTEST	CLIN-EASE
LAVADO INICIAL	dos veces	dos veces
INCUBACIÓN DE SUEROS CONTROL (POS. Y NEG.) Y SUEROS PROBLEMA	1 Hr. a 37C	1 Hr. a 37C
LAVADO POST-INCUBACIÓN:	tres veces	tres veces
CONJUGADO (s):	12 Hrs. a 5C y 30 min. a 37C	1 Hr. a 37C
LAVADO POST-INCUBACIÓN:	tres veces	tres veces
SUSTRATO:	30 min. (temperatura ambiente)	30 min. (temperatura ambiente)
LECTOR DE ELISA (D.O.):	450 nanómetros	405 nanómetros

*Los cálculos se llevan a cabo tomando en cuenta la densidad óptica (D.O.) con respecto a los sueros control (negativos y positivos) para cada suero problema en ambos casos.

RESULTADOS:

Se trabajaron 200 sueros de animales con las características señaladas anteriormente utilizando los "Kits de ELISA" señalados para obtener el diagnóstico. Los resultados fueron los siguientes:

ESTADO	INTERTEST		CLINEASE-PRV	
	POSITIVOS	NEGATIVOS	POSITIVOS	NEGATIVOS
JALISCO	8 (80%)	2 (20%)	5 (50%)	5 (50%)
GUANAJUATO	13 (17.1%)	63 (82.9%)	10 (13.1)	66 (86.8%)
SONORA	-	9 (100%)	-	9 (100%)
PUEBLA	-	84 (100%)	-	84 (100%)
SINALOA	-	21 (100%)	-	21 (100%)
TOTAL =	21 (10.5%)	179 (89.5%)	15 (7.5%)	185 (92.5%)

De cinco Estados muestreados, se encontró que: a) de un total de 200 animales, la mayoría (89.5% a 92.5%) fueron negativos a la presencia de anticuerpos contra la glicoproteína G1; b) estos animales sin anticuerpos contra la G1 corresponden a las categorías: D, E, F y G, provenientes de granjas tecnificadas; c) aproximadamente, el 9% (7.5% a 10.5%) de los animales muestreados, fué positivo a la presencia de anticuerpos contra la glicoproteína G1; d) los sueros de los animales positivos a la G1, el 45% corresponde a animales provenientes de USA (categoría C) y el 55% restante, corresponde a las categorías A y B; e) los animales positivos a anticuerpos G1, fueron detectados en los Estados de Jalisco y Guanajuato; f) aunque aún falta la correlación de estos resultados contra seroneutralización, los "Kits" de ELISA usados, presentan una previa utilización en Campañas de Erradicación de la Enfermedad de Aujeszky en otros países y con una elevada certeza de aproximadamente un 96% con respecto a la seroneutralización (1, 2, 4, 9, 10).

Fué posible observar una correlación del 100% al utilizar los dos "Kits" diagnósticos con los sueros que resultaron negativos a la G1, procedentes de Sonora, Puebla y Sinaloa.

En el caso de Guanajuato, también hubo un alto grado de correlación entre los sueros que resultaron positivos y negativos a la prueba de ELISA G1-.

En Jalisco, no hubo una perfecta correlación con respecto a ambas pruebas, pero al igual que en el caso de Guanajuato, los sueros que no coincidieron, correspondieron a sueros contaminados, razón por la cual se observa esta ligera variabilidad.

Al comparar los totales, se puede observar que también hubo un alto grado de correlación entre los resultados positivos y negativos obtenidos con ambos "Kits" diagnósticos, y que del 89.5% al 92.5% de los sueros, fueron negativos a anticuerpos contra la G1; y entre el 7.5% y 10% de los sueros, fueron positivos respectivamente, a la presencia de anticuerpos contra la G1. Desafortunadamente, mediante esta pruebas no es posible diferenciar la causa de que estos sueros sean positivos a la G1, sin embargo, al revisar las Categorías a las cuales pertenecen éstos animales, nos da la pauta para señalar que únicamente desconocemos la historia clínica de aquellos animales provenientes de Estados Unidos.

No obstante que resultaron negativos a la G1 los sueros de Sonora, Puebla y Sinaloa, sería necesario probar mucho más sueros para corroborar que éstos Estados realmente son negativos.

De los resultados obtenidos, se puede deducir que en Jalisco y Guanajuato hay cerdos positivos a la G1; lo cual puede significar que los cerdos padecieron la infección por virus de campo virulento o que fueron vacunados con vacunas inactivadas hechas con virus virulento.

CONCLUSIONES:

- 1) No obstante que son pocas las muestras trabajadas en comparación con la cantidad de cerdos existentes en los Estados correspondientes, se puede ver que los resultados concuerdan con la situación de Aujeszky en los Estados señalados.
- 2) También nos percatamos de que al comparar los "Kits" de diagnóstico diferencial, se observó que presentaron pequeñas variaciones en los resultados obtenidos con los dos "Kits"; lo cual es atribuible a que algunos de los sueros utilizados, estaban contaminados y ésto alteró el resultado final; por lo que se recomienda sangrar nuevamente a éstos animales y repetir el estudio inmunológico de Aujeszky con esos sueros, evitando la contaminación de los mismos.
- 3) Se puede ver claramente que en las granjas muestreadas de Jalisco y Guanajuato, se han presentado infecciones con virus virulento de Aujeszky, han vacunado con vacunas de genoma completo (sin delección G1) en algunas granjas y han recibido animales provenientes de USA en el último año.
- 4) Los sueros negativos pueden corresponder a: a) cerdos sin anticuerpos contra Aujeszky; b) cerdos vacunados con vacuna G1- (neg.); c) cerdos con la infección en período de incubación; d) cerdos con infección latente; o e) cerdos con varias de éstas.
- 5) Los cerdos positivos a la G1, pueden corresponder a: a) cerdos infectados con virus de Aujeszky virulento; b) vacunados con vacunas inactivadas preparadas con virus de genoma completo (sin delección G1); c) cerdos infectados con virus virulento y además, fueron vacunados con vacuna de virus con genoma completo (sin delección G1), o bien, con vacuna con delección genómica G1 post-infección.
- 6) Es aconsejable, a futuro, complementar estos resultados iniciales, con pruebas de seroneutralización, para así comprobar la sensibilidad y especificidad de las pruebas de ELISA utilizadas en nuestro país.
- 7) Debido a la alta confiabilidad, sensibilidad y especificidad de las pruebas de "ELISA", por los antecedentes que existen sobre el uso de vacunación con vacunas con delección G1 y "Kits" diferenciales correspondientes en países donde ha sido posible la Erradicación de la Enfermedad de Aujeszky, se concluye que esto podría ser de gran utilidad para la Erradicación de "Aujeszky" en México.

REFERENCIAS:

1. ENGEL, M. and WIERUP, M. 1985. Vaccination and eradication programme against Aujeszky's Disease in Sweden, based on a gI ELISA test. Vet. Rec. 125: 236-237
2. GINGERICH, D. 1990. Comments and viewpoints by the National Pork Producers Council, APHIS Veterinary Services, and other program cooperators; in: "PSEUDORABIES ERADICATION, 1990 REPORT", APHIS, USDA, USA, 4-5
3. METTENLEITER, T.C. 1991. Molecular biology of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 14 (2): 151-163
4. McMILLEN, J. 1991. A new generation in Pseudorabies vaccination and control. First International Symposium of the Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) virus, (May 19-22), Minnesota, USA, p. 50
5. MERCADO S., S., R.F. SOLORZANO y G. AVILA R. 1985. Avances en el estudio epizootológico de la enfermedad de Aujeszky en México. Mem. XX Reunión Nal. AMVEC-85, Mérida, Yucatán (Julio 10-13), p. 57-60
6. MOENNIG, V., WOLDESENBET, P., FREY, H.R., LIESS, B., DOPATKA, H.D. and BERENS, F. 1982. Comprehensive evaluation of ELISA and Neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. 17: 51-56
7. RAMIREZ-NECOECHEA, R. 1985. Importancia de la enfermedad de Aujeszky en México. Avances en las Enfermedades del Cerdo, en: Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas.
8. RAMIREZ-NECOECHEA, R. 1990. Importación de cerdos y sus enfermedades. 7º Congreso Nacional de Porcicultura, Síntesis Porcina 9 (10): 14
9. VANDEPUTTE, J., CHAPPUIS, G., FARGEAUD, D., PRECAUSTA, P., GUILLEMIN, F., BRUN, A., DESMETTRE, Ph. and STELLMANN, C. 1990. Vaccination against pseudorabies with glycoprotein gI+ or gI- vaccine. Am. J. Vet. Res. 51 (7): 1100-1106
10. VAN OIRSCHOT, J.T. and De WAAL, C.A.H. 1987. An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. Vet. Rec. 121: 305-306