

Valoración de un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente al virus del PRRS mediante sueros de campo de origen mexicano.

Sitjà M, Medrano A, Rúbies X, Rebordosa X, Caballero J, Busquets P*.

Laboratorios Hipra, S.A., Av. La Selva, 135. 17170 Amer (Girona) Spain.

INTRODUCCIÓN. El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) es una enfermedad del ganado porcino, causada por un virus, que se caracteriza por alteraciones tanto reproductoras como respiratorias, en periodos de maternidad, transición y engorde. Este virus está presente en la mayoría de países con una producción industrial de porcino, existiendo dos variantes principales del virus, que se denominan variante europea y variante americana^{1,4}.

La importancia de esta patología ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar técnicas que permitan tanto su diagnóstico diferencial, como el control de la circulación del virus en las explotaciones ganaderas. En este sentido, los ensayos serológicos diseñados para detectar la presencia de anticuerpos contra el PRRSV, se han revelado como las técnicas más adecuadas para un diagnóstico rápido y específico de la infección por este virus².

MATERIAL Y MÉTODOS.

Sueros de campo. Se analizaron un total de 168 sueros porcinos procedentes de granjas mexicanas. El total de sueros se distribuyeron en 9 grupos según su procedencia. Los grupos corresponden: del 1 al 3 a sueros de animales de 3 granjas negativas a PRRS; del 4 al 6 a sueros procedentes de una misma granja positiva distribuidos en 3 edades diferentes (4: cerdos de engorde, 5: cerdas de reposición y 6: cerdas multíparas) y los tres grupos restantes (7-9) proceden de otras 3 granjas positivas.

Infección experimental. Para este estudio se utilizaron 6 cerdos de una granja libre de PRRS. Se infectaron cuatro con 2 ml de 10^{5.5} DICT50/ml virus de PRRS variante americana por vía intranasal. Los otros 2 animales se utilizaron como controles y se les inoculó con PBS por la misma vía. Se realizaron extracciones de sangre los días 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 21 post-infección.

Análisis serológico por IPMA (ensayo inmunoperoxidasa en monocapa celular). Sobre placas fijadas de macrófagos alveolares porcinos infectados con el virus de PRRS se incubaron diluciones seriadas de los sueros. Los anticuerpos específicos contra el virus de PRRS se revelaron con la adición de un policlonal conjugado con peroxidasa y 3-amino 9-ethyl carbazol. Se consideró un suero positivo cuando su título era igual o superior a 1/30.

Análisis serológico por ELISA. Para el análisis serológico se utilizó un enzoinmunoensayo indirecto para la detección del virus de PRRS. Se incubaron los sueros diluidos 1/200 sobre placas tapizadas con antígeno específico para el virus de PRRS durante 1h a 37°C. Se lavaron los pocillos y se añadió anticuerpo monoclonal conjugado a peroxidasa con afinidad a anticuerpos porcinos, se incubó 1h a 37°C. Posteriormente, se lavó el exceso de conjugado y se añadió un substrato de la peroxidasa (TMB). Después de una incubación de 10 min. a temperatura ambiente se leyó la densidad óptica (DO) a 450 nm. Para la interpretación de los resultados se obtuvo el valor de IRPC (Índice Relativo x100) de cada muestra a partir de los valores de los controles internos:

$$\text{IRPC} = \left[\frac{\text{DO}_{450} \text{ Muestra} - \text{Media DO}_{450} \text{ Control Negativo}}{\text{Media DO}_{450} \text{ Control Positivo} - \text{Media DO}_{450} \text{ Control Negativo}} \right] \times 100$$

Se consideró una muestra negativa cuando el valor de IRPC era igual o inferior a 20.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

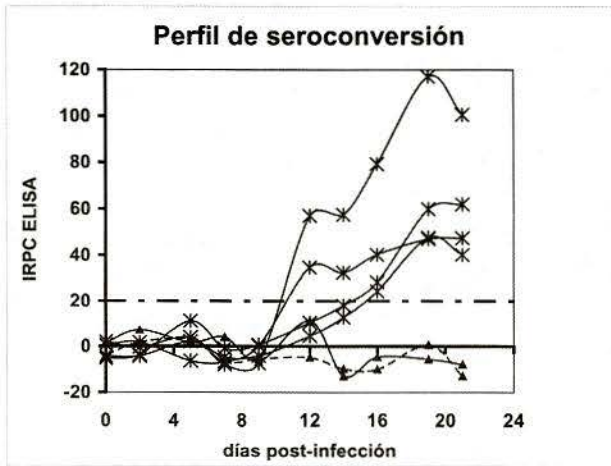
Tabla 1

		Positivo	Negativo	
CIVTEST suis	Positivo	38	2	40
	Negativo	2	32	34
		40	34	

Comparativa de los resultados ELISA e IPMA. Se analizaron por IPMA y ELISA 74 sueros: 46 procedentes de 3 granjas positivas y 28 de una granja negativa. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1. Se ha observado que este ELISA indirecto presenta un 95% de sensibilidad y un 94% de especificidad respecto a IPMA. Si se analizan

concretamente los 4 sueros discrepantes, se observa que todos proceden de las granjas positivas. Por consiguiente, las discrepancias entre los dos sueros positivos por ELISA y negativos por IPMA podrían atribuirse a una falta de sensibilidad del IPMA, más que a una falta de especificidad del ELISA³.

Sensibilidad post-infección. La evaluación de la infección experimental se realizó con el análisis serológico por ELISA de las extracciones seriadas de los 4 animales infectados y los 2 animales control. Los resultados obtenidos están representados en la Figura 1. La infección experimental se produjo correctamente ya que en los 4 animales infectados se detectó, mediante PCR, la presencia del virus en sangre a los 2 días post-infección. El ELISA permitió detectar la seroconversión en tres de los animales infectados a los 12 días post-infección, siendo positivos a los 14 días post-infección todos los animales infectados. Los resultados muestran que el ELISA permite la cuantificación de la

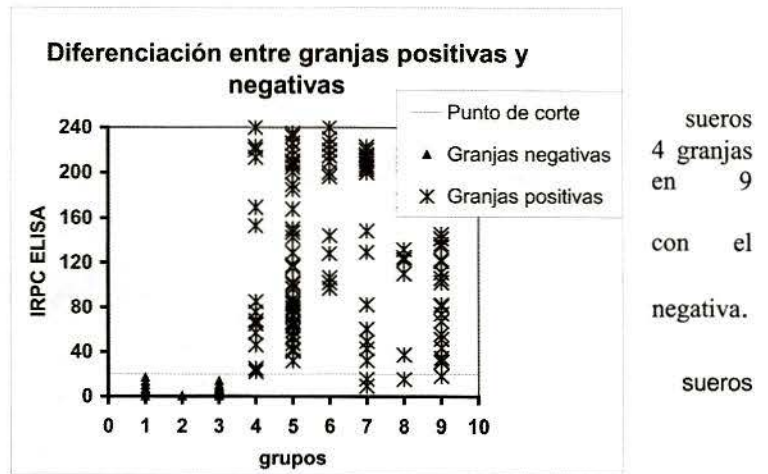


aparición progresiva, post-infección, de los anticuerpos específicos contra el virus de PRRS.

Figura 1: Perfil de seroconversión de la infección experimental (* animales infectados, ▲ animales control)

Seroperfiles de granjas positivas y negativas. Se analizaron por ELISA 168 procedentes de 3 granjas negativas a PRRS y positivas a PRRS. Los sueros se distribuyeron grupos en función de su procedencia. Los resultados obtenidos (Figura 2) indican que ELISA indirecto es posible distinguir claramente una granja positiva de una

Figura 2: Análisis serológico por ELISA de los de campo distribuidos en 9 grupos según su procedencia.



IMPLICACIONES.

Este ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos contra el virus de PRRS:

- Presenta una especificidad del 94% y una sensibilidad del 95% respecto a IPMA; aunque las discrepancias pueden atribuirse a una falta de sensibilidad del IPMA más que a una falta de especificidad del ELISA.
- Permite monitorizar la seroconversión de animales infectados con el virus de PRRS.
- Puede utilizarse para el control serológico de las granjas frente a infecciones del virus de PRRS, pudiéndose diferenciar claramente las explotaciones libres del virus debido a la gran especificidad de la prueba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

(1) Collins JE, et al. 1992. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 117-126; (2) Mengeling WL, et al. 1995. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 3-16; (3) Rebordosa X, et al. 1998. Lab. Vet. AVEDILA, 9; (4) Wensvoort G, et al. 1991. Vet. Q. 13: 121-130.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a la Dra. Rosalba Carreón (UNAM-México) y al Sr. Gonzalo León el suministro de los sueros procedentes de granjas mexicanas.