



PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES Y SU EVALUACIÓN EN EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE ENFERMEDAD VIRALES VETERINARIAS.

Alonso RA^{1*}, Gayosso A.¹, Flores H.¹, Carreón R.², Coba AMA.³, Zapata SLE,³ Calderón R¹

¹Departamento de Genética y Bioestadística y ²Departamento Producción Animal: Cerdos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. México D.F. ³INIFAP- CENID- Microbiología.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de enfermedades infecciosas es esencial para tomar decisiones en el control y erradicación de enfermedades. El diagnóstico serológico es muy conveniente porque puede ser aplicado a gran escala, a bajo costo, obteniendo información epidemiológica de una población, pudiendo detectar animales activamente infectados, aquellos que han sido expuestos al patógeno, así como evaluar los niveles de protección. Esta información es fundamental para lograr y evaluar el éxito de las medidas de erradicación y bioseguridad.

En nuestro medio la necesidad de diagnóstico serológico se resuelve casi totalmente por la importación de sistemas comerciales, los cuales son costosos, de lenta disponibilidad y que emplean antígenos exóticos.

El uso en sistemas de diagnóstico de antígenos recombinantes (AgR), en lugar de antígenos nativos crudos o purificados, presenta ventajas como mayor sensibilidad y especificidad, entre otras.

Un procedimiento para producir AgR es la expresión en células de insecto mediado por baculovirus. Estos sistemas mimetizan los procesos de modificación y plegamiento de las proteínas que ocurren en células de mamífero. Las células de insecto además tienen la ventaja de crecer en medios poco complejos y pueden propagarse en fermentadores.

Este trabajo tuvo como objetivo producir y evaluar antígenos recombinantes (AgR) para emplearse en sistemas de diagnóstico serológicos tipo ELISA de algunas enfermedades virales de importancia en medicina veterinaria. Particularmente de tres enfermedades porcinas: La enfermedad de Aujeszky (EA), el síndrome respiratorio y reproductivo (PRRS) y la fiebre porcina clásica (FPC).

MATERIAL Y METODOS

Se amplificaron por PCR (EA) o RT-PCR (PRRS y FPC) los genes de los antígenos relevantes para cada enfermedad viral (El gen ORF7 para PRRS, el gen gE en el caso de EA y el gen E2 para FPC). Estos genes fueron clonados en un vector de expresión y movilizados al genoma del baculovirus. Los AgR se expresaron al infectar células de insecto con los baculovirus recombinantes. Se caracterizaron las propiedades antigénicas de los AgR por ensayos de ELISA y Western blot. Se evaluaron los niveles de expresión de los AgR en relación a la multiplicidad de infección de los baculovirus en células de insecto y se determinó la cantidad de AgR requerido para detectar individuos seropositivos en ensayos de ELISA. Se obtuvieron experimentalmente en cerdos, antiseros para emplearse como controles

positivos y negativos, para cada virus. Se compararon en su desempeño, los sistemas de ELISA para cada AgR vs sistemas comerciales, empleando una batería de sueros de campo (275 para EA, 251 para FPC y 365 para PRRS).

RESULTADOS

Los niveles de expresión de los AgR fueron más eficientes en multiplicidades de infección bajas. Ensayos de ELISA y Western blot mostraron que los AgR producidos por los baculovirus conservaron sus propiedades antigénicas. Se observó que los sistemas de ELISA con AgR detectaron más sueros positivos que los kits comerciales. En relación a los sistemas comerciales, se encontró un grado de discrepancia en los resultados de 8.7% para Aujeszky, 12.8% para PRRS y 28.3% para FPC. En los sistemas de ELISA con AgR se evaluó el grado de repetitividad de los resultados, encontrando que el número de resultados inconsistentes fue de 3/224 en los sueros de FPC; 9/224 en PRRS y 2/301 en EA. En promedio el grado de repetitividad fue de 98.13%.

DISCUSION

Este trabajo muestra que los AgR expresados en baculovirus, conservan sus propiedades antigénicas y pueden emplearse en sistemas ELISA, para el diagnóstico serológico de enfermedades infecciosas de importancia en Medicina Veterinaria en México. Los niveles de repetitividad de los resultados con los AgR fueron altos. Los resultados discrepantes, en relación a los sistemas comerciales, son difíciles de explicar, pero se puede especular que debido a que los AgR provienen de cepas locales, se están detectando más eficientemente animales con anticuerpos específicos a estas cepas. Observamos que los resultados discrepantes se agruparon preferentemente por casos, estos resultados igualmente son difíciles de interpretar, pero sugieren que los individuos de una misma localidad tienen anticuerpos contra una misma variante viral local. Sin embargo, la evaluación objetiva de los sistemas de ELISA, solo puede obtenerse empleando una batería de sueros positivos y negativos, obtenidos experimentalmente con cepas conocidas, pudiendo medir así los niveles de especificidad y sensibilidad. Por lo anterior, es importante contar en nuestro medio con una colección de sueros de referencia para la evaluación objetiva de sistemas diagnósticos, tanto experimentales como comerciales, aunado a una estricta vigilancia epidemiológica que identifique a las variantes antigénicas circulantes de los diferentes virus y se incluyan en los sistemas de diagnóstico e inmunización.