

ESTUDIO DE SEIS CEPAS DE FIEBRE PORCINA CLASICA POR INMUNOTRANSFERENCIA CON SUEROS DE CERDOS DE DIFERENTE "STATUS" INMUNOLOGICO.



MENDOZA, E.S., AGUILERA, C.E., CRUZ, S.T., CORREA, G.P., HERNANDEZ, B.E., Y CIPRIAN, C.A.
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLAN, UNAM.
AREA: SANIDAD ANIMAL
CATEDRA: AFECCIONES BACTERIANAS Y VIRALES DEL CERDO

INTRODUCCION:

La FPC es una enfermedad altamente contagiosa, que afecta al sistema nervioso, endotelios vasculares y células reticuloendoteliales, se caracteriza por la presencia de hemorragias generalizadas e infartos en los órganos internos (Biront y cols.). Existen algunas pruebas que se encuentran disponibles para la detección de anticuerpos hacia FPC. El diagnóstico serológico contra la FPC es una enfermedad útil que permite evaluar fallas en la vacunación, además permite evaluar animales animales con la enfermedad asubclínica (cerdos infectados), mediante los perfiles serológicos o bien para utilizarla como un sistema de vigilancia epizootológica, diagnóstico necesario para la última fase de erradicación de la campaña.

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 en cultivo primario de órganos linfoides, los resultados mostraron que existieron diferencias en patogenicidad. Con la pretensión de encontrar diferencias que sean propias de las cepas de la FPC, ya sean de campo, vacunales o de referencia. Otro estudio realizado por Mendoza y cols. (1994a, 1994b, 1994c, 1994d, 1994e), demostraron que 6 cepas del VFPC (2 de campo, 1 de referencia y 3 vacunales) presentaron resultados importantes después de la ultracentrifugación con gradientes de sacarosa, los rangos de densidad bouyante fueron los siguientes (cepas de campo: 1.114 ± 0.002 g/ml; cepas vacunales (1.135 ± 0.011 g/ml) y la cepa de referencia (1.184 g/ml), las fracciones purificadas importantes para todas las cepas fué la 8 y la 9 a excepción de la ALD que fueron 3-4 y 9-10. Por otro lado a estas fracciones se les realizó un estudio de espectrometría mostrando resultados que todas las cepas presentan los picos de absorbancia a 240 y 280nm 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. De estas fracciones seleccionadas se procedió a estudiarlas por medio de Microscopía Electrónica, observándose partículas completas, en fase de destrucción, observándose peplomeros alrededor del núcleo ya que la envoltura está fuertemente adherida a la capsida, toda la partícula se observo con un perfil icosaédrico aparente. Estas partículas solo se observaron en las fracciones 8 y 9 de las cepas vacunales: Minnesota, PAV-1, PAV-250 y de las de campo: 89-126 y 89-55 y en la fracción 9 y 10 de las cepas de referencia ALD. Por último, otro trabajo de Mendoza y cols., (1994), encontraron por medio de Electroforesis PAGE-SDS, las glicoproteínas E1 y E2 (reportadas por Weenvoort, 1989), la proteína 31 y algunas proteínas de peso molecular alto y así como de otras no reportadas por ningún investigador.

OBJETIVOS:

Determinar que proteínas del gel de poliacrilamida transferidas a papel de nitrocelulosa reaccionan con sueros de cerdos diferentes partes de la República Mexicana, y que presentan diferente "status" inmunológico.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO: Se utilizaron 6 cepas del VFPC: Cepa Minnesota, Cepa PAV-1 y Cepa PAV-250, una Cepa de Referencia ALD y dos Cepas de Campo: 89-126 y 89-55.

SELECCION DE FRACCIONES: De cada cepa fueron seleccionadas las fracciones 8 y 9 a excepción de la ALD que fueron 9 y 10.
ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES EN GELES DE POLIACRILAMIDA DUODECILSULFATO DE SODIO (SDS): De las fracciones obtenidas para cada cepa, se trataron con un detergente iónico (NP-40). Para la preparación del gel de poliacrilamida al 7.5% y 12% con SDS y del gel concentrador al 5% según Laemli, así como los reguladores de corrimiento y de muestra, 2-mercaptoetanol, finalmente se realizaron dos tinciones con azul de coomassie y con nitrato de plata.

INMUNOTRANSFERENCIA: Los geles donde se corrieron las fracciones de cada cepa fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (Inmobilón-P-Millipore), de poro de 0.45 μ m. En un recipiente se ponen a humedecer con el amortiguador de transferencia (Tris/Glicina/SDS/Metanol), tanto el Inmobilón-P como el papel filtro y las fibras. En un "cassette" del aparato de electrotransferencia y se coloca de la siguiente manera: acrílico+fibra+papel filtro+Inmobilón-P+Gel de poliacrilamida con las proteínas+papel filtro+fibra+acrílico, todo se cubre con el amortiguador de transferencia (sistema-metanol/tris/glicina), se debe cuidar de que no se formen burbujas entre el papel y el gel. Se le pone una marca con lápiz, se cierra, quedando todo fuertemente aprisionado. -Se coloca el "cassette" en la cámara de transferencia se conecta a los electrodos de tal manera que el cátodo este del lado del gel, se coloca el sistema a la fuente de poder, la transferencia se realizó a 30 v, Voltaje=Cte, durante 1.6 hrs, con agitación constante y reflujo de agua fría. Al término de la transferencia se procesa para detectar las proteínas transferidas y serán teñidos los pesos moleculares con negro amido. El papel de Inmobilón ya transferido se corta en pequeñas tiras de 0.3 mm, que serán utilizados para enfrentarlos a los sueros. Para detectar si hay glicoproteínas se tiñe una tira con Concanavalina A*peroxidada en un sistema de ELISA-MATE. Se procedió a realizar la prueba de tablero de ajedrez para encontrar las concentraciones ideales para el conjugado y la anti-IgG. Se procedió a realizar la Técnica de Elisa-Mate, con el revelador 4-Cl-Na-OI.

12.- Se registraron las bandas que aparecieron.

ANIMALES MUESTREADOS: Se muestrearon animales de diferentes zonas del país, Sonora que se encuentra libre de FPC; Irapuato que se encuentra en zona de control con vacunación extensiva y control de movilización y Mérida como zona en erradicación. Los animales controlados son sueros de animales libres de patógenos específicos (SPF).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se pueden observar los resultados de la serología de las muestras de las diferentes zonas contra el VFPC y porcentaje de animales positivos. Donde Sonora muestra 10 animales positivos de un total de 21 (47.62%), de Irapuato 11 animales de 22 resultaron positivos (50%), de Mérida 9 animales de 23 (39.13), de los animales desafiados 11 animales de 18 (61.11) y finalmente de los controles resultaron 0 de 3 (0%).

Por otro lado los resultados del porcentaje de animales positivos de diferentes zonas del país a las 6 cepas diferentes del VFPC, mostraron que Mérida presentó mayor actividad hacia la cepa 1, y sucesivamente a las cepas 5, 6, 2, 4 y 3. Los sueros de Sonora reaccionaron principalmente con las cepas 6, 2, 5, 1, 4 y 3 respectivamente. Los sueros de Irapuato mostraron tener una reactividad del 100% a la cepa 5, luego a la cepa 6 y de igual porcentaje a la 1, 2, 4 y finalmente a la 3. Los animales desafiados presentaron mayor reactividad a la cepa 5, 6, 2, de igual forma a la 3 y 4 y finalmente a la 1. Estos resultados se pueden observar en el cuadro 2.

Con respecto a los sueros de Sonora, no se encontró una respuesta asociada a las cepas patógenas de campo exceptuando los sueros donde se encontró respuesta solamente en contra de las bandas de 23Kd y 5 Kd que corresponde a proteínas comunes a todas las cepas vacunales como de referencia. Las fracciones contra las que se encontró mayor índice de respuesta fueron las de 118,72,38,37, 32, 31, 29, 28, 27,25,23,21 Kd que corresponde a los reportados por Weenvort, 1990, y otros autores, sin embargo se encontraron reacciones aisladas en contra de fracciones de 210 y 219 Kd, las cuales no se encuentran reportadas con anterioridad. Con respecto a los sueros del Edo. de Irapuato se encontró una reacción importante contra una de las cepas patógenas de campo, a las 2 vacunales y a la de referencia. Los principales bandeos fueron para la fracción 209*, 199*, 71*, 72*, 48,49*, 44,37,33-35,28,27, 24-26,23,22,21, de las cuales las marcadas con un asterisco no se encuentran reportadas en la literatura.

Con respecto a los sueros de Mérida las bandas reaccionaron moderadamente en contra de las cepas de campo y el bandedo fue el siguiente 210*, 175*, 68,69,51,44-46, 37, 33-34, 26-29,23,24,22, 21, de los cuales no se encuentran reportados los marcados con (*). Los animales desafiados presentaron reacción a las fracciones, 175*, 75,51,42, 29,28, 27,24,22,21, el suero hiperinmune mostro el bandedo solo a la cepa 5 y muy poca a la cepa 6, los bandeos fueron 199*, 175*, 103*, 59*, 51,42, 40*, 38, 27,22.

Estos resultados nos muestran que los sueros que reaccionaron a las cepas 3 y 4 de campo, no reaccionaron de igual manera a la de referencia y a las vacunales, esto puede descartar la posibilidad de que las cepas de campo no son de vacunas, mientras que la cepa a la que más reaccionaron los sueros fue a la cepa 5 (vacunal-PAV-250). Por otro lado se encontraron bandeos no reportados con anterioridad, los bandeos no reportados en el perfil electroforético de las cepas se encontraron proteínas que al parecer son propios a las cepas de campo, por lo que esta información puede ser de vital importancia para tomarlas como marcadores y poder diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos infectantes, lo cuál podrá ser demostrado en trabajos posteriores.

BIBLIOGRAFIA

- Biront, P., Leunen J., Depierreux, R., Vandeveld A., Pastoret, P.P., Dewaele A. (1993): La peste porcine classique transmission et prophylaxie. Ann. Med. Vet. (127): 547-563.
- Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández, B.E., y Ciprián, A.C. (1992). Perspectiva de un Método de diagnóstico serológico rápido para la Fiebre Porcina Clásica. XXVII Congreso Nacional AMVEC, Acapulco, Gro, pp.54.
- Mendoza, S., Correa, P., Ayala, G., Hernández, E., Ciprián, C.A. (1994). Biological differences among field, reference and vaccinal strains of Hog Cholera virus. International Proceeding Veterinary Society. Vol 1, pp80
- Mendoza E.S., Aguilera, E., Colmenares, G, Hernández, E, Ciprián, A.(1994). Analysis of bouyant density and ultraviolet of Hog Cholera strains. International Proceeding Veterinary Society. Vol 1, pp81.
- Wenvoort, G., Boonstra, G. and Bodzinga, B.G. (1990) Epitopes on structural proteins of Hog Cholera. Journal General Virology 71, 531-540.