

ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CERDOS CON LAS "CEPAS" VACUNAL Y DE REFERENCIA DE FIEBRE PORCINA CLASICA (FPC):III.- Reconocimiento de proteínas por inmunotransferencia.

Coba A^{1,2*}, Torres A.O.*^{1A}, Aguilera C.E.¹, Correa G.P.^{1,2}, Ciprián C.A.¹, Mendoza E.S.¹ 1.-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2.-CENID-MV, INIFAP, SAGAR. Proyecto CONACYT 1082P-B Becario CONACYT No. 93890^A, 93885^F Cátedra Afecciones Bacterianas y Virales del Cerdo y Enfermedades Respiratorias del Cerdo

INTRODUCCION.

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) es causada por un virus que pertenece a la Familia Flaviviridae, género Pestivirus, y los 3 miembros de este género son: el virus de la FPC, el virus de la Diarrea Viral Bovina (V BVD) y el virus de la Enfermedad de la Frontera (BD) que afecta a los borregos. Estos últimos por su antigenicidad y su estructura están cercanamente relacionados con el VFPC. El genoma de los Pestivirus consiste de un RNA de cadena sencilla (cs), con polaridad positiva de cerca de 12-12.5 kb de largo; mide de 40-50 nm de diámetro, con una nucleocápside de 29 nm y una envoltura que rodea al núcleo ("core"); en la superficie del virión hay proyecciones de 6-8 nm. La parte 5' terminal de el genoma del VFPC codifica una proteína no estructural (p23) y 4 proteínas estructurales (la proteína de la nucleocápside p14; y 3 glicoproteínas, gp44/48, gp33 y gp55). Se ha demostrado con anticuerpos monoclonales (Acs M's), que la glicoproteína de la envoltura gp44/48 induce neutralización; la gp55 parece ser la de mayor importancia para neutralización del virus, puesto que los anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra esta glicoproteína. A partir de viriones purificados, se ha determinado una proteína de la nucleocápside, denominada C y 3 glicoproteínas asociadas a la envoltura, las llamadas proteínas: E, que correspondieren en el orden de su disposición a la E0 (GP44/48); E1 (gp33); y E2 (gp55). Los anticuerpos que neutralizan la infectividad del virus están dirigidos contra epitopes localizados sobre la E2 y la E0. Se ha encontrado también que estas glicoproteínas forman complejos, la proteína E0 es un homodímero de 100 kd; E1-E2 son un heterodímero con 75 kd y E2 un homodímero de 100 kd; todos los cuales son encontrados en células infectadas, así como también en viriones.

OBJETIVO.

Determinar por la técnica de inmunotransferencia si hay reconocimiento de proteínas, mediante el uso de los sueros hiperinmunes contra las "cepas" vacunal PAV-250 y patógena ALD de FPC.

MATERIALES Y METODOS.

Se utilizó la "cepa" vacunal PAV-250 y el virus patógeno ALD de FPC, con los cuales inicialmente se realizaron pruebas de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), al 12.5 %, de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). Después de llevar a cabo la transferencia con las dos "cepas" estudiadas, de acuerdo a la técnica de Towbin, et al. (1979). Al término de cada transferencia y para poder detectar las proteínas transferidas, se cortó el pedazo donde corrieron los marcadores de PM para ser teñidos con la tinción de negro de amido. Posteriormente se procedió a cortar las tiras del papel de nitrocelulosa, con las proteínas ya transferidas, correspondientes a cada "cepa" (PAV-250 y ALD). Para realizar la inmunotransferencia se procedió a bloquear cada tira; luego se les adicionó la dilución del suero problema, previamente establecida; posteriormente se agregó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (Anti-Ig G-SIGMA-Chemical), después se llevó a cabo el revelado con el sustrato. Al término de lo anterior se procedió a realizar la lectura de las bandas observadas. Los sueros hiperinmunes contra la "cepa" vacunal PAV-250 y la "cepa" patógena ALD de FPC, utilizadas para llevar a cabo la inmunotransferencia, procedieron de los siguientes grupos de cerdos: 1) sueros de cerdos negativos a anticuerpos contra FPC; 2) sueros de cerdos vacunados con la "cepa" vacunal PAV-250; 3) sueros de cerdos expuestos al virus patógeno ALD; 3) sueros de cerdos vacunados con una dosis de la vacuna PAV-250 y expuestos con el virus ALD; y 4) sueros de cerdos vacunados con dos dosis

de la vacuna PAV-250 y expuestos con el virus ALD. La dilución del suero problema, para cada grupo de trabajo fue previamente establecida, al igual que la dilución del anticuerpo secundario peroxidado.

RESULTADOS.

En base a las pruebas de inmunotransferencia, realizadas con los grupos de sueros hiperinmunes utilizados, se encontró que para la "cepa" patógena ALD: Grupo control, fue negativo. Grupo control vacunado, se reconocieron bandas de 100-120 kd, 80-100 kd, 50-70kd, 30-50 kd, 20-40 kd y de 10-20 kd; en los cerdos centinelas de 100-120 kd, 80-100 kd, 50-70 kd y de 10-20 kd. El Grupo control de la "cepa" ALD, reconoció bandas de 100-120 kd, 80-100 kd, 50-70 kd, 30-50 kd y de 20-40 kd. El Grupo vacunado y expuesto reconoció bandas de 100-120 kd, 80-100 kd, 50-70 kd, 30-50 kd y de 20-40 kd; los centinelas de 100-120 kd, 80-100 kd, 50-70 kd y de 20-40 kd. El Grupo vacunado con dos dosis y expuesto, reconoció bandas de 100-120 kd, 80-100 kd, 50-70 kd y de 20-40 kd; y los centinelas de 100-120 kd, 80-100 kd, 50-70 kd y de 20-40 kd. Para la "cepa" PAV-250: Grupo Control, fue negativo. Grupo control vacunado, reconocieron bandas de 100-80 kd y de 80-90 kd; los centinelas reconocieron de 80-90 kd. Grupo Control de la "cepa" ALD, reconocieron bandas de 20-40 kd. Grupo vacunado y expuesto, bandas de 80-90 kd; los centinelas, bandas de 100-80 kd y de 80-90 kd. Grupo vacunado con 2 dosis y expuesto, reconocieron bandas de 120-140 kd, de 100-120 kd y de 80-90 kd; los centinelas de 120-140 kd, de 100-120 kd, de 80-90 kd y de 20-40 kd.

CONCLUSIONES.

Es necesario continuar estos estudios para finalmente tratar de determinar cuáles son las proteínas que son reconocidas, mediante esta técnica, en el proceso cinético de la enfermedad; y asimismo determinar si existen diferencias detectables entre ambas "cepas".