

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

Coba A<sup>1,2\*</sup>, Torres A.O.\*<sup>1A</sup>, Aguilera C.E.<sup>1</sup>, Correa G.P.<sup>1,2</sup>, Ciprián C.A.<sup>1</sup>, Mendoza E.S.<sup>1</sup> 1.-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2.-CENID-MV, INIFAP, SAGAR. Proyecto CONACYT 1082P-B Becario CONACYT No. 93890<sup>A</sup>, 93885<sup>F</sup> 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".