

## EVALUACION DE LOS METODOS DOT-ELISA Y SERONEUTRALIZACION PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD AUJESZKY EN CERDOS

Cuevas R. S., Guzmán H. M., Alvarado I.A., Sánchez M. P. de Paz V. O., Colmenares V. G., Hernández-Baumgarten C.E., Pérez Gd.E. bCENID Microbiología Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, CP (05110) México, D. F. CCoordinación de Estudios de Posgrado FES Cuautitlán. ~Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica.

### INTRODUCCION

Desde la presentación de la Enfermedad de Aujeszky (EA) en México hasta la fecha, el comportamiento epidemiológico de ésta, no se ha regido por un patrón establecido y se ha extendido en gran parte de la población porcina del país (1), para el diagnóstico es necesario contar con métodos de diagnóstico específicos y sensibles. La prueba estándar empleada para el diagnóstico serológico es la Seroneutralización en Cultivo de Tejidos (SN), que está considerada como la más específica y al mismo tiempo la menos sensible, (4,5). Durante los últimos años se han desarrollado diferentes pruebas serológicas (inmunodifusión, aglutinación con partículas de latex, ELISA en placa, dot ELISA, etc.) (5) Una prueba diagnóstica deberá tener una alta validez de tal forma que los porcentajes de resultados falsos positivos y falsos negativos deberán ser limitados. La validez está expresada por la sensibilidad y especificidad de la prueba. Para la valoración y validación de una prueba como segundo método, deberá obtenerse una validación de aproximadamente 100%. La evaluación estadística se realiza mediante tablas de contingencia de 2X2. A partir de estas tablas algunos otros parámetros podrán ser calculados como: valores predictivos de resultados positivos/negativos de la prueba y prevalencias aparentes, así como, el efecto de la sensibilidad, especificidad y la prevalencia real sobre la prevalencia aparente y los valores predictivos. El objetivo de éste trabajo fue correlacionar la prueba inmunoenzimática Dot-ELISA con seroneutralización determinar sus valores de especificidad y sensibilidad y el comportamiento epidemiológico de estas para el diagnóstico serológico, estudios epidemiológicos y de control de la Enfermedad de Aujeszky.

### MATERIALES Y METODOS.

Se elaboró el antígeno en un equipo Cell Factory marca "NUNC", con la cepa 1' Teoloyucan 11 del VEA, proliferada en línea celular PK15 crecida con medio de cultivo Eagle, cuando el monoestrato fue confluyente, se infectó con Virus de la Enfermedad de Aujeszky, cuando se presentó efecto citopático las partículas virales se cosecharon mediante congelación-descongelación. Se purificó por ultracentrifugó a 100 000 g 60 min. se tomaron muestras alícuotas para determinar el título viral mediante el método de Reed y Muench (14). Para la obtención de tiras reactivas Dot-Auj se fijó el antígeno a las membranas de nitrocelulosa en un equipo de microfiltración Bio-Dot marca BIO-RAD; la membrana se hidrató 5 min con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2, adicionado con 0.05% de Tween 20 (SL,) y se secó aplicando vacío; para obtener la dilución óptima de trabajo, se sensibilizó la membrana con 100 ~1 de diluciones dobles del antígeno (en amortiguador de carbonato/ bicarbonato 0.5 M pH 9.6), se incubó durante 20 min y se secó. La nitrocelulosa se bloqueó con una solución de caseína al 1% diluida en amortiguador de fosfatos (PBS) 60 min; se lavó con SL tres veces durante 3 min y dos veces con PBS; se dejó secar y se cortaron tiras de 0.5 cm x 1.2 cm y se adhirieron individualmente a un soporte plástico de 0.5 cm x 7.0 cm. y se almacenaron en refrigeración.

La metodología que se utilizó para la toma de muestras, fue adaptada de las descritas por Eliot y Toma (7); Gay y Hamdy (8), tomando la muestra directamente con las tiras Dot-Auj. Para su revelado se lavaron 3 veces con solución de lavado y dos con PBS, se adicionó anti-IgG de cerdo conjugada con Peroxidasa (KPL) diluida 1:400 se incubó durante 1 hora en agitación. Después se lavó 2 veces con SL y 2 con PBS, el revelado de cada tira Dot-Auj se realizó adicionando 2 ml de sustrato fresco preparado con 30 mg de 4-N-Cloronaftol en 10 ml de diluido en amortiguador Tris pH 7.6, adicionado con 5 ~1 de H2O2 concentrado (30%). La reacción positiva se manifiesta por la aparición de un color violeta en la zona de reacción se observó durante los primeros 25 minutos de reacción. Se trabajó con cerdos SPF del bioterio del CENID-Microbiología, se formaron dos grupos uno experimentalmente infectado con el VEA y otro testigo sin infectar. Se colectaron un total de 100 muestras de ambos grupos, 74 muestras pertenecieron a animales infectados con el VEA y 26 muestras fueron de animales sanos; también se colectó suero para realizar la confrontación con la prueba de SN.

### RESULTADOS Y DISCUSION

El antígeno de VEA tuvo un título de 107 (TICD)/ml. La dilución óptima para la utilización del antígeno de VEA en la prueba de Dot-ELISA fue de 1:32

La prueba de SN tuvo una sensibilidad de 89.19% y una especificidad de 100%; con valores predictivos de 100% para detectar animales positivos y 76.47% para detectar negativos; en relación a las condiciones de esta prueba, los cálculos de probabilidad son 0% para tener un resultado falso positivo y 25.53% de obtener un resultado falso negativo; por otro lado, en relación al estado de la enfermedad en la piara, el calculo de probabilidad para obtener un resultado falso positivo fue de cero; y la de obtener un resultado falso negativo fue de 10.81%. La prevalencia aparente fue de 66% y nos indica la probabilidad de obtener un resultado positivo; la prevalencia real en los sueros estudiados es de 74%

Para la prueba Dot-Auj, el análisis estadístico dio una sensibilidad de 98.65% y una especificidad de 92.31%; estudios previos, realizados por Afshar et al. con 860 sueros de cerdos infectados con el VEA, compararon la prueba de Dot-ELISA, con la de SN, y ELISA en placa, la prueba de Dot-ELISA, mostró además de ser equiparable a las pruebas de SN y ELISA, una sensibilidad relativa y una especificidad del 98% y 99% respectivamente (6), en nuestro estudio, la sensibilidad que obtuvimos es ligeramente mayor y por consiguiente la especificidad es ligeramente menor a los valores reportados, pese a las diferencias en el diseño



de la tira Dot-Auj y el Dot-ELISA realizado por Afshar et al. los resultados concuerdan. Los valores predictivos de esta prueba para detectar animales positivos o negativos son 97.33% y 96% respectivamente. En relación a las características de la Prueba Dot-Auj, la probabilidad calculada de tener un resultado falso positivo fue de 2.67% y la probabilidad de obtener un resultado falso negativo fue de 4%. Por otro lado, en relación al estado de la enfermedad, la probabilidad de obtener un resultado falso positivo fue de 7.69% y la de obtener un resultado falso negativo fue de 1.35%. La prevalencia aparente fue de 75%; y la prevalencia real en los sueros estudiados es de 74%

Las pruebas de evaluación nos marcan diferencias importantes en el comportamiento de estas con relación a las prevalencias reales y aparentes y los valores predictivos. Estos estudios son importantes para poder tomar decisiones sobre de la aplicación mas adecuada de estos métodos de diagnóstico en el campo y poder establecer las estrategias de control. La prueba de Dot-Auj es una alternativa para el diagnóstico serológico en zonas libres de vacunación y por sus ventajas puede ser empleada como prueba tamiz en grandes poblaciones de cerdos.

REFERENCIAS

1. SARH. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. DGSA. En: Programa de Control y Erradicación del Cólera Porcino y la Enfermedad de Aujeszky. 1992.
2. Martell D. M, Alcocer B R, Cerón M F, Lozano S J L, Del-Valle P P, Auró A A. Aislamiento y caracterización del virus de la enfermedad de Aujeszky o pseudorrabia en México. Téc Pec Méx 1971; 18 (2) 27.
3. Mercado SS, Solorzano RF, Avila RG. Avances en el estudio epizootiológico de la Enfermedad de Aujeszky en México. Avances en Enfermedades del cerdo. la Ed. México: 1985: 271.
4. Avrameas S, Guilbert B. Dosage enzimo-immunologique de protéines á l'aide d'immunoabsorbants et d'antigènes marqués aux enzymes. C. R. Acad Sci Paris. 1971; 273 2705
5. Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monocloal and other antibodies. Anal Biochem. 1982;119 142
6. Dinter Zvonimir. En Diagnostic Virology J. Moreno-López ED. Swedish University of Agricultural Sciences, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden and Swedish International Developing Authority. 1989. 30
7. Eliot M, Toma B. Use of blood dried filter papers applied to the screening of pseudorabies virus infected herds. XXIII World Veterinary Congress, Montreal, 1987. 292.
8. Gay G M, Hamdy M F. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación en microtécnica 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.