

PERSPECTIVA DE UN METODO RAPIDO DE DIAGNOSTICO PARA LA FIEBRE PORCINA CLASICA. II. ESTUDIOS COMPARATIVOS DE DENSIDAD BOYANTE Y ESPECTROSCOPIA EN ULTRAVIOLETA DE SEIS CEPAS DE FIEBRE PORCINA CLASICA.

MENDOZA, E.S., AGUILERA, C.E., TORRES, A.O., COLMENARES, V.G.*, HERNANDEZ-BAUMGARTEN, E. Y CIPRIAN, C.A.

COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, UNAM. *CENID-MICROBIOLOGIA VETERINARIA, INIFAP-SARH.

AREA: SANIDAD ANIMAL

PADEP: FCU-9121; DFCU9210; 100 304 FCU-9121 Y CATEDRA: AFECCIONES BACTERIANAS Y VIRALES DE LOS CERDOS.

a) **INTRODUCCION:** El diagnóstico serológico contra la Fiebre Porcina Clásica (FPC) es una herramienta útil para evaluar fallas en la vacunación, para evaluar animales con la enfermedad subclínica (cerdos infectados) o bien para utilizarla como un sistema de vigilancia epizootiológica. Sin embargo hasta ahora, no se cuenta con una técnica serológica que permita diferenciar en los cerdos los anticuerpos vacunales de los infectantes. En un trabajo previo Mendoza y cols. (1992), encontraron diferencias entre cepas de campo, vacunales y de referencia en cuanto a su comportamiento durante su proliferación en líneas celulares y en cultivos primarios de órganos linfoides, los resultados mostraron que existieron diferencias en patogenicidad. Con la pretensión de encontrar diferencias que sean propias de las cepas de FPC, ya sean de campo, vacunales o de referencia. Al virus de la Fiebre Porcina Clásica se le han encontrado tres proteínas estructurales en la envoltura viral, dos de ellas son glicoproteínas (gp) y se denominan: E1 ó gp 55 (55,000 daltones) y E2 ó gp 46 (46,000 daltones) y la tercera que no está glicosilada fue denominada C ó p 36 (36,000 daltones). Wensvoort y colaboradores en Holanda (1989) purificaron la cepa Brescia de FPC a partir de lisados de cultivos celulares infectados, empleando un gradiente de glicerol al 30-0% / tartrato de Na-K al 0-55% y encontró que la fracción proteínica aislada a una densidad boyante de 1.13 - 1.15 g/ml presentaba altos títulos infectantes, mientras que en la fracción de 1.12 - 1.14 g/ml presentaba alta afinidad en el ensayo de captura de antígeno (ECA). Las siete fracciones individuales presentes en estos dos "picos" se les realizó una electroforesis con un gel poliacrilamida-SDS. Las primeras tres fracciones que pertenecieron a la fracción de alta infectividad solo se encontraron la gp 54 y la gp 51; mientras que en las otras fracciones con alta afinidad a el ECA y baja infectividad, revelaron solo la gp 31.

b) **OBJETIVO:** Encontrar diferencias entre las cepas de campo, vacunales y de referencia del virus de la Fiebre Porcina Clásica mediante estudios de densidad boyante y espectroscopía en ultravioleta.

c) MATERIAL Y METODOS:

Material biológico: Se utilizaron tres cepas vacunales: Cepa Minnesota, Cepa PAV-1 y Cepa PAV-250; una Cepa de referencia: ALD y dos cepas de campo: 89-126 y 89-55.

Gradiente y Ultracentrifugación:

Las cepas se ultracentrifugaron a 35,000 g durante 1.5 hrs. en una ultracentrifuga Beckman SW41 a 4 C. El gradiente que se utilizò fuè de sacarosa de 70%, 50%, 30% 20%. (Purchio, A.F. y cols., 1984).

Espectro en ultravioleta: Se hizò un espectro de 200 a 320 nm, en un espectrofotometro de UV Beckman.

d) **RESULTADOS:** La Cepa Minnesota, presentò una densidad boyante (DB) de 1.146 g/ml, el gradiente tuvo una correlaciòn (r) de 0.83 y el espectro en UV (EUV), revelò un pico de absorbancia a 245.06 nm y tres picos a 284 nm. La Cepa PAV-1, presentò una DB de 1.134 g/ml, su gradiente una $r=0.945$ y el espectro mostrò un pico de absorbancia a 242.54 nm y otro a 279.71 nm. La cepa PAV-250 tuvo una DB de 1.124 g/ml, una $r=0.985$ y el espectro revelò un pico a 246.20 nm y otro a 282.28 nm. En cuanto a la cepa de referencia ALD, esta tuvo una DB de 1.184 g/ml, una $r=0.944$ y el BE revelò una "meseta" desde 255.28 nm a 298.57 nm, un pico a 248 nm y otro a 279.14 nm. La cepa de campo 89-126 tuvo DB de 1.116 g/ml, $r=0.992$ y el espectro mostrò dos picos, uno a 236 nm y otro a 280.57 nm. La cepa 89-55 tuvo DB=1.112, $r=0.986$ y su espectro mostrò una "meseta" desde 264.28 nm a 298.57 nm, dos picos bien definidos uno a 243.07 nm y otro a 280.57 nm y dos picos juntos a 239.42 nm. Los valores de densidad boyante y los máximos de absorbancia registrados en el espectro de ultravioleta de las cepas estudiadas en este trabajo se muestran en el Cuadro 1.

CUADRO 1.

Cepa	f	p	r	máximos de absorbancia en espectro de Ultravioleta
Minnesota	8-9	1.146	0.83	245.06 y triple a 284.00 nm
PAV-1,	8-9	1.134	0.945	242.54 y 279.71 nm
PAV-250	8-9	1.124	0.985	246.20 y 282.28 nm
ALD	3-4 9-10	1.184	0.944	248.00, 279.14 nm y 255.28 a 298.57 nm
89-126	8-9	1.116	0.992	236.00 y 280.57 nm
89-55	8-9 10-11	1.112	0.986	243.07, 280.57 y 264.28 a 298.57 nm, y dos picos juntos a 239.42 nm.

p= densidad boyante en g/ml de la fracción

r= coeficiente de correlaciòn del gradiente de sacarosa

e) **DISCUSION:** La cepa Brèscia purificada a partir de

sobrenadantes de cultivos celulares infectados o de células infectadas, en un gradiente de glicerol/tartrato de Na-K mostró que la fracción de una densidad boyante de 1.13 - 1.15 g/ml presentaba altos títulos infectantes, mientras que en la fracción de 1.12 - 1.14 g/ml presentaba alta afinidad en el ensayo de captura de antígeno (ECA). Nosotros empleamos un gradiente de sacarosa, determinamos la densidad boyante y analizamos los espectros de cada una de las cepas, Se obtuvieron 12 fracciones de cada cepa donde se encontraron que las fracciones más importantes fueron 8 y 9, para las cepas vacunales Minnesota, PAV-1, PAV-250, para las cepas de campo 89-55 y 89-126, para la cepa de referencia ALD las fracciones importantes fueron 3-4 y 9-10. Por otro lado la DB mostró ligeras diferencias entre cepas nosotros encontramos que las cepas de campo mostraron una Densidad Boyante de 1.114 ± 0.002 g/ml; las cepas vacunales mostraron una DB un poco mayor 1.135 ± 0.011 g/ml, y la cepa de referencia ALD mostró una DB más elevada de 1.184 g/ml.

Los espectros mostraron que todas las cepas presentan los picos de absorbancia a 240 y 280 nm que corresponden a las absorbancias de los aminoácidos aromáticos de las proteínas y los ácidos nucleicos respectivamente. Las cepas ALD y la 89-55 presentaron otros máximos de absorbancia.

En cuanto al análisis, Wensvoort y cols., (1989) encontraron siete fracciones individuales presentes en estos dos "picos" y les realizó una electroforesis con un gel de poliacrilamida-SDS; las primeras tres fracciones que pertenecieron al pico de alta infectividad solo encontraron la gp54 y la gp51; mientras que en las otras fracciones con altas señales (afinidad) del ECA y baja infectividad, revelaron solo la gp31. Actualmente, nosotros estamos en esta etapa, para realizar inmunotransferencias con sueros de animales vacunados, infectados y vacunados/ infectados.

f) BIBLIOGRAFIA:

1. Terpstra, C; Bloemradd, M. and Gielkens, A.L. 1984. The neutralizing peroxidasa-linded assay for detection of monoclonal antibodies.in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.
2. G. Wensvoort, C. Terpstra, E.P de Kluyver, C. Kragten, J.C. Warnaar. (1989). Characterizationj of pestivirus strains with monoclonal against Hog Cholera Virus,.in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.
3. Wensvoort, G. Terpstra, C., boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. (1986). Produccion of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. Veterinary Microbiology 17, 129-140.
4. Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández-Baumgarten, E.. y Ciprián, C.A. (1992). Perspectiva de un Método de Diagnóstico Serológico rápido para Fiebre Porcina Clásica. I. XXI Congreso Nacional AMVEC 1992, Acapulco, Gro., México.