

**TITULO: VALIDACION DE CAMPO DE LA PRUEBA DE DOT-BLOT PARA REALIZAR DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN GRANJAS PORCICOLAS.**

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

**INTITUCION:** SARH, INIFAP, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología. Proyecto Enfermedad de Aujeszky.

**INTRODUCCION**

Durante 1992 se planteo la elaboración del programa de la Campaña nacional para control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky. En el cual surge la elaboración de esquemas de muestreo para diferentes estados de la República, principalmente en el norte del país; para así tener un reconocimiento oficial de estados enzoóticas para la enfermedad de Aujeszky y poder determinar donde se permite la vacunación.

Recientemente el INIFAP, pretende desarrollar métodos inmunoenzimáticos que permitan un diagnóstico rápido y fácil, como es la técnica de Dot-Blot, que fue descrita por Hawkes et al. (1982), se basa en la propiedad de mantener total o parcialmente las propiedades antigénica 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 antigénicos y de respuesta inmune (Hawkes R., et al. 1982).

La metodología que se está utilizando en la toma de muestras, es una modificación que se hizo en el laboratorio, al método que se ha adaptado para cerdos en la toma de sangre de la oreja con papel filtro descrito por Eliot y Toma (1987); Gay y Hamdy (1989), la cual consiste en tomar la muestra directamente al papel de nitrocelulosa previamente antigenado con el VEA.

El objetivo de este trabajo fué realizar la validación de campo de esta prueba para detectar anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en granjas, tomando la muestra directamente de la vena marginal de la oreja del cerdo.

**MATERIAL Y METODOS**

Se muestrearon 3 granjas de diferente zona del país:

Granja A: Ubicada en La Piedra Michoacan de 800 vientres, con esquema de inmunización para la Enfermedad de Aujeszky con vacuna con delesión (gl-). De esta granja se sangraron 84 animales.

Granja B: Ubicada en el Estado de México (Los Reyes, La Paz) Texcoco, de 400 vientres, sin programa de vacunación contra VEA y sin problemas aparentes. Se sangraron 40 animales.

Granja C: De animales SPF perteneciente al Patronato de Apoyo a la Investigación Pecuaria en México, se sangraron 10 animales.

La técnica de Dot-Blot, se comparó con los métodos de virus neutralización en cultivo de tejidos y con la técnica de ELISA.

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. Se lavo la membrana con PBS + tween 20 al 0.1%, (solución de lavado), 3 veces durante 3 min cada una, se deja secar, las zonas antigenizadas se cortan y adhieren a un soporte plástico en forma de tira, las tiras se conservan en refrigeración.

4. Las tiras se aplicaron sobre la sangre que fluía de la punción de la vena marginal de la oreja del cerdo. y se colocaron en buffer con anticuagulante durante 30 minutos.

5. Se lavó 3 veces con la solución de lavado.

6. Se agregaron 500  $\mu$ l de anti IgG de cerdo conjugada con peroxidasa (marca KPL diluida 1:1000) y se incubó durante 60 min.

7. Se lavó nuevamente con la solución de lavado 3 veces, y con PBS otras 2 veces.

8. Se revelaron con 1 ml de la solución formada con 30 mg de Ó-Cloronaftol diluido en buffer de tris pH 7.6, adicionado (en el instante que se va a utilizar) con 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

9. Para la prueba de ELISA 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; para Seroneutralización se emplearon 200  $\mu$ l del suero porcino diluido 1:8.

## RESULTADOS Y DISCUSION

PRUEBA	No. Muestras	DOT-BLOT	SN	ELISA
		Pos /Neg	Pos/Neg	Pos/Neg
GRANJA "A"	85	85/0		67/18
GRANJA "B"	32	18/14	4/15	
GRANJA "C"	10	0 /10	0/10	

En la granja "A" se observó que el 100% de los animales sangrados resultaron positivos a la prueba de Dot-Blot, ésto se esperaba ya que se trata de una granja positiva con un esquema de vacunación bien definido. Al aplicar la técnica de ELISA para la que se utilizó el Kit comercial ClinEase-PRV donde se observó que 67 muestras de 85 (78.8%) resultaron positivas lo que de acuerdo al Kit son animales que han estado en contacto con el virus de campo. Lo que sugiere que los animales que salieron negativos es debido al tipo de vacuna que se esta empleando.

En la Granja "B", el 56% de los animales muestreados resultó positivo a la prueba de Dot-Blot, siendo una granja sin antecedentes de vacunación, ni infección, sin embargo se localiza en una zona enzootica de la enfermedad. Para la prueba



de Seroneutralización solamente se realizó al 50% de las muestras se observó que el 27% resultó positivo, donde los animales que salieron positivos a SN correspondían a los animales positivos por Dot-Blot, lo mismo para los negativos.

En la granja C, se pretendía observar si existía alguna reacción inespecífica al emplear nuestra metodología en el manejo y toma de muestra; sin embargo no existió ninguna reacción inespecífica y el 100% de las muestras evaluadas resultaron negativas, tanto a la prueba de Dot-Blot como a SN. Por lo que se considera una alta especificidad de la prueba.

También se observó que las tiras reactivas incubadas con la muestra de sangre completa no interfiere en la prueba.

Con este trabajo se pretende demostrar la aplicación de esta técnica como prueba tamiz para diagnóstico de la enfermedad en granjas, lo que ayudará al Veterinario en la aplicación de las medidas de control sanitario y de manejo de la misma. Como parte de la Validación de esta Técnica se sugiere su aplicación en granjas ubicadas en zonas libres de la Enfermedad.

#### 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).